
Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias

Título:

**“Síndrome diarreico en potrillos, diagnóstico y
caracterización de los agentes virales
involucrados”**

Doctorando: Lic. Orlando Samuel Miño

Director: Dra. María Barrandeguy

Co-Director: Dra. Viviana Parreño

Lugar de desarrollo: Laboratorio de Virus Equinos, Instituto de Virología “Dr. Scholein Rivenson”, CICV y A, INTA Castelar.

Año: 2017

El presente trabajo de tesis doctoral titulado “Síndrome diarreico en potrillos, diagnóstico y caracterización de los agentes virales involucrados” fue realizado en el Instituto de Virología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), situado en Castelar, provincia de Buenos Aires, Argentina, bajo la dirección de la Dra. María Barrandeguy y la co-dirección de la Dra. Viviana Parreño.

.....
V°B°

Lic. Samuel Miño

.....
V°B°

Dra. María Barrandeguy

.....
V°B°

Dra. Viviana Parreño

Dedicatoria

A mi familia, Facundo, Susana, Gloria, mi vieja (Marta) y mi viejo que ya no está físicamente pero siempre presente.

A mi pareja, que me acompaña día a día en el camino de la vida.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras, María Barrandeguy y Viviana Parreño, por apoyarme y guiarme en el arduo camino del trabajo de tesis doctoral. Sin dudas, fue su confianza en mí y su espíritu solidario lo que me permitió afrontar este desafío, lo cual se corona con la presentación de esta tesis.

Gracias, a la institución que me acoge y apoya en este camino de la ciencia, el INTA, y en particular al Instituto de Virología que es donde diariamente desarrollo mi labor.

Gracias, a todo el grupo de trabajo de Virus Equinos, María Silvia, Cecilia, Aldana, Luciana, Verónica, Matilde (que hoy nos mira desde el cielo), porque con ellas comparto todos y cada uno de los días de trabajo, con ellas discuto y me río de las cosas buenas y no tanto que nos ofrece el milagro de la vida.

Gracias, a todos los chicos del Instituto, de los distintos laboratorios que me bancan en consultas y mates, siempre con mejor onda.

Gracias, a los soldados de Curupayti, con quienes pasamos incontables momentos de vida desde mi llegada a Buenos Aires hasta hoy.

Gracias, a los profesores que me abrieron las puertas de sus laboratorios, Dr. Jelle Matthijssens (Leuven, Bélgica), Dr. Etienne Thiry (Liege, Bélgica) y Dr. XiaoJun Wang (Harbin, China), porque a sus consejos y enseñanzas las aplico y apliqué no solo al desarrollo de este trabajo, sino de una forma de vida.

Gracias, al profesor Dr. Gabriel Parra, quien desinteresadamente me guió, enseñó, me acompañó y acompaña en el camino de la ciencia.

Gracias, a todos los que en algún momento compartieron su tiempo de vida con el fin de superar algún obstáculo, los chicos de IncuINTA, de Virus Adventicios, del Laboratorio C y de todos los laboratorios del instituto, de la cátedra de Virología de la Fac. de Farmacia y Bioquímica,

También agradezco a mis compañeros de rugby (ALIKAL 15) que fueron y son pilares fundamentales en todos los proyectos de mi vida.

Índice

Contenido

Índice	3
Listado de Figuras	5
Abreviaturas	10
Resumen.....	11
Abstract	12
Introducción	13
1. La Industria Hípica.....	14
2. Rotavirus Equino	16
a) Diarrea por Rotavirus.....	16
b) Etiología	18
c) Epidemiología de RVA en equinos	20
d) Clasificación taxonómica de los RVA equinos	22
e) Vía de transmisión y estabilidad de los RVA en el ambiente	22
f) Diagnóstico	23
g) Prevención	23
3. Otros agentes causantes de diarrea en potrillos.....	26
Hipótesis y Objetivos	32
Hipótesis de trabajo.....	33
Objetivos generales.....	34
Objetivos específicos	35
Resultados	36
Capítulo 1.....	37
Comparación de equipos comerciales y un ELISA desarrollado en nuestro laboratorio para la detección RVA en equinos.	38
Introducción.....	38
Materiales y Métodos	40
Resultados.....	45
Discusión	54
Capítulo 2.....	62
Caracterización molecular de los Rotavirus equinos circulantes en potrillos de Argentina durante el período 2009 - 2014.....	63
Materiales y Métodos	65
Resultados.....	67
Discusión	73
Capítulo 3.....	77
Análisis Evolutivo de los genes G3, G14, I2, I6, P[12] y E12 de Rotavirus Equino.....	78
Introducción.....	78
Materiales y Métodos	80
Resultados.....	83
Discusión	93
Capítulo 4.....	97

Ligamiento genético de los segmentos que codifican las proteínas VP6:VP7 en Rotavirus equino.....	98
Materiales y Métodos	102
Resultados.....	105
Discusión	115
Capítulo 5.....	117
Estudio de Coronavirus y Norovirus como agentes causantes de diarrea en potrillos por métodos de rutina y por estudios de metagenómica	118
Parte 1.....	120
Estudiar la presencia Coronavirus y Norovirus en muestras de materia fecal de potrillos con diarrea utilizando técnicas serológicas y moleculares convencionales.....	120
Materiales y Métodos	120
Resultados.....	125
Conclusiones parciales.....	127
Parte 2.....	128
Metagenómica de materia fecal de potrillos con diarrea mediante <i>Next Generation Sequencing</i>	128
Materiales y Métodos	130
Resultados.....	133
Discusión	136
Conclusiones	140
Discusión.....	141
Discusión	142
Perspectivas.....	147
Referencias.....	148

Listado de figuras y tablas

Figura I. 1	<i>Mecanismo de infección de RVA en células de las microvellosidades del intestino delgado.</i>	18
Figura I. 2	<i>A: Virión completo de RVA. (Li et al., 2009) B: Unidad estructural de RVA que contiene un trímero de VP4 (rojo), las proteínas VP7 (amarillo) que rodean al trímero y las proteínas VP6 (verde) de la capa intermedia. También se observa la interacción de VP6 con las proteínas VP2 (azul) de la capa interna (core) (Trask et al., 2012).</i>	19
Figura I. 3	<i>Distribución global de los genotipos de RVA equinos. Se muestra la proporción de los genotipos descritos en cada continente. Tomado de Papp y col. (2013).</i>	21
Figura I. 4	<i>Vacunas anti Rotavirus equinos disponibles en el mercado utilizadas en USA y Europa (Pfizer-Zoetis), en Japón (Nisseiken Co Lda) y Argentina (Biochemiq S.A.).</i>	24
Figura I. 5	<i>Esquema del genoma de CoVE. Cada recuadro se corresponde con un ORF y se indican las proteínas estructurales que codifican (Zhang et al., 2007).</i>	27
Figura I. 6	<i>Árbol filogenético de la clasificación estándar de NoV propuesto para la nomenclatura, tomado de (Zheng et al., 2006). Se observan los 5 genogrupos (GI a GV) con los 29 genotipos definidos en el estudio (8 genotipos en GI, 17 genotipos en GII, 2 genotipos en GIII, 1 genotipo en GIV y 1 genotipo en GV), y las cepas que agrupan dentro de cada uno de los genotipos correspondientes.</i>	30
Figura R1. 1	<i>Métodos diagnósticos validados en este trabajo. A: Pathfinder™ Rotavirus; B: FASTest Rota® strip; C: ELISA KERI.</i>	41
Tabla R1. 1	<i>Resultados de los tres métodos utilizados para detectar RVA equino en materia fecal de potrillos con diarrea.</i>	47
Figura R1. 2	<i>Árbol filogenético construido en base al ORF del gen de VP6 de RVA equino, utilizando el método NJ con el modelo evolutivo K2P. En los nodos se muestran valores de remuestreo superiores al 80%.</i>	47
Figura R1. 3	<i>Fotografía de partículas virales compatibles con Rotavirus observadas por microscopía electrónica con 60K de aumento.</i>	48
Tabla R1. 2	<i>Límite de detección de los métodos analizados.</i>	47
Figura R1. 4	<i>La figura muestra el promedio de los resultados obtenidos para todas las muestras del análisis ROC ("Receiver Operating Characteristics") en cada uno de los métodos comparados (▲ Pathfinder™ Rotavirus; ○ FASTest® Rota STRIP; □ ELISA KERI), (n=50 verdaderos positivos; n=122 verdaderos negativos).</i>	49
Figura R1. 5	<i>La figura muestra la curva ROC del método Pathfinder™ Rotavirus cuando se analiza la población completa. Las líneas (– –) indican el intervalo de confianza de las mediciones realizadas.</i>	50

Figura R1. 6	<i>La figura muestra la curva ROC del Pathfinder™ Rotavirus cuando se analiza solamente la población G14P[12]-I2. El recuadro (– –) indica el intervalo de confianza de las mediciones realizadas.</i>	50
Figura R1. 7	<i>A: Análisis ROC utilizando los datos de absorbancia corregida (ΔOD). B los datos de la absorbancia en la captura positiva (R1).</i>	51
Figura R1. 8	<i>A: Curva ROC (sensibilidad respecto a 100-especificidad “0”) con el intervalo de confianza. B: Punto de corte utilizado en base a la población de referencia.</i>	52
Tabla R1. 3	<i>Análisis del ELISA KERI.</i>	52
Tabla R1. 4	<i>Cambios de aminoácidos en el dominio B de VP6.</i>	53
Tabla R1. 5	<i>Cambios de aminoácidos en el dominio H de VP6.</i>	53
Tabla R1.S1	<i>Verdaderos positivos.</i>	57
Tabla R1.S2	<i>Verdaderos negativos.</i>	58
Tabla R2.1	<i>Brotos y muestras analizadas.</i>	67
Figura R2. 1	<i>Histogramas de frecuencias correspondientes a la tasa de detección de RVA equino en muestras (A) y brotes de diarrea (B) en potrillos de nuestro país en función del tiempo (años).</i>	68
Figura R2. 2	<i>Detección de RVA en muestras de materia fecal (A) y en brotes de diarrea en potrillos (B) durante el período estudiado (2009-2014) y en todo el período del cual se tienen registros (1992-2014).</i>	69
Tabla R2.2	<i>Resumen de las cepas de RVA equino genotipificadas.</i>	69
Figura R2. 3	<i>Frecuencia de detección de los P genotipos G3 y G14 (expresada en porcentaje) durante el período estudiado.</i>	70
Figura R2. 4	<i>Arboles filogenéticos construidos con la secuencia nucleotídica del ORF de G3 (A), G14 (B) y P[12] (C). Las cepas analizadas en este estudio están identificadas con un círculo blanco, mientras que las secuencias Argentinas de referencia con un círculo negro.</i>	72
Tabla R2.S1	<i>Secuencias obtenidas.</i>	75
Tabla R3.1	<i>Valores en la convergencia de las corridas realizadas en BEAST.</i>	83
Tabla R3.2	<i>TMRCAs de los grupos de secuencias Argentinas.</i>	84
Tabla R3.3	<i>Tasa de mutación de los genes estudiados.</i>	84
Figura R3. 1	<i>Se muestran los MCCT de los segmentos de VP7 (G3 y G14) y VP6 (I6 e I2) obtenidos en el análisis. Se observa la formación de los linajes Sudamericanos (azul), Europeo (verde) y Asiático (rojo) en todos los genotipos. En los nodos se muestran los valores de probabilidad posterior correspondiente.</i>	87

