

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS DE ARTERITIS VIRAL EQUINA AISLADAS EN ARGENTINA

Tesis de Maestría en Microbiología Molecular

Universidad Nacional de San Martín

Maestrando: Dra. María Gabriela Echeverría

Director: Dr. Edgardo Omar Nosetto

Codirector: Dra. Silvina Díaz

Cátedra de Virología,

Facultad de Ciencias Veterinarias,

Universidad Nacional de La Plata

2006

Jurados: Dr. José La Torre, Dr. Oscar Taboga, Dr. Martín Abba

Buenos Aires, 22 de mayo de 2006

Mi más profundo agradecimiento a todos aquellos que hicieron posible de una u otra forma la realización de este trabajo

A mis directores Dres. Edgardo Nosetto y Silvina Díaz por confiar en mí

A mis compañeros de Cátedra que me cubrían los días viernes de cursada

A Gerardo y Germán, mis compañeros de viaje

A toda mi familia, especialmente a la Flaca, que siempre me arregla los líos y a mi madre, por ayudarme con mis hijos

A Pilar y Mosqui por mostrarme otras perspectivas

A Ge, por sus mates y su buen humor

A Sole y Ger, que siempre me alientan, qué bueno haberlos elegido!

A mi esposo y a mis hijos por ser incondicionales

A la memoria de mi padre, orgulloso siempre de mis títulos.....

ÍNDICE	
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	
Arteritis viral Equina, un poco de historia	3
Patogenia	5
Signos clínicos	6
Lesiones macro y microscópicas	7
Epizootiología	8
Prevención y control	9
Diagnóstico	10
Características del virus	11
Replicación	12
Propiedades biológicas y culturales	13
Respuesta inmune	14
Epitopes neutralizantes	15
Variaciones genéticas relacionadas con la virulencia	16
Propósito de la investigación. Situación en Argentina	17
Objetivos	21
Materiales y métodos	
Medios y soluciones de cultivo	22
Células	22
Virus	22
Inoculación viral para extracción de RNA	23
Replicación viral para VN	23
Titulación viral en microplacas	23
Análisis de neutralización viral	24
VN cruzada	24
RT-PCR	25
PCR-SSCP	26
PCR-RFLP	26
Secuenciación	27
Banco de datos	28
Resultados	
VN cruzada	30
RT-PCR	32
PCR-SSCP	33
PCR-RFLP	34
Análisis de las secuencias	38
Discusión	65
Conclusiones	69
Referencias	70

RESUMEN

El virus de Arteritis Equina (VAE), perteneciente a la familia *Arteriviridae*, ocasiona infecciones, en su mayoría subclínicas, aunque puede causar abortos y enfermedad respiratoria en adultos y neumonía en potrillos. Los ORF5 y ORF6 de su genoma codifican las proteínas de envoltura GP5 y M, respectivamente, cuya interacción es crítica para la infectividad y expresión de determinantes antigénicos del virus. Existe un solo serotipo de virus, aunque hay variabilidad entre aislamientos de regiones geográficas diferentes. Los primeros aislamientos en Argentina se realizaron en nuestro laboratorio entre los años 2001 (cepa LP01) y 2002 (cepas LP02/R, LP02/C y LP02/P). En este trabajo se analizó el fenotipo de los aislamientos, en primera instancia, por la técnica de virusneutralización. Luego se realizó un rastreo de la variabilidad de las secuencias codificantes de las proteínas M y GP5 por los métodos de PCR-RFLP y PCR-SSCP. Finalmente se secuenciaron parte de los ORFs 5 y 6 y las secuencias obtenidas se analizaron comparativamente con la cepa Bucyrus y las secuencias disponibles en la base de datos GenBank. Todas las cepas Argentinas presentaron un fenotipo de neutralización similar entre sí, y la cepa de referencia de origen americano (Bucyrus), utilizada en nuestro laboratorio, fue neutralizada en menor medida. Los cuatro aislamientos argentinos y Bucyrus mostraron patrones de SSCP distintos, al igual que diferentes patrones de RFLP. La estimación de los valores de identidad y el análisis de las relaciones filogenéticas entre las secuencias confirmaron que la cepa aislada en 2001 es diferente a las tres cepas aisladas en 2002. Además las cuatro cepas forman un grupo definido en el cluster de origen europeo. Los métodos de rastreo de variabilidad utilizados permitieron diferenciar los aislamientos argentinos, diferencias confirmadas con el análisis de las secuencias de ambos ORFs, permitiendo realizar así la primera caracterización de aislamientos de AVE en Argentina.

Palabras claves: arteritis viral equina – PCR-SSCP- PCR-RFLP – caracterización genética

ABSTRACT

The Equine arteritis virus (EAV) classified in the *Arteriviridae* family, usually causes subclinical infections although might produce respiratory disease and abortions, or pneumonia in foals. The interaction of proteins GP5 and M, codified on ORF 5 and 6 of the virus genome, is critical for infectivity. Although only one serotype of EAV was described, there are variability among isolates from different geographic regions. In Argentina, EAV was first isolated in 2001 (LP01 strain) and other 3 isolates were obtained in 2002 (LP02/R, LP02/C and LP02/P). In this work the phenotype of the strains were analyzed by the virusneutralization method. Then a screening of genetic variability was performed by PCR-SSCP and PCR-RFLP. Finally, sequencing of ORFs 5 and 6 allowed the comparative analysis with the Bucyrus reference EAV strain and sequences available from the GenBank database. Argentine strains showed similar neutralization patterns among them and different from the Bucyrus strain. The four isolates showed different SSCP patterns in both ORFs, as well as distinct RFLP patterns. Estimated identity values and the analysis of the phylogenetic relationships among sequences confirmed that the strain isolated in 2001 is different to 2002 isolates. In addition, Argentine EAV isolates grouped together in a definite cluster near European strains. The screening method used in this work allowed us to differentiate the Argentine isolates, confirmed by the sequence analysis in both ORF5 and 6 coding sequences, and to perform the first characterization of the Argentine EAV isolates.

Key words: Equine arteritis virus- PCR-SSCP- PCR-RFLP- genetic characterization

INTRODUCCIÓN

ARTERITIS VIRAL EQUINA, UN POCO DE HISTORIA

Hasta el año 1953 se consideraba que el agente etiológico de los abortos en yeguas con cuadros febriles y asociados con sintomatología propia de una afección del tracto respiratorio, eran producidas por el virus herpes equino tipo I (Rinoneumonitis Equina). En diciembre del citado año, en Bucyrus, Ohio, EEUU se desató una epizootia en equinos, presentándose signos similares a los antes referidos (**Doll y col., 1957b**). Se descartó la infección con el virus de la Rinoneumonitis al no observarse las lesiones histopatológicas típicas en los tejidos analizados, pero se logró la reproducción experimental de la enfermedad inoculando material de los fetos abortados en yeguas preñadas. Del inóculo y de los animales que enfermaron experimentalmente fue aislado un virus, que fue diferenciado de la cepa Ky-B del virus de Rinoneumonitis equina, siendo denominado cepa Bucyrus (**Doll y col., 1957a**).

La denominación de Virus de Arteritis Equina (VAE) así como el de Arteritis Viral Equina (AVE) dado a la enfermedad, se basó en las constantes y características lesiones de necrosis de las pequeñas arterias de los equinos infectados (**Doll y col., 1957a; Jones y col., 1957**).

Desde su aislamiento, el VAE fue reconocido como una entidad nosológica distinta a los restantes virus del complejo de enfermedades respiratorias equinas (**Doll y col., 1957a**). Estos autores inicialmente lo diferenciaron basándose en pruebas de protección cruzada en equinos, en técnicas de laboratorio como fijación del complemento y virusneutralización, por las lesiones típicas y por el efecto citopatogénico (ECP) característico luego de su adaptación a cultivos de tejidos.

Luego de esta caracterización parcial, el mismo grupo de investigadores realizó otros aislamientos del virus que resultaron idénticos a la cepa Bucyrus inicialmente obtenida y posteriormente, dentro de EEUU, fue aislado en los estados de California, Pennsylvania e Indiana (**McCollum y Bryans, 1973**).

En 1970, **Burky** lo aisló en Europa luego de epizootias ocurridas en Austria y Suiza y fue caracterizado como un virus RNA que poseía envoltura lipoproteica. Posteriormente fue clasificado como miembro de la familia *Togaviridae* (**Breese y McCollum, 1971; Horzinek y col., 1971; Van der Zeijst y Horzinek, 1975; Fenner, 1976; Zeeger y col., 1976; Laude, 1979**). Hoy en día, el virus se incluye en la familia *Arteriviridae*, junto con el de la deshidrogenasa láctica del ratón (LDV), el del síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRSV) y el de la fiebre hemorrágica de los simios (SHFV) (**Cavanagh 1997**).

Los equinos son los únicos hospedadores susceptibles y actualmente se considera, basándose en evidencias serológicas, que se encuentra ampliamente distribuido en el mundo (**McCollum y Bryans, 1973; Akashi y col., 1976; De Boer, 1978; Moraillon y Moraillon, 1978; Powell y col., 1978; Redaelli, 1979**). Las principales epizootias de AVE han ocurrido en EEUU y algunos países europeos (Suiza, Polonia, Inglaterra y Austria). En otros países sólo se ha detectado la presencia de anticuerpos contra el virus, sin observarse manifestaciones clínicas de la enfermedad. En EEUU se emplea una vacuna a virus vivo atenuado para el control de la enfermedad. La misma se utiliza en casos de epizootias o para la vacunación de yeguas que serán servidas por padrillos portadores.

PATOGENIA

La puerta de entrada del virus es respiratoria o venérea y su diseminación se produce a través de las células blancas sanguíneas. Luego de la exposición a aerosoles, el VAE replica inicialmente en macrófagos pulmonares donde ya a las 24 hs posinfección (PI) se detectan antígenos virales; a las 48 hs aumenta el número de macrófagos infectados y se detectan antígenos en los ganglios bronquiales. Al tercer día PI se disemina rápidamente a través de las células blancas sanguíneas infectando células endoteliales del músculo liso de arterias, venas y linfáticos (**Crawford y Henson, 1973**). Entre 6-8 días PI se localiza en el endotelio de los vasos del miometrio y a los 10-12 días en el epitelio tubular renal, y por consecuencia el virus se localiza en orina, adrenal y células de las criptas intestinales. Desde el tercer día PI todos los tejidos y fluidos contienen virus, excepto el cerebro, alcanzando su máxima concentración en los ganglios linfáticos bronquiales y mesentéricos. El virus se detecta en suero sanguíneo entre el 2° y 7-9° día PI, desapareciendo abruptamente, coincidiendo con la aparición de anticuerpos neutralizantes (AcN).

La infección por VAE puede causar abortos, dificultades respiratorias o bien ser asintomática y producir un estado de portador persistente. Aún cuando la transmisión primaria es por vía aerógena, los padrillos persistentemente infectados son los principales reservorios de VAE e infectan yeguas susceptibles en forma venérea, transmitiendo virus de menor virulencia (**Timoney y col., 1986; Timoney y McCollum, 1993**), lo que hace que la transmisión sexual sea la ruta secundaria de infección, aunque no menos importante.

En la infección subclínica, la gran variedad de signos como dificultad respiratoria, fiebre y necrosis de las pequeñas arterias y la severidad del cuadro varía de acuerdo a la cepa viral, edad y condición general del animal.

SIGNOS CLÍNICOS

En la mayoría de los casos, las infecciones producidas por VAE son subclínicas y sólo son detectadas por seroconversión o en estudios retrospectivos (**McCollum y Bryans, 1973; Gerber y col., 1978; Timoney y McCollum, 1991**). Sin embargo, entre un 15-20% de las infecciones se manifiestan clínicamente ya sea con una sintomatología respiratoria o produciendo abortos (**Timoney, 1984**). Los signos clínicos, cuando están presentes, comienzan 3-14 días luego de la exposición y persisten por 5-9 días. El período de incubación de la enfermedad es de 2 a 4 días en animales inoculados experimentalmente. En la enfermedad aguda los signos más frecuentes son: fiebre que oscila entre los 39 a 41°C (**Doll y col., 1957a; Prickett y col., 1973**), anorexia, lacrimación excesiva, edema palpebral, conjuntivitis, flujo nasal seroso y congestión de la mucosa nasal (**Prickett y col., 1973**), inflamación catarral de las mucosas del tracto respiratorio y edema abdominal y de los miembros. En algunos casos se observa queratitis que se manifiesta por opalescencia blanquecino-azulada de la córnea, junto con edema palpebral. En la mayoría de los casos se observa dificultad respiratoria y disnea, que aumentan con el ejercicio. Junto con el cuadro febril se observa disminución del sensorio, apatía e indiferencia. Hay debilidad muscular generalizada e incoordinación cerca del fin del período febril. Además de la anorexia de aparición variable, pueden presentarse cólicos y diarreas (**Doll y col., 1957a, Gerber y col., 1978**). La recuperación en los casos agudos ocurre entre los 8 y 12 días, pudiendo los edemas persistir por unos días más (**Doll y col., 1957a y b; McCollum y Bryans, 1973; Gerber y col., 1978**).

En general los animales se recobran sin complicaciones posteriores, sin embargo las mayores pérdidas se producen por abortos. En más del 50% de las yeguas, los mismos pueden ocurrir entre el tercer y décimo mes de gestación, sin mostrar signos clínicos previos,

como resultado del edema endometrial que produce compresión de vasos y disminución del flujo sanguíneo hacia el feto y necrosis del miometrio que conduce al desprendimiento de la placenta y muerte fetal. En caso de infección natural el aborto es menos frecuente que en la infección experimental coincidentemente con la fase convaleciente de la infección (3-10 meses de gestación). Los fetos son expulsados parcialmente autolisados o bien con hemorragias en serosas y edemas. El virus puede ser aislado de placenta y fluidos del feto que diseminan la enfermedad a otros animales susceptibles **(Timoney, 1984)**.

Una de las características más importantes de la enfermedad es que entre un 30-60% de los padrillos infectados pueden transformarse en portadores crónicos y de esta manera diseminar el virus mediante el servicio natural o la inseminación artificial (vía venérea) **(Timoney y McCollum, 1993)**. El virus infecta el aparato genital de los machos ya que replica en vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales, es mantenido en ampollas deferentes y se elimina constantemente por líquido seminal **(Neu y col., 1988)**. La persistencia viral es dependiente de la testosterona y de esta manera los machos transmiten el virus por períodos variables, aún en presencia de altos títulos de AcN, lo que indica que la inmunidad humoral *per se* no previene la replicación viral en el aparato genital masculino **(McCollum y col., 1994)**.

LESIONES MACRO y MICROSCÓPICAS

En las necropsias de fetos abortados pueden aparecer edemas en tejidos subcutáneos y cavidades torácica y abdominal, hemorragias en mucosas, hemorragias petequiales en bazo, múltiples infartos y esplenomegalia **(Doll y col., 1957a)**. En adultos además pueden encontrarse edemas ya sea de tejido subcutáneo, de articulaciones, cavidad pleural y

pulmones, así como en cavidad abdominal, congestión y hemorragias petequiales de mucosas y serosas.

La arteritis se caracteriza por el edema perivascular y la necrosis medial de las arterias de todo el organismo, que varían en tamaño y forma y se distribuyen irregularmente a lo largo de su recorrido (**Doll y col., 1957a**). Esta necrosis se caracteriza por la presencia de restos nucleares (pichosis) e infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear (**Jones y col., 1957**). En intestino delgado, colon y ciego se observa edema, trombosis de las arterias de la submucosa e infartos (**Doll y col., 1957a**), y también edema y congestión de linfáticos y venas junto con engrosamiento del septo interlobular y subpleural; congestión en riñón, glándulas adrenales y ganglios linfáticos, especialmente los bronquiales, mesentéricos y cecocólicos y neumonía intersticial suave o severa, con infiltración leucocitaria.

EPIZOOTIOLOGÍA

Las infecciones naturales ocurren en los miembros de la familia Equidae y se distribuyen por todo el mundo. En EEUU se observó que las razas más afectadas son las de trote y salto, mientras que en los pura sangre de carrera fueron hallados los porcentajes más bajos de animales seropositivos. En Europa esta distribución es más equilibrada (**McCollum y Bryans, 1973; Moraillon y Moraillon, 1974, Moraillon y Moraillon, 1978**).

Las consecuencias de la infección varían desde infección subclínica, abortos y neumonía en neonatos. Los potrillos nacidos de madres seropositivas adquieren AcN a través del calostro. Estos anticuerpos pueden persistir por unos meses, haciendo que los porcentajes de animales jóvenes infectados sean bajos, y el número de animales enfermos aumente con la edad (**Gerber y col., 1978; Moraillon y Moraillon, 1978**).

Durante la fase aguda de la enfermedad el contagio se produce por vía respiratoria o venérea, ya sea por secreciones genitales de la hembra, orina, heces o por el semen. Existe muy poca transmisión por fomites o personal. Durante la fase crónica el contagio ocurre solamente por vía venérea. Entre un 80 a 100% de las yeguas servidas por padrillos portadores pueden infectarse aunque las hembras infectadas por machos portadores, no presentan problemas de fertilidad posteriores y no se transforman en portadoras crónicas **(Timoney y col., 1986)**.

Debido a que el virus es viable en semen fresco y congelado, un porcentaje entre 85 a 100% de las hembras seronegativas se infectan y seroconvierten y, si desarrollan enfermedad respiratoria la transmiten a otros susceptibles. Si las hembras se infectan por vía respiratoria durante la gestación avanzada el virus puede pasar al feto y estos pueden nacer débiles o normales, o manifestar enfermedad respiratoria severa poco después de nacer, que puede ser letal.

PREVENCIÓN Y CONTROL

La única prevención efectiva y de larga duración contra esta enfermedad es la vacunación **(Doll y col., 1957^a y 1968; McCollum, 1970 y 1986)**. Existen 2 tipos de vacunas comerciales desarrolladas ambas de manera tradicional: a virus vivo modificado (MLV) que se utiliza en EEUU y a virus inactivado (en Europa y Japón). Si bien las primeras protegen de la infección clínica y otorgan mayor duración en la inmunidad, no previenen la reinfección **(McCollum y col., 1988)**. No obstante, este tipo de vacunas se utiliza en los brotes de AVE desde 1984 en los estados de Kentucky y New York **(Glaser y col., 1997)**. De acuerdo a estudios realizados por investigadores japoneses, las vacunas inactivadas previenen a los machos de transformarse en portadores crónicos y a las hembras preñadas del aborto. Hoy en día se

discuten y comparan las ventajas y desventajas de ambos tipos. Como desventaja de ambas es que no permiten la discriminación entre animales vacunados de infectados naturalmente. Los avances de la ingeniería genética permiten contar hoy en día con vacunas a subunidades de distintos orígenes que permiten distinguir entre animales vacunados de aquellos infectados en forma natural. Sin embargo y por razones que explicaremos más adelante, en Argentina no está permitida la vacunación.

DIAGNÓSTICO

Como otras enfermedades de origen viral presentan un cuadro similar al descrito, es imprescindible la confirmación del laboratorio. El diagnóstico se realiza, en casos de enfermedad respiratoria, remitiendo al laboratorio hisopados nasales, nasofaríngeos y conjuntivales y, sangre con anticoagulante para aislamiento viral. Las muestras deben ser tomadas poco después de la aparición de los signos.

Para determinar seroconversión se utilizan dos muestras de suero tomadas en las fases aguda y convalescente de la enfermedad y se utiliza la técnica de virusneutralización (VN). En casos de abortos, el virus puede ser aislado de placentas y tejidos fetales.

Para comprobar el estado de portador-transmisor de un padrillo seropositivo (infección persistente), primero se realiza la detección de anticuerpos por VN, si es positivo (título mayor de 1:4) se puede intentar el aislamiento viral a partir del semen o realizar una prueba de servicio. Esta consiste en servir a dos yeguas seronegativas y comprobar si existe seroconversión en el período comprendido entre el servicio y los treinta días posteriores al mismo (test mating). La extracción de semen se realiza con vagina artificial y se conserva a 4°C en las primeras 24 h de extracción o a -20°C por dos días. Conviene enviar al laboratorio dos muestras consecutivas, del mismo día separadas por algunas horas o del día siguiente.

Además el virus puede identificarse por inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, en cortes de tejidos como hígado, pulmón, bazo, ganglios linfáticos y riñón, que también pueden utilizarse como muestras para aislamiento viral.

