

CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS DEL VIRUS DE LA ARTERITIS EQUINA OBTENIDAS DIRECTAMENTE DE MUESTRAS DE SEMEN DE EQUINOS SEROPOSITIVOS

Metz GE¹, Serena MS¹, Díaz S², Echeverría MG²

Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata,

¹ Becarios del CONICET, ² Investigadores del CONICET, IGEVET CCT-LA PLATA

Resumen: Arteritis Viral Equina (AVE) ocasiona infecciones, en su mayoría subclínicas, pero puede causar abortos y enfermedad respiratoria. Los ORF5 y ORF6 del virus codifican las proteínas de envoltura GP5 y M cuya interacción es crítica para la infectividad y expresión de determinantes antigénicos del virus. Existe un solo serotipo de AVE, aunque hay variabilidad entre aislamientos de regiones geográficas diferentes, sobre todo a nivel del ORF 5. En Argentina se realizaron 5 aislamientos en 2001, 2002 y 2007. En este trabajo se caracterizan y comparan entre sí nuevas secuencias de virus de arteritis obtenidas de muestras de semen de archivo con las 5 cepas Argentinas. En el análisis de identidad, se evidencia que las secuencias LP02/R, LP02/C, LP02/P, LT-LP-ARG, RO-LP-ARG y RZ-LP-ARG resultaron las más similares entre sí (99%) mientras que las secuencias RO-LP-ARG y LT-LP-ARG tienen 100% de identidad. En el árbol filogenético, todas las secuencias a excepción de LP01 forman un único cluster. La secuenciación de esta porción del genoma permite determinar las características moleculares de las cepas circulantes en Argentina, aunque en estudios futuros debería determinarse si estas variaciones son responsables de las diferencias de tropismo, antigenicidad y virulencia de las cepas.

Palabras claves: arteritis viral equina – RT-PCR- semen- secuencias ORF 5

RT-PCR IN SEMEN SAMPLES BELONGING TO POSITIVE HORSES TO EQUINE ARTERITIS VIRUS: ANALYSIS OF NEW ARGENTINEAN SEQUENCES

Abstract: Equine arteritis virus causes subclinical infections characterized by respiratory disease, abortion or pneumonia. The interaction of proteins GP5 and M, codified on ORF 5 and 6, respectively, is critical for infectivity. Only one serotype of EAV is described although variations between isolates from different geographic regions exist. In Argentina 5 EAV strains were isolated in 2001 (LP01 strain) in 2002 (LP02/R, LP02/C and LP02/P) and in 2007 (LT-LP-ARG strain). In this work we compare and characterize new sequences of EAV obtained from 3 archive semen samples together with the Argentinean strains. LP02/R, LP02/C, LP02/P, LT-LP-ARG, RO-LP-ARG and RZ-LP-ARG showed 99% homology by sequences identity, meanwhile RO-LP-ARG and LT-LP-ARG have 100% identity. Phylogenetic tree analysis identified one cluster including LP02/R, LP02/P, LP02/C, LT-LP-ARG, RO-LP-ARG, RZ-LP-ARG and KB-LP-ARG. The results obtained allowed us to determine molecular characteristics between the Argentinean strains. Further studies will be needed in order to determine if the variations found are responsible for antigenicity, tropism and virulence.

Key Words: equine viral arteritis – RT-PCR- semen samples- ORF 5 sequences

Fecha de recepción: 25/07/08

Fecha de aprobación: 10/08/08

Dirección para correspondencia: María G. Echeverría, Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata, Argentina.