- Figura R3. 2** MCCT construido a partir del gen de VP8 genotipo P[12]. En azul se muestran las cepas de Argentina, en verde las cepas de Europa y en rojo las cepas de Asia. Los valores en los nodos corresponden a valores de probabilidad posterior (pp). _____ 88
- Figura R3. 3** (A): Árbol filogenético de distancias construido con cepas de todos los genotipos de NSP4 reportados. El árbol fue construido utilizando el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013) con el modelo evolutivo TN93. (B): MCCT de las cepas E12, en azul oscuro (Eq) se observan las cepas equinas, en azul claro las cepas bovinas (Bo-1) y en celeste las cepas bovinas, caprinas, humanas y de guanaco en semi-cautiverio (Bo-2). En los nodos se grafica la edad del ancestro y la pp de cada nodo entre paréntesis. La barra inferior representa la edad expresada en años, marcada con una cruz verde se observa la fecha de la 1° fundación de Buenos Aires en 1536. _____ 90
- Figura R3. 4** MCCT de los genes estudiados donde se indica la estructura geográfica. En azul se observan las cepas sudamericanas, en verde las cepas europeas y en rojo las cepas asiáticas. Los números romanos indican los linajes propuestos de acuerdo a su origen geográfico. Para el gen de NSP4 (E12) se muestra la estructura dada por especies (Eq= equinos, Bo= bovinos). A su vez, las poblaciones bovinas muestran 2 sub-poblaciones para este gen (Bo-1: exclusivamente cepas bovinas, y Bo-2: cepas bovinas, caprinas, humanas y de guanacos en semi-cautiverio). _____ 91
- Figura R3. 5** Gráficos de Skyline donde se observa que la población tiene un comportamiento constante a lo largo del tiempo. La línea negra indica la media estimada y la sombra azul representa el intervalo de confianza del 95%. Los gráficos fueron calculados utilizando los valores que se muestran en la Tabla R3.1. _____ 92
- Figura R3. 6** Hipótesis propuesta sobre la generación del genotipo E12. El gráfico muestra las rutas de conquista realizadas por los españoles desde su llegada al continente en 1492, mostrando las fundaciones de Buenos Aires (1536 y 1580), la fundación de la Capitanía de Chila (1541) y la fundación de Lima (1540). El círculo rojo indica la zona donde probablemente se produjeron las infecciones mixtas entre cepas de RVA autóctonos y los RVA presentes en los animales introducidos. El recuadro muestra el mecanismo por medio del cual se podría haber generado la infección mixta entre cepas autóctonas (genoma azul) y cepas presentes en los caballos (genoma naranja), y el resultado obtenido de dicha infección, fijación del segmento de NSP4 genotipo E12. _____ 95
- Figura R4. 1** A: Partícula de Rotavirus completa. Se muestran los canales que se forman (Tipo I y II). B: Esquema del virión donde se muestran las capas que lo componen, capa externa (VP7 [Amarillo] y VP4 [rojo]), capa intermedia (VP6 [verde]) y capa interna (VP2 [celeste]). C: Vista ampliada de las proteínas que componen las capas externa, intermedia e interna. D: Esquema donde se muestra como el ARN mensajero sale del virión para ser transcrito. E: Vista superior de un bloque de la capa externa donde se observan las proteínas VP4 en el centro y los 6 trímeros de VP7 a su alrededor. F: Vista superior de la capa intermedia donde se observan las proteínas VP4 en el centro y los seis trímeros de VP6 a su alrededor. En el centro del hexámero se observa el canal por donde se transporta el ARN mensajero (figuras tomadas de Mathieu et al., 2001 y Aoki et al., 2009). _____ 100
- Tabla R4.1** Secuencias de RVA equino utilizadas en el análisis estructural. _____ 103
- Tabla R4.2** Valores de soporte del modelado molecular. _____ 104

Figura R4. 2	Árbol filogenético construido con la secuencia nucleotídica del gen de VP7 de RVA equino. Las secuencias de Argentina se muestran marcadas con un círculo sólido, mientras que las demás cepas de RVA equino con un círculo vacío. Las cepas genotipo G3 se muestran comprimidas para un mejor análisis del genotipo G14. _____	105
Figura R4. 3	Árbol filogenético construido con la secuencia nucleotídica del gen de VP7 de RVA equino. Las secuencias de Argentina se muestran marcadas con un cuadrado sólido, mientras que las demás cepas de RVA equino con un cuadrado vacío. Las cepas genotipo G14 se muestran comprimidas para un mejor análisis del genotipo G3. _____	106
Figura R4. 4	Árbol filogenético construido con la secuencia nucleotídica del gen de VP6 de RVA equino. Las secuencias de Argentina se muestran marcadas con un círculo sólido, mientras que las demás cepas de RVA equino con un círculo vacío. Las cepas genotipo I6 se muestran comprimidas para un mejor análisis del genotipo I2. _____	107
Figura R4. 5	Árbol filogenético construido con la secuencia nucleotídica del gen de VP6 de RVA equino. Las secuencias de Argentina se muestran marcadas con un cuadrado sólido, mientras que las demás cepas de RVA equino s con un cuadrado vacío. Las cepas genotipo I2 se muestran comprimidas para un mejor análisis del genotipo I6. _____	108
Tabla R4.3	Distribución de genotipos de VP6 y VP7. _____	109
Tabla R4.4	Diferencias de aminoácidos entre los genotipos I6 e I2. _____	109
Figura R4. 6	Esquema de cintas de un monómero de VP6 donde se muestran las 5 regiones de contacto con VP7 propuestas por Mathieu y col. (2001) y Liu y col. (2009); B: Esquema de cintas de los genotipos de VP6 I2 (verde) y I6 (celeste) superpuestos, donde se aprecia la estructura idéntica y la ubicación de la inserción 299-300; C: Ampliación de la región de la inserción 299-300. _____	110
Figura R4. 7	Estructura molecular del trímero de VP6 donde se muestran las diferencias entre ambos genotipos (I2 vs I6), cada monómero se muestra en verde, celeste y azul, las diferencias se muestran en rosado; B: Uno de los monómeros fue removido para observar los cambios que se producen en el interior del trímero; C: Vista superior del trímero donde se aprecian los cambios en, o cerca de, los sitios antigénicos. _____	111
Figura R4. 8	Estructura molecular del trímero de VP7 en diferentes vistas mostrando los cambios involucrados en la interacción con VP6. Cada monómero se muestra en amarillo patito, amarillo claro y dorado. A: Vista lateral. B: Un monómero fue removido para observar los cambios en el interior del trímero. C: Vista superior (cara externa) donde se aprecian los cambios en, o cerca de, los sitios antigénicos. D: Vista inferior (cara interna). _____	112
Tabla R4.4	Diferencias de aminoácidos entre los genotipos G3 y G14 de RVA equino de Argentina. _ _____	112
Figura R4. 9	Esquema molecular de los trímeros donde se muestran los potenciales electrostáticos de la superficie de las moléculas de VP6 (I2 y I6) y VP7 (G3 y G14). A: vista lateral de los trímeros de VP6 (I2 y I6). B: vista superior del trímero de VP6 (I2 e I6), C: Vista de la cara interna del trímero de de VP7 (G3 y G14). La barra de escala se muestra en Kcal/mol. _____	114
Tabla R5. 1	Cebadores utilizados, Coronavirus y Norovirus. _____	126

Tabla R5. 2	<i>Muestras equinas analizadas para CoVE por ELISA.</i> _____	126
Figura R5. 1	<i>Distribución de las muestras positivas a CoV por ELISA en el período estudiado.</i> _____	126
Tabla R5. 3	<i>Grupos de muestras analizadas por NGS.</i> _____	126
Figura R5. 2	<i>Esquema del procesamiento de las muestras para entrar al Illumina HiSeq 2500. Tomado de Conceição-Neto et al., 2015.</i> _____	132
Figura R5. 3	<i>Análisis del viroma obtenido para el pool 1.</i> _____	134
Figura R5. 4	<i>Análisis del viroma del pool 2.</i> _____	135
Figura R5. 5	<i>Representación esquemática de los fragmentos hallados en el Pool 2 sobre un genoma de referencia de un Kobuvirus.</i> _____	137
Figura R5. 6	<i>Representación esquemática del genoma de los Mamastrovirus con los 3 marcos abiertos de lectura. Los recuadros indican las secuencias obtenidas por NGS en azul para el Pool 1 y en rojo para el Pool 2.</i> _____	138

Abreviaturas

ΔOD: Densidad óptica corregida	N: nucleocápside.
°C: Grados centígrados,	NGS: Next generation sequencing.
Å: Amstrong	NJ: Neighbor-joining
Abs: Absorbancia	nm: nanómetros
ABTS: 2-2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonato)	NoV: Norovirus
Ac: Anticuerpo.	NSP: Proteína No Estructural
Acs: Anticuerpos	NSP4: Proteína no estructural 4
ADN: Ácido desoxiribonucleico.	OD: Densidad óptica
Ag: Antígeno	ORF: Marco abierto de lectura
ARG: Argentina	PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
ARN: Ácido ribonucleico	PBS: Tampón fosfato salino
ARNdc: Ácido ribonucleico doble catenario	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
AUC: Área bajo la curva	PDB: Protein data base.
CaV: Calicivirus	pH: Potencial de hidrógeno
CoV: Coronavirus	PP: probabilidad posterior.
CoVb: Coronavirus bovinos	R1: Captura positive
CoVe: Coronavirus equinos	R2: Captura negative
CoVh: Coronavirus humano.	RAW: formato de datos crudos.
CV: Coeficiente de variación.	RCWG: Rotavirus Classification Working Group
DLP: Double layer particle	ROC: Receiver-Operating Characteristic
ELISA: Enzimo Lynked Immuno Sorven Assay	RT-PCR: Transcripción reversa seguida de una reacción en cadena de la polimerasa
ESS: Tamaño efectivo de la muestra	RV: Rotavirus
FFFU: unidades formadoras de focos fluorescentes.	RVA: Rotavirus grupo A
HDP: Highest density posterior	S: Espícula
HE: Hemaglutinina	SDS: duodecil sulfato de sodio
ICTV: Comité internacional de taxonomía viral.	TLP: Triple layer particle (Partícula triple capa)
IgG: Inmunoglobulina G.	TMRCA: Ancestro común más reciente
K2P: Kimura-2 correction parameter	UK: Reino Unido
kDa: Kilo Daltons	ul: microlitros
KERI: Kit de Elisa Rotavirus INTA	UPGMA: agrupación de las secuencias que presentan la menor distancia genética entre sí.
KPB:	USA: Estados Unidos
Kpb: Kilo pares de bases.	UV: Ultra violeta
MCCT: Árbol que maximiza la probabilidad de las ramas.	VP: Proteína estructural
MCMC: Cadenas de Markov-Monte Carlo	WTA: Whole transcriptome amplification.
ME: Microscopía electrónica	
MF: Materia fecal	
ml: mililitros	

Resumen

Las diarreas neonatales representan uno de los síndromes clínicos más relevantes y frecuentes en potrillos menores de 6 meses de edad. Rotavirus grupo A (RVA) es el principal agente viral asociado a diarreas en potrillos, a nivel mundial. Sin embargo, en aproximadamente el 50% de los casos de diarrea no se puede establecer su etiología. Por estos motivos, los objetivos de este trabajo fueron, profundizar el conocimiento de la epidemiología molecular y, de las características evolutivas y estructurales de RVA equino, y estudiar la presencia de otros agentes virales como posibles causantes de diarreas en potrillos de nuestro país.