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

El virus pertenece a la familia *Arteriviridae* (**Cavanagh, 1997**). Las partículas virales poseen envoltura de naturaleza lipoproteica y tienen un diámetro aproximado de entre 40 y 60 nm. Su genoma está constituido por RNA de cadena simple, continua y de polaridad positiva de aproximadamente 12704 pares de bases (pb); contiene nueve marcos abiertos de lectura (ORF-ORFs) que codifican las proteínas no estructurales, involucradas en la replicación y las estructurales (6 localizadas en la envoltura y una en la nucleocápside). Estos ORFs se denominan 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6 y 7 (**Snijder 2001**). Los primeros, 1a y 1b codifican la replicasa viral, los restantes codifican las 7 proteínas estructurales: ORFs 2a, 2b, 3, 4, 5 y 6 las proteínas de la membrana, y el ORF 7 la proteína de la nucleocápside N (14 kDa). La glicoproteína mayor de la envoltura GP5 –GL- (30-44 kDa) está codificada por ORF 5 mientras que el ORF 6 codifica para la proteína no glicosilada de la envoltura M (17 kDa). Además, la envoltura viral contiene 3 glicoproteínas menores denominadas GP2b –GS- , GP3 y GP4 (25, 36-42 y 28 kDa respectivamente) codificadas por ORFs 2b, 3 y 4 respectivamente y una proteína menor no glicosilada de la envoltura –E- (8 kDa), codificada por ORF 2a. GP5 (antes gL) expresa los determinantes de la neutralización viral (**Snijder y col., 1999, Wieringa y col., 2003**). GP2b, GP3 y GP4 forman un trímero en la partícula viral y la M y GP5 un dímero unido por un puente disulfuro –cisteína 8 de M y cisteína 34 de GP5-

(de Vries y col., 1995; Snijder y col., 2003; Wieringa y col., 2003). La conformación e interacción de estas dos proteínas –M y GP5- es crítica para la infectividad y la expresión de los determinantes antigénicos de la partícula viral **(Balasuriya y col., 1993; Snijder y col., 1999).**

La cápside es de simetría icosaédrica, mide aproximadamente 30-35 nm de diámetro y está formada únicamente por la proteína N, constituye entre un 20-40% del total de las proteínas del virión y es altamente inmunogénica.

Debido a la composición lipoproteica de la envoltura, los arterivirus son sensibles a solventes orgánicos (éter y cloroformo), a la tripsina y a detergentes no iónicos (desoxicolato, nonidet) Su estabilidad está influenciada por la temperatura y el pH; son rápidamente inactivados a pH 3, mientras que permanecen infecciosos a pH entre 6 y 7,5. A temperatura ambiente, los viriones son estables por 24 hs, mientras que a temperaturas superiores se inactivan rápidamente. El virus de AVE es sumamente estable a bajas temperaturas, en organismos congelados enteros a -20° C permanece viable por 6 años o más. En medios de cultivo a 4° C su viabilidad es de 75 días como mínimo, 2 días a 37° C y 20 minutos a 56° C **(Mc Collum y col., 1961a).** La densidad de flotación en sucrosa de los arterivirus oscila entre 1,13-1,17 g/cm³, mientras que el coeficiente de sedimentación varía entre 214 y 230 S. Estos valores en gradiente de cloruro de cesio y tartrato de potasio son de 1,185-1,215 g/ml y 1,17-1,24, respectivamente **(Hyllseth, 1970).**

REPLICACIÓN

Los virus replican en el citoplasma celular y maduran por brotación **(Davis y col., 1973; Horzinek, 1980).** La adsorción, primera etapa de la replicación, se realiza mediante la interacción de algunas glicoproteínas virales y receptores celulares específicos en la

membrana de la célula blanco. Continúa la endocitosis y la formación del endosoma, etapa en donde interviene la clatrina, proteína que recubre ciertas vesículas que actúan como transportadoras. Posteriormente se produce la liberación del genoma en el citoplasma.

La estrategia de replicación se asemeja a la de la familia Coronaviridae, siendo esa la razón por la que se clasifican dentro del orden de los Nidovirales. El genoma policistrónico se transcribe en forma discontinua: el ciclo de replicación comienza con la expresión del gen de la replicasa (RNA polimerasa RNA dependiente) a través del RNA genómico viral. Consecutivamente se transcriben una serie de RNAs mensajeros subgenómicos que se traducen luego en las proteínas estructurales. Estos mRNAs se ordenan como un conjunto anidado de tamaño progresivamente decreciente. Los arterivirus son ensamblados y posteriormente liberados por exocitosis a través del REL y/o aparato de Golgi, donde adquieren la envoltura.

PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y CULTURALES

El virus de AVE fue propagado primeramente en cultivos primarios de células de riñón equino **(Mc Collum y col., 1961b)**, riñón de hámster **(Wilson y col., 1962)** y riñón de conejo **(Mc Collum y col., 1962)** y fue adaptado luego a diversas líneas celulares como BHK-21 -riñón de hámster lactante- **(Hyllseth, 1969; Maess y col., 1970)**, RK-13 -riñón de conejo- **(McCollum, 1969)**, LLC-MK-2 -riñón de mono Rhesus- **(McCollum, 1969)**, Vero -riñón de mono verde africano- **(Inoue y col., 1975; Konishi y col., 1975)**. Los cambios citopáticos producidos por el virus se caracterizan por aumento de la refringencia, redondeamiento, picnosis, cariorexis y desprendimiento de las células. La necrosis completa de las células infectadas ocurre dentro de las 48-72 hs posinoculación **(Wilson y col., 1962; Mc Collum 1961 a y b)**.

RESPUESTA INMUNE

La infección natural en los equinos ocurre por dos vías: la respiratoria, luego de la infección horizontal mediante aerosoles o la del tracto reproductivo, posterior a la infección venérea **(Timoney y McCollum, 1993; Balasuriya y col., 2001)**. La respuesta inmune innata de ambos tractos se caracteriza por la producción local de interferones de tipo I (IFN- α y β) y tipo II (IFN- γ), TNF- α e interleuquinas (IL-12) macrófagos y células NK. Los IFN tipo I estimulan las células NK y confieren resistencia antiviral y median la expresión de los antígenos de histocompatibilidad clase I (MHC I) en la superficie de las células no infectadas protegiéndolas de la lisis mediada por las células NK. Ya en la respuesta inmune adaptativa, los anticuerpos (Ac) producidos contra VAE se detectan en las primeras semanas PI; son altamente neutralizantes, persisten por años y protegen contra la reinfección aún con cepas altamente virulentas **(Doll y col., 1957a y 1968; McCollum 1970 y 1986)**. Esta respuesta humoral se caracteriza por la producción de Ac tanto fijadores de complemento como neutralizantes. Los primeros se desarrollan en las dos semanas iniciales de la infección, alcanzan su pico a las 3 semanas y desaparecen a los 8 meses, mientras que los segundos se detectan también en las primeras dos semanas, alcanzan su pico a los 2-4 meses y persisten por años **(Fukunaga y McCollum, 1977; Timoney y McCollum, 1993; Balasuriya y col 1999a y b y 2002)**. Las pruebas de inmunoblotting realizadas a partir de proteínas estructurales recombinantes (GP5, GP2b, M y N) demuestran que los sueros equinos reconocen la proteína conservada M, especialmente la región carboxiterminal (aminoácidos 88 a 162) **(Jeronimo y Archambault, 2002)**, que la respuesta a GP5 y N es variable y que la respuesta a GP2b es muy pobre. Sin embargo, los sueros de animales portadores responden en gran medida a la proteína N. Esta respuesta a proteínas recombinantes es claramente mucho menos sensible que la VN convencional. Otros autores demostraron que la sensibilidad a la respuesta de proteínas

recombinantes por inmunoblotting y ELISA es muy variable, y esto depende en gran medida de la cepa actuante, la duración de la infección, de variaciones individuales equinas y del método utilizado para su detección (**Chirniside y col., 1995b; Hedges y col., 1998; MacLachlan y col., 1998; Nugent y col., 2000; Starik y col., 2001**). Por todas estas variabilidades, la VN que detecta principalmente Ac contra GP5, sigue siendo la técnica más sensible para la detección de Ac específicos anti- AVE en suero equino. La aparición de AcN en suero coincide con la recuperación clínica y la restricción de la excreción de virus, que ocurre generalmente a los 28 días PI (**Doll y col., 1968; Timoney y McCollum, 1993; Balasuriya y col., 1999a y b**). Aunque la respuesta inmune celular contra arterivirus no ha sido estudiada aún en detalle, experiencias preliminares indican que aumentan los linfocitos T citotóxicos CD8+ (**Castillo Olivares y col., 2003 a y b**).

EPITOPES NEUTRALIZANTES

GP5 expresa los mayores determinantes antigénicos de la neutralización de VAE (**Balasuriya y col., 1993, 1995a y b, 1997, 2000, y 2004a; Deregt y col., 1994; Chirnside y col., 1995; Glaser y col., 1995**) y aunque existe variación considerable en la secuencia de la proteína GP5 de los aislamientos de campo, existe un solo serotipo del VAE y todas las cepas de campo evaluadas hasta el momento son neutralizadas por el antisuero policlonal contra la cepa Bucyrus (**Balasuriya y col., 1997, 1998, 1999a y b, 2004a y b; Westcott y col., 1995; Hedges y col., 1999**). Sin embargo, los aislamientos de AVE se han podido distinguir con frecuencia en base a su perfil de neutralización utilizando diversos antisueros policlonales y monoclonales y además pueden diferenciarse por la severidad de la enfermedad clínica que inducen y en su potencial abortigénico (**Timoney y McCollum, 1993; Balasuriya y col., 1998, 1999 a y b, 2002; McCollum y col., 1999; Patton y col., 1999**). Diversos autores han

demostrado que los cambios de aminoácidos en GP5 alteran el fenotipo virusneutralizante (**Hedges y col., 1999; Balasiruya y col., 2001**).

En una gran cantidad de estudios se analizaron las secuencias aminoacídicas de GP5 de varias cepas de AVE que dieron como resultado la identificación de tres regiones distintas variables: V_1 (desde los aminoácidos 61 al 121); V_2 que comprende desde el 141 al 178, y V_3 del 202 al 222; una secuencia señal en los primeros 18 aminoácidos y 4 regiones conservadas: C_1 (19-60); C_2 (122-140); C_3 (179-201) y C_4 (223-255) y un sitio de glicosilación en el aminoácido 56 (Asn) que es crítico para la infectividad viral y altamente conservado y otro variable localizado en aminoácido 81 (asn-81) (**Balasuriya y col., 1995a y b, 1999a ; Snijder y col., 2003**). Asimismo se describen 4 sitios neutralizantes A (aminoácido 49); B (aminoácido 61); C (aminoácidos 67-90) y D (aminoácidos 99-104) (**Balasuriya y col., 1997**).

VARIACIONES GENÉTICAS RELACIONADAS CON LA VIRULENCIA

De acuerdo a estudios realizados por **Timoney y col. (1986)** y **Timoney y McCollum (1993)**, los padrillos portadores asintomáticos son los principales reservorios de AVE e infectan a yeguas susceptibles con virus de virulencia reducida por vía venérea. Durante el curso de la infección persistente ocurre una significativa variación genética, del tipo de sustituciones aminoacídicas no sinónimas, mientras que el virus que desencadena epizootias transmitido por aerosoles en forma horizontal, es mucho más estable (**Balasuriya y col., 1999a; Hedges y col., 1999**). Aún considerando que las cepas de campo son más estables también sufren variaciones menores y estas variaciones son más pronunciadas en las regiones variables del ORF5 al igual que en las cepas aisladas de animales portadores y en ambos casos, se correlacionan con el fenotipo virusneutralizante (**Balasuriya y col., 1995b y 1997; Glaser y col. 1995**) y con mayor frecuencia en la zona V_1 (**Balasuriya y col., 1997 y 1999a**). La región

más variable dentro de esta V_1 descrita en virus de infecciones persistentes, es la zona comprendida entre los aminoácidos 61 y 84 que contiene a los sitios neutralizantes B y C, críticos para la virusneutralización y que varían significativamente entre los aislamientos de América y Europa. Las diferencias de aminoácidos que ocurren en esta región implican cambios en el fenotipo neutralizante **(Balasuriya y col., 1995b y 1998)**. Una situación similar ocurriría por adquisición o pérdida de sitios de glicosilación en GP5, que podría facilitar la transmisión y persistencia de un virus con limitada capacidad de generar diversidad genética. Se plantea entonces que la glicosilación variable podría influir en la patogénesis y virulencia de los Arterivirus **(Balasuriya y col., 1999a)**. Un ejemplo de la bibliografía cita que la pérdida de dos sitios de N-glicosilación en el virus de la deshidrogenasa láctica del ratón se asocia con el aumento de la neurovirulencia y la adquisición de sitios en la misma proteína produce infección persistente sin neurovirulencia **(Anderson y col., 1995; Faaberg y col., 1995; Plagemann, 1996)**.

POR QUE ESTUDIAR AVE. PROPÓSITO DE LA INVESTIGACIÓN

SITUACIÓN EN ARGENTINA

En el año 1994 las autoridades sanitarias argentinas (SENASA) autorizaron la importación de padrillos de razas reguladas por el Stud Book Argentino desde países con enfermedad declarada. Los animales ingresantes debían cumplir ciertas exigencias, como la ausencia de Ac, determinada por VN en su país de origen, de animales no vacunados, o bien que aquellos que hubieran sido vacunados demuestren ser no transmisores de virus por semen. Asimismo, los machos enteros serológicamente positivos debían ser sometidos a una prueba biológica. En noviembre de 1997, se amplió la autorización para la importación definitiva de equinos **(de la Sota y col., 2005)**. Hasta el año 1998 nuestro estatus sanitario, declarado ante la Oficina

Internacional de Epizootias, era de *enfermedad no señalada de denuncia obligatoria y cuarentena en frontera*. Las importaciones de material reproductivo y animales en pie desde los países que tenían la enfermedad se autorizaban sólo *ad referéndum* de la correspondiente certificación, extendida en origen por la autoridad veterinaria oficial. Posteriormente a esa fecha, al iniciarse en nuestro país el recontrol oficial efectuando la prueba diagnóstica al ingreso, se detectaron animales no vacunados y semen importado positivos para AVE, lo que motivó su correspondiente reexportación o destrucción, respectivamente. Como ya fue mencionado, uno de los puntos más importantes de la enfermedad es que hasta un 60% de los padrillos infectados pueden transformarse en portadores crónicos, y de esta manera, diseminar el virus mediante el servicio natural o la inseminación **(Chirnside, 1992)**. Las medidas de prevención que SENASA toma actualmente son la certificación oficial de padrillos y de semen, tanto nacional como importado, como prerequisite para la inclusión en el registro de servicios. Además, en los animales seropositivos se solicita el diagnóstico de dos muestras pareadas para determinar seroconversión. Los animales importados son retenidos en aislamiento en el Lazareto Capital durante 14 días, momento en que las muestras de sangre se evalúan para la presencia de Ac contra AVE. Hasta el momento la vacunación no está permitida, aunque se admite el ingreso de animales vacunados con la certificación extendida en origen por la autoridad veterinaria oficial.

En nuestro país se detectaron Ac a partir de 1984 **(Nosetto y col., 1984)**, pero no se registraron casos clínicos. En 2001, el virus se aisló por primera vez a partir de muestras de semen, sin detectarse aún sintomatología atribuible a esta virosis **(Echeverría y col., 2003)** y hasta nuestro conocimiento es la primera vez que se aísla VAE en América del Sur. La Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La

Plata es uno de los 4 laboratorios habilitados en Argentina por el SENASA (www.senasa.gov.ar) para el diagnóstico de AVE, no sólo por serología sino también para el procesamiento de las muestras para aislamiento viral, técnicas de PCR y caracterización genética. En nuestra experiencia y la de otros colegas, AVE se presenta en nuestro país sin sintomatología clínica compatible, es por eso que el diagnóstico se realiza no sólo a los animales de importación-exportación, sino también a los animales que se inscriben en el registro de padrillos (Resolución 434/01) como parte del programa de vigilancia epidemiológica de AVE.

Las consecuencias económicas directas atribuibles a esta virosis son debido a abortos o muerte perinatal, cierre de mercados por infección persistente de animales en pie o semen, y disminución del valor comercial del portador persistente. La industria equina es una actividad tradicional que implica el movimiento de más de 130.000.000 de dólares anuales. El incremento del comercio internacional de animales en pie para deporte, compañía y cría y el uso intensivo de inseminación artificial ha incrementado notablemente el riesgo de difusión de AVE y por lo tanto su ingreso en los países libres de esta enfermedad. Nuestra situación sanitaria ha cambiado desde 2001, dejando de ser AVE una enfermedad exótica. Aunque la enfermedad está bastante circunscripta, el riesgo potencial de diseminación futura, nos lleva a la necesidad de desarrollar metodologías de diagnóstico que permitan implementar estrategias de control eficientes para evitar su diseminación.

De acuerdo a datos obtenidos del muestreo serológico llevado a cabo por el SENASA entre 2001 y 2002, sobre 1774 muestras de suero sanguíneo de padrillos inscriptos para servicio, 14 fueron positivos; once pertenecían a animales vacunados en origen e importados a nuestro país en los últimos años; los tres restantes se encuentran actualmente en dos

establecimientos bajo la supervisión y control de SENASA. En 2002 se realizaron nuevos aislamientos a partir de muestras de semen de un haras en donde los animales no presentaron sintomatología clínica.

Resumiendo y teniendo en cuenta que:

- 1. Los ORF 5 y 6 codifican proteínas de envoltura GP5 y M, cuya interacción es crítica para la infectividad y expresión de determinantes antigénicos**
- 2. Existe un solo serotipo de AVE aunque se ha informado que existe variabilidad entre aislamientos de distintas regiones geográficas mediante la comparación de las secuencias que codifican principalmente para las proteínas M, N y GP5, que confirman la ocurrencia de recombinación del RNA (Chirnside y col., 1994; Balasuriya y col., 1999a; Sugita y col., 1994).**
- 3. Estas mezclas heterogéneas existentes en la población viral podrían ser las responsables de la diferencias de tropismo, antigenicidad y virulencia de las cepas.**
- 4. Se han podido separar en distintos grupos cepas aisladas de Europa y EEUU (Sugita y col., 1994; Balasuriya y col., 1995b; Stadejek y col., 1999).**
- 5. En Argentina, el primer aislamiento de AVE se realizó en 2001 (LP01) y en el 2002 se realizaron 3 aislamientos más de un establecimiento con alta prevalencia de Ac pero sin signos clínicos de la enfermedad (LP02/R, LP02/C y LP02/P).**
- 6. La evidencia experimental muestra que las cepas aisladas en Argentina tienen diferente patrón de neutralización y que la cepa de referencia Bucyrus, utilizada en los test diagnósticos por nuestro laboratorio, es neutralizada en menor medida por antisueros heterólogos (Echeverría y col 2005).**

Se plantea el siguiente objetivo general:

- **Estudiar comparativamente los aislamientos Argentinos del 2001 y 2002 con la cepa de referencia Bucyrus, para investigar diferencias epidemiológicas entre los mismos y determinar el posible origen de las cepas Argentinas.**

Objetivos específicos:

- 1. Analizar el fenotipo de las cepas Argentinas por la técnica virológica clásica de virusneutralización cruzada.**
- 2. Analizar por técnicas moleculares las secuencias codificantes de la proteína M y GP5 por:**
 - a. Rastreo de variabilidad por medio de PCR-RFLP y PCR-SSCP**
 - b. Secuenciación**
- 3. Analizar las secuencias de parte de los ORF5 y 6 de las cepas aisladas en Argentina con referencia a la cepa Bucyrus en primer lugar y luego con las secuencias del banco de datos (GenBank).**

MATERIALES Y MÉTODOS

MEDIOS Y SOLUCIONES DE CULTIVO

Como medio de crecimiento celular (MC) se utilizó MEM Eagle con el agregado de 0,3 mg/ml de glutamina, 200 UI/ml de penicilina, 0,5 mg/ml de estreptomicina, 20 UI/ml de nistatina y 10% de suero fetal bovino (SFB). El pH final del medio fue de 7,2 logrado con la adición de bicarbonato de sodio al 7,5%. Como medio de mantenimiento, se redujo el suero al 2% (MM). Para determinadas experiencias se utilizó medio de cultivo sin suero (MSS). Para la disgregación de las monocapas celulares se utilizó una solución de tripsina (Laboratorios Difco, USA) al 0,25% y sal sódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) al 0,2% en solución tamponada de fosfatos (PBS).

CÉLULAS

Para todas las experiencias el sustrato utilizado fue células de línea RK13 (ABAC) -Rabbit Kidney-, las que fueron crecidas en monocapas en placas de 6 pocillos o en frascos de cultivo de 25cm² según correspondiera.

VIRUS

Se utilizó una cepa vacunal derivada de la cepa Bucyrus del virus de arteritis equina cedida por el Dr. W. McCollum de la Universidad de Lexington, Kentucky, EEUU, como cepa control y de referencia, de moderados pasajes en células RK13, utilizada en nuestro laboratorio desde los 80s. El suero control positivo utilizado también está dirigido contra la cepa Bucyrus. Las cepas aisladas en Argentina utilizadas fueron: LP01, LP02/R, LP02/C y LP02/P **(Echeverría y col., 2005).**

INOCULACIÓN VIRAL PARA EXTRACCIÓN DE RNA

Luego de la formación de la monocapa celular completa, fue eliminado el MC y se inocularon con 0,2 ml de cada suspensión viral (segundo pasaje). Se llevaron a estufa a 37° C durante 60 min para permitir la adsorción viral y luego se agregaron 3 ml de MM. En los pocillos testigo se substituyó el inóculo viral por MM procediéndose de igual manera.

REPLICACIÓN VIRAL PARA VN

Todas las cepas argentinas fueron replicadas entre dos y tres veces sobre las células RK13, desarrolladas en frascos de vidrio de diferentes capacidades. Los sobrenadantes correspondientes fueron luego centrifugados, divididos en tubos Eppendorf (0,5 ml) y congelados a -70°C hasta su uso y posterior titulación.