E-mail: gecheverria@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Arteritis Viral Equina (AVE) es una enfermedad caracterizada por trastornos respiratorios en adultos, abortos y neumonía en potrillos [1]. Si bien la mayoría de las infecciones son subclínicas, un alto porcentaje de los padrillos se transforman en portadores persistentemente infectados que eliminan virus en semen por periodos variables [2]. El genoma del virus de la Arteritis Equina (VAE) está formado por una molécula de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 12,7 kb que incluye 9 marcos abiertos de lectura (ORF), que codifican entre otras, 7 proteínas estructurales, denominadas E, GP2, GP3, GP4, GP5, M y N, localizadas en los ORF 2 a y 2 b, 3, 4, 5, 6, y 7 respectivamente [3]; [4]. A excepción de la proteína N, las demás están localizadas en la envoltura viral, de las cuales, las principales son: la GP5, glicoproteína mayor de la envoltura, y la proteína M. Ambas forman un heterodímero unido por puentes disulfuro resultando crítica su interacción para la infectividad y la expresión de los determinantes antigénicos de la partícula viral [5]; [6]. Aunque existe un solo serotipo de VAE, 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 [7]; [8]. Esta variabilidad existente en la población viral, podría ser la responsable de las diferencias en el tropismo, antigenicidad y virulencia entre las distintas cepas aisladas. En Argentina, el primer aislamiento de VAE denominado LP01 se realizó en 2001 [9], mientras que en el 2002 se realizaron 3 nuevos aislamientos denominados LP02/R, LP02/C y LP02/P. La cepa aislada en el 2001 como las aisladas en el 2002 provenían de dos establecimientos distintos, ambos con alta prevalencia de anticuerpos pero sin signos clínicos aparentes de enfermedad [10]. La cepa LT-LP-ARG fue un nuevo aislamiento realizado en 2007 y estudios previos demuestran que podría ser la línea parental que dio origen al resto de las cepas Argentinas [11]. Las evidencias experimentales muestran que las cepas aisladas en Argentina tienen diferente patrón de neutralización ya que la cepa de referencia Americana CVDLS, utilizada en los test diagnósticos por nuestro laboratorio, es neutralizada en menor medida por antisueros heterólogos (Echeverría, comunicación personal).

Se describe en la bibliografía que el VAE es relativamente sencillo de obtener a partir de la inoculación de cultivos celulares con muestras de semen de padrillos serológicamente positivos. De no ser posible recuperar viriones de las muestras inoculadas, debido a la pérdida de infectiosidad por dificultades en la toma de la muestra, su almacenamiento y/o su transporte, se acepta la detección de ARN viral como diagnóstico positivo

de AVE [12].

Se describe al ORF 5 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 [12]; [13]; [14]. Asimismo en el ORF 5 se identificaron 3 regiones variables comprendidas entre los aminoácidos 61 y 121 (V_1), entre los 141 y 178 (V_2) y entre los 202 y 222 (V_3) [7]. Los datos que se presentan en este estudio caracterizan y comparan entre sí secuencias de VAE obtenidas a partir de muestras de semen de archivo, de animales seropositivos con aislamiento viral negativos, de padrillos localizados en los dos Haras de donde fueron aisladas las primeras cepas virales en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS DE SEMEN DE ARCHIVO:

Se analizaron 8 muestras de semen pertenecientes a 8 padrillos positivos a AVE, que llegaron a nuestro laboratorio entre 2000 y 2002. En el momento de arribo, las muestras fueron procesadas para aislamiento viral, resultando negativas de acuerdo a la metodología internacional. De estas 8 muestras de semen, 4 de ellas denominadas PT, TF, LN y RO pertenecían a padrillos alojados en el Haras A, mientras que las 4 restantes pertenecían a los padrillos RZ, CD, KB y PL alojados en el Haras B. Ambos Haras están situados en la Provincia de Buenos Aires y poseen animales de salto y otros deportes. En ambos establecimientos se determinó una alta prevalencia de anticuerpos contra AVE, pero los equinos no presentaron signos clínicos detectables. Sin embargo, las cepas virales anteriormente descritas fueron aisladas de ambos establecimientos: LP01 del Haras A mientras que LP02/P, LP02/R y LP02/C del Haras B.

CEPAS VIRALES ARGENTINAS:

Las secuencias de las 5 cepas virales aisladas en Argentina utilizadas en este estudio comparativo fueron registradas en el banco de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) bajo los siguientes números de acceso: LP01 (DQ435439); LP02/R (DQ435440); LP02/C (DQ435441); LP02/P (DQ435442); LT-LP-ARG (EU622859) [10]; [11].

EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL Y RT-PCR:

Las muestras de semen se descongelaron del archivo y centrifugaron a 10.000 rpm para obtener al menos 500 μ l de plasma seminal. El ARN total fue extraído con Trizol (Invitrogen Corporation), de acuerdo a las especificaciones del fabricante, y luego fue precipitado con isopropanol y resuspendido en agua. Cinco (5) μ l de ARN fueron usados para síntesis de ADNc,

mediante el agregado de transcriptasa reversa (MMLV Moloney Murine Leukemia Virus) y hexámeros al azar (retrotranscripción). Para la amplificación por PCR a partir del ADNc, se utilizó el siguiente par de primers específico para el ORF 5: GL105F 5' GCTGACGGATCGCGGCGT-TATT 3' (posición 11250-11271), y GL673R 5' ATAGTGGGCCTACCTGGGACTAA 3' (posición 11840-11818). Se realizaron 35 ciclos de 94° C 45", 60° C 1' y 72° C, 90" [15]. Cada producto de PCR fue examinado en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y observados bajo luz ultravioleta.

SECUENCIACIÓN:

Previamente, los productos de PCR fueron purificados por precipitación con polietilenglicol (PEG 20%, NaCl 2,5 mM), y cuantificados en gel con estándar de peso molecular conocido. Se realizó secuenciación directa, utilizando el siguiente par de primers internos: CR2 5' GCCAATTTGCT-GCGATATGATGA 3' (posición 11272-11294), y EAV32 5' TGGGCCTACCTGGGACTAACAAAC 3' (posición 11836-11814) [14]. Ambas cadenas de cada amplicón fueron secuenciadas en forma automatizada por el método dye-terminator en equipo Mega BACE™ 1000 en el Servicio de Secuenciación del IGEVET (FCV-UNLP).

ANÁLISIS FILOGENÉTICO:

El análisis de las secuencias se realizó con programas disponibles en la web: CLUSTAL W [16] y por medio del programa MEGA versión 4 [17] y DNASTar, se construyeron los árboles filogenéticos por el método de Neighbor Joining [18] usando el test de "bootstrap" con 1000 iteraciones [19].

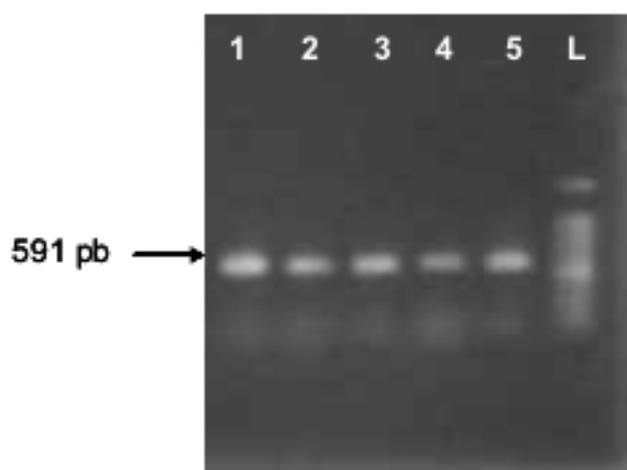
RESULTADOS

EXTRACCIÓN DE ARN Y RT-PCR:

Usando como molde ARN extraído de cada una de las muestras analizadas, se realizó la síntesis de ADNc, con los cuales se realizó la PCR con los primers GL105F y GL673R obteniendo un producto de 591 pares de bases, con las muestras RO, KB y RZ. La obtención del producto del tamaño esperado luego de la amplificación, permitió corroborar la presencia de ARN específico de VAE en las muestras de semen analizadas (Figura 1).

FIGURA 1: amplificación de ORF 5 parciales (591 pb) a partir de ARN de semen de padrillos RO, RZ y KB. Las cepas de VAE Argentinas LP01 y LT-LP-ARG fueron utilizadas como control.

FIGURE 1: PCR products of partial ORF 5 (591 bp) obtained from semen of stallions RO, RZ and KB. The Argentinean LP01 and LT-LP-ARG strains were used as control.