El estudio de RVA equino comenzó con la determinación de la sensibilidad y especificidad de tres métodos de diagnóstico. En segundo lugar, se estudió la epidemiología molecular de los RVA circulantes en equinos durante el período 2009 – 2014. Las variantes G3P[12] y G14P[12] fueron las cepas detectadas con una prevalencia cíclica y alternada entre los años bajo estudio. Con todas las cepas disponibles se realizó un estudio evolutivo, determinándose la monofilia de los RVA equinos de Argentina. Se identificó el genotipo E12 -correspondiente al gen codificante de la enterotoxina viral NSP4- como un indicador geográfico que permitió trazar la evolución de los RVA equino de Sudamérica, desde la primera fundación de Buenos Aires en 1536. El resultado obtenido permite plantear la hipótesis de una infección inter especie que dio origen a una cepa emergente resultado de la reasociación de genes entre las cepas de RVA de animales autóctonos (guanacos) y las cepas de RVA de los animales introducidos (equinos y bovinos). Se detectó el fenómeno de transferencia y fijación del genotipo E12 autóctono en las cepas de RVA circulantes en equinos y bovinos de Sudamérica. El estudio de RVA equino incluyó también un análisis estructural que permitió explicar el ligamiento genético observado entre las variantes de las proteínas estructurales VP7 y VP6. Finalmente, mediante la tecnología de “*next generation sequencing*”, se estudió el viroma de la materia fecal de potrillos con diarrea. Así se determinó la presencia de otros agentes virales, potenciales causantes de diarrea.

En conclusión, este trabajo profundizó aspectos relacionados con el diagnóstico de RVA equino, aportando datos novedosos respecto a los procesos evolutivos, filodinámicos y estructurales que podrían extrapolarse a otros virus de genoma segmentado. Asimismo, se describió por primera vez el viroma de materia fecal de potrillos con diarrea, sugiriendo otros posibles agentes causales. Nuestros resultados enfatizan la importancia de realizar una vigilancia epidemiológica continua de las diarreas en potrillos, profundizar en la identificación y caracterización de los agentes virales asociados, con el fin último de realizar el diseño racional de nuevas herramientas de prevención y control.

Abstract

Neonatal diarrhea is one of the most relevant and frequent syndromes in foals younger than six months of age. Group A Rotavirus (RVA) is the main viral agent associated to diarrhea in foals, worldwide. However, around 50% of the diarrhea episodes remain without an etiological diagnosis. The aims of the present work were, to go in detail into the molecular epidemiology, the evolutive and structural characteristics of equine RVA and to investigate the presence and role of other viral agents as potential causes of diarrhea in Argentinean foals.

The study in equine RVA started with the evaluation of the sensitivity and specificity of tree diagnosis tests. Secondly, we studied the molecular epidemiology of the RVA circulating in Argentinean foals from 2009 to 2014. The G3P[12] and G14P[12] genotypes were detected with a cyclic prevalence among the years under study.

Considering all the genome sequences of the equine RVA strains available an evolutive study allowed us to determine the monophyletic clustering of the equine RVA detected in Argentina. The E12 genotype -encoding the viral enterotoxin NSP4- was defined as a geographical marker which allows describing the evolution of the equine RVA present in South America since the first foundation of Buenos Aires in 1536. The obtained results led to the hypothesis that an inter-species transmission gave rise to new RVA genome constellations as a result of gene reassortment between the RVA circulating in American autochthonous species (*Lama guanicoe*) and the RVA of the introduced species (equine and bovine). The E12 gene from the autochthonous RVA to the equine and bovine RVA backbones were transferred and fixed. The study of equine RVA also included a structural analysis that showed the genetic linkage between the two genotypes of the VP7 and VP6 structural proteins. Finally, the virome of diarrheic samples from foals were studied by “*next generation sequencing*” technology.

In conclusion the present work contributed new information regarding equine RVA diagnosis and addressed aspects related to evolutive, phylodynamic and structural processes of RVA that might be extrapolated to other viruses carrying segmented genomes. In addition, the analysis of the virome from samples from diarrheic foals allowed us to detect other potential viral agents associated to diarrhea in equines. Our results remark the importance of conducting the continuous surveillance of diarrhea in foals, the identification and characterization of the associated viral agents with the final goal of the rationale design of new control and preventive tools.

Introducción

- 1- La Industria hípica*
- 2- Rotavirus Equino*
- 3- Otros agentes virales*

1. La Industria Hípica

Hípica es el término que se aplica a todo lo relacionado con los deportes ecuestres, aunque en algunos países de América latina se refiere exclusivamente a las carreras de caballos. Algunos caballos destacados por su desempeño deportivo pueden costar millones y a su vez generarlos con facilidad como sementales. Así, la cría, el entrenamiento, las competiciones y las apuestas suponen una importante actividad económica (Editorial UTTA, 2014).

El caballo ha tenido un papel preponderante en nuestro territorio, desde la colonización de estas tierras hasta nuestros días. Actualmente, la industria hípica es un segmento de la producción agropecuaria significativo y de importante volumen en nuestra economía nacional, así como en las economías regionales. El espectro de implicancia de este mercado es diverso, como así también los matices a considerar en cuanto a su impacto. No sólo desde el punto de vista de la producción agropecuaria nacional, sino también su importancia en torno al deporte, juego, entretenimiento, recreación y empleo que genera. Por todo esto, los espectáculos hípicos son el último eslabón de una cadena de producción agropecuaria (Editorial UTTA, 2014).

A nivel mundial, Argentina se ubica entre los 10 países con mayor número de caballos del mundo; ocupa el 5^{to} lugar como productor mundial de caballos de carrera y el 1^{ero} en caballos de polo. Además, es el 1er exportador de carne equina para consumo humano (Editorial UTTA, 2014).

En nuestro país, la población de caballos se estima en 2,7 millones, constituyendo la industria hípica el 5% del producto bruto agropecuario; generando movimientos económicos superiores a US\$800 millones al año. Argentina cuenta con 36 hipódromos oficiales y más de 300 extraoficiales. Cada caballo de carrera o polo genera entre 6-7 puestos de trabajo (promedio 2,3 puestos de trabajo en cualquier actividad), generando aproximadamente 73.200 empleos directos, más de 110.000 indirectos e involucra, en total, a más de 730.000 personas (Editorial UTTA, 2014).

La industria hípica en nuestro país se relaciona directamente con varios sectores, como ser a) la industria veterinaria, b) transporte, fletes y seguros, c) alimentos y forrajes, d) herrajes, e) prensa y publicidad, f) talabarterías y enseres y, g) operadores o intermediarios de ventas (Editorial UTTA, 2014; Roy Hora, 2014).

Los caballos con registro de “pedigree” en nuestro país deben inscribirse en las entidades que los nuclean, siendo estas i) la Sociedad Rural Argentina, ii) la Asociación Argentina de Fomento Equino y, iii) el Jockey Club Argentino (Stud Book).

En el año 2014, de un total de 13.803 yeguas servidas (inscriptas en el Jockey Club Argentino) nacieron 8033 potrillos y potrancas en aproximadamente 400 establecimientos de cría de caballos sangre pura de carrera; siendo el número de potrillos nacidos en cada establecimiento entre 10 y 200 (“Jockey Club Argentino,” 2015). En general, la prevalencia de enfermedades infecciosas en los potrillos está directamente relacionada con la densidad de la población, siendo más frecuentes cuando hay condiciones de cría intensiva, por ejemplo en establecimientos con más de 30 potrillos por temporada (Magdesian et al., 2014).

Diarrea en Potrillos

La diarrea en los potrillos es una afección frecuente que puede tener consecuencias sistémicas graves, incluso fatales. La etiología incluye agentes bacterianos, virales y parasitarios, además de una variedad de patologías no infecciosas como asfixia perinatal, mal nutrición o agentes mecánicos (Magdesian et al., 2014). Los cuadros clínicamente más relevantes y frecuentes en potrillos neonatos son las diarreas infecciosas de origen bacteriano (clostridiosis y salmonelosis) y virales (principalmente Rotavirus). Existen, asimismo, un amplio porcentaje de estas diarreas en las que no se puede identificar la etiología (Frederick et al., 2009; Magdesian et al., 2014).

En esta tesis se aborda: i) el estudio de las diarreas virales (Rotavirus) en potrillos de la Argentina y; ii) la búsqueda de otros posibles agentes causales, los que han sido descritos en otras especies animales pero no en potrillos o que han sido estudiados en otras partes del mundo pero no han sido identificados en nuestro país. Para esto último, se emplearon métodos de diagnóstico de rutina y también técnicas de última generación, como la secuenciación (“*next generation sequencing*”). En cuanto al estudio del principal agente viral causante de diarrea, Rotavirus, se estudiaron los métodos disponibles para su detección en equinos; se realizó un estudio epidemiológico del período 2009 – 2014, se analizó la evolución de Rotavirus equino en la Argentina; se estudió la relación entre 2 proteínas de la cápside viral utilizando análisis de estructuras de proteínas.

2. Rotavirus Equino

- a- *Diarrea por Rotavirus*
- b- *Etiología*
- c- *Epidemiología*
- d- *Clasificación*
- e- *Diagnóstico*
- f- *Prevención*
- g- *Otro patógenos virales: Coronavirus y Norovirus*

a) Diarrea por Rotavirus

Rotavirus (RV) grupo A (RVA) Equino fue detectado por primera vez en materia fecal de potrillos con diarrea en Inglaterra en 1975 (Flewett et al., 1975), a partir de ese momento fue diagnosticado en numerosas oportunidades en prácticamente todos los países del mundo en los que la cría de caballos es una actividad productiva, considerándose el principal agente viral causante de diarrea en potrillos de prevalencia mundial (Magdesian et al., 2014).

La diarrea en potrillos jóvenes es una enfermedad que tiene un gran impacto económico, costos asociados al tratamiento de los animales afectados, eventuales muertes, implementación de planes de prevención (vacunación), diagnóstico, etc. En Argentina, la enfermedad se presenta en forma de brote, anualmente desde septiembre a enero (en coincidencia con la temporada de parición), afectado una gran proporción de los animales susceptibles. La vacunación, si bien no previene la infección, contribuye en reducir la severidad de los cuadros clínicos (Barrandeguy *et al.*, 1998) y la reducción de virus en el ambiente (Estes and Greenberg, 2013). Cuando se produce un brote de diarrea en potrillos, la morbilidad varía entre el 20% y el 80%, dependiendo de la calidad de la transferencia de inmunidad pasiva desde las yeguas madres a sus crías, de la cantidad de virus en el ambiente y de la densidad de población (Magdesian et al., 2014).

Las diarreas asociadas a RVA equino causan pérdidas económicas significativas en los establecimientos de cría de caballos (haras), debido a que los potrillos enfermos deben ser colocados en aislamiento, y las hembras preñadas deben ser separadas a fin de evitar la dispersión de la enfermedad, lo cual es una labor intensiva y costosa para los establecimientos (Bailey *et al.*, 2013; Ntafis *et al.*, 2010; Wohlfender *et al.*, 2009).

La diarrea por RVA tiene una elevada morbilidad y, aunque la enfermedad clínica es usualmente auto-limitada, la deshidratación, otras infecciones asociadas y las úlceras duodenales puede ocasionar la muerte. En potrillos, la enfermedad se presenta clínicamente con inapetencia, depresión, diarrea, deshidratación y pirexia, afectando animales de 1 día a 4 meses de edad, siendo los más jóvenes los que muestran signos clínicos más severos. El período de incubación es generalmente corto, con el primer evento de diarrea entre el día 1-4 post exposición al agente. Además, el virus puede ser diseminado por materia fecal antes, durante y luego de producida la diarrea (Estes and Greenberg, 2013).