TITULACIÓN VIRAL EN MICROPLACAS

Se realizó la siembra de células RK13 y la inoculación del material viral en forma simultánea. Las diluciones virales se efectuaron en base logarítmica 10 en MSS (desde 10^{-1} a 10^{-10}). Se cargaron los pocillos con 0,05 ml de la dilución viral correspondiente, utilizando 5 pocillos por cada una y se adicionaron 0,1 ml de células RK13 ($1,5 \times 10^5$ células/ml). Como controles de células, se cargaron pocillos, reemplazando el inóculo por MSS. Las placas se incubaron a 37° C en atmósfera de CO₂, se controlaron diariamente y la lectura final se realizó a los 3 días, calculándose el título viral mediante el método de Reed y Muench.

ANÁLISIS DE NEUTRALIZACIÓN VIRAL

Los análisis de neutralización viral se realizaron de acuerdo a los estándares internacionales **(Timoney 2000)**. Para la determinación de Ac, los sueros fueron descomplementados a 56 ° C por 30 min y diluidos con MSS en base 2, partiendo de una dilución 1:2. Se incluyeron además controles de toxicidad inespecífica de cada suero. A las diluciones de los sueros, se les adicionó un volumen equivalente conteniendo 100 DICT₅₀ de la cepa de referencia Bucyrus. Luego de 60 min de incubación en 5% de CO₂, fueron agregados 100 µl de células RK 13 (3 x 10⁵ cel/ml), incubándose la reacción por 72 h. Los títulos de Ac fueron expresados como la recíproca de la mayor dilución que protegió al 50% de las unidades reveladoras, considerándose negativos aquellos con títulos menores a 1:4.

VN CRUZADA

Se utilizaron 100 partículas infectivas/0,025 ml de cada una de las cepas virales. Se cargaron 0,025 ml de MSS a todos los pocillos de las placas más 0,025 ml adicionales a los pocillos de titulación y control de células. Luego fueron agregados 0,025 ml de cada uno de los sueros anti-EAV en los pocillos correspondientes, por duplicado. Se realizaron las diluciones en base logarítmica 2 con pipeta multicanal, tomando 0,025 ml desde la hilera H hasta la A. Luego se adicionó 0,025 ml de la dilución viral correspondiente a 100 partículas virales a cada una de los pocillos menos en el de control celular. En la placa de titulación se agregó 0,05 ml de cada dilución desde 10⁻² a 10⁻¹⁰. Posteriormente se mantuvo en incubación durante 60 min a 37°C en 5% de CO₂, agitando suavemente cada 15 min para favorecer la neutralización del virus por los Ac. Finalmente, se les agregó a todos los pocillos 0,1 ml de la suspensión de células y se dejaron en incubación hasta el 3° día en que se determinó el título neutralizante de los

sueros. Las pruebas de neutralización cruzada utilizando como antígenos cada una de las cepas virales tituladas se desarrollaron simultáneamente para eliminar la variabilidad de reactivos y a la realización de las diluciones.

RT-PCR

Se realizó RT-PCR de dos regiones que codifican para la proteína M y GP5 de cada una de las cepas virales a partir del segundo pasaje en cultivos RK13 (LP01, LP02/R, LP02/C y LP02/P) y de la cepa de referencia Bucyrus de moderados pasajes en las mismas células, utilizada en nuestro laboratorio desde los 80s. Para realizarla modificamos algunos puntos de la técnica descrita por **Sekiguchi y col., 1995** para proteína M (ORF6), con los siguientes pares de primers:

M1 5' CTGAGGTATGGGAGCCATAG- 3' -11894-11913- y

M10 5' – GGCCTGCGGACGTGATCG- 3' - 12342-12325-

que flanquean una región conservada del gen de la proteína de matriz (M) de 411 pb.

Para GP5 (ORF5) utilizamos los siguientes primers:

GL105F 5' GCTGACGGATCGCGGCGTTATT- 3' -11250-11271- y

GL673R 5' ATAGTGGGCCTACCTGGGACTAA 3' 11840-11818

que flanquean una región de 546 nucleótidos (**Mittelholzer y col., 2005**).

Para ambos casos, las posiciones y las secuencias de los primers se basaron en la secuencia NCBI NC_002532.

El RNA viral fue extraído directamente del medio de cultivo infectado (250µl) con 500µl de Trizol, precipitando el mismo con isopropanol. Cinco (5) µl de RNA resuspendido en agua destilada, fue usado para síntesis de ADNc, mediante el agregado de transcriptasa reversa y

hexámeros al azar (retrotranscripción). Para ambas amplificaciones se realizaron 35 ciclos de 94° C 45", 60° C 1' y 72 °C por 90". Cada producto de PCR fue examinado en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio y observados bajo luz ultravioleta.

PCR-SSCP

Para detectar polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP) se utilizaron diluciones de cada uno de los productos de PCR de ORF5 y 6 y buffer de siembra de baja fuerza iónica - LIS- (10% sacarosa, 0,01% azul de bromofenol y 0,01% xilen cyanol FF), o buffer con formamida (95% formamida, 20mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol y 0,05% xilen cyanol FF). Para disminuir el tamaño del amplicón del ORF 5 los productos de PCR fueron digeridos con *BstXI*, enzima que tiene un solo sitio de corte en las cepas Argentinas, produciendo dos bandas de 440 y 150 pb. Las muestras fueron calentadas a 96° C durante 10 min y enfriadas inmediatamente antes de sembrarlas en geles nativos de acrilamida:bisacrilamida (38:1) -200 x 220 x 1mm- al 8 o 10% , 0,1% persulfato de amonio, 0,01% TEMED utilizando 0,5X buffer TBE (45mM tris, 45mM ácido bórico, 1mM EDTA, pH8) y sometidas a electroforesis a 150 o 200V, por 16 horas a 10°C con sistema control de temperatura constante. La tinción de los geles fue realizada con nitrato de plata 0,1%.

PCR-RFLP

Para detectar polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos de amplificación de la proteína M (449 pb) que permitan diferenciar los distintos aislamientos virales con la cepa de referencia, se utilizaron 10 UI de cada una de las siguientes enzimas de restricción: *XbaI*, *AluI*, *MvaI*, *MboI*, *HhaI*, *AvaI*, *DdeI* y *HindIII* y 20 µl de

cada uno de los productos de PCR previamente purificados (SV Promega). Los productos de GP5 (591 nucleótidos) también purificados por el mismo procedimiento fueron digeridos con *AluI*, *MvaI*, *MboI*, *HhaI*, *Avall*, *DdeI*, *EcoRI*, *NcoI*, *BstXI*. Luego de la digestión a 37°C durante 2 horas, se realizó electroforesis en minigeles de agarosa al 3% o en minigeles de acrilamida-bisacrilamida (38:1) al 6% ambos en 1X TBE (90mM tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA, pH8) y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

SECUENCIACIÓN

Previo a la secuenciación, los productos de PCR fueron purificados y concentrados. Los productos del ORF6 fueron clonados en vector pCR Topo 2.1 y expresados en células Top10. La secuenciación se realizó utilizando primers universales M13. Para ORF5, se realizó secuenciación directa utilizando primers internos (CR2 -11272-11294 5' GCCAATTTGCTGCGATATGATGA 3' y EAV32 -11836-11814 5' TGGGCCTACCTGGGACTAACAAC 3') no siendo necesario el clonado en vectores (**Stadejek y col., 1999**). Ambas cadenas de cada amplicón de los ORF5 y 6 fueron secuenciadas utilizando los primers descriptos. La secuenciación automatizada se realizó por el método dye-terminator en equipo ABI 377 (Cornell University, BioResource Center, DNA Sequencing Facility, Ithaca, NY). El análisis de las secuencias se realizó con programas del Baylor College of Medicine (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>): Webcutter, CLUSTAL W (**Thompson y col., 1994**), BLAST 2 (**Altschul y col., 1997**), y por medio del programa MEGA (**Kumar y col., 2004**), y DNASTar se construyeron los árboles filogenéticos para cada secuencia por el método de Neighbour Joining (**Saitou y Nei, 1987**) usando test de “bootstrap” (**Felsenstein, 1985**) en

comparación con la cepa de referencia Bucyrus NC_002532 en y con las secuencias disponibles en las bases de datos.

BANCO DE DATOS

Para el análisis comparativo las secuencias se eligieron teniendo en cuenta la distribución geográfica de los aislamientos y el reporte de ambos ORF en cada uno. Como referencia, la cepa utilizada fue la americana Bucyrus NC_002532. En el **Cuadro 1** se indican la procedencia, año de aislamiento y número de acceso al GenBank (www.ncbi.nih.gov/Genbank) de las secuencias de las cepas utilizadas en este trabajo. Las mismas se eligieron debido a que se contaba con la secuencia de ambos ORFs 5 y 6: [AF107279 (KY84); U81021 (CAN86); U81018 (PA76); U81017 (KY93); U81015 (KY77); U81013 (VBS53); U81023 (CA95G); AF107266 (D84); AF107275 (E85); AY349167 (CW96); AF118782 (RQ); AF118777 (G1); AF118781 (BT-PA96); AF118775 (P1); AF118773 (R1) y AF118769 (A1)].

CUADRO 1: Denominación, año de aislamiento, procedencia, número de acceso al GenBank (www.ncbi.nih.gov/Genbank) y referencia bibliográfica de las secuencias de las cepas utilizadas en este trabajo.

Denominación	Año de aislamiento	Procedencia	GenBank	Referencia
Bucyrus	1953	EEUU (Ohio)	NC_002532	Ziebuhr y col., 2000
VBS53	1953 *	EEUU (Ohio)	U81013	Balasuriya y col., 1995b
KY93	1993	EEUU (Michigan)	U81017	Balasuriya y col., 1995b
KY77	1997	EEUU (Kentucky)	U81015	Balasuriya y col., 1995b
PA76	1976	EEUU (Pennsylvania)	U81018	Balasuriya y col., 1995b
CAN86	1986	Canadá (Alberta)	U81021	Balasuriya y col., 1995b
KY84	1984	EEUU (Kentucky)	AF107279	Balasuriya y col., 1995b
CA95G	1995	EEUU (California)	U81023	Patton y col., 1999
CW96	1996	Europa	AY349167	Balasuriya y col., 2004b
D84	1984	EEUU (Kentucky)	AF107266	Hedges y col., 1999
E85	1985	EEUU (Kentucky)	AF107275	Hedges y col., 1999
BT-PA96	1996	Europa	AF118781	Balasuriya y col., 1999a
R1	1996	Europa	AF118773	Balasuriya y col., 1999a
RQ	1996	Europa	AF118782	Balasuriya y col., 1999a
P1	1996	Europa	AF118775	Balasuriya y col., 1999a
G1	1995	Europa	AF118777	Balasuriya y col., 1999a
A1	1995	Europa	AF118769	Balasuriya y col., 1999a

* esta cepa es derivada de NC_002532 sin sufrir pasajes en cultivos celulares

RESULTADOS

VN CRUZADA

Los sueros de cada padrillo (R, C y P) de los que se obtuvo un aislamiento, tenían AcN contra AVE con títulos variables entre 1:8 y 1:16, de acuerdo a lo determinado a su arribo al laboratorio, utilizando la cepa de referencia Bucyrus. El fenotipo de cada virus fue caracterizado en microneutralización utilizando un panel de sueros policlonales positivos a AVE del banco de sueros de la Cátedra de Virología, cuyos resultados se observan en la **Tabla 1**. Cada antisuero neutralizó su virus homólogo, pero no siempre neutralizó los otros virus con igual título. Asimismo, los sueros positivos anti-AVE de equinos naturalmente infectados (sin vacunación) también neutralizaron los aislamientos con títulos variables (16 a 512). Para considerar un cambio significativo en el fenotipo de neutralización fue considerada una diferencia de 4 diluciones o más en el título neutralizante. También el suero de referencia anti-AVE obtenido de equinos inoculados con la cepa Bucyrus original también neutralizó en bajo título a cada uno de los aislamientos Argentinos (1:4 a 1:16). La cepa Bucyrus fue neutralizada en menor título por los antisueros heterólogos.

TABLA 1: Reactividad de los Ac policlonales a los distintos aislamientos de AVE por VN

Cepa/Aislamiento	Bucyrus	LP01	LP02/R	LP02/C	LP02/P
Sueros Policlonales					
Sueros ref.anti-bucyrus	1:4	1:16	1:4	1:4	1:8
“R”	1:16	1:256	1:512	1:128	1:256
“C”	1:8	1:128	1:512	1:128	1:128
“P”	1:16	1:128	1:256	1:256	1:256
“CH6”	1:16	1:64	1:256	1:256	1:256
“GC”	1:16	1:128	1:64	1:256	1:128
“PR”	1:64	1:256	1:128	1:128	1:128
“U”	1:32	1:256	1:128	1:256	1:128
“ACZ”	1:8	1:256	1:256	1:256	1:128
“RE”	1:16	1:128	1:32	1:128	1:128
“F”	1:4	-	1:8	1:16	1:16
“B”	1:8	1:8	1:8	1:8	1:32
“CI”	1:8	1:64	1:128	1:128	1:128

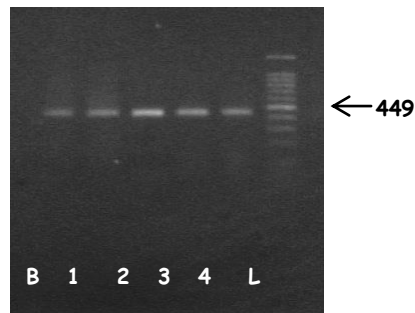
El título neutralizante se expresa como la recíproca de la dilución de suero que neutraliza el 50% de 100 DICT₅₀ de cada cepa viral

RT-PCR

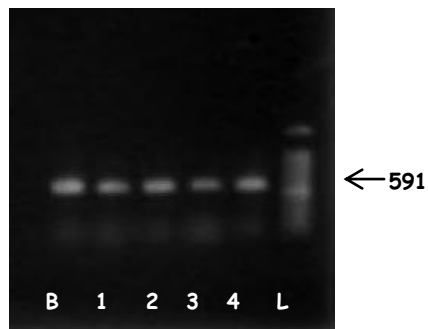
Cada cDNA fue amplificado utilizando como molde RNA extraído de células RK13 infectadas con cada una de las cepas de AVE Argentinas y la utilizada como control. Tanto para el RT-PCR del ORF 6 (proteína M) como del ORF5 (GP5) se obtuvo un producto claro y una banda visible de aproximadamente ~449 pb o ~591 pb, respectivamente. La presencia del producto del tamaño esperado permitió corroborar la identidad de los aislamientos como AVE (**Figuras 1 a y b**).

FIGURA 1: amplificación de ORF6 y ORF5 parciales a partir de cepas de AVE Argentinas y de la de referencia en geles de agarosa -a) 449 y b) 591 pb respectivamente-

a)



b)



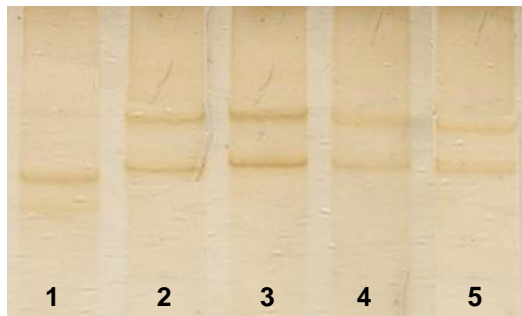
B=cepa de referencia Bucyrus; 1= LP01; 2= LP02/R; 3=LP02/C; 4 LP02/P; L marcador de 100 pb

PCR-SSCP

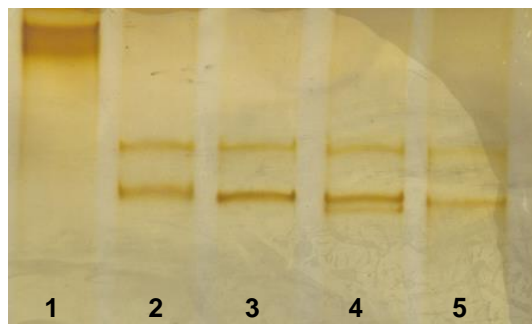
Para un primer rastreo de la variabilidad de las secuencias correspondientes a ambos ORFs de los aislamientos argentinos de AVE, los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de SSCP. En las condiciones empleadas cada amplificado produjo un patrón de bandas diferente, es decir, que por este método fue posible discriminar cada uno de los aislamientos **(Figuras 2 a y b)**. La técnica fue realizada en más de una oportunidad para confirmar los resultados.

FIGURA 2: Geles de SSCP que muestra los patrones de bandas de los amplicones correspondientes al ORF6 (a) y ORF5 (b) del las cepas de AVE.

a) ORF 6 (gel 8%, buffer LIS, 150V)



b) ORF 5 (gel 10%, buffer formamida, 200V)



1= Bucyrus; 2= LP01; 3= LP02/R; 4= LP02/C; 5= LP02/P.

PCR-RPLP

Como segundo paso para detectar variabilidad en las secuencias analizadas, se realizaron digestiones de los productos de PCR correspondientes a los ORF de la proteína M (~449 pb) y GP5 (~591 pb) con las enzimas de restricción *Alul*, *Avall*, *Ddel*, *Mval*, *MbolI*, *HindIII*, *XbaI* y *HhaI* (ORF6) -**Figura 3**- y con *Alul*, *Mval*, *MbolI*, *HhaI*, *Avall*, *Ddel*, *EcoRI*, *NcoI*, *BstXI* (ORF5) -**Figura 4**-. Para cada caso, los tamaños aproximados de los fragmentos fueron determinados en base al marcador de 100 pb.

ORF6: la digestión con *XbaI* y *MbolI* generó 2 patrones diferentes (**Figura 3a y 3e**), que permitieron distinguir LP01 de Bucyrus y del resto de cepas Argentinas (LP02/R, LP02/C y LP02/P). La enzima *XbaI* produjo bandas de 395+55 pb en Bucyrus, LP02/R, LP02/C y LP02/P, pero no digirió en LP01 mientras que *MbolI* produjo un patrón de digestión diferente en Bucyrus, LP02/R, LP02/C y LP02/P (360 + 90) con respecto a LP01 (280 + 160). Los productos de todas las cepas fueron cortados por *Alul* en más de dos fragmentos con tamaños menores a 200 pb (**Figura 3e**). Además, la digestión con *Avall* resultó en dos patrones de restricción que discriminaron LP01 y Bucyrus del resto de cepas Argentinas (282+56+111pb). Sin embargo, la digestión con *Ddel* y *HindIII* resultó en el mismo patrón de restricción para las 5 cepas -366 + 83 y 410 + 39 respectivamente- (**Figura 3b**) mientras que *HhaI* y *Mval* no presentaron sitios de corte en ninguna de las mismas (**Figuras 3c y 3d**).

ORF5: la digestión enzimática de los amplicones (591 pb) correspondientes a la GP5 se observan en la **figura 4 (a-e)**. *Mval*, *HhaI*, *BstXI*, *EcoRI* *Ddel* y *Alul* generaron dos patrones diferentes que permitieron distinguir las cepas Argentinas de la cepa de referencia Bucyrus (**Figura 4a-e**). Con *Mval* se obtuvieron 2 bandas de 450 y 130 pb en las cepas Argentinas y 3 bandas -360, 125 y 110- en Bucyrus (**Figura 4a**). *HhaI* y *EcoRI* presentaron solo sitio de corte en Bucyrus -420 + 170 y 345 + 245 pb respectivamente- (**Figura 4a y 4c**). *BstXI* cortó

solamente las cepas Argentinas en dos fragmentos de aproximadamente 440 y 150 pb (**Figura 4b**) mientras que *Ddel* en 2 fragmentos de 520 y 60 pb y en 3 fragmentos en Bucyrus (380, 150 y 60 pb (**Figura 4d**) y *AluI* en 3 fragmentos (400 + 120 + 70) en la cepas Argentinas y dos en Bucyrus (520 y 70). La digestión con *NcoI*, *HaeIII* y *Avall* nos permitió discriminar entre las cepas LP01 y LP02 (LP02/R, LP02/C, LP02/P) y la cepa de referencia Bucyrus. *NcoI* no cortó LP01 pero generó en Bucyrus (395 + 195 pb) un patrón distinto al de las cepas LP02 -400 + 190 pb- (**Figura 4c**). Los distintos fragmentos generados por el corte con *HaeIII* podrían ser el resultado de la presencia de al menos 4 sitios de restricción cuyas combinaciones producen 3 patrones diferentes, uno en Bucyrus (230, 190 y 150 pb), uno en LP01 (210, 200 y 140 pb) y el restante en las cepas LP02 (200, 150, 130, 100 pb). La misma situación ocurre en la digestión con *Avall*: se generaron tres patrones de restricción que nos permitieron distinguir LP01 (dos bandas de aproximadamente 430 y 160 pb) y LP02 (LP02/R, LP02/C, LP02 /P) –ningún sitio de corte- y la cepa de referencia Bucyrus -300pb y otra menor- (**Figura 4e**).

FIGURA 3: Resultados de la digestión de los productos de amplificación del ORF6 (449 pb) de las cepas de AVE con *XbaI* -a-, *DdeI* y *HindIII* -b-, *HhaI* -c-, *MvaI* -d-, y *AluI*, *MboII*, y *AvaII* -e-. 1= Bucyrus; 2= LP01; 3= LP02/R; 4= LP02/C; 5= LP02/P; W= producto de PCR sin digerir y L marcador de 100 pb.