1= LP01; 2= LT-LP-ARG; 3=RO; 4=RZ; 5=KB; L marcador de 100 pb

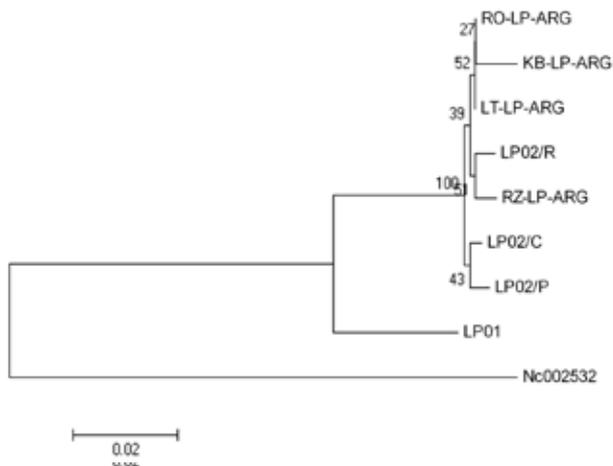
TABLA 1: Porcentajes de identidad nucleotídica (diagonal superior) y aminoácídica (diagonal inferior) sobre un total de 519 nucleótidos y 172 aminoácidos respectivamente, y entre las secuencias del ORF 5 de los aislamientos Argentinos del VAE. Los valores de identidad se calcularon mediante el programa CLUSTAL W

TABLE 1: Pairwise nucleotide identity (upper right) and amino acid (lower left) from a total of 519 and 172 respectively, of 8 Argentinean EAV based on ORF 5 sequences. The identity was obtained using CLUSTAL W

	LP01	LP02/R	LP02/C	LP02/P	LT-LP-ARG	RO-LP-ARG	RZ-LP-ARG	KB-LP-ARG
LP01	--	94,6	95,0	95,2	95,2	95,2	94,6	94,4
LP02/R	95,9	--	99,2	99,0	99,4	99,4	99,2	98,7
LP02/C	96,5	98,3	--	99,4	99,4	99,4	99,2	98,7
LP02/P	96,5	98,3	98,8	--	99,2	99,2	99,0	98,5
LT-LP-ARG	96,5	99,4	98,8	98,8	--	100,0	99,4	99,2
RO-LP-ARG	96,5	99,4	98,8	98,8	100,0	--	99,4	99,2
RZ-LP-ARG	96,5	98,8	98,3	98,8	99,4	99,4	--	98,7
KB-LP-ARG	94,8	97,7	97,1	97,1	98,3	98,3	97,7	--

FIGURA 2: Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las secuencias argentinas del Virus de Arteritis Equina (VAE). Los números sobre las ramas indican los valores del test de Bootstrap (con 1000 iteraciones) y 2 parámetros de Kimura para ese nodo. La cepa americana NC002532 fue utilizada como grupo externo (OG)

FIGURE 2: Phylogenetic tree showing the relationships among ORF 5 Argentinean EAV nucleic acid sequences. Numbers on branches indicate Bootstrap values (1000 iterations) and Kimura-2 parameters. American NC002532 strain was used as outgroup



ANÁLISIS DE SECUENCIAS:

La secuencia completa del ORF 5 comprende 768 nucleótidos (posiciones 11146 -11913 del genoma viral). La secuenciación con los primers internos permitió obtener un fragmento de 519 nucleótidos dentro del ORF 5. En el análisis se observaron solamente sustituciones nucleotídicas, sin deleciones ni inserciones. Las secuencias de nucleótidos de los productos del ORF 5 de cada una de las muestras de semen analizadas en este estudio fueron registradas en la base de datos GenBank (www.ncbi.nih.gov/Genbank) con los siguientes números de acceso: RO-LP-ARG EU622862; RZ-LP-ARG EU622861; KB-LP-ARG EU622860. Del análisis de nucleótidos de la tabla 1 puede observarse que sólo alrededor del 6% de los sitios son variables entre secuencias (que involucran 29 cambios nucleotídicos en total). Sin embargo, las secuencias de LP02/C y LP02/R sólo difieren en 3 posiciones de nucleótidos. La identidad de más del 99% entre pares de secuencias evidencia que los aislamientos LP02/R, LP02/C, LP02/P, LT-LP-ARG, RO-LP-ARG y RZ-LP-ARG como los más similares entre sí y que las secuencias RO-LP-ARG y LT-LP-ARG tienen 100% de identidad. LP01 presenta la mayor divergencia entre todas (menos del 96%). Las mayores diferencias ocurren entre la cepa LP01 y el resto de las secuencias Argentinas (Tabla 1). La traducción a aminoácidos (172 de 255 totales) reflejó que las sustituciones nucleotídicas involucraron 9 cambios de aminoácidos dentro

de las regiones variables, (~5%) entre las cepas Argentinas y las nuevas secuencias descritas. Siete de estos cambios ocurren dentro de la región V_1 , mientras que 1 ocurre en la V_2 y el último en la V_3 .