Los RVA son altamente contagiosos, replican rápidamente en el epitelio intestinal y se eliminan en elevado título en las heces de los animales enfermos; siendo entonces la transmisión por vía fecal-oral. La patogénesis de RV es considerada multifactorial. Los RV infectan las células de las microvellosidades del duodeno, yeyuno e íleon, pero no las células de la cripta. El virus replica en el citoplasma de las células y los viriones son liberados por lisis de las células infectadas. La destrucción de los enterocitos resulta en el acortamiento de las vellosidades, lo que produce diarrea por mala absorción. Sin embargo, la severidad de la diarrea no siempre se correlaciona con lesiones histológicas, sugiriendo otro mecanismo de patogénesis. La proteína viral no estructural 4 (NSP4), producida en la célula infectada, ha sido identificada como una enterotoxina viral. Esta actuaría por varios mecanismos, tales como, inhibición del cotransporte sodio-glucosa, reducción de las enzimas disacaridasas y a nivel del sistema nervioso entérico, aumentando el peristaltismo y la secreción de agua. Esto produce la acumulación de disacáridos en el lumen del intestino, diarrea osmótica y también secretoria. (Figura I.1) (Estes and Greenberg, 2013).

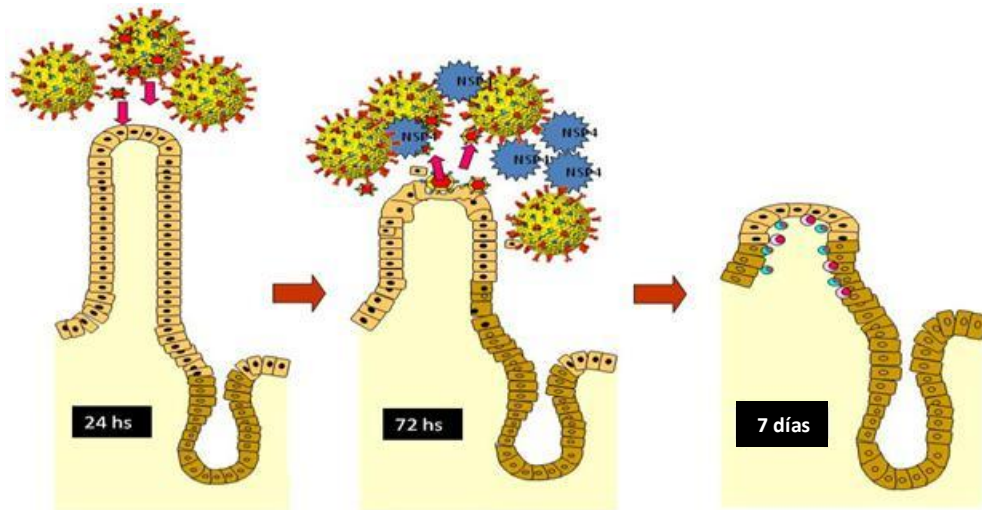


Figura I. 1 Mecanismo de infección de RVA en células de las microvellosidades del intestino delgado.

b) Etiología

La familia *Reoviridae*, subfamilia *Sedoreoviridae*, contiene cinco géneros: *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus*, *Aquavirus* y *Rotavirus*. El Género *Rotavirus* se caracteriza por poseer viriones maduros desnudos de entre 80-100nm (1,000Å) de diámetro con el genoma compuesto por 11 segmentos de ARN doble cadena (ARNdc), que codifican las 11/12 proteínas virales, de las cuales, seis son estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) y cinco/seis son no estructurales (NSP1-NSP5/6). El virión está formado por una triple cápside proteica de simetría icosaédrica organizadas en tres capas concéntricas de proteínas que le dan a la partícula la apariencia de una rueda (del latín, rota) al observarse por microscopía electrónica. El virión completo se denomina partícula TLP (por sus siglas en inglés “Triple layer particle”). La cápside externa está compuesta por la glicoproteína VP7 y la espícula viral VP4. El principal antígeno de la cápside externa es la glicoproteína VP7 (30% del virión), principal antígeno neutralizante, altamente variable. Los RVA se clasifican en G-genotipos en base a variaciones nucleotídicas en la secuencia del gen viral que codifica para ésta proteína y en G-serotipos según sus variantes antigénicas. Las espículas, 60 de 10-12 nm de largo, están formadas por trímeros de VP4 (1,5% de la masa viral), que protruyen de la cápside, son altamente variable y determinan el P-genotipos de las cepas. VP4 es una proteína sensible a proteasas que se cliva por la pancreatina intestinal en dos

subunidades, VP5* y VP8*. El clivaje de VP4 debe ocurrir para que el virus sea infeccioso. Además, VP4, presenta actividad de hemaglutinina, contiene epitopes neutralizantes específicos (P tipos) y participa en la adsorción y penetración del virus a la célula. Actualmente, la secuencia nucleotídica del gen de VP8* es la que se utiliza para determinar el P-genotipo de las cepas de RVA (Figura I.2) (Estes and Greenberg, 2013).

La cápside intermedia está formada por la proteína VP6, la cual es el principal antígeno viral (constituye el 50% de la masa del virión) (Figura I.2). En base a la secuencia nucleotídica de la proteína VP6, los RVA se clasifican en 8 grupos (A-H). Los RVA son los únicos descritos hasta el momento en equinos de todo el mundo (Estes and Greenberg, 2013; Magdesian et al., 2014).

El “core” viral, formado por la proteína VP2 (capa interna), contiene el complejo ARN/proteínas (VP1 y VP3). Estas tres proteínas forman un complejo enzimático siendo VP1, la ARN polimerasa viral ARN dependiente, y VP2, que actúa como proteína de empaquetamiento debido a que posee capacidad de unión al ARN. VP1 y VP2 juntas poseen actividad replicasa. VP3 es una enzima multifuncional que posee actividad de guanidiltransferasa y metiltransferasa. Estas tres proteínas participan en los procesos de transcripción y replicación viral (Estes and Greenberg, 2013).

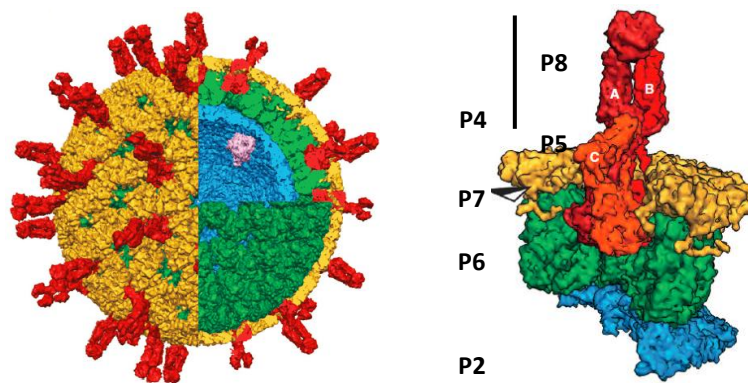


Figura I. 2 A: Virión completo de RVA. (Li et al., 2009) B: Unidad estructural de RVA que contiene un trímero de VP4 (rojo), las proteínas VP7 (amarillo) que rodean al trímero y las proteínas VP6 (verde) de la capa intermedia. También se observa la interacción de VP6 con las proteínas VP2 (azul) de la capa interna (core) (Trask et al., 2012).

c) Epidemiología de RVA en equinos

Los RVA son endémicos en las poblaciones equinas, habiendo sido detectados en Inglaterra, Estados Unidos, Japón, Nueva Zelandia, Alemania, Italia, Grecia, Francia, Suiza, Bélgica, Hungría, Holanda, India, Venezuela y Argentina, con una prevalencia que varía entre el 20% y el 77% (Figura I.3) (Baily y col., 2013; Papp y col., 2013).

Las combinaciones G3P[12] y G14P[12] se consideran epidemiológicamente importantes en equinos (Figura I.3) (Bailey et al., 2013; Papp et al., 2013b). Sin embargo, otras combinaciones fueron reportadas en diferentes lugares del mundo. En el Reino Unido, a mediados de los '70 se aislaron las cepas RVA/Horse-tc/GBR/H-2/1975/G3P[12] y la cepa RVA/Horse-tc/GBR/H-1/1975/G5P[7] (Flewett et al., 1975), siendo esta última, de origen porcino (Hoshino et al., 1983). Más tarde, en 1991, se detectó la cepa RVA/Horse-tc/GBR/L338/1991/G13P[18], (Browning et al., 1991a). A mediados de los '90 se aisló una cepa de presunto origen bovino RVA/Horse-tc/GBR/26-94/199X/G8P[1] (Isa et al., 1996). Por otra parte, en Japón se aisló la cepa RVA/Horse-tc/JPN/R-22/1984/G10P[11], que también posee un genoma típico bovino (Imagawa et al., 1992). En Argentina, una combinación inusual, con un genoma típico de felinos/caninos, fue detectada en 2008 (RVA/Horse-wt/ARG/ E3198/2008/G3P[3]) (Miño et al., 2013).

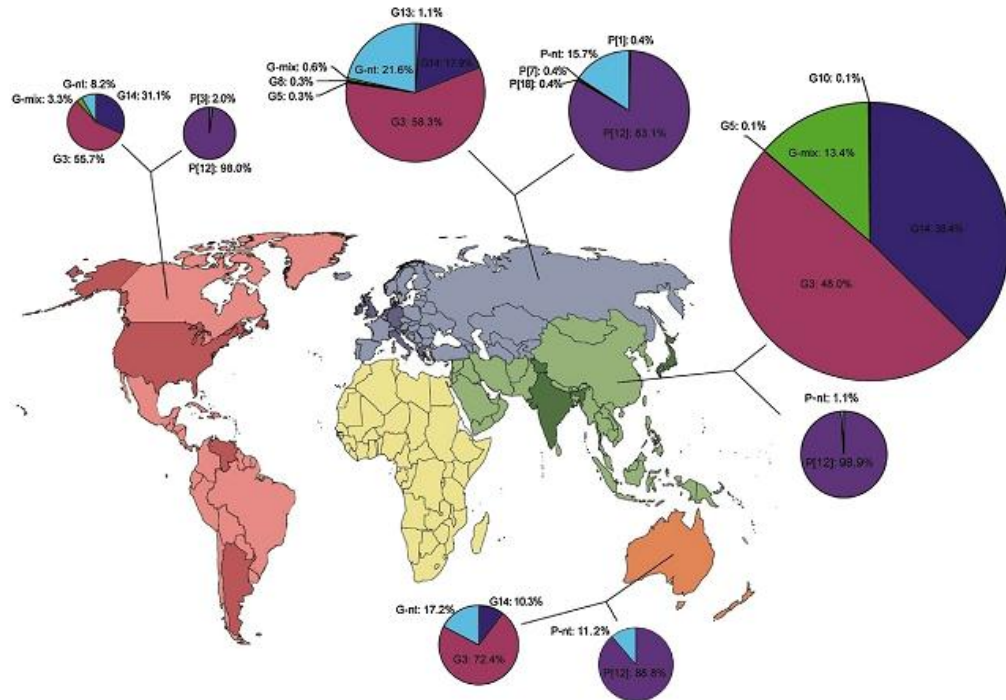


Figura I. 3 Distribución global de los genotipos de RVA equinos. Se muestra la proporción de los genotipos descritos en cada continente. Tomado de Papp y col. (2013).