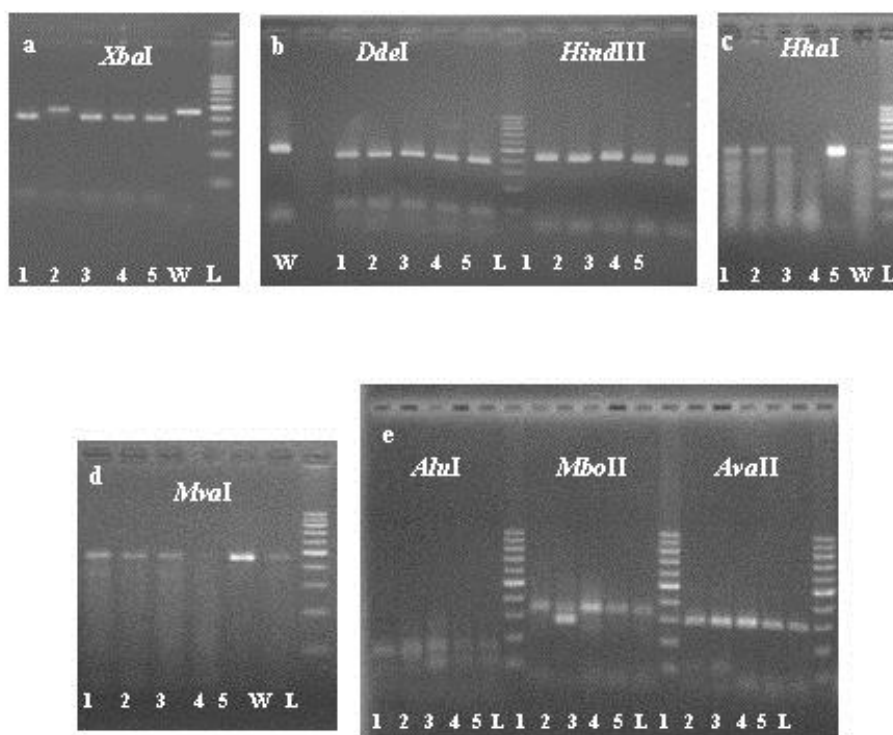
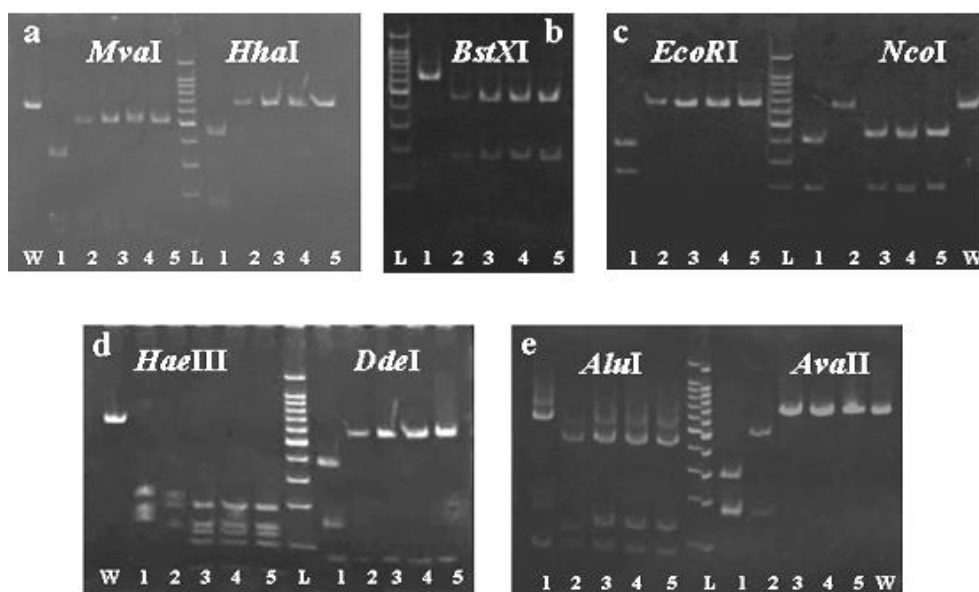


FIGURA 4: Resultados de la digestión de los productos de amplificación del ORF5 (591 pb) de las cepas de AVE con *MvaI* y *HhaI* –a-, *BstXI* –b-, *EcoRI* y *NcoI* –c-, *HaeIII* y *DdeI* –d-, *AluI* y *AvaII* –e-. 1= Bucyrus; 2= LP01; 3= LP02/R; 4= LP02/C ; 5= LP02/P; W= producto de PCR sin digerir y L marcador de 100 pb.



ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Para confirmar la variabilidad de los ORFs detectada por SSCP y RFLP, los productos de PCR de las cepas Argentinas fueron secuenciados y comparados entre sí y con la cepa de referencia NC_002532.

El ORF6 completo abarca 489 nucleótidos (nucleótido 11901 al 12389). En nuestro caso y por el par de primers que utilizamos secuenciamos 411 nucleótidos, como puede verse en la **Figura 5**. En el análisis se observaron 46 sustituciones nucleotídicas totales (~11%), sin deleciones ni inserciones. Las secuencias fueron registradas en el GenBank (www.ncbi.nih.gov/Genbank) con los siguientes números de acceso DQ333586, DQ333587, DQ333588 y DQ333589 para LP01, LP02/R, LP02/C y LP02/P respectivamente.

La comparación de las secuencias predichas de aminoácidos de los aislamientos Argentinos (136 de 162 totales) con la cepa de referencia, reveló un total de 8 cambios de aminoácidos (**Figura 6**). Siete de ellos ocurrieron en las mismas posiciones en los 4 aislamientos Argentinos: leucina por isoleucina y por metionina (posiciones 30 y 42 respectivamente) valina por leucina (posición 80) metionina por isoleucina, por valina y por leucina (posiciones 81, 87 y 88 respectivamente) y fenilalanina por cisteína (posición 95). Sin embargo, en la posición 114 la sustitución de la prolina por serina sólo se observó en los aislamientos LP02 (**Figura 6**).

Las diferencias entre secuencias de nucleótidos resultó en ~10% entre las cepas Argentinas y la cepa de referencia NC_002532. El número de sustituciones nucleotídicas fue de aproximadamente 16/411 (3,89%) entre LP01 y LP02. Las cepas LP02 difieren entre sí solamente en 3 a 4 nucleótidos (<1%). Los valores de identidad resultaron en 99% entre las cepas LP02/R, LP02/C y LP02/P (**Tabla 2**).

FIGURA 5: Alineamiento de parte de la secuencia de nucleótidos del ORF6 (411 nucleótidos) de los cuatro aislamientos argentinos del virus de AVE con la cepa de referencia Bucyrus (Numero de Acceso GenBank NC_002532). La denominación de las cepas se indica a la izquierda. Los puntos indican identidad respecto a la cepa de referencia NC_002532. En negrita se indica la posición de nucleótido de acuerdo a la secuencia NC_002532

11914	
NC_002532	1 ATTCATTTTGTGGTGACGGGATTTTAGGTGAGTATCTAGATTACTTTATTCTGTCCGTCC 60
LP02/R	.C.....A.....T.....T.....
LP02/C	.C.....A.....T.....
LP02/P	.C.....A.....T.....
LP01	.C.....A...T.....T.....T.....
NC_002532	61 CACTCTTGCTGTTGCTTACTAGGTATGTAGCATCTGGGTTAGTGTATGTTTTGACTGCCT 120
LP02/R	...T...T...C.AA.....G.....A..G..A....GA.....T.
LP02/C	...T...T...AA.....G.....A..G..A....GA.....T.
LP02/P	...T...T...C.AA.....G.....A..G..A....GA.....T.
LP01	...T...T...C..A.....G.....A..G.....AA.....T.
NC_002532	121 TGTCTATTCCCTTTGTATTAGCAGCTTATATTGGTTTGTATTAGTTGGAAGAGCCTTTT 180
LP02/R	...T.....G.....T..C.
LP02/C	...T.....T....G.....T..C.
LP02/P	...G.....T..C.
LP01	...T.....T....G.....G..T...
NC_002532	181 CTACTGCTTATGCTTTTGTGCTTTTGGCTGCTTTTCTGTTATTAGTAATGAGGATGATTG 240
LP02/RT.GC.....C....T...A..A.....
LP02/CGC.....C....T...A..A.....
LP02/PGC.....C....T...A..A.....
LP01	.C....C.....AC.....C....T...A..A.....
NC_002532	241 TGGGTATGATGCCTCGTCTTCGGTCCATTTTCAACCATCGCCAACTGGTGGTAGCTGATT 300
LP02/R	.A...G..T.....GT..T..C.....
LP02/C	.A...G..T.....GT..T..C.....
LP02/P	.A...G..T.....GT..T..C.....
LP01	.A...G..T.....GT..T..C....G.....
NC_002532	301 TTGTGGACACACCTAGTGGACCTGTTCCCATCCCCGCTCAACTACTCAGGTAGTGGTTC 360
LP02/RC.....C...T.....C.
LP02/CC.....C...T.....C.
LP02/PC.....C...T.....C.
LP01C.....C.....
NC_002532	361 GCGGCAACGGGTACACCGCAGTTGGTAACAAGCTTGTGCGATGGCGTCAAGA 411
LP02/R	...T.....A.....
LP02/C	...T.....A.....
LP02/P	...T.....A.....
LP01	...T.....A.....
12324	

FIGURA 6: Alineamiento de parte de la secuencia de aminoácidos del ORF6 (136 de un total de 162 aminoácidos) de los cuatro aislamientos argentinos del virus de AVE con la cepa de referencia Bucyrus (Numero de Acceso GenBank NC_002532). La denominación de las cepas se indica a la izquierda. Los puntos indican identidad respecto a la cepa de referencia NC_002532 y los guiones ausencia de dato. En negrita se indica el número de aminoácido correspondiente de acuerdo a la secuencia NC_002532

NC002532	1	MGAIDSFCGDGILGEYLDYFILSVPLLLLLTRYVASGLVYVLTALFYSEFVLAAYIWFVIVGRAFS	65
LP02/C	----I.....M.....	
LP02/P	----I.....M.....	
LP02/R	----I.....M.....	
LP01	----I.....M.....	
NC002532	66	TAYAFVLLAAFLLLVMRMIVGMMPLRSIFNHRQLVVADFVDTPSGFPVIPRSTTQVVVRGNGYT	130
LP02/C	LI.....VL.....C.....S.....	
LP02/P	LI.....VL.....C.....S.....	
LP02/R	LI.....VL.....C.....S.....	
LP01	LI.....VL.....C.....	
NC002532	131	AVGNKLVLDGVKTITSAGRLFSKRRTAATAYKLQ	162
LP02/C	-----	
LP02/P	-----	
LP02/R	-----	
LP01	-----	

TABLA 2: Número de cambios nucleotídicos (diagonal superior) y aminoacídicos (diagonal inferior) sobre un total de 411 y 136 respectivamente, y porcentajes de identidad (entre paréntesis), entre las secuencias del ORF6 de los aislamientos Argentinos del VAE y la cepa de referencia Bucyrus NC_002532. Los valores de identidad se calcularon mediante el programa DNASTar

	NC_002532	LP01	LP02/R	LP02/C	LP02/P
NC_002532	***	39 (90.51)	40 (90.26)	38 (90.75)	37 (90.99)
LP01	7 (94.85)	***	15 (96.35)	15 (96.35)	16 (96.10)
LP02/R	8 (94.11)	1 (99.26)	***	4 (99.02)	3 (99.27)
LP02/C	8 (94.11)	1 (99.26)	0 (100)	***	3 (99.27)
LP02/P	8 (94.11)	1 (99.26)	0 (100)	0 (100)	***

El ORF5 completo abarca 768 nucleótidos (nucleótidos 11146 al 11913). En nuestro caso y por el par de primers que utilizamos secuenciamos 519 nucleótidos, como puede verse en la **Figura 7**. En el análisis se observaron 96 sustituciones nucleotídicas (~18%), sin deleciones ni inserciones. Las secuencias fueron registradas en el GenBank (www.ncbi.nih.gov/Genbank) con los siguientes números de acceso DQ435439, DQ435440, DQ435441 y DQ435442 para LP01, LP02/R, LP02/C y LP02/P respectivamente.

La traducción a aminoácidos (172 de 255 totales) reflejó que las sustituciones nucleotídicas involucraron 26 cambios de aminoácidos, que se detallan a continuación: sustitución de lisina por ácido glutámico (posición 61), isoleucina por valina (posición 73) y alanina por valina (posición 141) únicamente en la cepa LP01. Asimismo, sólo en la cepa LP02/R se sustituyó la cisteína por el triptófano en la posición 57; mientras que la treonina de la posición 67 fue sustituida por valina en LP01 y LP02/C o por ácido glutámico en LP02/P y LP02/R. En la posición 82, en LP01 y LP02/P se reemplazó ácido aspártico por asparagina y en la 84, tirosina por histidina (LP02/C y LP02/P). Solamente en las cepas LP02 se sustituyó ácido glutámico por aspártico en la posición 71. El resto de las sustituciones fueron concordantes en todas las cepas Argentinas respecto de la de referencia NC_002532: ácido aspártico por glicina y por asparagina (posiciones 79 y 81 respectivamente); alanina por serina (posiciones 85 y 89), por valina (posiciones 101 y 174) y por treonina (posición 171); ácido glutámico por treonina (posición 90); valina por fenilalanina (119), por isoleucina (208 y 217) y por alanina (220); leucina por metionina (posición 121) e isoleucina por valina (posiciones 154, 155, 175 y 178) y por leucina (posición 158) – **Figura 8-**.

Las diferencias entre secuencias de nucleótidos resultó en ~17% entre las cepas Argentinas y la cepa de referencia NC_002532. El número de sustituciones nucleotídicas fue

de aproximadamente 28/519 (5,39%) entre LP01 y LP02. Las cepas LP02 difieren entre sí solamente en 3 a 5 nucleótidos (<1%). Los valores de identidad resultaron en 99% entre las cepas LP02/R, LP02/C y LP02/P (**Tabla 3**).

Se describe al ORF5 como uno de los más variables del genoma de VAE y es por ese motivo que es uno de los más estudiados para hallar diferencias entre las cepas. En la **Figura 9** se muestran las secuencias de aminoácidos de las cepas Argentinas con respecto a la de referencia NC_002532 y se indican las zonas variables y constantes, así como los sitios más involucrados en la neutralización y los sitios probables de N-glicosilación. Los sitios variables y constantes en las cepas Argentinas concuerdan con los indicados en la bibliografía. El sitio de glicosilación crítico para la infectividad viral y altamente conservado (aminoácido 56) se encuentra conservado en todas las cepas Argentinas y en la NC_002532, aunque el sitio de glicosilación variable no aparece en esta última (aminoácido 81). El sitio neutralizante B, varía solo en la cepa LP01; el C es el más variable con respecto a la NC_002532 y entre las cepas Argentinas entre sí, y el D tiene el mismo cambio de aminoácidos en todas las cepas Argentinas respecto a NC_002532.

FIGURA 7: Alineamiento de parte de la secuencia de nucleótidos del ORF5 (519 nucleótidos) de los cuatro aislamientos del virus de AVE de Argentina con la cepa de referencia Bucyrus. Los números en negrita indican la posición de los nucleótidos correspondientes al RNAm del ORF5 (Numero de Acceso GenBank NC_002532). La denominación de las cepas se indica a la izquierda. Los puntos indican identidad respecto a la cepa de referencia NC_002532

11295	
NC_002532	1 GCACACTGCTTTGTACAATTGTTCCGCCAGTAAACCTGTTGGTATTGCACATTCCTGGA 60
LP02/RA..CC.....G.....C..G.....C.....C...GAG...T....
LP02/CA..CC.....C.....C..G.....C.....C...GTG...T....
LP02/PA..CC.....C.....C..G.....C.....C...GAG...T....
LP01CC.....C.....CG.....C.....GTG...T....
NC_002532	61 CGAACAGATTATCACGTTTGAACCGATTGTGATGACACCTACGCGGTCCCAGTTGCTGA 120
LP02/R	...C.....C.....A.....G..T.GC...A.....T.T.....T.CAC
LP02/C	...C.....C.....A.....G..T.GC...A.....C..T.T.....T.CAC
LP02/P	...C.....C.....A.....G..T.GC...A..A.....C..T.T.....T.CAC
LP01G.C.....A.....G..T.GC...A..A.....TT.T.....T.CAC
NC_002532	121 GGTCTGGAACAGGCGCATGGACCGTACAGTGCCTGTTTGATGACATGCCCCCTTTTAT 180
LP02/R	A..TT...G....T....G.....T.....
LP02/C	A..TT...G....T....G.....T.....
LP02/P	A..TT...G....T....G.....T.....
LP01	A...T...G....T....G.....T.....C..
NC_002532	181 TTACTATGGCCGTGAATTCGGCATAGTTGTGTTGGATGTGTTTATGTTCTATCCCGTTTT 240
LP02/R	C.....G..T..T...T....A.....T....A....
LP02/C	C.....G..T..T...T....A.....T....A....
LP02/P	C.....G..T..T...T....A.....T....A....
LP01C.....T..T...T....A.....T....A....
NC_002532	241 AGTTCTGTTTTTCTTATCAGTACTACCTATGCTACGCTTATTCTTGAAATGTGTGTATC 300
LP02/R	...T.....G.....T.G..T....C..A.....G.....T..
LP02/C	...T.....G.....T.G..T....C..A.....G.....T..
LP02/P	...T.....G.....T.G..T....C..A.....G.....T..
LP01	G...T.....G.....T.G..T....T...A.....G.....G..
NC_002532	301 TATTCTGTTTATAATCTATGGCATTTCAGCGGGGCTACTTGGCCATGGGCATATTTGC 360
LP02/R	C...T.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A.....A.....
LP02/C	C...T.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A.....A.....
LP02/P	...T.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A.....A.....
LP01	...T.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A..T....A.....
NC_002532	361 GGCCACGCTTGCTATACATTCAATTGTTGGTCTCCGCCAATTACTGTGGTTATGCCTGGC 420
LP02/R	.A.....C..T.G.....GG.....T.....G.....G.....
LP02/C	.A.....C..T.G.....G.....T.....G.....G.....
LP02/P	.A.....C..T.G.....G.....T.....G.....G.....
LP01	.A.....C..T.G.....G.....T.....G.....C.G.....
NC_002532	421 TTGGCGATACCGCTGTACGCTTCACGCGTCCTTTATATCAGCTGAGGGGAAAGTGTACCC 480
LP02/R	C.....G..T.....C.....C.....C.....GA.T....
LP02/C	C.....G..T.....C.....C.....C.....GA.T....
LP02/P	C.....G..T.....C.....C.....C.....GA.T....
LP01G..T.....C.....C.....C.....A.T....
NC_002532	481 CGTAGACCCCGGACTCCCGGTTGCCGCCGTGGGCAATCG 519
LP02/RAA.....T.CT.....
LP02/CAA.....T.CT.....
LP02/PAA.....T.CT.....
LP01AA.....T.CT.....
11813	

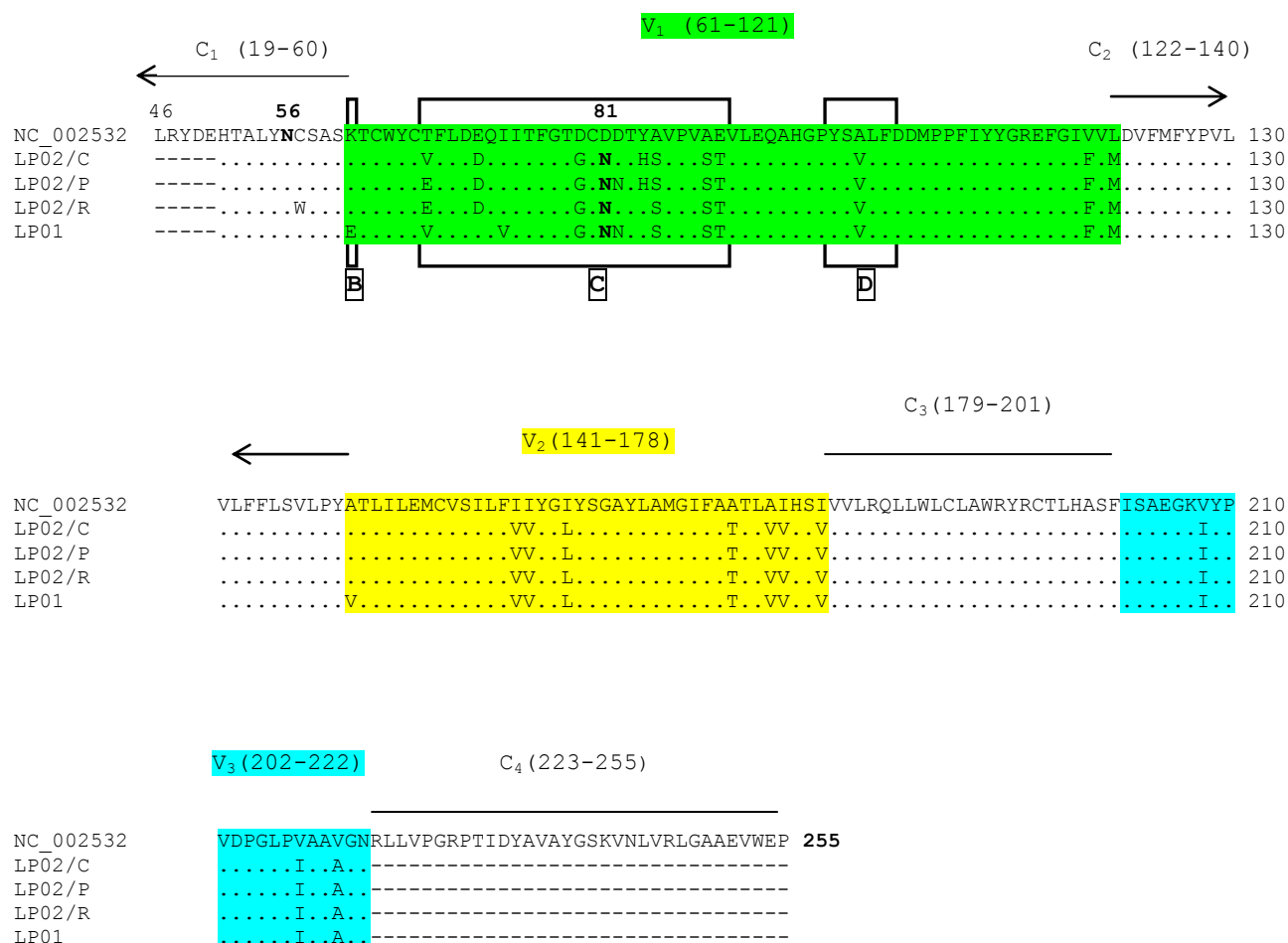
FIGURA 8: Alineamiento de parte de la secuencia de aminoácidos del ORF5 (172 de un total de 255 aminoácidos) de los cuatro aislamientos argentinos del virus de AVE con la cepa de referencia Bucyrus (Numero de Acceso GenBank NC_002532). La denominación de las cepas se indica a la izquierda. Los puntos indican identidad respecto a la cepa de referencia NC_002532 y los guiones ausencia de dato. En negrita se indica el número de aminoácido correspondiente de acuerdo a la secuencia NC_002532