Las diferencias y similitudes entre las secuencias analizadas se reflejan en el árbol filogenético de la Figura 2. Las secuencias LP02/R, LP02/P, LP02/C, LT-LP-ARG, RO-LP-ARG, RZ-LP-ARG y KB-LP-ARG forman un mismo cluster (Bootstrap =100%) mientras que LP01 queda separada de este grupo.

DISCUSIÓN

En este estudio comparamos el ORF 5 parcial de la glicoproteína GP5 de 3 nuevas secuencias de VAE con las 5 cepas aisladas en Argentina con anterioridad [10]. El análisis de las secuencias parciales del ORF 5 mostró que las diferencias observadas correspondieron a variaciones de nucleótidos puntuales. Los valores de identidad y las relaciones filogenéticas entre las secuencias, confirmaron que LP01 es diferente del resto de las cepas Argentinas. Este padrillo podría haberse infectado con anterioridad al arribo a nuestro país. Nuestros resultados siguen confirmando que las secuencias Argentinas pertenecen al grupo Europeo. Es importante remarcar que la secuencia RO-LP-ARG fue obtenida de un padrillo del Haras A, de donde fue aislada la primera cepa Argentina en 2001 (LP01) [9] y que las secuencias RZ-LP-ARG y KB-LP-ARG se obtuvieron de padrillos localizados en el Haras B, de donde fueron aisladas las cepas del grupo LP02 [10]. A pesar que todavía ocurren brotes de AVE en el mundo, generalmente no se evidencian signos clínicos, aún cuando se registra una alta prevalencia de anticuerpos. Como ocurre en otros lugares, en nuestro país se ve la misma situación y se postula que las cepas circulantes hoy en día son de reducida virulencia [20]; [21].

Si bien las muestras de semen fueron conservadas en forma adecuada, el aislamiento viral no fue posible en nuestras condiciones de laboratorio a pesar de haber resultado positivas por RT-PCR. Esto si bien indica la presencia ARN viral no implica que el mismo necesariamente sea infectivo [15]. La cepa LT-LP-ARG fue obtenida de un testículo de un padrillo ingresado a nuestro país con anterioridad a 1998, importado de Europa, positivo por serología a AVE del cual no se conocían más datos, ni el lugar de alojamiento, ni la realización de pruebas biológicas en otros laboratorios de referencia en Argentina [11]. Sin embargo, esta situación no parece influir, ya que el tránsito de animales de deporte entre distintos establecimientos es muy frecuente.

El valor de identidad estimado para las secuencias LT-LP-ARG y RO-LP-ARG es del 100%.

Si bien no hay datos preliminares que relacionen a los animales, sobre la base de la secuencia analizada, corresponderían al mismo equino, a pesar de provenir teóricamente de distintos animales localizados en distintos establecimientos. Cabe determinar si existen diferencias entre las secuencias LT-LP-ARG, RO-LP-ARG y LP02/R (de la cual difieren en solo tres posiciones de nucleótidos que derivan en un único cambio de aminoácido) a nivel de otra porción del ORF 5 o de otros ORFs.

La evidencia experimental muestra que las cepas aisladas en Argentina tienen diferente patrón de neutralización y que la cepa de referencia Americana CVDLS, utilizada en los test diagnósticos por nuestro laboratorio, es neutralizada en menor medida por antisueros heterólogos (Echeverría, comunicación personal).

La secuenciación de esta porción de genoma permite determinar las características moleculares de las cepas circulantes en Argentina, aunque en estudios futuros debería determinarse si las variaciones halladas son responsables de diferencias de tropismo, antigenicidad y virulencia de las cepas.