Los resultados obtenidos de la secuenciación de genomas completos de RVA confirman que G3P[12] y G14P[12] son RVA típicos de equinos y que los aislamientos de otros genotipos fueron casos eventuales de transmisión inter especie, dado que estas cepas no volvieron a ser reportadas en la población equina (Matthijnsens et al., 2012; Nemoto et al., 2015).

Analizando el genoma completo de los RVA que infectan a los equinos, se evidencia que las dos cepas de relevancia epidemiológica G3P[12] y G14P[12] poseen 8 de los 11 segmentos altamente conservados entre sí, presentando 2 variantes en las proteínas, VP6 (I2 e I6), VP7 (G3 y G14) y NSP4 (E2 y E12) (Matthijnsens et al., 2012; Nemoto et al., 2015).

Si bien, se han descrito infecciones mixtas con más de una cepa de RVA, incluyendo virus con diferentes G-tipos. Del mismo modo, co-infecciones con otros patógenos como *Salmonella spp.*, *Cryptosporidium spp.* y Coronavirus equino también han sido reportadas y se desconoce su importancia clínica (Frederick et al., 2009; Slovis et al., 2013).

d) Clasificación taxonómica de los RVA equinos

La clasificación de los RVA originalmente fue realizada por un sistema binario, similar al utilizado en Influenza, basado en la reactividad de anticuerpos contra las proteínas de superficie VP7 (glicoproteína) y VP4 (sensible a proteasas), determinando así el G- y P- serotipo respectivamente (Estes and Greenberg, 2013). En el año 2008 se creó el “*Rotavirus Classification Working Group*” (RCWG), que reunió a especialistas y referentes de todo el mundo en un comité encargado de evaluar los genotipos virales existentes con el fin de organizar la información. Este comité definió las normas para denominar a las cepas de RVA, así como también la metodología para reportar un nuevo genotipo. Así, basados en la secuencias nucleotídicas se definieron los G- y P- genotipos. Los G- serotipos y G- genotipos mostraron una correlación perfecta. Por el contrario, los P-serotipos y los P- genotipos mostraron discrepancias. Para salvar este problema, se determinó el uso de corchetes ([]) para denotar el P- genotipo y diferenciarlo del serotipo. Hasta la fecha se han descrito 35 G- y 49 P- genotipos (Matthijnssens et al., 2008; Matthijnssens and Theuns, 2015). El RCWG también recomienda la secuenciación de genomas completos que permitan el estudio de eventos de recombinación lo que facilita la detección de transmisión interespecie, estudios de evolución viral, entre otros. Así, el genoma de una cepa de RVA se describe como Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, donde se expresa el genotipo (x) de los genes de VP7, VP4, VP6, VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 y NSP5 respectivamente (Matthijnssens et al., 2008). En nuestro país, se ha descrito la prevalencia de RVA equino G3 y G14, siempre asociados a P[12], así como también se caracterizaron los genes de VP6 I2 e I6 y el gen de la proteína no estructural NSP4 (E12) solo encontrado en Sudamérica (Garaicoechea et al., 2011; Matthijnssens et al., 2012; Miño et al., 2016).

e) Vía de transmisión y estabilidad de los RVA en el ambiente

La contaminación ambiental es la principal vía de transmisión de los RVA. Mientras que la dosis mínima para infectar potrillos susceptibles y el título de RVA excretado en materia fecal se desconoce en equinos, estudios realizados en otras especies sugieren que las heces de un solo potrillo infectado podrían causar la infección de la mayoría de potrillos susceptibles que entren en contacto con el animal enfermo, rápidamente (Estes and Greenberg, 2013; Magdesian et al., 2014).

Las partículas de RVA son altamente resistentes a la inactivación físico-química, permanecen estables dentro de un rango de pH de 3 a 9 y son capaces de conservar su infecciosidad durante meses (aproximadamente 9) en ambientes húmedos, con temperaturas entre los 4 y 20°C, en presencia de iones Ca^{+2} que estabilizan la cápside externa, confiriendo al virión la capacidad de sobrevivir en distintas superficies y contribuyendo a su rápida dispersión (Estes and Greenberg, 2013; Magdesian et al., 2014).

f) Diagnóstico

Las manifestaciones clínicas de la diarrea por RVA no son suficientes para su diagnóstico, por ello se requiere la detección del virus, del antígeno (Ag) viral, del ARN, o la demostración de una respuesta serológica (muestras de suero de fase aguda versus convaleciente) para confirmar que el agente causal de la diarrea es RVA. Aunque se considera a la microscopía electrónica como la técnica “*Gold Standard*”, esta es poco útil dado que requiere un equipamiento sofisticado, personal altamente entrenado, además de requerir una elevada concentración de partículas virales en la muestra para poder detectarlas. Por estas razones, se utilizan ensayos como los “*enzyme-linked immunosorbent assays*” (ELISAs), *inmuno-cromatografía*, *aglutinación de partículas de látex e hibridización en membrana*. Durante los años '80 y '90 se utilizaba la técnica de PAGE (*electroforesis en gel de poliacrilamida*), dado que los RVA se clasifican en electroferotipos en base al patrón de migración de las bandas. Actualmente los ensayos de ELISA y RT-PCR se utilizan en conjunto para realizar un diagnóstico apropiado de RVA en muestras de materia fecal (Estes and Greenberg, 2013; Magdesian et al., 2014). En ambos casos es importante controlar que los ensayos sean aptos para detectar correctamente las cepas equinas, en general se suelen utilizar ensayos de ELISA comerciales y RT PCR con cebadores diseñados para detectar RVA humanos y puede suceder que se requieran ajustes para lograr una óptima detección de los RVA equinos (Adlhoch et al., 2011).

g) Prevención

En la actualidad, se clasifica a los RVs dentro del gran grupo de patógenos de los cuales se cree que nunca serán completamente erradicados, dado que no generan inmunidad esterilizante y es capaz de infectar diferentes huéspedes animales, generando

constantemente la aparición de nuevas cepas virales por re-asociación de genes entre cepas de diferentes especies. Por ello, se postula que un objetivo razonable en la lucha contra este agente infeccioso es controlar o al menos reducir los signos clínicos asociados a la infección viral (Estes and Greenberg, 2013; Martella et al., 2010).

Actualmente se encuentran comercialmente disponibles 3 vacunas, desarrolladas en Estados Unidos (USA), Japón y Argentina. Las dos primeras son monovalentes, en USA se utiliza la cepa H-2 (G3P[12]) (Powell et al., 1997) y en Japón la cepa HO-5 (G3P[12]) (Nemoto et al., 2012). La vacuna desarrollada en Argentina es trivalente y contiene las cepas H-2 (G3P[12]), SA11 (G3P[2]) y la cepa NCDV-Lincoln (G6P[1]) (Barrandeguy et al., 1998), y es utilizada desde 1996 (Figura I.4). Ha sido demostrado que estas vacunas incrementan el título de anticuerpos (Acs) neutralizantes en suero de las hembras vacunadas y estos son pasivamente transferidos a sus potrillos mediante el calostro. El aumento de Acs pasivamente adquiridos se traduce en la completa protección o el retraso significativo en el inicio de la enfermedad, la disminución de la severidad y la duración del cuadro clínico (Barrandeguy et al., 1998; Powell et al., 1997).



Figura I. 4 Vacunas anti Rotavirus equinos disponibles en el mercado utilizadas en USA y Europa (Pfizer-Zoetis), en Japón (Nisseiken Co Lda) y Argentina (Biochemiq S.A.).

Este trabajo de tesis intenta profundizar tres aspectos de las diarreas por RVA equino. En el capítulo de resultados 1 se describe la validación de métodos de diagnóstico diseñados para humanos y bovinos (dos métodos comerciales y un método “in-house”) para su uso con muestras equinas. En el capítulo de resultados 2 se describe

la epidemiología molecular de los RVA equinos que han circulado en la Argentina desde 2009 a 2014, considerando el estudio de los genomas completos de las cepas detectadas en nuestro país. En el capítulo de resultados 3 se realizaron estudios evolutivos de las cepas de RVA equino detectadas en nuestro país, describiendo los linajes presentes, la tasa de mutación, el origen del gen E12 (proteína NSP4) solo presente en Sudamérica y, la filodinámica de los RVA equinos. Finalmente, en el capítulo de resultados 4 se realizaron análisis estructurales que describen la interacción entre variantes específicas de VP6 y VP7 (ligamiento genético en proteínas virales) que portan los RVA equinos.

3. Otros agentes virales causantes de diarrea en potrillos.

Diarreas en potrillos

Las diarreas infecciosas son causadas por microorganismos, siendo los más comunes Rotavirus grupo A, *Clostridium perfringens* tipo A y tipo C, *Clostridium difficile* y *Salmonella entérica* (Magdesian, 2005). En un estudio llevado a cabo durante 6 años (2003 – 2008) en el Centro de Medicina Veterinaria de la Universidad de Florida, *C. perfringens*, Rotavirus, *Cryptosporidium* spp., y *Strongyloides westeri*, fueron significativamente asociados a diarrea en potrillos (Frederick *et al.*, 2009). Dentro de los posibles agentes virales causantes de diarrea, además de Rotavirus, nuestros esfuerzos se concentraron en detectar la presencia de Coronavirus y Norovirus, debido a que el primero ha sido hallado en equinos en otros países y el segundo, si bien no se cuenta con información, podría infectar esta especie y provocar diarrea severa como las descritas en humanos por ejemplo.

Coronavirus

Coronavirus (CoV) es un patógeno que causa enfermedad respiratoria y entérica en una variedad de especies animales, incluyendo humanos, bovinos, cerdos, gallinas, pavos, perros, gatos, ratones, conejos, murciélagos y caballos (Masters & Perlman, 2013).

Actualmente, de acuerdo al informe del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) de 2012, Coronavirus bovino (CoVb), Coronavirus humano (CoVH-OC43), el virus de encefalomiелitis hemaglutinante porcina y los Coronavirus equino (CoVe) se incluyen dentro de la especie Betacoronavirus-1, del género Betacoronavirus, familia *Coronaviridae*, orden Nidovirales (de Groot, 2012).

Los CoV han sido detectados en equinos con enterocolitis, aunque hay pocos estudios que relacionen al patógeno como causante del síndrome clínico (González Arguedas, 2007). CoVE ha sido hallado en materia fecal de potrillos sanos y con enfermedad intestinal, así como también en caballos adultos, en quienes produce una diarrea severa, fiebre, anorexia, letargia e incluso la muerte. Los signos clínicos son muy generales, siendo además los cólicos y cambios en la consistencia de la materia fecal sucesos esporádicos. La muerte puede ser ocasional, pero en general el cuadro diarreico se da con una progresión rápida que se resuelve con el tratamiento paliativo (Masters & Perlman, 2013).

Los CoV son virus envueltos, de entre 80-120nm de diámetro, con genoma de ARN de polaridad positiva, que se transcribe en un gen policistrónico excepcionalmente largo de 27–31 kb (Masters & Perlman, 2013). Hasta la fecha, existe una única cepa equina con el genoma completo secuenciado (ECoV-NC99) publicado en 2007 (Zhang *et al.*, 2007). El genoma de los CoVE está compuesto por una hebra de ARN de polaridad positiva de 31Kpb. Aunque no se conoce la función exacta de todo el genoma, existen 11 (1a, 1b, 2–8, 9a y 9b) potenciales marcos abiertos de lectura (ORF). Los ORF 1a y 1b codifican para las polimerasas y replicasas virales y los ORF restantes codifican para las proteínas estructurales y accesorias (Figura I.5) (Zhang *et al.*, 2007).