NC_002532	46	LRYDEHTALYNCSASKTCWYCTFLDEQIITFGTDCDDTYAVPVAEVLEQAHGPYSALFDDMPPIYYGREFGIVVLDVFM	125
LP02/C	----V...D.....G.N..HS...ST.....V.....F.M....	
LP02/P	----E...D.....G.NN.HS...ST.....V.....F.M....	
LP02/R	----W.....E...D.....G.N...S...ST.....V.....F.M....	
LP01	----E....V....V.....G.NN..S...ST.....V.....F.M....	
NC_002532	126	FYPVLVLFFLSVLPYATLILEMCVSILFIIYGIYSGAYLAMGIFAATLAIHSIVVLRQLLWLCLAWRYRCTLHASFISAE	205
LP02/C	VV..L.....T..VV..V.....	
LP02/P	VV..L.....T..VV..V.....	
LP02/R	VV..L.....T..VV..V.....	
LP01	V.....VV..L.....T..VV..V.....	
NC_002532	206	GKVYPVDPGLPVAAVGNRLLVPGRPTIDYAVAYGSKVNLVRLGAAEVWEP	255
LP02/C		..I.....I..A..-----	
LP02/P		..I.....I..A..-----	
LP02/R		..I.....I..A..-----	
LP01		..I.....I..A..-----	

TABLA 3: Número de cambios nucleotídicos (diagonal superior) y aminoacídicos (diagonal inferior) sobre un total de 519 y 172 respectivamente, y porcentajes de identidad (entre paréntesis), entre las secuencias del ORF5 de los aislamientos Argentinos del VAE y la cepa de referencia Bucyrus NC_002532. Los valores de identidad se calcularon mediante el programa DNASTar.

	NC2532	LP01	LP02/R	LP02/C	LP02/P
NC2532	***	81 (84.39)	84 (83.81)	84 (83.81)	84 (83.81)
LP01	23 (86.62)	***	28 (94.60)	26 (94.99)	25 (95.18)
LP02/R	21 (87.79)	7 (95.93)	***	4 (99.22)	5 (99.03)
LP02/C	21 (87.79)	6 (96.51)	3 (98.25)	***	3 (99.42)
LP02/P	22 (87.20)	6 (96.51)	3 (98.25)	2 (98.83)	***

FIGURA 9: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del ORF5 de las cepas de VAE Argentinas en comparación con la cepa de referencia NC_002532, donde se indican las zonas variables (V_1 - V_3) y constantes (C_1 - C_4), así como los sitios involucrados en la neutralización (B-D) y los sitios probables de N-glicosilación (**N**).



El número de aminoácido correspondiente figura entre paréntesis. Regiones variables: **V₁ (61-121)**, **V₂ (141-178)**, y **V₃ (202-222)**. Regiones conservadas: C₁ (19-60); C₂ (122-140); C₃ (179-201) y C₄ (223-255) indicadas con barras o flechas. Sitios de glicosilación en negrita –asparagina- principal y altamente conservado (56) y uno variable (81) Sitios de neutralización mayores B (61) C (67-90) y D (99-104) indicados en rectángulos

El análisis de las secuencias de las cepas Argentinas se extendió a la comparación con las secuencias de las cepas de AVE elegidas del banco de datos, representantes de América y Europa. En la **Figura 10** se observa el alineamiento de parte de la secuencia de nucleótidos del ORF6 (411 nucleótidos) de los cuatro aislamientos de VAE de Argentina con la cepa de referencia Bucyrus NC_002532 y con las secuencias de América y Europa, denotadas en rojo y azul, respectivamente. Se observa que las sustituciones de nucleótidos en las cepas Argentinas se asemeja a las de las cepas Europeas, al igual que en las secuencias predichas de aminoácidos que se observan en la **Figura 11**. Los porcentajes mayores de identidad entre nucleótidos se encontraron entre las cepas Argentinas con cepas Europeas, a saber: para LP01 fueron de 97,6 con P1; para LP02/R de 97,8 con las cepas RQ, G1, BT-PA96 y R1; para LP02/C de 97,8 con G1 y para LP02/P de 98,1 también con G1. En cuanto a las identidades entre aminoácidos, coincidieron registrándose para LP01, el 100% con G1 y P1; y para las cepas LP02 el mismo porcentaje con RQ, BT-PA96 y R1 (**Tabla 4**).

Una situación equivalente ocurre al analizar todas las cepas, Argentinas, Americanas y Europeas entre sí en el ORF5 (**Figuras 12 y 13**). Las cepas Argentinas tienen prácticamente las mismas sustituciones aminoacídicas a excepción de LP01, especialmente en V_1 . LP02/R, LP02/C y LP02/P difieren entre sí en 3 aminoácidos en la misma región. Todas las cepas analizadas a excepción de la cepa NC_002532 tienen el sitio de glicosilación en el aminoácido 81. Para remarcar, en la zona variable V_1 se observa la sustitución del ácido glutámico por treonina en la posición 90 y que ese cambio es común a todas las cepas Europeas y Argentinas mientras que la serina sustituye a la alanina en la posición 85, común en todas las Europeas, en una Americana (KY93) y la Argentinas. Excepto para CW96, el ácido aspártico fue sustituido por valina en la posición 101 y por asparagina únicamente en KY93 en la posición 104. La leucina es sustituida por metionina en todas las Europeas y Argentinas en la

posición 121. En la zona V₂ se sustituye la isoleucina por valina en todas las Argentinas y Europeas (excepto en CW96) en posición 154 y por leucina en el aminoácido 158. En la posición 171 se sustituye la alanina por treonina en todas las cepas Argentinas y Europeas (excepto CW96). En la zona V₃ se sustituye la valina por isoleucina (aminoácido 208) en todas las cepas Argentinas y Europeas excepto en CW96.

Los porcentajes de identidad, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, mostraron que todas las cepas Argentinas se asemejan más a las Europeas; entre nucleótidos con la cepa A1 con valores de 97,3 con LP01 y LP02/C; 96,9 para LP02/R y 97,1 para LP02/P. Para aminoácidos, valores de 98,3 entre LP01 y G1 y de 98,3, 98,8 y 97,7 para LP02/R, LP02/C y LP02/P con la cepa A1 (**Tabla 5**).

Las diferencias y similitudes entre las secuencias analizadas se reflejan en los árboles filogenéticos de la **Figuras 14, 15, 16 y 17**. Los aislamientos LP02/R, LP02/P y LP02/C forman un mismo cluster (Bootstrap =95%), agrupándose con las cepas Europeas.

FIGURA 10: Alineamiento de parte de la secuencia de nucleótidos del ORF6 (411 nucleótidos) de los cuatro aislamientos AVE de Argentina con la cepa de referencia Bucyrus y con las secuencias obtenidas del banco de datos representantes de América (en rojo) y Europa (en azul). Los números en negrita indican la posición de los nucleótidos correspondientes al RNAm del ORF6 (GenBank NC_002532). La denominación de las cepas se indica a la izquierda. Los puntos indican identidad respecto a la cepa de referencia

	11914	
NC_002532	1	ATTTCATTTTGTGGTGACGGGATTTTAGGTGAGTATCTAGATTACTTTATTCTGTCCGTC 60
LP01		.C.....A...T.....T.....T.....
LP02/R		.C.....A.....T.....T.....
LP02/C		.C.....A.....T.....T.....
LP02/P		.C.....A.....T.....T.....
KY84		.C.....T.....T.....
CAN86	T.....T.....
PA76	T.....T.....
KY93		.C.....T.....T.....
KY77	T.....T.....
VBS53	T.....T.....
CA95G	T.....T.....T.....
D84		.C.....T.....T.....
E85		.C.....T.....T.....
CW96		.C..T.....A.....T.....T.....CT...T....
RQ		.C..G.....A.....T.....T.....
G1		.C.....A.....T.....T.....
BT-PA96		.C..G.....A.....T.....T.....
P1		.C..G.....A.....T.....T.....
R1		.C..G.....A.....T.....T.....
A1		.C..G.....A.....T.....T.....
NC_002532	61	CACCTCTTGCTGTTGCTTACTAGGTATGTAGCATCTGGGTTAGTGTATGTTTIGACTGCCT 120
LP01		...T...T..C..A.....G.....A..G.....AA.....T..
LP02/R		...T...T..C.AA.....G.....A..G..A....GA.....T..
LP02/C		...T...T...AA.....G.....A..G..A....GA.....T..
LP02/P		...T...T..C.AA.....G.....A..G..A....GA.....T..
KY84		...T..A.....C.....C.....
CAN86		...AT.....
PA76		...AT.....
KY93		...T..A.....C...C.....C.....
KY77		...T..A.....C.....C.....
VBS53		...T..AT.....C.....G.....
CA95G		...T..A.....C.....C.....
D84		...T..A.....C.....C.....
E85		...T..A.....C.....
CW96		...T...T..C.AA.....A.....GA.....TC
RQ		...T...T..C.AA.....G.....A..G..A...C..GA.....T..
G1		...T...T..C.AA.....G.....A..G..A...C..GA.....T..
BT-PA96		...T...T..C.AA.....G.....A..G..A...C..GA.....T..
P1		...T...T..C.AA.....G.....A..G..A...C..GA.....T..
R1		...T...T..C.AA.....G.....A..G..A...C..GA.....T..
A1		...T...T..C.AA.....G.....A..G..A...C..GA.....T..

```

NC_002532 121 TGTTCTATTCCCTTTGTATTAGCAGCTTATATTTGGTTTGTATAGTTGGAAGAGCCTTTT 180
LP01          ....T....T....G.....G..T...
LP02/R        ....T.....G.....T..C.
LP02/C        ....T....T....G.....T..C.
LP02/P        ....T.....G.....T..C.
KY84          .....TC..G.....
CAN86         .....TC..G.....A.....
PA76          .....TC..G.....C.....C
KY93          .....TC..G.....
KY77          .....TC..G.....
VBS53         .....
CA95G        ....T....TC..G.....C.
D84           .....TC..G.....
E85           .....TC..G.....
CW96          .....AC..G.....C.....T...
RQ            ....T..C.....G.....G..T...
G1            ....T..C.....G.....G..T...
BT-PA96       ....T..C.....G.....G..T...
P1            ....T..C.....G.....G..T...
R1            ....T..C.....G.....G..T...
A1            ....T..C.....G.....G..T...

```

```

NC_002532 181 CTACTGCTTATGCTTTTGTGCTTTTGGCTGCTTTTCTGTTATTAGTAATGAGGATGATTG 240
LP01          .C....C.....AC.....C....T...A..A.....
LP02/R        .....T.GC.....C....T...A..A.....
LP02/C        .....GC.....C....T...A..A.....
LP02/P        .....GC.....C....T...A..A.....
KY84          ..GT.....CT.A.....G.....
CAN86         .....T....C..A.....G.....
PA76          ....T.....A.....G.....
KY93          ..GT.....A.....C..A.....G.....
KY77          ..GT.....C.....C..A.....G.....
VBS53         .....
CA95G        .....A.....G.....C.
D84           ..GT.....CT.A.....G.....
E85           ..GT.....CT.A.....G.....
CW96          .....T..C.....C...A..A..A..A
RQ            .....C.....T.AC.....C....T...A..A.....
G1            .....C.....AC.....C....T...A..A.....
BT-PA96       .....C.....T.AC.....C....T...A..A.....
P1            .....C.....AC.....C....T...A..A.....
R1            .....C.....T.AC.....C....T...A..A.....
A1            ...A..C.....AC.....C....T...A..A.....

```

```

NC_002532 241 TGGGTATGATGCCTCGTCTTCGGTCCATTTTCAACCATCGCCAACTGGTGGTAGCTGATT 300
LP01          .A...G..T.....GT..T..C....G.....
LP02/R        .A...G..T.....GT..T..C.....
LP02/C        .A...G..T.....GT..T..C.....
LP02/P        .A...G..T.....GT..T..C.....
KY84          .A...G.A..A.....C.....
CAN86         .A.....T.....
PA76          .A.....
KY93          .A...G.A..A.....T.....
KY77          .A...G...A.....C.....T.....
VBS53         .A.....
CA95G        .A.....T.....
D84           .A...G.A..A.....C.....
E85           .A...G.A..A.....C.....T.....T.....
CW96          .A...G..T.....GT....C..T...T.....
RQ            .A...G..T.....GT..T..C....G.....
G1            .A...G..T.....GT..T..C.....
BT-PA96       .A...G..T.....GT..T..C....G.....
P1            .A...G..T.....GT..T..C....G.....
R1            .A...G..T.....GT..T..C....G.....
A1            .A...G..T.....GT..T..C....G.....

```

NC_002532	301	TTGTGGACACACCTAGTGGACCTGTTCCCATCCCCGCTCAACTACTCAGGTAGTGGTTC	360
LP01	C.....C.....	
LP02/R	C.....C..T.....	
LP02/C	C.....C..T.....	
LP02/P	C.....C..T.....	
KY84	C.....T.C.....	
CAN86	C.....C.....	
PA76	C.....	
KY93	C.....T.C.....	
KY77	C.....T.C.....	
VBS53	A.....	
CA95G	C.....C.....	
D84	C.....T.C.....	
E85	C.....T.C.....	
CW96	C.....	
RQ	C.....C..T.....	
G1	C.....C.....	
BT-PA96	C.....C..T.....	
P1	C.....C.....	
R1	C.....C..T.....	
A1	C.....C.....	

NC_002532	361	GCGGCAACGGGTACACCGCAGTTGGTAACAAGCTTGTCGATGGCGTCAAGA	411
LP01	A.....	
LP02/R		...T.....A.....	
LP02/C		...T.....A.....	
LP02/P		...T.....A.....	
KY84		...T.....G..T.....A.....	
CAN86		...T.....T.....	
PA76		...T.....C.....	
KY93	A.....	
KY77		...T.....T.....A.....	
VBS53		
CA95G	T.....	
D84		...T.....G..T.....A.....	
E85		...T.....G..T.....A.....	
CW96	C.....	
RQ	A.....	
G1		...T.....A.....	
BT-PA96	A.....	
P1	A.....	
R1	A.....	
A1	A.....	

12324

FIGURA 11: Alineamiento de parte de la secuencia de aminoácidos del ORF6 (136 de un total de 162 aminoácidos) de los cuatro aislamientos argentinos de AVE con la cepa de referencia Bucyrus (Numero de Acceso GenBank NC_002532) y con las secuencias obtenidas del banco de datos representantes de América (en rojo) y Europa (en azul). La denominación de las cepas se indica a la izquierda. Los puntos indican identidad respecto a la cepa de referencia NC_002532. En negrita se indica el número de aminoácido correspondiente de acuerdo a la secuencia NC_002532

	6		
NC_002532	1	SFCGDGILGEYLDYFILSVPLLLLLTRYVASGLVYVLTALFYSFVLAAYIWFVIVGRAFSTAYAFVLLAA	70
LP01	I.....M.....	
LP02/R	I.....M.....	
LP02/C	I.....M.....	
LP02/P	I.....M.....	
KY84	L.....V.....	
CAN86	L.....T.....V.....	
PA76	L.....PI.....	
KY93	H.....L.....V.....	
KY77	L.....V.....	
VSB53	L.....	
CA95G	L.....	
D84	L.....V.....	
E85	L.....V.....	
CW96	I.....M.....L.....	
RQ	I.....M.....	
G1	I.....M.....	
BT-PA96	I.....M.....	
P1	I.....M.....	
R1	I.....M.....	
A1	I.....M.....N.....	
NC_002532	71	FLLLVMRMIVGMMPLRSIFNHRQLVVADFVDTPSGPVPIPRSTTQVVVRNGYTAVGNKLVDGVK	136
LP01		...LI...VL...C.....	
LP02/R		...LI...VL...C.....S.....	
LP02/C		...LI...VL...C.....S.....	
LP02/P		...LI...VL...C.....S.....	
KY84	VI.....S.....I.....	
CAN86		
PA76		
KY93	VI.....S.....I.....	
KY77	VI.....S.....I.....	
VSB53	I.....	
CA95G		
D84	VI.....S.....I.....	
E85	VI.....S.....I.....	
CW96		...AI.I.I.VL...C.....	
RQ		...LI...VL...C.....S.....	
G1		...LI...VL...C.....	
BT-PA96		...LI...VL...C.....S.....	
P1		...LI...VL...C.....	
R1		...LI...VL...C.....S.....	
A1		...LI...VL...C.....	