Si bien los datos aportados son relevantes en cuanto a la diferenciación de las cepas Argentinas del virus, estamos abocados a estimar las relaciones filogenéticas sobre la base de la secuencia parcial del ORF 5, estudio que permitirá establecer el probable origen de las cepas Argentinas de VAE.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subvencionado parcialmente por ANPCyT (PICT 01-13541). Nuestro mayor agradecimiento al personal técnico de la Cátedra de Virología de la FCV-UNLP, Srta. María del Carmen Mondragón, Sra. Adriana Conde y Sr. Claudio Leguizamón.

BIBLIOGRAFÍA

1. Glaser AL, Rottier PJM, Horzinek MC, Colenbrander B. Equine arteritis virus: a review of clinical features and management aspects. *Vet Q* 1996, 18: 95-99
2. Timoney PJ, McCollum WH. Equine viral arteritis. *Vet Clin N Am Equine Pract* 1993, 9: 295-309
3. Snijder E. *Fields Virology*. Edited by Knipe, DM, Howley PM. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, (USA) 2001, 1205-1220
4. Wieringa R, de Vries A, Raamsman M, Rottier P. Characterization of two new structural glycoproteins, GP(3) and GP(4), of equine arteritis virus. *J Virol* 2002, 76: 10829-10840
5. Balasuriya UB, Rossito PV, DeMaula CD, MacLachlan NJ. 29 K envelope glycoprotein of equine arteritis virus expresses neutralization determinants recognized by murine monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 1993; 74: 2525-2529

6. Snijder E, Van Tol H., Pedersen K, Raamsman M, de Vries A. Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J Virol* 1999, 73, 6335-6345
7. Balasuriya UBR, Hedges JF, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ. Genetic stability of equine arteritis virus during horizontal and vertical transmission in an outbreak of equine viral arteritis. *J Gen Virol* 1999; 80: 1949-1958
8. Chirnside ED, Wearing CM, Bims MM, Mumford JA. Comparison of M and N gene sequences distinguishes amongst equine arteritis virus isolates. *J Gen Virol* 1994; 75: 1491-1497
9. Echeverría MG, Pecoraro M, Galosi C, Etcheverrigaray M, Nosoletto E. The first isolation of equine arteritis virus in Argentina. *Rev Sci Tech* 2003, 22: 1029-1033
10. Echeverría MG, Díaz S, Metz GE, Serena MS, Panei CJ, Nosoletto EO. Genetic typing of Equine Arteritis Virus isolates from Argentina. *Virus Genes* 2007, 35: 313-320
11. Metz GE, Serena MS, Martin Ocampos GP, Panei CJ, Fernandez VL, Echeverría MG. Equine Arteritis Virus: a new isolation from the presumable first carrier stallion in Argentina and its genetic relationships among the unique four reported Argentinean strains. *Arch Virol On line* 2008 DOI: 10-1007/s00705-008-0224-5
12. Hornyak A, Bakonyi T, Tekes G, Szeredi L, Rusvai M. A novel subgroup among genotypes of Equine Arteritis virus: genetic comparison of 40 strains. *J Vet Med Sci B* 2005, 52: 1-7
13. Balasuriya UBR, Hedges JF, Smalley VL, Navarrette A, McCollum WH, Timoney PJ, Snijder EJ, MacLachlan NJ. Genetic characterization of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J Gen Virol* 2004, 85: 379-390.
14. 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. Genetic diversity of equine arteritis virus. *J Gen Virol* 1999, 80: 691-699
15. Mittelholzer C, Johansson I, Olsson A, Roneus M, Klingeborn B, Belak S. Recovery of Swedish Equine arteritis viruses from semen by cell culture isolation and RNA transfection. *J Virol Meth* 2006, 133: 48-52
16. Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, 22: 4673-4680
17. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007, 24:1596-1599
18. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987, 4: 406-425
19. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985, 39: 783-791
20. Larsen LE, Storgaard T, Holm E. Phylogenetic char-

G. Metz y col.

acterization 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* 2001, 80: 339-346

21.Szeredi L, Hornyak A, Denes B, Rusvai M. Equine viral arteritis in a newborn foal: parallel detection of the virus by immunohistochemistry, polymerase chain reaction and virus isolation. *J Vet Med B* 2003, 50: 270-274