Figura I. 5 Esquema del genoma de CoVE. Cada recuadro se corresponde con un ORF y se indican las proteínas estructurales que codifican (Zhang *et al.*, 2007).

Coronavirus equino fue aislado por primera vez en 1999 en Carolina del Norte, Estados Unidos, a partir de materia fecal de un potrillo con diarrea (cepa ECoV-NC99) (Guy *et al.*, 2000). Posteriormente en Japón, se detectó CoVE en heces de caballos adultos con enfermedad entérica y fiebre, la cepa se denominó ECoV-Tokachi09 y es muy similar, pero no idéntica, a la cepa NC99 (Oue *et al.*, 2011). En estudios realizados en Europa y Estados Unidos (USA), una enfermedad entérica leve en potrillos y brotes de diarrea severa, fiebre y muerte en caballos adultos, se asociaron a CoVE (Pusterla *et al.*, 2013).

Los CoVE han sido detectados mediante microscopía electrónica, aislamiento en cultivo celular, ELISA, RT-PCR y recientemente por PCR cuantitativo en tiempo real, en materia fecal de caballos con o sin enfermedad entérica (Masters & Perlman, 2013). La tasa de detección de CoVE es muy variada en los pocos reportes existentes. En Japón, un brote de enfermedad entérica ocurrido en 2009 afectó al 22% (132/600) de una población, donde se detectaron 3 materias fecales positivas a CoVE por RT-PCR (Oue *et al.*, 2011). Posteriormente, en USA, en estudios realizados en poblaciones de caballos adultos, se detectó un 86% (38/44) y un 7% (7/96) de equinos enfermos y sanos respectivamente, infectados con CoVE (Pusterla *et al.*, 2013). En Europa, la tasa de detección hallada es del 2% (12/595) y todos los casos fueron co-infecciones con *Cryptosporidium spp.* (Miszczak *et al.*, 2014). En nuestro país no existen reportes de detección de CoV en materia fecal de potrillos con diarrea.

Calicivirus (Norovirus)

Los Calicivirus (CaV), familia *Caliciviridae*, son agentes virales relacionados a un extenso espectro de enfermedades y lesiones en un amplio rango de huéspedes, incluyendo infecciones en el tracto digestivo (humanos, cerdos, terneros, perros, bisontes y mamíferos marinos), lesiones vesiculares y fallas reproductivas, estomatitis, enfermedad sistémica e infección del tracto respiratorio superior (gatos) y enfermedad hemorrágica (conejos) (Green, 2013).

La familia *Caliciviridae* incluye 5 géneros: Lagovirus, Nebovirus, Norovirus, Sapovirus y Vesivirus. Adicionalmente, 5 calicivirus no clasificados ("Atlantic salmon calicivirus", "Bavovirus", "Nacovirus", "Recovirus" y "Valovirus") podrían representar nuevos géneros (Clarke *et al.*, 2012).

Dentro de los Calicivirus, los Norovirus (NoVs) son el segundo agente causal de diarrea severa en niños, después de Rotavirus grupo A, y la causa más común de brotes de enfermedad gastroentérica aguda en humanos adultos, incluyendo aquellas transmitidas por alimentos. Además, son los principales agentes causantes de gastroenteritis epidémica no bacteriana y esporádica, habiendo sido identificados también en bovinos y otras especies animales relacionados con lesiones y signos clínicos de gastroenteritis (Green, 2013).

La infección con NoVs se caracteriza por requerir baja dosis infectiva (~10 partículas virales), por lo que la transmisión puede ocurrir por microgotas, contacto de persona a persona, o contaminación ambiental, del agua y alimentos. La excreción viral de un individuo infectado suele ser muy alta y persiste un período prolongado de tiempo (hasta 2 semanas), incluso después de haber desaparecido los síntomas (Green, 2013).

Los NoV son virus pequeños (27 a 40 nm) y no envueltos. Poseen dos proteínas estructurales, VP1 (60 kDa), la proteína mayor de la cápside y VP2 (20 kDa), la proteína pequeña. La cápside está formada por 180 copias (90 dímeros) de la proteína VP1 que se disponen otorgando simetría icosaédrica, T=3, a la partícula viral. Su genoma es de ARN simple cadena, lineal, de polaridad positiva, de 7,5 kb organizado en tres ORF. El ORF1 codifica las proteínas no estructurales, el ORF2 la VP1 y el ORF3 la VP2 (Thorne & Goodfellow, 2014).

Los NoV se clasifican en genogrupos (G, denotado con números romanos) y genotipos (denotado con números ordinarios del 1 al 33). Además, el genotipo se escribe separado del genogrupo por un punto (por ejemplo GI.1). Hasta la fecha se han reportado 5 genogrupos (GI-GV) y 33 genotipos, divididos de la siguiente manera: 8 dentro de GI (GI.1-8), 19 dentro de GII (GII.1-19), 2 dentro de GIII (GIII.1 y 2), 3 dentro de GIV (GIV.1-3), y 1 dentro del GV (GV.1) (Figura I.6) (Clarke *et al.*, 2012).

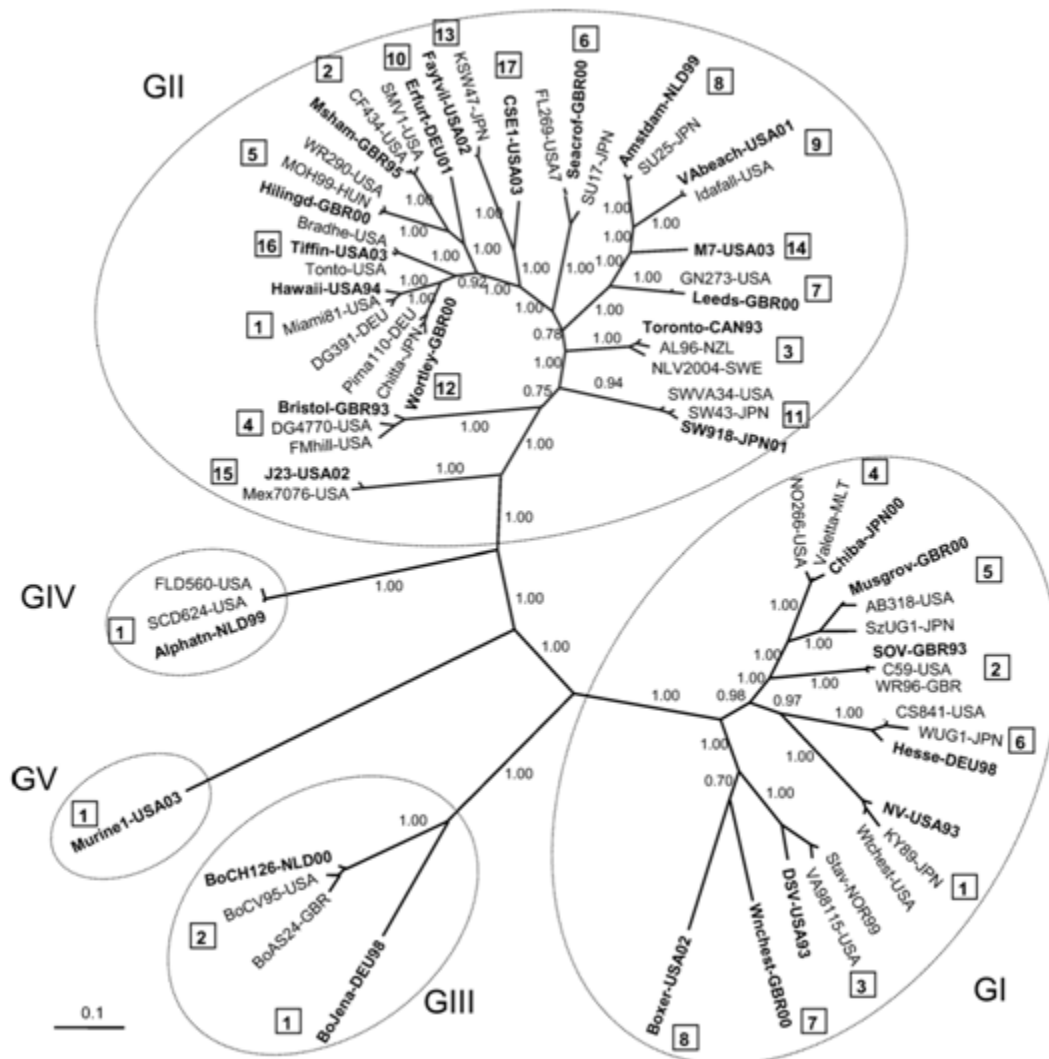


Figura I. 6 Árbol filogenético de la clasificación estándar de NoV propuesto para la nomenclatura, tomado de (Zheng *et al.*, 2006). Se observan los 5 genogrupos (GI a GV) con los 29 genotipos definidos en el estudio (8 genotipos en GI, 17 genotipos en GII, 2 genotipos en GIII, 1 genotipo en GIV y 1 genotipo en GV), y las cepas que agrupan dentro de cada uno de los genotipos correspondientes.

Dada la gran diversidad antigénica y genética de los NoV, los métodos de diagnóstico deben detectar un amplio rango de tipos virales. Además, la falta de un

sistema de cultivo celular, excepto para NoV murinos, ha constituido un obstáculo en el desarrollo de métodos de diagnóstico. Actualmente, la RT-PCR es considerada la técnica “*gold standard*” para el diagnóstico de NoV en muestras de materia fecal y ambientales. Sin embargo, sigue siendo muy difícil encontrar un par de cebadores que sean específicos para la detección de todos los NoV, por lo que existen cebadores diseñados para amplificar fragmentos pequeños y conservados del gen de la polimerasa viral de grupos de virus (RdRp) (Chhabra *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2011; Sai *et al.*, 2013).

Calicivirus en equinos

No existen evidencias de infección natural por NoV en equinos. Solamente se realizó un estudio buscando a otro miembro de la familia *Caliciviridae*, los Vesivirus, como posibles agentes causantes de abortos en caballos. En este trabajo se demostró la presencia de anticuerpos específicos contra Vesivirus asociados a abortos en caballos, pero no se han podido detectar el virus o el genoma viral en ningún caso, lo que no permitió confirmar los resultados obtenidos (Kurth *et al.*, 2006; Scipioni *et al.*, 2008).

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis de trabajo

1. *Rotavirus equinos grupo A es el principal agente causal de diarreas en potrillos y el estudio de su evolución -en términos de análisis filodinámicos y características estructurales- han sido parcialmente estudiadas.*
2. *Otros agentes virales (Coronavirus, Calicivirus), además de Rotavirus, podrían ser agentes causales de diarrea en potrillos de Argentina.*

Objetivos generales

- 1- *Profundizar el conocimiento de la epidemiología molecular y las características evolutivas y estructurales de Rotavirus equino grupo A detectados en potrillos de nuestro país.*

- 2- *Estudiar la presencia de otros agentes virales como posibles causantes de diarreas en potrillos.*

Objetivos específicos

1. *Evaluar y validar estadísticamente los equipos comerciales y ensayos propios (in-house) utilizados para el diagnóstico de RVA.*
2. *Determinar la tasa de detección y caracterizar las cepas de RVA equino circulantes en la población equina estudiada en el periodo 2009-2014 de acuerdo a lo recomendado por el comité de taxonomía de RVA. Comparar los resultados obtenidos con los datos epidemiológicos históricos.*
3. *Realizar análisis evolutivos y filodinámicos de los genes codificantes de las proteínas VP6, VP7, VP8 y NSP4 (I, G, P y E tipos respectivamente) de los RVA equinos detectados.*
4. *Analizar estructuralmente las interacciones entre las proteínas VP6, VP7 y VP4 de las cepas de RVA equinos circulantes en Argentina.*
5. *Estudiar la presencia de CaV y CoV en heces de potrillos con diarrea.*
6. *Estudiar el viroma de materia fecal de potrillos con diarrea.*

Resultados

Capítulo 1

Comparación de equipos comerciales y un ELISA desarrollado en nuestro laboratorio para la detección RVA en equinos.