TABLA 4: Porcentajes de identidad de a pares de secuencias de nucleótidos (diagonal superior) y aminoácidos (diagonal inferior) entre las secuencias del ORF6 de los aislamientos Argentinos del VAE y cepas Americanas y Europeas. La identidad se calculó mediante el programa DNASTar. Resaltados en amarillo y verde, se indican los mayores porcentajes de identidad de nucleótidos y aminoácidos respectivamente, entre las cepas Argentinas y Europeas

	NC2532	LP01	LP02/R	LP02/C	LP02/P	KY84	CAN86	PA76	KY93	KY77	VBS53	CA95G	D84	E85	CW96	RQ	G1	BTPA96	P1	R1	A1	
NC2532	***	90.5	90.3	90.8	91.0	93.2	95.6	96.1	93.9	93.4	99.5	94.9	93.2	92.9	90.5	89.3	90.8	89.3	89.8	89.3	89.5	NC2532
LP01	94.9	***	96.4	96.4	96.1	88.6	90.5	90.0	89.3	89.3	90.5	91.2	88.6	88.8	92.2	97.1	97.1	97.1	97.6	97.1	97.3	LP01
LP02/R	94.1	99.3	***	99.0	99.3	87.8	89.8	89.3	88.1	89.1	90.3	90.5	87.8	88.1	92.0	97.8	97.8	97.8	97.3	97.8	97.1	LP02/R
LP02/C	94.1	99.3	100.0	***	99.3	88.3	90.3	89.8	88.6	89.5	90.8	91.0	88.3	88.6	91.7	96.8	97.8	96.8	96.8	96.8	96.6	LP02/C
LP02/P	94.1	99.3	100.0	100.0	***	88.1	90.0	89.5	88.3	89.3	91.0	90.3	88.1	88.3	92.2	97.1	98.1	97.1	97.1	97.1	96.8	LP02/P
KY84	95.6	92.6	91.9	91.9	91.9	***	95.1	95.1	97.8	98.3	93.2	94.4	100.0	99.3	88.6	86.4	87.3	86.4	86.9	86.4	86.9	KY84
CAN86	97.8	92.6	91.9	91.9	91.9	94.9	***	97.6	95.9	95.9	95.6	97.3	95.1	95.4	90.3	88.3	89.3	88.3	88.8	88.3	88.6	CAN86
PA76	97.8	92.6	91.9	91.9	91.9	95.6	97.1	***	95.4	95.4	96.1	96.4	95.1	94.9	89.8	87.8	88.8	87.8	88.3	87.8	88.3	PA76
KY93	94.9	91.9	91.2	91.2	91.2	99.3	94.1	92.1	***	98.1	93.9	95.6	97.8	97.6	88.6	87.1	87.6	87.1	87.6	87.1	87.6	KY93
KY77	95.6	92.6	91.9	91.9	91.9	100.0	94.9	95.6	99.3	***	93.4	95.1	98.3	98.1	88.1	87.6	88.6	87.6	88.1	87.6	88.1	KY77
VBS53	99.3	94.1	93.4	93.4	93.4	94.9	97.1	97.1	94.1	94.9	***	94.9	93.2	92.9	90.5	89.3	90.8	89.3	89.8	89.3	89.5	VBS53
CA95G	99.3	94.1	93.4	93.4	93.4	96.3	98.5	98.5	95.6	96.3	98.5	***	94.4	94.6	89.5	89.1	89.5	89.1	89.5	89.1	89.3	CA95G
D84	95.6	92.6	91.9	91.9	91.9	100.0	94.9	95.6	99.3	100.0	94.9	96.3	***	99.3	88.6	86.4	87.3	86.4	86.9	86.4	86.9	D84
E85	95.6	92.6	91.9	91.9	91.9	100.0	94.9	95.6	99.3	100.0	94.9	96.3	100.0	***	89.3	86.6	87.6	86.6	87.1	86.6	87.1	E85
CW96	92.6	97.1	96.3	96.3	96.3	91.9	91.9	91.9	91.2	91.9	91.9	93.4	91.9	91.9	***	91.2	91.5	91.2	91.7	91.2	91.5	CW96
RQ	94.1	99.3	100.0	100.0	100.0	91.9	91.9	91.9	91.2	91.9	93.4	93.4	91.9	91.9	96.3	***	98.1	100.0	99.5	100.0	99.3	RQ
G1	94.9	100.0	99.3	99.3	99.3	92.6	92.6	92.6	91.9	92.6	94.1	94.1	92.6	92.6	97.1	99.3	***	98.1	98.5	98.1	98.3	G1
BT-PA96	94.1	99.3	100.0	100.0	100.0	91.9	91.9	91.9	91.2	91.9	93.4	93.4	91.9	91.9	96.3	100.0	99.3	***	99.5	100.0	99.3	BT-PA96
P1	94.9	100.0	99.3	99.3	99.3	92.6	92.6	92.6	91.9	92.6	94.1	94.1	92.6	92.6	97.1	99.3	100.0	99.3	***	99.5	99.8	P1
R1	94.1	99.3	100.0	100.0	100.0	91.9	91.9	91.9	91.2	91.9	93.4	93.4	91.9	91.9	96.3	100.0	99.3	100.0	99.3	***	99.3	R1
A1	94.1	99.3	98.5	98.5	98.5	92.6	91.9	92.6	91.9	92.6	93.4	93.4	92.6	92.6	96.3	98.5	99.3	98.5	99.3	98.5	***	A1
	NC2532	LP01	LP02/R	LP02/C	LP02/P	KY84	CAN86	PA76	KY93	KY77	VBS53	CA95G	D84	E85	CW96	RQ	G1	BTPA96	P1	R1	A1	

FIGURA 12: Alineamiento de parte de la secuencia de nucleótidos del ORF5 (519 nucleótidos) de los cuatro aislamientos Argentinos de AVE con la cepa de referencia Bucyrus y con las secuencias obtenidas del banco de datos representantes de América (en rojo) y Europa (en azul). Los números en negrita indican la posición de los nucleótidos correspondientes al RNAm del ORF6 (GenBank NC_002532). La denominación de las cepas se indica a la izquierda. Los puntos indican identidad respecto a la cepa de referencia

	11295	
NC_002532	1	GCACACTGCTTTGTACAATTGTTCCGCCAGTAAACCTGTTGGTATTGCACATTCCTGGA 60
LP01	CC.....C.....CG.....C.....GTG...T...
LP02/R	A..CC.....G.....C..G.....C.....C...GAG...T...
LP02/C	A..CC.....C.....C..G.....C.....C...GTG...T...
LP02/P	A..CC.....C.....C..G.....C.....C...GAG...T...
KY84	A.....T.....C.....T.....A...
CAN86	C.....CG.....C.....A...
PA76	T.....T.....C..G.....
KY93	A.....T.....G.....A...
KY77	A.....T.....T.....A...
VBS53	G.....C..T.....A...
CA95G	C.....G.....C..T.....A...
D84	A.....T.....C.....T.....A...
E85	A.....T.....C.....T.....A...
CW96		..T....CC.....C.....GTGA..C.....T...
RQ	CC.....C.....C..C.....C.....GTG...T...
G1	CC.....C.....C.....C.....AG...T...
BT-PA96	CC.....C.....C..C.....C.....GTG...T...
P1	CC.....C.....C.....C.....GAG...T...
R1	CC.....C.....C..C.....C.....GTG...T...
A1	CC.....C.....C.....C.....GTG...T...
NC_002532	61	CGAACAGATTATCACGTTTGAACCGATTGTGATGACACCTACGCGGTCCCAGTTGCTGA 120
LP01	G.C.....A.....G..T.GC...A..A.....TT.T.....T.CAC
LP02/R		...C....C.....A.....G..T.GC...A.....T.T.....T.CAC
LP02/C		...C....C.....A.....G..T.GC...A.....C..T.T.....T.CAC
LP02/P		...C....C.....A.....G..T.GC...A..A.....C..T.T.....T.CAC
KY84	C.....A.....A.....T.....T
CAN86	G.C.....G.....A.....C.....CT...T
PA76		...C.....A.....A.....C.....T...T
KY93	G.....C.....A.....A.....T.....T...T
KY77	G.....C.....A.....T.....T
VBS53	A.....
CA95G	C.....G.....A..A.....C.....CT...T
D84	C.....A.....A.....T.....T
E85	G.....C.....A.....A.....C.T.....T
CW96		T.....G.....G..T.G...A.....T.TTT.A....G...T...T
RQ	C.....A.....G..T.GC...A.....T.T.....T.CAC
G1		T.....G.C.....A.....G..T.GC...A..A.....T.T.....T.CAC
BT-PA96	C.....A.....G..T.GC...A.....T.T.....T.CAC
P1	C.....A.....G..T.GC...A.....T.T.....T.CAC
R1	C.....A.....G..T.GC...A.....T.T.....T.CAC
A1	C.....A.....G..T.GC...A.....T.T.....T.CAC

```

NC_002532 121 GGTCCTGGAACAGGCGCATGGACCGTACAGTGCCTGTTTGTATGACATGCCCCCTTTTAT 180
LP01 A...T...G...T...G...T...T...C...
LP02/R A..TT...G...T...G...T...T...
LP02/C A..TT...G...T...G...T...T...
LP02/P A..TT...G...T...G...T...T...
KY84 ...TT...T...C...
CAN86 ...T...G...T...C...
PA76 ...T...A...C...
KY93 ...TT...T...A...C...
KY77 ...T...C...
VBS53 ...T...
CA95G ...TT...G...T...C...
D84 ...TT...T...C...
E85 ...TT...T...C...
CW96 ...G..A..A...G...A...
RQ A..TT...G...C...G...T...C...
G1 A..TT...G...C...G..A...T...C...
BT-PA96 A..TT...G...C...G...T...C...
P1 A..TT...G...C...G...T...C...
R1 A..TT...G...C...G...T...C...
A1 A..TT...G...T...G...T...C...

```

```

NC_002532 181 TTACTATGGCCGTGAATTCGGCATAGTTGTGTTGGATGTGTTTATGTTCTATCCCGTTTT 240
LP01 .....C.....T..T..T...A.....T...A...
LP02/R C.....G..T..T..T...A.....T...A...
LP02/C C.....G..T..T..T...A.....T...A...
LP02/P C.....G..T..T..T...A.....T...A...
KY84 C.....T...T..A.....T..C...
CAN86 ...T.....T.....T.....T...
PA76 .....C...T.....C..T...
KY93 .....T.....T..A.....T..C..T...C...
KY77 .....T.....T..A.....T..C...
VBS53 .....
CA95G ...T.....T...T.....T...
D84 C.....T.....T..A.....T..C...
E85 C.....T.....T..A.....T..C...
CW96 .....G.....CT...TA.....T...A...
RQ .....G..T...T...A.....T...A...
G1 .....T...G..T...T...A.....T...A...
BT-PA96 .....G..T...T...A.....T...A...
P1 ...T.....G..T...T...A.....T...A...
R1 .....G..T...T...A.....T...A...
A1 .....G..T...T...A.....T...A...

```

```

NC_002532 241 AGTTCTGTTTTCTTATCAGTACTACCCTATGCTACGCTTATTCTTGAAATGTGTGTATC 300
LP01 G...T.....G.....T.G..T...T...A.....G.....G..
LP02/R ...T.....G.....T.G..T...C..A.....G.....T..
LP02/C ...T.....G.....T.G..T...C..A.....G.....T..
LP02/P ...T.....G.....T.G..T...C..A.....G.....T..
KY84 .....A.....T...T.....AT.....CT...
CAN86 ...T.....GT...T.....
PA76 .....T...
KY93 .....A.....T...A.....AT.....CTA...
KY77 .....T.....AT.....
VBS53 .....
CA95G ...T.....GT.G..T.....C...
D84 .....A.....T...T.....AT.....CT...
E85 ...T..A.....TT...T.....AT.....CT...
CW96 ...T.....G..T...T...T...A.....
RQ ...T.....G...T.G..T...C..A.....G.....G..
G1 ...T.....G...T.G..T...A.C..A.....G.....G..
BT-PA96 ...T.....G...T.G..T...C..A.....G.....G..
P1 ...T.....G...T.G..T...TC..A.....G.....G..
R1 ...T.....G...T.G..T...C..A.....G.....G..
A1 ...T.....G...T.G..T...C..A.....G.....G..

```

NC_002532 301 TATTCTGTTTATAATCTATGGCATTACAGCGGGGCCTACTTGGCCATGGGCATATTTGC 360
 LP01T.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A..T.....A.....
 LP02/R C...T.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A.....A.....
 LP02/C C...T.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A.....A.....
 LP02/PT.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A.....A.....
 KY84T.....G.....T.....
 CAN86G.....T.....
 PA76T.....
 KY93T.....G.....T.....
 KY77G.....T.....
 VBS53
 CA95GA.....T.....
 D84T.....G.....T.....
 E85G.....T.....
 CW96 .G..T...C..T.....T...T..T..A...T.....C.....
 RQT.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A.....A.....
 G1T.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A.....A.....
 BT-PA96T.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A.....A.....
 P1 .G..T...G..G.....C.....T..A..T..T..A.....A.....
 R1T.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A.....A.....
 A1T.....G.GG.....C.....T..A..T..T..A.....A.....

NC_002532 361 GGCCACGCTTGCTATACATTCAATTGTGGTCTCCGCCAATTACTGTGGTTATGCCTGGC 420
 LP01 .A.....C.T.G.....G.....G.....C.G.....
 LP02/R .A.....C.T.G.....GG.....T.....G.....G.....
 LP02/C .A.....C.T.G.....G.....T.....G.....G.....
 LP02/P .A.....C.T.G.....G.....T.....G.....G.....
 KY84C.T.....G.....T.....G.....C.G...T....
 CAN86G.....T.....G.....T.....
 PA76C.....G.....G.....G.....
 KY93CAT.....G.....A.....G.....C.G...T....
 KY77C.T.....G.....T.....G.....C.G...T....
 VBS53
 CA95GG.....T.....GT.....T....
 D84C.T.....G.....T.....G.....C.G...T....
 E85C.T.....G.....T.....G.....C.G...T....
 CW96A..AAT.....T.....T..T.....GT.....C.G...T....
 RQ .A.....C.T.G.....G.....G.....G.....
 G1 .A.....C.T.G.....G.....G.....G.....
 BT-PA96 .A.....C.T.G.....G.....G.....G.....
 P1 .A.....C.T.G.....G.....G.....G.....
 R1 .A.....C.T.G.....G.....G.....G.....
 A1 .A.....C.T.G.....G.....G.....G.....

NC_002532 421 TTGGCGATACCGCTGTACGCTTCACGCGTCCTTTATATCAGCTGAGGGGAAAGTGTACCC 480
 LP01G..T.....C.....C.....A.T.....
 LP02/R C.....G..T.....C.....C.....GA.T.....
 LP02/C C.....G..T.....C.....C.....GA.T.....
 LP02/P C.....G..T.....C.....C.....GA.T.....
 KY84C.....C..T.....A.....T....
 CAN86C.....T.....G.....
 PA76T.....T.....
 KY93C.....C..T.....A.....T....
 KY77C.....C..T.....
 VBS53
 CA95GC.....G..T.....G.....
 D84C.....C..T.....A.....T....
 E85C.....C..T.....A.....T....
 CW96 C.....T..T..C.....C.....A.....
 RQ C.....G..T.....C.....C.....A.T.....
 G1 C.....G..T.....C.....C.....A.T.....
 BT-PA96 C.....G..T.....C.....C.....A.T.....
 P1 C.....G..T.....C.....C.....A.T.....
 R1 C.....G..T.....C.....C.....A.T.....
 A1 C.....G..T.....C.....C.....A.T.....


```

NC_002532 481 CGTAGACCCCGGACTCCCGGTTGCCGCCGTGGGCAATCG 519
LP01 .....AA.....T.CT.....
LP02/R .....AA.....T.CT.....
LP02/C .....AA.....T.CT.....
LP02/P .....AA.....T.CT.....
KY84 .....A.....
CAN86 .....C.....A.....
PA76 .....A.....T.....
KY93 .....
KY77 .....T.....A.....T.....
VBS53 .....C.....
CA95G .....C.....A.....
D84 .....A.....
E85 .....A.....
CW96 ...T.....A.....T..C.....
RQ .....CA.....T.CT.....
G1 .....AA.....T.CT.....
BT-PA96 .....CA.....T.CT.....
P1 .....AA.....T.CT.....
R1 .....CA.....T.CT.....
A1 .....AA.....T.CT.....
11813

```

FIGURA 13: Alineamiento de parte de la secuencia de aminoácidos del ORF5 (172 de un total de 255 aminoácidos) de los cuatro aislamientos Argentinos de AVE con la cepa de referencia Bucyrus (Numero de Acceso GenBank NC_002532) y con las secuencias obtenidas del banco de datos representantes de América (en rojo) y Europa (en azul). La denominación de las cepas se indica a la izquierda. Los puntos indican identidad respecto a la cepa de referencia NC_002532. En negrita se indica el número de aminoácido correspondiente de acuerdo a la secuencia NC_002532

	51	
NC_002532	1	HTALYNCSASKTCWYCTFLDEQIITFGTDCDDTYAVPVAEVLEQAHGPPYSALFDDMPPFI 60
LP01	E.....V.....V.....G.NN..S...ST.....V.....
LP02/R	W.....E.....D.....G.N..S...ST.....V.....
LP02/C	V.....D.....G.N..HS...ST.....V.....
LP02/P	E.....D.....G.NN.HS...ST.....V.....
KY84	Q.....N.N.....V.....V.....
CAN86	E.....V.....G.N..H...SV.....V.....
PA76	A.....D.....NN.H...SV.....V.....
KY93	E.....V.....N.N..S...SV.....V.N.....
KY77	V.....N.....V.....V.....
VBS53	N.....V.....
CA95G	E.....G.NN.H...SV.....V.....
D84	Q.....N.N.....V.....V.....
E85	Q.....V.....N.N..H...V.....V.....
CW96	VD.....V.....G.N..FS...SV.....T.....
RQ	N.....V.....G.N..S...ST.....V.....
G1	K.....V.....G.NN..S...ST.....V.....
BT-PA96	N.....V.....G.N..S...ST.....V.....
P1	E.....G.N..S...ST.....V.....
R1	N.....V.....G.N..S...ST.....V.....
A1	V.....G.N..S...ST.....V.....
NC_002532	61	YYGREFGIVVLDVFMFYPVLVLFLLSVLPYATLILEMCVSILFIIYGIYSGAYLAMGIFA 120
LP01	F.M.....V.....VV..L.....
LP02/R	F.M.....VV..L.....
LP02/C	F.M.....VV..L.....
LP02/P	F.M.....VV..L.....
KY84	L.....F..L.....V.....
CAN86	F.....F.....V.....
PA76	L.....F..L.....V.....
KY93	L.....F.....V.....
KY77	L.....F.....V.....
VBS53	F.....
CA95G	F.....
D84	L.....F..L.....V.....
E85	L.....F..L.....V.....
CW96	F.M.....V.....
RQ	F.M.....VV..L.....
G1	F.M.....T.....VV..L.....
BT-PA96	F.M.....VV..L.....
P1	F.M.....V.....V..L.....
R1	F.M.....VV..L.....
A1	F.M.....VV..L.....
NC_002532	121	ATLAIHSIVVLRQLLWLCLAWRYRCTLHASFISAEGKVYPVDPGLPVAAVGN 172
LP01		T..VV..V.....I.....I..A..
LP02/R		T..VV..V.....I.....I..A..
LP02/C		T..VV..V.....I.....I..A..
LP02/P		T..VV..V.....I.....I..A..
KY84		..V..V.....I.....
CAN86		..V.....M.....
PA76		..I.....I.....
KY93		..I..V.....
KY77		..V..V.....S...I....
VBS53	A.....
CA95G		..V.....M.....
D84		..V..V.....I.....
E85		..V..V.....I.....
CW96		..I.....F.....I..VA..
RQ		T..VV..V.....I.....I..A..
G1		T..VV..V.....I.....I..A..
BT-PA96		T..VV..V.....I.....I..A..
P1		T..VV..V.....I.....I..A..
R1		T..VV..V.....I.....I..A..
A1		T..VV..V.....I.....I..A..

TABLA 5: Porcentajes de identidad de a pares de secuencias de nucleótidos (diagonal superior) y aminoácidos (diagonal inferior) entre las secuencias del ORF5 de los aislamientos Argentinos del VAE y cepas Americanas y Europeas. La identidad se calculó mediante el programa DNASTar. Resaltados en amarillo y verde, se indican los mayores porcentajes de identidad de nucleótidos y aminoácidos respectivamente, entre las cepas Argentinas y Europeas

	NC2532	LP01	LP02/R	LP02/C	LP02/P	KY84	CAN86	PA76	KY93	KY77	VBS53	CA95G	D84	E85	CW96	RQ	G1	BTPA96	P1	R1	A1	
NC2532	***	84.4	83.8	83.8	83.8	91.5	93.1	95.0	90.6	93.3	99.4	92.1	91.5	90.9	85.5	85.4	84.6	85.4	85.2	85.4	85.5	NC2532
LP01	86.6	***	94.6	95.0	95.2	84.2	85.5	85.4	84.2	85.7	85.0	85.0	84.2	84.4	85.5	96.7	96.3	96.7	96.5	96.7	97.3	LP01
LP02/R	87.8	95.9	***	99.2	99.0	83.4	84.6	84.8	82.9	84.0	84.4	84.4	83.4	83.2	84.0	96.5	95.6	96.5	96.1	96.5	96.9	LP02/R
LP02/C	87.8	96.5	98.3	***	99.4	83.4	85.0	85.2	82.9	84.0	84.4	84.8	83.4	83.6	84.0	96.9	95.6	96.9	96.1	96.9	97.3	LP02/C
LP02/P	87.2	96.5	98.3	98.8	***	83.4	85.0	85.5	82.9	84.0	84.4	85.2	83.4	83.6	84.0	96.7	96.1	96.7	96.3	96.7	97.1	LP02/P
KY84	93.0	89.0	89.5	89.5	89.0	***	90.8	91.7	96.5	97.1	91.7	90.8	100.0	99.0	83.6	84.6	83.8	84.6	84.0	84.6	84.8	KY84
CAN86	93.0	90.7	89.5	90.7	90.1	89.2	***	92.9	90.9	92.1	93.3	97.9	90.8	91.7	84.6	85.7	85.4	85.7	85.9	85.7	85.9	CAN86
PA76	94.8	88.4	89.5	90.7	91.3	92.4	93.6	***	90.6	93.8	95.2	92.3	91.7	91.5	84.0	85.9	85.2	85.9	85.7	85.9	86.1	PA76
KY93	91.3	89.5	88.4	88.4	87.8	95.9	92.4	90.7	***	95.0	90.8	90.4	96.5	96.3	83.8	84.4	84.4	84.4	83.8	84.4	84.6	KY93
KY77	93.6	89.5	89.5	89.5	89.0	94.9	89.8	93.0	94.8	***	93.4	91.3	97.1	96.9	85.2	85.5	85.2	85.5	85.0	85.5	85.7	KY77
VBS53	98.3	88.4	89.5	89.5	89.0	91.5	92.0	95.3	91.9	92.0	***	92.3	91.7	91.1	85.7	85.9	85.2	85.9	85.7	85.9	86.1	VBS53
CA95G	93.6	90.7	89.5	90.7	91.3	89.8	96.0	95.3	91.9	89.2	92.6	***	90.8	91.3	84.2	85.5	85.2	85.5	85.7	85.5	85.7	CA95G
D84	93.0	89.0	89.5	89.5	89.0	100.0	91.3	92.4	95.9	97.1	93.6	91.9	***	99.0	83.6	84.6	83.8	84.6	84.0	84.6	84.8	D84
E85	91.9	89.0	88.4	89.5	89.0	98.8	92.4	92.4	95.9	97.1	92.4	91.9	98.8	***	83.8	84.4	84.0	84.4	83.8	84.4	84.6	E85
CW96	89.5	89.0	88.4	89.0	88.4	89.0	91.9	90.1	90.1	89.5	90.7	91.3	89.0	89.5	***	85.9	85.7	85.9	85.9	85.9	85.9	CW96
RQ	88.4	97.7	97.7	98.3	97.1	88.6	88.6	89.0	89.5	88.1	88.1	88.6	90.7	89.5	89.5	***	98.1	100.0	98.7	100.0	99.4	RQ
G1	87.2	98.3	96.5	96.5	97.1	89.0	90.1	89.0	89.0	90.1	89.0	90.1	89.0	89.0	89.0	97.1	***	98.1	97.9	98.1	98.3	G1
BT-PA96	88.4	97.7	97.7	98.3	97.1	90.7	90.7	89.0	89.5	90.1	90.1	90.7	90.7	89.5	89.5	100.0	97.1	***	98.7	100.0	99.4	BT-PA96
P1	88.4	96.5	97.1	96.5	96.5	89.0	90.1	89.0	87.8	89.0	90.1	90.1	89.0	87.8	90.1	97.1	96.5	97.1	***	98.7	98.8	P1
R1	88.4	97.7	97.7	98.3	97.1	90.7	90.7	89.0	89.5	90.1	90.1	90.7	90.7	89.5	89.5	100.0	97.1	100.0	97.1	***	99.4	R1
A1	89.0	97.7	98.3	98.8	97.7	90.7	90.7	89.5	89.5	90.7	90.7	90.7	90.7	89.5	89.5	99.4	97.7	99.4	97.7	99.4	***	A1

FIGURA 14: Árbol filogenético de las secuencias del ORF6 que muestra las relaciones nucleotídicas entre los aislamientos argentinos del VAE, la cepa de referencia Bucyrus NC_002532 y las cepas representantes de Europa y América. Los números sobre las ramas indican los valores del test de *Bootstrap* (con 1000 iteraciones) para ese nodo.