Comparación de equipos comerciales y un ELISA desarrollado en nuestro laboratorio para la detección RVA en equinos.

Introducción

Rotavirus grupo A está asociado con cuadros diarreicos tanto en humanos como en muchas especies de animales, incluyendo a los equinos (Estes and Greenberg, 2013). Rotavirus es la principal causa de severos brotes de diarrea en potrillos menores de 6 meses de edad, considerándose un severo problema sanitario y económico para la industria hípica mundial (Browning *et al.*, 1991; Dwyer, 2007; Frederick *et al.*, 2009; Kapikian, 1994; Slovis *et al.*, 2013).

De acuerdo a la variabilidad de la proteína de la cápside intermedia (VP6) los RVs pueden clasificarse en 8 grupos (A, B, C, D, E, F, G y H), siendo RVA, los más comúnmente detectados en numerosas especies animales incluidos los equinos. La proteína VP6 se pliega formando 2 dominios, el dominio B (1-150 y 335-397), el cual corresponde a la base de la molécula y, el dominio H (151-334) el cual corresponde a la parte superior de la molécula. Este último contiene los determinantes antigénicos en base a los cuales se clasifican (Mathieu *et al.*, 2001). Los RVA se clasifican según las variantes de VP7 (35 G-), VP4 (49 P-) y VP6 (21 I-) en G-, P- e I- genotipos respectivamente (Matthijnssens *et al.*, 2008; Matthijnssens and Theuns, 2015). G3P[12]-I6 y G14P[12]-I2 son los genotipos más comunes descriptos en caballos alrededor del mundo (K. Gary Magdesian *et al.*, 2014).

La detección rápida de los RVA en la enfermedad de los potrillos, durante el inicio de un brote, constituye una herramienta importante dado que permite la rápida implementación de medidas de manejo apropiadas para minimizar la diseminación de la infección (Cho *et al.*, 2012; Dennehy *et al.*, 1994; McGuirk, 2008). El diagnóstico de RVA se basa en la detección de partículas virales, antígenos o segmentos del genoma

viral, en materia fecal de potrillos obtenidas durante el curso del cuadro clínico. La mayoría de estos métodos requieren de personal técnico entrenado y de equipamiento costoso y sofisticado, lo que dificulta su aplicación en el diagnóstico de rutina en los haras (Brooks *et al.*, 1989; Cicek *et al.*, 2007; Cornaglia *et al.*, 1989; Cho *et al.*, 2012; Dennehy *et al.*, 1988; Dennehy *et al.*, 1999; Dennehy *et al.*, 1994; Eing *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2009; Lipson *et al.*, 2001; Maes *et al.*, 2003; Marchlewicz *et al.*, 1988). De este conjunto de técnicas se cuenta con ELISAs en tubo e inmunocromatografía de flujo lateral (Strip test) comerciales que constituyen los métodos más rápidos para realizar el diagnóstico al pie de los animales. Sin embargo, en general, los métodos de diagnóstico comerciales están diseñados para la detección de RVA en humanos y no han sido validados para el uso veterinario. Por tanto, este capítulo del trabajo de tesis se focalizó en la validación de métodos de detección disponibles en nuestro país, que podrían ser utilizados rutinariamente para el diagnóstico de RVA en equinos.

El objetivo de este trabajo fue validar la sensibilidad, especificidad y precisión de dos equipos comerciales para diagnóstico de RVA (un *strip test* y un ELISA en tubo), y un ensayo desarrollado por nuestro laboratorio (ELISA KERI), para la detección de RVA en materia fecal de potrillos con diarrea.

Materiales y Métodos

Muestras:

Se utilizaron las muestras de materia fecal de potrillos con diarrea recibidas en el laboratorio de Virus Equinos, Instituto de Virología (INTA-Castelar), para el diagnóstico de RV grupo A durante el periodo 2009-2011.

Diseño experimental

Todas las muestras fueron analizadas con dos “equipos comerciales” y el ELISA KERI propio. Las muestras que resultaron positivas por al menos un ensayo fueron analizadas por RT-PCR para confirmar la presencia de RVA. Una muestra fue considerada “verdadero positivo” cuando dos o más ensayos detectaron RVA en la misma. Del mismo modo, una muestra fue considerada como “verdadero negativo” cuando no se detectó RVA por ninguno de los tres métodos. De acuerdo a este criterio, las muestras “verdaderos positivos y verdaderos negativos” se consideraron población de referencia para realizar los análisis de validación. A las muestras con resultados discordantes se le efectuó microscopía electrónica (ME). La sensibilidad, especificidad y precisión de los ensayos fueron estimados por el método “Receiver-Operating Characteristic (ROC)”, y la concordancia entre cada ensayo fue medida con el estadístico kappa ponderado (Greiner et al., 2000; Viera, A; Garret, 2005).

Detección de RVA en materia fecal:

Se utilizó el equipo de ELISA comercial (Pathfinder™ Rotavirus EIA; BioRad, Marnes-la-Coquette, France), diseñado para la detección de RVA en materia fecal de humanos. Este equipo posee tubos plásticos sensibilizados con anticuerpos policlonales producidos contra la cepa de RVA SA-11 (G3P[1]I2) como anticuerpos de captura, y un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa como anticuerpo detector, este último está dirigido contra epítopes específicos de VP6. El ensayo se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante (Figura R1.1A).

El segundo equipo comercial utilizado fue el *FASTest Rota*® strip (MEGACOR, Diagnostk GmbH, A-6912 Hörbranz, Austria), un ensayo de inmunocromatografía de flujo lateral que detecta RVA en materia fecal de animales. El ensayo se basa en anticuerpos monoclonales anti-RVA unidos a partículas de latex que migran a través de una membrana de nitrocelulosa. El ensayo se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante (Figura R1.1B).



Figura R1. 1 Métodos diagnósticos validados en este trabajo. A: Pathfinder™ Rotavirus; B: FASTest Rota® strip; C: ELISA KERI.

Se utilizó también un ELISA “doble sándwich” desarrollado en el INTA (Cornaglia *et al.*, 1989). Brevemente, placas de 96 pocillos (Maxisorp, NUNC, Thermo Fisher Scientific, 75 Panorama Creek Drive, Rochester, NY, USA) fueron sensibilizadas con 100 μ l de una dilución, en buffer carbonato-bicarbonato (pH 9.6), de antisuero IgG policlonal producida en cobayos contra RVA/Cow-xx/USA/INDIANA/XXXX/G6P[5]-I2 (Indiana) como anticuerpo de captura positiva (R1, pocillos impares) y, anticuerpos IgG de cobayos no inmunizados como captura negativa (R2, pocillos pares) e incubados a 4°C durante 16 ± 2 h. Luego de 2 lavados con PBS-Tween20 0.05%, pH: 7.4 (buffer de lavado), una dilución (1:10) de cada materia fecal fue agregada a cada pocillo (R1 y R2), e incubada a 37°C por 1h. Luego se realizaron 4 lavados y se agregó el anticuerpo policlonal producido en bovino (IgG) contra la cepa de RVA Indiana como anticuerpo detector. Se incubo 1h a 37 °C y luego se realizaron 4 lavados. Finalmente, se agrega el anticuerpo monoclonal comercial anti-bovino, producido en cabra, conjugado con peroxidasa (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., USA), y se incuba nuevamente 1h a 37 °C. La unión antígeno anticuerpo fue revelada con H₂O₂-ABTS [2-2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonato)] como sistema sustrato/cromógeno. La reacción fue detenida por el agregado de 50 μ l/pocillo de SDS (dodecyl sulfato de sodio) al 5%. La ODorbancia fue leída a 405 nm (lector de ELISA, Multiskan Ex, Lab Systems®). Este ensayo se utiliza rutinariamente en nuestro laboratorio para la detección de RVA en

materia fecal de bovinos, equinos, camélidos y cerdos, usando siempre un valor de corte estricto. Es decir, la muestra se considera positiva si la diferencia entre la densidad óptica (OD) medida a 405nm en la captura positiva (R1) y la captura negativa (R2) (ΔOD) es mayor a 0,200 unidades de ODorbancia y si la OD en R1 es mayor a la media de OD en la captura positiva con PBS (blanco de reacción) más 2 desvíos estándares (Marcoppido *et al.*, 2011; Parreño *et al.*, 2004). En el presente trabajo, el punto de corte del ensayo fue re-calculado y corregido para incrementar la sensibilidad, manteniendo una especificidad mayor al 90% para la detección de RVA en materia fecal de potrillos con diarrea (Figura R1.1C).

Confirmación de la presencia de RVA por RT-PCR y tipificación de VP6, VP7 y VP4.

La presencia de RVA en todas las muestras que resultaron positivas por al menos uno de los tres métodos mencionados fue confirmada por RT-PCR dirigido al gen de VP6 (I-tipo). Además las muestras fueron analizadas por RT-PCR para determinar el G- y P-tipo (VP7 y VP4) de las cepas de RVA seleccionadas como población de referencia (Garaicoechea *et al.*, 2011; Matthijnsens *et al.*, 2012a; Miño *et al.*, 2013).

Los productos de PCR fueron purificados y enviados a la Unidad de Genómica, Instituto de Biotecnología, CICV y A, INTA-Castelar para su secuenciación. El genotipo de VP6, VP7 y VP4 fue determinado de acuerdo a las recomendaciones del Rotavirus Classification Working Group (RCWG) (Matthijnsens *et al.*, 2008) utilizando la herramienta informática RotaC (<http://rotac.regatools.be/>) (Maes *et al.*, 2009).

Las secuencias fueron editadas con el software Bioedit (Hall *et al.*, 1999), y alineadas con CLUSTALX 2 (Larkin *et al.*, 2007). Los arboles filogenéticos fueron construidos con MEGA5 (Tamura K, 2011). La distancia genética fue calculada usando el método de “*Kimura-2 correction parameter*” (K2P) a nivel nucleotídico y, los arboles fueron construidos con el método de “*neighbor-joining*” (NJ) y 1000 réplicas de re muestreo como soporte estadístico.

Microscopía Electrónica

Cuatro muestras con resultados discordantes fueron analizadas por microscopía electrónica: una muestra que fue negativa por Pathfinder y positiva por los demás métodos (# 33); una muestra negativa por los dos métodos comerciales pero positiva por ELISA KERI y RT-PCR, aunque de genotipo no tipificable (# 35); una muestra positiva por FASTest® Rota strip y ELISA KERI, pero negativa por Pathfinder y RT-PCR (# 37) y; una muestra positiva por los tres métodos que resultó ser una infección mixta (#38). Las muestras fueron diluidas (1:5) en PBS y centrifugadas a 1.300g a 4 °C por 20 minutos. El sobrenadante fue luego centrifugado a 20.000g por 30 minutos y, el precipitado obtenido fue re suspendido en 100ul de PBS. Una gota de la suspensión se colocó sobre una grilla de cobre y fue teñida con uranil acetato al 1%. Las partículas virales fueron observadas con el microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL-1200EX-II del servicio de microscopia del CICV y A, INTA Castelar.