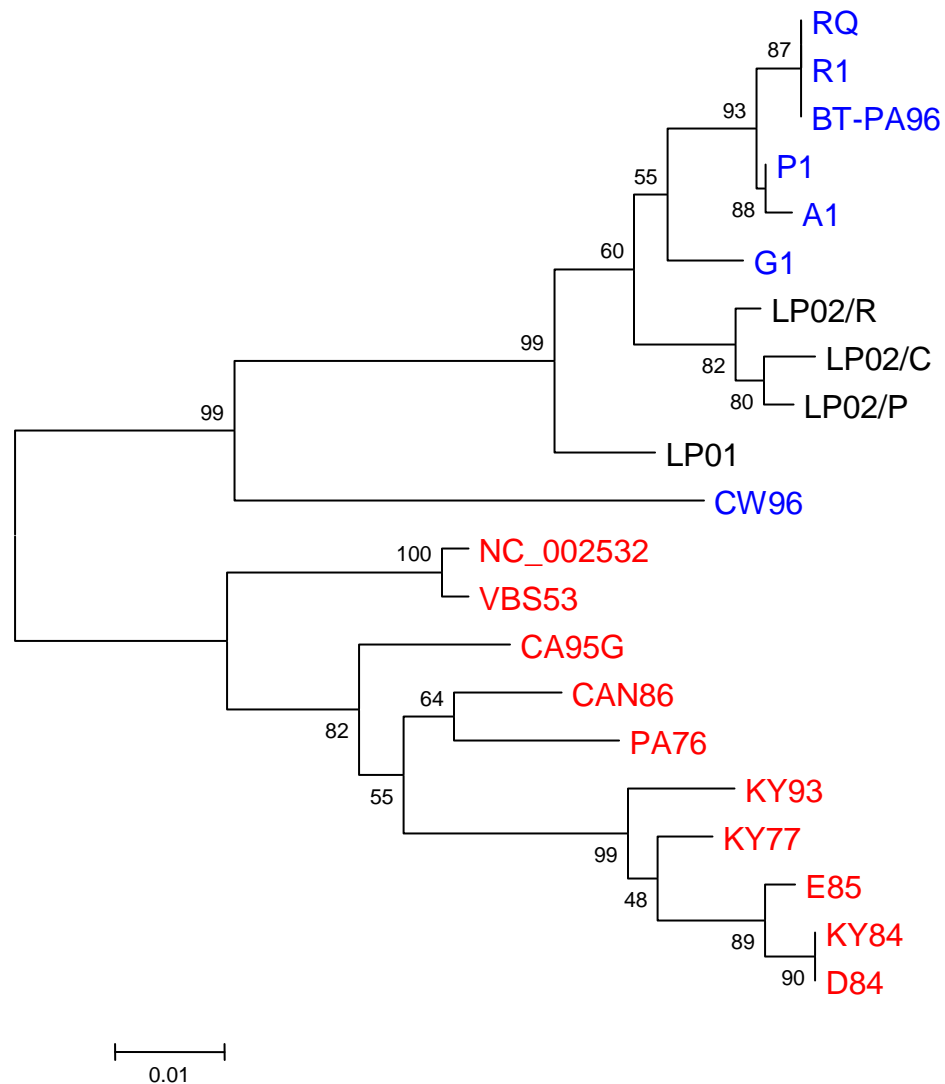
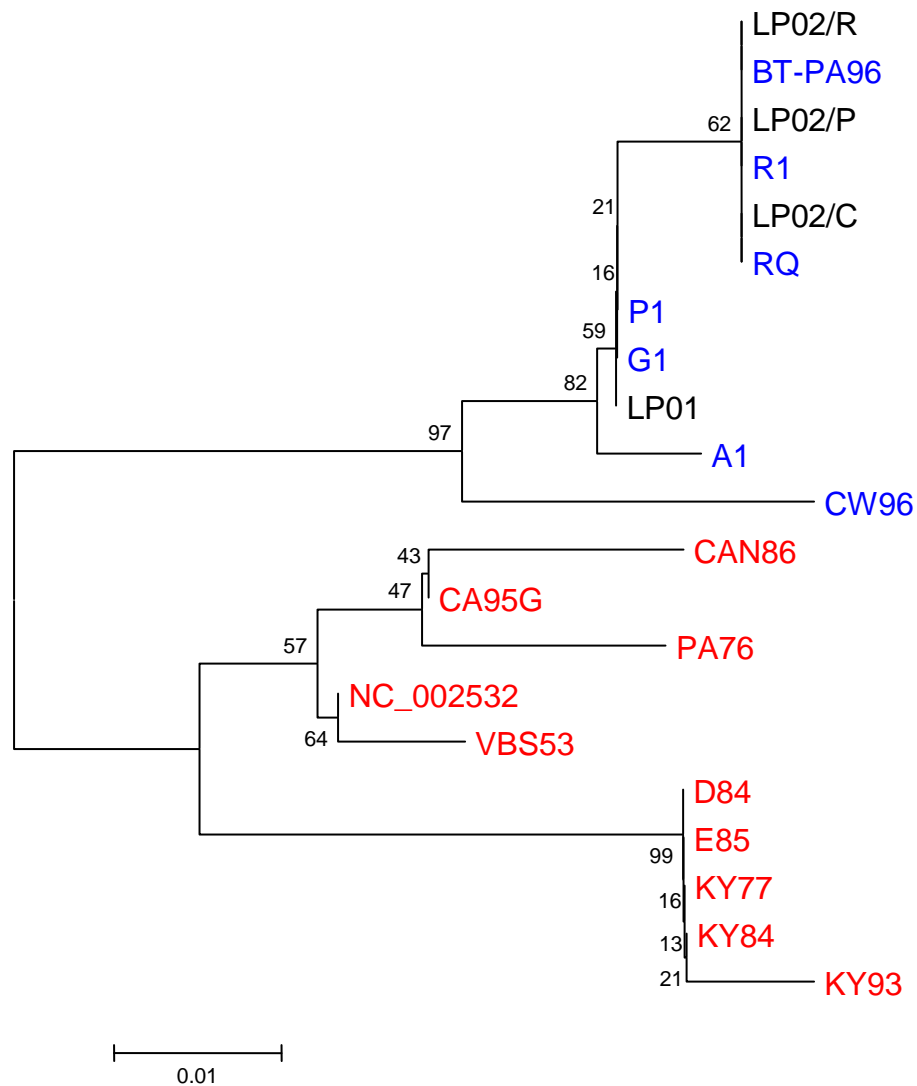


FIGURA 15: Árbol filogenético de las secuencias del ORF6 que muestra las relaciones aminoacídicas entre los aislamientos argentinos del VAE, la cepa de referencia Bucyrus NC_002532 y las cepas representantes de Europa y América. Los números sobre las ramas indican los valores del test de *Bootstrap* (con 1000 iteraciones) para ese nodo.



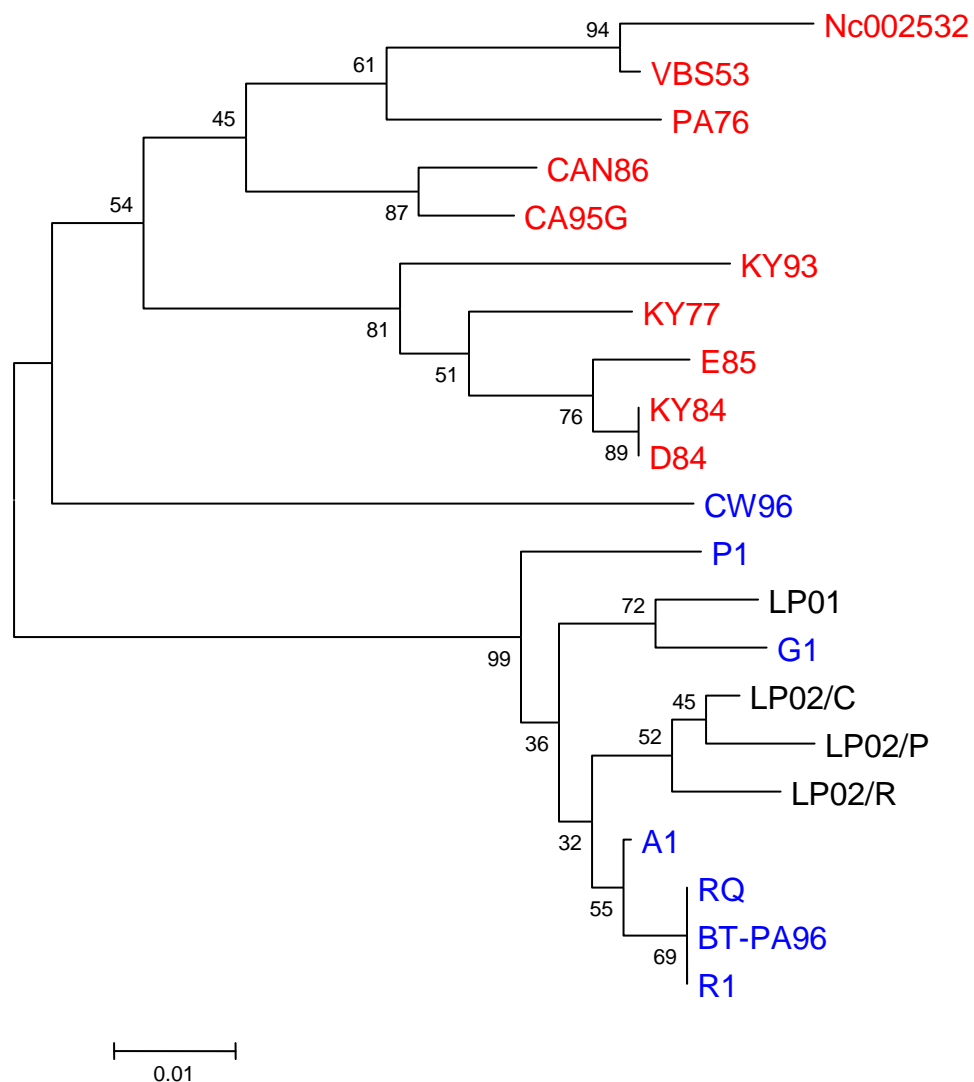
Phylogenetic tree showing relationships between various bacterial strains. The tree is rooted on the left and branches out to the right. Strains are labeled with names and accession numbers. Bootstrap values are indicated at the nodes. A scale bar at the bottom indicates 0.02 substitutions per site.

Strains and their bootstrap values (from top to bottom):

- RQ (95)
- R1 (43)
- BT-PA96 (20)
- A1 (27)
- P1 (73)
- G1 (100)
- LP02/P (100)
- LP02/R (47)
- LP02/C (100)
- LP01 (100)
- CW96 (100)
- CAN86 (100)
- CA95G (100)
- NC_002532 (100)
- VBS53 (87)
- PA76 (53)
- KY77 (99)
- KY93 (80)
- E85 (97)
- KY84 (99)
- D84

Scale bar: 0.02

FIGURA 17: Árbol filogenético de las secuencias del ORF5 que muestra las relaciones aminoacídicas entre los aislamientos argentinos del VAE, la cepa de referencia Bucyrus NC_002532 y las cepas representantes de Europa y América. Los números sobre las ramas indican los valores del test de *Bootstrap* (con 1000 iteraciones) para ese nodo.



DISCUSIÓN

En este estudio comparamos la variabilidad de las secuencias de las proteínas M y GP5 (ORF6 y 5 respectivamente) por PCR-SSCP, RFLP y secuenciación de las únicas cepas de AVE aisladas en Argentina pertenecientes a 4 padrillos localizados en 2 establecimientos con alta prevalencia de Ac pero sin enfermedad clínica.

Todas las cepas Argentinas presentaron un fenotipo de neutralización similar: enfrentadas con sueros pertenecientes al mismo establecimiento de donde fueron aisladas los títulos variaron entre 1:64 y 1:512, mientras que los aislamientos fueron neutralizados en menor medida por el suero policlonal de referencia (1:4-1:16). **Balasuriya y col.**, en numerosos estudios informaron que el índice de neutralización de virus aislados de la misma área geográfica podrían variar debido a la existencia de una considerable variación antigénica entre aislamientos ocurridos durante un mismo año o más aún obtenidos de la misma epizootia. Compararon los títulos neutralizantes de cepas aisladas en Europa, las cuales eran neutralizadas por 4 sueros policlonales anti-AVE con títulos entre 128 a 512 y que otras cepas de campo con un mismo policlonal tenían títulos neutralizantes variables entre 32 a 512 (**Balasuriya y col., 1995a y 1997**). Otros autores, también informaron variaciones en la neutralización en cepas de campo utilizando tanto Ac monoclonales como policlonales (**Glaser y col., 1995; Wescott y col., 1995**). En nuestro caso, la cepa Bucyrus utilizada en nuestro laboratorio aparece antigénicamente distinta ya que fue neutralizada en menor medida por los antisueros pertenecientes a los padrillos donde ocurrieron los aislamientos. En este establecimiento hubo una alta prevalencia de Ac sin enfermedad clínica, coincidiendo con lo informado por **Timoney y McCollum, 1993 y Patton y col., 1999**.

Estos autores demostraron que la infección asintomática y subclínica en equinos es muy común y que los animales persistentemente infectados transmiten en forma venérea virus aún de baja virulencia.

Los patrones de migración diferentes observados por PCR-SSCP indican que los cuatro aislamientos poseen diferentes secuencias en ambos ORFs entre ellos y con respecto a Bucyrus. Este método es muy sensible para detectar variaciones puntuales entre secuencias (**Orita y col., 1989; Hayashi, 1991**). No hemos encontrado trabajos científicos que utilicen PCR-SSCP como rastreo de variabilidad en cepas de AVE; no obstante, es un método que ha sido utilizado con éxito en otras virosis (**Farfan y col., 1997; Chandler y Nordoff, 1999; Kiss y col., 1999; Jones y Weber, 2001; Moncayo y col., 2001**).

Como fue informado por **Sekiguchi y col., 1995**, PCR-RFLP de una porción de la proteína M (449 pb) es un método confiable que permite distinguir cepas de AVE. Nos permitió diferenciar la cepa aislada por primera vez (LP01) de los otros tres aislamientos argentinos procedentes de un mismo establecimiento LP02/R, LP02/C y LP02/P y de la cepa de referencia Bucyrus.

El análisis de las secuencias parciales de los ORFs mostró que las diferencias observadas con los métodos de rastreo correspondieron a variaciones de nucleótidos puntuales entre los aislamientos. Los valores de identidad y las relaciones filogenéticas entre las secuencias confirmaron que LP01 es diferente del resto de las cepas Argentinas y que las cuatro pueden ser agrupadas en un grupo filogenético distinto a la cepa NC_002532.

Nuestros resultados coinciden en cierto modo con los obtenidos por **Balasuriya y col., 1998** y **Sugita y col., 1994**, quienes observaron heterogeneidad en aislamientos de AVE y variaciones antigénicas de las proteínas involucradas en la neutralización, utilizando técnicas

viroológicas clásicas y moleculares. También **Fukunaga y col., 1994**, demostraron diferencias serológicas entre la cepa Bucyrus, Bucyrus modificada y cepas de campo utilizando la VN cruzada y ellos pudieron diferenciar equinos vacunados con vacunas activas de aquellos vacunados con cepas de campo mediante PCR-RFLP de otros ORF como 2, 4 y 5. Sin embargo, las diferencias entre los aminoácidos de LP02/R, LP02/ C y LP02/P no se reflejaron en variaciones del fenotipo de VN.

La variabilidad genética de las proteínas M, N y GP5 ya fue demostrada en distintos aislamientos (**Chirnside y col., 1994, Balasuriya y col., 1995b, Sugita y col., 1994**). La secuenciación del ORF6 ha sido utilizada en los comienzos para determinar la existencia de distintos grupos geográficos entre aislamientos de América y Europa. Posteriormente los análisis filogenéticos se basaron en las secuencias de ORF5 ya que en él se observa el mayor nivel de diversidad (**Balasuriya y col., 1995b, 1998 y 1999a; Stadejek y col., 1999; Larsen y col., 2001**).

Respecto a las zonas variables del ORF5 entre cepas de AVE, V₁ sigue siendo la zona más variable entre los aislamientos de Argentina. Asimismo, el sitio de glicosilación (aminoácido 81) es altamente conservado entre todas las cepas analizadas. Como ya fue expresado, la adquisición de sitios de glicosilación podría influir en la patogénesis y virulencia de los arterivirus (**Balasuriya y col, 1999a**). En el caso de LP01, LP02/P, PA76, CA95G y G1 también hay una sustitución por asparagina en la posición 82. Así como parece ocurrir en el virus de la deshidrogenasa láctica del ratón, donde la adquisición de sitios de glicosilación en la misma proteína causaría infección persistente sin neurovirulencia (**Anderson y col, 1995; Faaberg y col, 1995; Plagemann 1996**), los padrillos residentes en Argentina de donde fueron obtenidas las muestras eran portadores asintomáticos.

En este estudio, mediante un rastreo de variabilidad utilizando secuencialmente PCR-SSCP y RFLP encontramos diferencias entre las cepas aisladas en Argentina. Mediante la secuenciación de ORF 6 y 5 pudimos confirmarla y establecer al menos un posible origen de las cepas: los árboles filogenéticos revelan identidad con las cepas Europeas. También es importante resaltar que aún cuando la mayoría de los autores selecciona la GP5 para establecer relaciones de filogenia, el uso del ORF6 mostró prácticamente el mismo resultado y demuestra que otros genes además del ORF5 pueden estudiarse para conocer variabilidad entre cepas. Más aún cuando ambas proteínas están involucradas en la replicación viral y la respuesta inmune.

Si bien la secuenciación es la mejor opción para caracterizar, PCR-SSCP y RFLP presentan alternativas sencillas y reproducibles a la hora de hacer un rastreo de la presencia de cepas que difieren en cuanto a la antigenicidad, al menos en laboratorios que no cuentan con acceso a la secuenciación.

CONCLUSIONES

- Las metodologías utilizadas nos permitieron caracterizar por primera vez los aislamientos de AVE de Argentina.
- El análisis comparativo de secuencias confirmó que los aislamientos Argentinos LP01 y LP02 son diferentes entre sí y de otros aislamientos.
- Las cepas Argentinas se agrupan con las cepas Europeas comparando ambos ORFs.
- Las diferencias antigénicas observadas en la VN cruzada entre la cepa Bucyrus y las Argentinas se confirma mediante el análisis comparativo de secuencias y se relacionan con cambios de aminoácidos.
- La adquisición de sitios de glicosilación en la región variable V₁ del ORF5 podría ser responsable de la infección persistente de los padrillos residentes en Argentina de donde fueron obtenidas las muestras.
- En estudios futuros debería determinarse si las variaciones encontradas son responsables de las diferencias de tropismo, antigenicidad y virulencia de las cepas.

REFERENCIAS

Anderson GW, Palmer GA, Rowland RRR, Even C, Plagemann PGW. (1995) Lactate dehydrogenase-elevating virus entry into the central nervous system and replication in anterior horn neurone. *J. Gen. Virol.* 76: 581-592.

Akashi H, Konishi S, Ogata M. (1976) Studies on Equine viral arteritis I: a serological survey of EVA in horses imported in 1973/74. *Jpn. J. Vet. Sci.* 87: 71-73.

Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Balasuriya UBR, Rossitto PV, DeMaula CD, MacLachlan NJ. (1993) 29 K envelope glycoprotein of equine arteritis virus expresses neutralization determinants recognized by murine monoclonal antibodies, *J. Gen. Virol.* 74: 2525–2529.

Balasuriya UBR, MacLachlan NJ, de Vries AAF, Rossitto PV, Rottier PJM. (1995a) Identification of a neutralization site in the major envelope glycoprotein (GL) of equine arteritis virus, *Virology* 207: 518–527.

Balasuriya UBR, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ. (1995b) Phylogenetic analysis of open reading frame 5 of field isolates of equine arteritis virus and identification of conserved and nonconserved regions in the GL envelope glycoprotein, *Virology* 214: 690–697.

Balasuriya UBR, Patton JF, Rossitto PV, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ. (1997) Neutralization determinants of laboratory strains and field isolates of equine arteritis virus: identification of four neutralization sites in the amino-terminal ectodomain of the GL envelope glycoprotein, *Virology* 232: 114–128.

Balasuriya UBR, Evermann JF, Hedges JF, McKeirnan AJ, Mitten JQ, Beyer JC, McCollum WH, Timoney PJ, MacLachlan NJ. (1998) Serologic and molecular characterization of an

abortigenic strain of equine arteritis virus derived from infective frozen semen and an aborted equine fetus, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213: 1586–1589

Balasuriya UBR, Hedges JF, Timoney PJ, McCollum WH MacLachlan NJ. (1999a) Genetic stability of equine arteritis virus during horizontal and vertical transmission in an outbreak of equine viral arteritis, *J. Gen. Virol.* 80: 1949–1958.

Balasuriya UBR, Snijder EJ, van Dinten LC, Heidner HW, Wilson WD, Hedges JF, Hullinger PJ, MacLachlan NJ. (1999b) Equine arteritis virus derived from an infectious cDNA clone is attenuated and genetically stable in infected stallions, *Virology* 260: 201–208.

Balasuriya UBR, Heidner WH, Hedges JF, Williams JC, Davis NL, Johnston RE, MacLachlan NJ. (2000) Expression of two major envelope proteins of equine arteritis virus as a heterodimer is necessary for induction of neutralizing antibodies in mice immunized with recombinant Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles, *J. Virol.* 74: 10623–10630

Balasuriya UBR, Hedges JF, MacLachlan NJ. (2001) Molecular epidemiology and evolution of equine arteritis virus, *Adv. Exp. Med. Biol.* 494: 19–24.

Balasuriya UBR, Heidner WH, DavisNL, Wagner HM, Hullinger PJ, Hedges JF, Williams JC, Johnston JE, Wilson DW, Liu IK, MacLachlan NJ. (2002) Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses, *Vaccine* 20: 1609–1617.

Balasuriya UBR, Dobbe JC, Heidner WH, Smalley VL, Navarrette A, Snijder EJ, MacLachlan NJ. (2004a) Characterization of the neutralization determinants of equine arteritis virus using recombinant chimeric viruses and site-specific mutagenesis of an infectious cDNA clone, *Virology* 321: 235–246.

Balasuriya UBR, Hedges JF, Smalley VL, Navarrette A, McCollum WC, Timoney PJ, Snijder EJ MacLachlan NJ (2004b), Genetic characterization of equine arteritis virus during persistent infection of stallions, *J. Gen. Virol.* 85 : 379–390.

Breese SS, McCollum WH. (1971) Equine arteritis virus: ferreting-tagging and determination of RNA core. *Arch. Ges. Virus* 35: 290-295.

Castillo-Olivares J, Tearle JP, Montesso F, Westcott D, Kydd JH, Davis-Poynter NJ, Hannant D. (2003a) Detection of equine arteritis virus (EAV)-specific cytotoxic CD8+ T lymphocyte precursors from EAV-infected ponies. *J. Gen. Virol.* 84: 2745–2753.

Castillo-Olivares J, Wieringa R, Bakonyi T, de Vries AA, Davis-Poynter NJ, Rottier PJ. (2003b) Generation of a candidate live marker vaccine for equine arteritis virus by deletion of the major virus neutralization domain. *J. Virol.* 77: 8470–8480.

Cavanagh D. (1997) Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* 142: 629–633.

Chandler, L. J. & Nordoff, N. G. , 1999. Identification of genetic variation among St. Louis encephalitis virus isolates, using single-strand conformation polymorphism analysis. *J. Virol. Methods* 80, 169-178.

Chirnside ED. (1992) Equine arteritis virus: an overview, *Brit. Vet. J.* 148: 181–197.

Chirnside ED, Wearing CM, Bims MM, Mumford JA. (1994) Comparison of M and N gene sequences distinguishes amongst equine arteritis virus isolates. *J Gen Virol* 75: 1491-1497.

Chirnside ED, de Vries AAF, Mumford JA, Rottier PJM. (1995) Equine arteritis virus-neutralizing antibody in the horse is induced by a determinant on the large envelope glycoprotein GL, *J. Gen. Virol.* 76: 1989–1998.

Crawford TB, Henson JB. (1973) Immunofluorescent light microscopic and immunologic studies of equine arteritis virus. *Equine Inf. Diseases III*: 282-302.

Davis S, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg H, Wood B McCarty M. (1973) Microbiology, 2nd ed., Harper and Row Ed.

De Boer GF. (1978) Prevalence of antibodies to equine viruses in the Netherlands. *Eq. Inf. Diseases IV*: 461-465.

De la Sota MD, González R, Chiricosta A (2005). Situación de la Arteritis Viral Equina en la Argentina. *Suplemento técnico veterinario de la Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires*, 33: 44-48.

de Vries AAF, Post SM, Raamsman MJB, Horzinek MC, Rottier, PJM. (1995) The two major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers, *J. Virol.* 69: 4668–4674.

Deregt D, de Vries AAF, Raamsman MJB, Elmgren LD, Rottier PJM. (1994) Monoclonal antibodies to equine arteritis virus proteins identify the GL protein as a target for virus neutralization, *J. Gen. Virol.* 75: 2439–2444.

Doll ER, Bryans JT, McCollum WH, Crowe MEW. (1957a) Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares. Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus, *Cornell Vet.* 47. 3–41.

Doll ER, Knappenbetrger R, Bryans JT. (1957b) An outbreak of abortion caused by the equine arteritis virus. *Cornell Vet.* 47: 69-75.

Doll ER, Bryans JT, Wilson JC, McCollum WH. (1968) Immunization against equine viral arteritis using modified live virus propagated in cell cultures of rabbit kidney, *Cornell Vet.* 48: 497–524.

Echeverría MG, Pecoraro MR, Galosi CM, Etcheverrigaray ME, Nosetto EO (2003) The first isolation of equine arteritis virus in Argentina. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22: 1029-1033

Echeverría MG, Galosi CM, Etcheverrigaray ME, Nosetto EO. (2005) Diagnóstico de arteritis viral equina (AVE) en el período 2001-2004. Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata 12° *Simposio Internacional de la Asociación*

Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario (WAVLD) y 7° Seminario de la OIE en Biotecnología, Montevideo, Uruguay, 16-19 de noviembre de 2005.

Farfan, J. A, Olson, K. E., Black, W. C. T., Gubler, D. J. & Beaty B. J., 1997. Rapid characterization of genetic diversity among twelve dengue-2 virus isolates by single-strand conformation polymorphism analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 416-422.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Fenner F. (1976) Classification and nomenclature of viruses. *Int. Comm. Tax. Viruses*, 2nd report, Ed. Karger-Basel: 45-47.

Fukunaga Y, McCollum WH. (1977) Complement-fixation reactions in equine viral arteritis, *Am. J. Vet. Res.* 38: 2043–2046.

Fukunaga Y, Matsumura T, Sugiura T, Wada R, Imagawa H, Kanemura T, Kamada M. (1994) Use of the serum neutralization test for equine viral arteritis with different virus strains. *Vet. Rec.* 134: 574-576.

Faaberg KS, Palmer GA, Even C, Anderson GW, Plagemann PGW. (1995) Differential glycosylation of the ectodomain of the primary envelope glycoprotein of two strains of lactate-dehydrogenase-elevating virus that differ in neuropathogenicity. *Vir. Res.* 39: 331-340.

Gerber H, Steck F, Hofer B, Walther L, Friedli U. (1978) Clinical and Serological investigations on Equine viral Arteritis. *In Proc. 4th International Conference of Equine Infectious Diseases. Edited by J.T. Bryans & H. Gerber. Lyon, France, 1976. Veterinary Publications Inc., Princeton, New Jersey, USA, pp 461-465.*

Glaser AL, de Vries AAF, Dubovi EJ. (1995) Comparison of equine arteritis virus isolates using neutralizing monoclonal antibodies and identification of sequence changes in GL associated with neutralization resistance, *J. Gen. Virol.* 76: 2223–2233.

Glaser AL, Chirnside ED, Horzinek MC, de Vries AAF. (1997) Equine Arteritis Virus. *Theriogenology* 47: 1275-1295

González RJ, De la Sota M, Barrandeguy M, Trono K, Ayerbe M, Tarantelli M, La Torre JL, Iglesias ME, Galosi CM, Echeverría MG. (2003) Relevamiento serológico de Arteritis Viral Equina en padrillos registrados en Argentina. 8th Congress of the World Equine Veterinary Association, Buenos Aires, 15-17 de octubre de 2003.

Hayashi, K. , 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.* 1, 34-38.

Hedges JF, Balasuriya UBR, Ahmad S, Timoney PJ, McCollum WH, Yilma TD, MacLachlan NJ. (1998) Detection of antibodies to equine arteritis virus by enzyme linked immunosorbant assays utilizing GL, M and N proteins expressed from recombinant baculoviruses, *J. Virol. Meth.* 76: 127–137

Hedges JF, Balasuriya UBR, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ. (1999) Genetic divergence with emergence of phenotypic variants of equine arteritis virus during persistent infection of stallions, *J. Virol.* 73: 3672–3681.

Horzinek M. (1980) Compendio de virología general, Ed. Hemisferio sur.

Horzinek M, Maess J, Laufs R. (1971) Studies on substructure of Togaviruses analysis of Equine Arteritis, Rubella, Bovine Viral diarrhea and Hog Cholera Viruses. *Arch. Ges. Virus*, 33: 306-318.

Hyllseth B. (1969) A plaque assay of eqine arteritis virus in BHK-21 cells. *Arch. Ges. Virus* 28: 26-33.

Hyllseth B. (1970) Buoyant density studies on equine arteritis virus. *Arch. Ges. Virus*, 30: 97-104.

Inoue T, Yanagama R, Shinagama M, Akiyama Y. (1975) Immunofluorescent studies on the multiplication of equine arteritis virus in Vero cells and ED (NBL-6) cells. *Jpn. J. Vet. Sci.* 37: 569-575.

Jeronimo C, Archambault, D. (2002) Importance of M-protein C terminus as substrate antigen for serodetection of equine arteritis virus infection, *Clin. Diag. Lab. Immun.* 9: 698–703.

Jones TC, Doll ER, Bryans JT. (1957) The lesions of equine viral arteritis. *Cornell Vet.* 47: 52.

Jones, L. R. & Weber, E. L., 2001. Application of single-strand conformation polymorphism to the study of bovine viral diarrhea virus isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 50-56.

Kiss, C., Ros, S., Kecskemeti, J., Tanyi, S., Klingeborn, B. & Belák, S., 1999. Observations on the quasispecies composition of three animal pathogenic RNA viruses. *Acta Vet. Hung.* 47, 471-480.

Konishi S, Akashi H, Sentsui H, Ogata, M. (1975) Studies on equine viral arteritis I: characterization of the virus and trial survey on antibody with Vero cells culture. *Jpn. J. Vet. Sci.* 37: 541-549.

Kumar S, Tamura M, Nei M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163.

Larsen LE, Storgaard T, Holm E. (2001) Phylogenetic characterization of the GL sequences of Equine Arteritis Virus isolated from semen of asymptomatic stallions and fatal cases of Equine Viral Arteritis in Denmark. *Vet. Microbiol.* 80: 339-346.

Laude H. (1979) Non arbo-togaviridae: comparative hydrodynamic properties of the pestivirus genus. *Arch. Virol.* 62: 347-351.

Maess J, Reczko E, Bohm H. (1970) Equine arteritis virus: multiplication in BHK-21 cells; buoyant density and electron microscopical demonstration. *Arch. Ges. Virus* 30: 47-59.

MacLachlan NJ, Balasuriya UBR, Hedges JF, Schweidler TM, McCollum WH, Timoney PJ, Hullinger PJ, Patton JF. (1998) Serologic response of horses to the structural proteins of equine arteritis virus, *J. Vet. Diag. Invest.* 10: 229–236.

McCollum WH, Doll ER, Wilson J. (1961a) The recovery of virus from horses with experimental cases of equine viral arteritis, using monolayers cells cultures of equine kidney. *Am. J. Vet. Res.* 23: 465-469.

McCollum WH, Doll ER, Wilson J, Johnson C. (1961b) Propagation of equine viral arteritis virus in monolayers cultures equine kidney. *Am. J. Vet. Res.* 22: 731-735.

McCollum WH, Doll ER, Wilson J, Cheatham J. (1962) Isolation and propagation of equine arteritis virus in monolayers cell cultures of rabbit kidney. *Cornell Vet.* 52: 452.

McCollum WH. (1969) Development of a modified virus strain and vaccine for equine viral arteritis. *JAVMA* 155: 318-322.

McCollum WH. (1970) Vaccination for equine viral arteritis *In: J.T. Bryans and H. Gerber, Editors, Proceedings of the Second International Conference on Equi. Infec. Dis., Paris, 1969, S. Karger, Basel, pp. 143–151.*

McCollum WH, Bryans JT. (1973) Serological identification of infection by equine arteritis virus in horses of several countries. *Equine Inf. Diseases III. In Proc. 3rd. International Conference of Equine Infectious Diseases, (J.T. Bryans & H. Gerber, eds), Paris, France, 1972. S. Karger, Basel, Switzerland, pp 256-263.*

McCollum WH. (1986) Responses of horses vaccinated with avirulent modified-live equine arteritis virus propagated in the E, Derm (NBL-6) cell line to nasal inoculation with virulent virus, *Am. J. Vet. Res.* 47: 1931–1934.

McCollum WH, Timoney PJ, Roberts AW, Willard JE, Carswell GD. (1988) Response of vaccinated and non-vaccinated mares to artificial insemination with semen from stallions persistently infected with equine arteritis virus In: D.G. Powell, Editors, *Proceedings of the Fifth International Conference on Equi. Infect. Dis., Lexington, 1987*, The University Press of Kentucky, Lexington, Kentucky, pp. 13–18.

McCollum WH, Little TV, Timoney PJ, Swerczek TW. (1994) Resistance of castrated male horses to attempted establishment of the carrier state with equine arteritis virus, *J. Comp. Pathol.* 111:383–388.

McCollum WH, Timoney PJ, Lee Jr JW, Habacker PL, Balasuriya UBR, MacLachlan NJ. (1999) Features of an outbreak of equine viral arteritis on a breeding farm associated with abortion and fatal interstitial pneumonia in neonatal foals In: U. Wernery, J.F. Wade, J.A. Mumford and O.-R. Kaaden, Editors, *Proceedings of the Conference on Equi. Infec. Dis., VIII*, R & W Publications (Newmarket) Limited, Newmarket, UK, pp. 559–560.

Mittelholzer C, Johansson I, Olsson A, Roneus M, Klingeborn B, Belák S. (2006) Recovery of Swedish Equine arteritis viruses from semen by cell culture isolation and RNA transfection. *J. Virol. Meth.* 133: 48-52

Moncayo, A., Medina, G., Kalvatchev, Z., & other 11 authors (2001) Genetic diversity and relationships among Venezuelan equine encephalitis virus field isolates from Colombia and Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 65, 738-746.

Moraillon A, Moraillon R. (1978) Results of a serological surveys of viral arteritis in France and in several European and African countries. *Equine Inf. Diseases IV*: 467-473.

Moraillon R, Moraillon A. (1974) Acquisitions recents dans l'épidémiologie de l'arterite a virus du cheval en France. *Rec. Med. Vet.* 150 : 1015-1022.

Neu SM, Timoney PJ, McCollum WH. (1988) Persistent infection of the reproductive tract in stallions persistently infected with equine arteritis virus In: D.G. Powell, Editors, *Proceedings*

of the Fifth International Conference on Equi. Infec. Dis., Lexington, 1987, The University Press of Kentucky, Lexington, Kentucky, pp. 149–154.

Nosetto EO, Etcheverrigaray ME, Oliva GA, Gonzalez ET, Samus SA (1984) Arteritis viral equina: detección de anticuerpos en equinos de la República Argentina. *Zbl. Vet. Med. B*, 31, 526-529.

Nugent J, Sinclair R, de Vries AAF, Eberhardt RY, Castillo-Olivares J, Poynter ND, Rottier PJM. (2000) Development and evaluation of ELISA procedures to detect antibodies against the major envelope protein (GL) of equine arteritis virus, *J. Virol. Meth.* 90: 167–183.

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. & Hayashi, K., 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 874-879.

Patton JF, Balasuriya UBR, Hedges JF, Schweidler TM, Hullinger PJ, MacLachlan NJ. (1999) Phylogenetic characterization of a highly attenuated strain of equine arteritis virus from the semen of a persistently infected standardbred stallion, *Arch. Virol.* 144: 817–827.

Plagemann PGW. (1996) Lactate dehydrogenase-elevating virus and related viruses. *In Fields Virology 3rd edition pp 1105-1120*. Edited by BN Fields, DM Knipe, PM Howley, Philadelphia, Lippincott-Raven.

Powell D, Burows R, Spooner P, Goodridge D, Thomson G. (1978) A study of infectious respiratory diseases among horses in Great Britain, 1971-1976. *Equine Inf. Diseases IV*: 451-459.

Prickett ME, McCollum WH, Bryans JT. (1973) The gross and microscopic pathology observed in horses experimentally infected with the equine arteritis virus. *Equine Inf. Diseases III*: 265-272, 1973.

Redaelli G. (1979) Arterite equine o malattia degli occhi rossi (Pink eye). *La clinica Vet.* 102: 560.

Saitou N, Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.

Sekiguchi K, Sugita S, Fukunaga Y, Kondo T, Wada R, Kamada M, Yamaguchi S. (1995) Detection of equine arteritis virus (EAV) by polymerase chain reaction (PCR) and differentiation of EAV strains by restriction enzyme analysis of PCR products. *Arch Virol* 140: 1483-1491.

Snijder EJ, Van Tol H, Pedersen KW, Raamsman MJB, de Vries AAF. (1999) Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J Virol* 73, 6335-6345.

Snijder EJ. (2001) Arteriviruses. In: Fields Virology, pp. 1205-1220. Edited by DM Knipe, PM Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams y Wilkins.

Snijder EJ, Dobbe JC, Spaan WJ. (2003) Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity. *J Virol.* 77: 97-104.

Stadejek T, Bjorklund H, Ros Bascunana C, Ciabatti IM, Scicluna MT, Amaddeo D, McCollum WH, Autorino GL, Timoney PJ, Paton DJ, Klingeborn B, Belak S. (1999) Genetic diversity of equine arteritis virus, *J. Gen. Virol.* 80: 691–699.

Starik E, Ginter A, Coppe P. (2001) ELISA and direct immunofluorescence test to detect equine arteritis virus (EAV) using a monoclonal antibody directed to the EAV-N protein, *J. Vet. Med. B* 48: 1–9.

Sugita S, Kondo T, Sekiguchi K, Yamaguchi S, Kamada M, Nerome K, Fukunaga Y (1994) Molecular evolution of the M gene of equine arteritis virus. *Proc. 7th Int. Conf. Equine Intern. Dis. Tokyo, Japan*, R&W Pubs. Newmarket, UK, pp 39-43.

Timoney PJ. (1984) Clinical, virological y epidemiological features of the 1984 outbreak of equine viral arteritis in the Thoroughbred population in Kentucky, USA. *Proc.. Int. Conf. Thoroughbred Breed Organ: Equine viral Arteritis 1984*: 24-33.

Timoney PJ, McCollum WH, Roberts AW, Murphy TW. (1986) Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion, *Res. Vet. Sci.* 41: 279–280.

Timoney PJ, McCollum WH. (1991) Equine viral arteritis: current clinical and economic significance. *Proceedings of the 36th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Lexington Kentucky, USA 1990. 36: 403-409.

Timoney PJ, McCollum WH. (1993) Equine viral arteritis, *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* 9: 295–309.

Timoney PJ. (2000) Equine arteritis virus. In: Office International des Epizooties. Manual of Standards for diagnostic tests and Vaccines, 4th edition, pp. 582-594.

Thompson J, Higgins D, Gibson T. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680

Van der Zeijst BA, Horzinek M. (1975) The genome of equine arteritis virus. *Virology*, 68: 418-425, 1975.

Westcott D, Lucas MH, Paton DJ. (1995) Equine arteritis virus: antigenic analysis of strain variation In: M. Schwyzer and M.R. Ackermann, Editors, *Proceedings of the Third Congress of the European Society of Veterinary Virology, Interlaken, Switzerland, 1994*, Foundation Marcel Merieux, Lyon (1995), pp. 479–483.

Wieringa R, de Vries AAF, Raamsman MJB, Rottier PJM. (2003) Characterization of two new structural glycoproteins, GP3 and GP4, of equine arteritis virus, *J. Virol.* 76: 10829–10840.

Wilson JC, Doll ER, McCollum WH. (1962) Propagation of equine arteritis virus previously adapted to cell cultures of equine kidney in monolayer cultures of hamster kidney. *Cornell Vet.* 52: 200-205.

Zeeger JJ, Van der Zeijst BA, Horzinek M. (1976) The structural proteins of equine arteritis virus. *Virology* 73: 200-205.

Ziebuhr J, Snijder EJ, Gorbalenya AE. (2000) Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.* 81: 853-879.