Análisis del límite de detección de RVA

El límite de detección de los equipos comerciales Pathfinder™ Rotavirus kit, FASTest® Rota strip y del ELISA KERI fue estimado por el análisis de diluciones seriadas en base 10 de las cepas de RVA RVA/Horse-tc/GRB/H-2/1976/G3P[12]-I6 (H-2) e RVA/Cow-xx/USA/INDIANA/XXXX/G6P[5]-I2 (IND), ambas con un título de 4×10^5 y $4,64 \times 10^5$ unidades formadoras de focos fluorescentes por mililitro (FFFU/ml), respectivamente (Saif *et al.*, 1997). Las mismas, fueron diluidas para comenzar el ensayo con una cantidad de 1×10^5 FFFU/ml de partículas infecciosas (Miño *et al.*, 2015).

Análisis Estadístico

Con el fin de comparar los 3 métodos diagnósticos utilizados, se realizó un análisis “*Receiving operating curve*” (ROC) y el test de concordancia “*weighted kappa statistic (kappa ponderado, κ test)*” utilizando el programa MedCalc® version 11.1.1.0 (Mariakerke, Bélgica), donde el número 0 fue asignado a las muestras verdaderas negativas y el número 1 a las muestras verdaderas positivas. El área bajo la curva (índice AUC) fue calculado para cada ensayo. Valores de AUC cercanos a 1 indican una alta precisión del ensayo (Greiner *et al.*, 2000). Además, los análisis ROC utilizando los

valores de OD de cada muestra en R1 y los valores de ΔOD fueron utilizados para recalculer el valor de corte del ensayo ELISA KERI.

La concordancia de cada ensayo para clasificar las muestras en positivas y negativas, comparadas con la población de referencia, fue calculada con el estadístico kappa ponderado. Valores de κ entre 0,41 y 0,60 indican una concordancia moderada; valores entre 0,61 y 0,80 una concordancia substancial y valores entre 0,81 y 0,99, indican una concordancia casi perfecta (Viera and Garrett, 2005).

Resultados

Población de muestras de referencia

El estudio incluyó un total de 172 muestras que fueron analizadas por los tres métodos (Pathfinder™ Rotavirus, *FASTest*® Rota strip y ELISA KERI) y confirmadas por RT-PCR. De acuerdo al criterio establecido, 50 muestras (29%) fueron verdaderos positivos y 122 (71%) verdaderos negativos para RVA equino. Esta población fue considerada población de referencia para la validación de los ensayos.

Concordancia entre métodos

En cuanto a la concordancia entre los métodos estudiados, los 3 ensayos detectaron 13 muestras positivas y 105 negativas, mostrando resultados discordantes en 54 muestras. De éstas, 25 fueron detectadas como positivas por 2 métodos y fueron clasificadas como verdaderas positivas. Finalmente, 29 muestras fueron detectadas como positivas por un solo método, de las cuales 12 fueron positivas por RT-PCR y fueron clasificadas como verdaderos positivos y las 17 restantes fueron clasificadas como verdaderas negativas (Tabla R1.1). El listado de muestras analizadas y el resultado de cada una de ellas se encuentra al final del capítulo (material suplementario R1.S1-S2).

Tabla R1.1. Resultados de los tres métodos utilizados para detectar RVA equino en materia fecal de potrillos con diarrea.

Test	Positivos (50)	Negativos (122)	Sensibilidad	Especificidad	Índice Kappa	Análisis ROC			
						AUC	95% CI	MCC	
Pathfinder™ Rotavirus	+	16	5	32% (16/50)	96%	0,358 ^a	65%	57- 73%	77%
<i>FASTest</i> Rota® Strip	+	46	4	92% (46/50)	97%	0,887	95%	90- 98%	95%
ELISA KERI	+	38	8	76% (38/50)	93%	0,695	88%	79- 91%	88%
	-	12	114						

Se realizó un análisis no paramétrico. **AUC:** Área bajo la curva ROC; **CI:** Intervalo de confianza. **MCC:** Muestras Correctamente Clasificadas. ^a Índice Kappa para la población completa. ^b Índice Kappa para la población sin las muestras G3P[12]I6.

Tipificación de los RVA equinos utilizados como población de referencia.

En 42 (86%) de las 50 muestras positivas a RVA se pudo determinar el G, P e I-tipo. Un total de 30 (72%) fueron G3P[12], 6 (14%) G14P[12] y 6 (14%) mostraron una infección mixta (G3+G14). Todos los RVA equinos de genotipo G3 (VP7), estuvieron asociados con genotipo I6 (VP6), mientras que todos los genotipos G14 (VP7) al genotipo I2 (VP6). Esta asociación se observa en el árbol filogenético (Figura R1.2). Los resultados individuales se muestran en la tabla de material suplementario A.

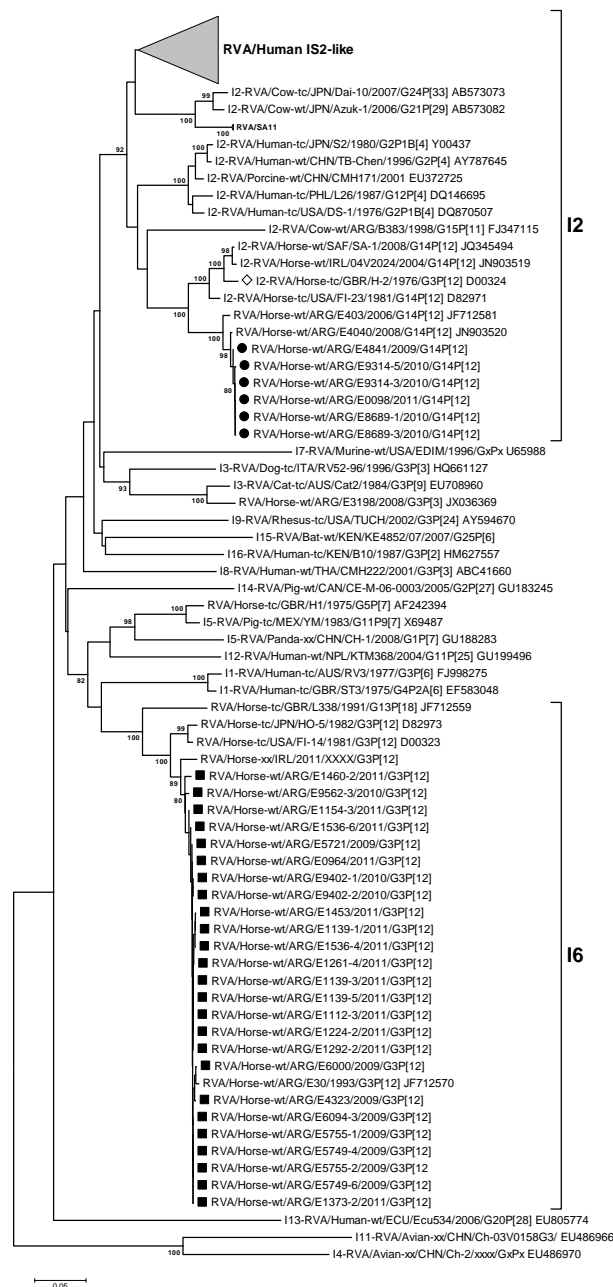


Figura R1. 2 *Árbol filogenético construido en base al ORF del gen de VP6 de RVA equino, utilizando el método NJ con el modelo evolutivo K2P. En los nodos se muestran valores de remuestreo superiores al 80%.*

Microscopía Electrónica

En las 4 muestras de materia fecal en las que se encontraron resultados discordantes, se detectaron partículas compatibles en tamaño y morfología con RVA (Figura R1.3). La muestra #33 fue genotipificada como G3P[12]I6; la muestra #35 fue positiva por RT-PCR pero no tipificable; la muestra #37 fue positiva por los dos métodos comerciales pero negativa por RT-PCR y la muestra #38 fue positiva por todos los métodos y presentó una infección mixta G3+G14.

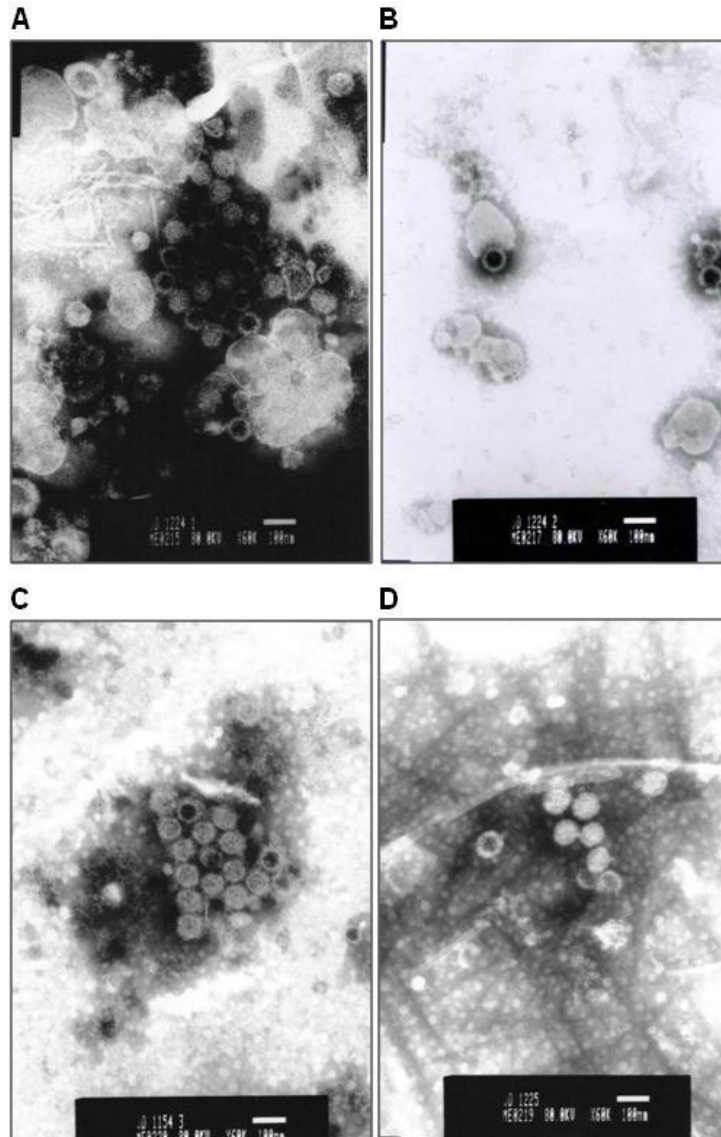


Figura R1.3 Fotografía de partículas virales compatibles con Rotavirus observadas por microscopía electrónica con 60K de aumento.

Límite de detección de los ensayos analizados

El límite de detección de los ensayos Pathfinder™ Rotavirus kit, FASTest® Rota strip y ELISA KERI fue estimado mediante diluciones en base 10 de suspensiones virales de las cepas de RVA equino H-2 e IND partiendo de una suspensión de 1×10^5 FFFU/ml de partículas infecciosas.

El equipo Pathfinder™ Rotavirus detectó un mínimo de 1000 FFFU/ml de ambas cepas; FASTest® Rota strip fue más sensible y detectó hasta 100 FFFU/ml de la cepa equina H2 y 100 FFFU/ml de la cepa bovina Indiana. Finalmente, el ELISA KERI detectó 100 FFFU/ml de la cepa bovina Indiana y 1000 FFFU/ml de la cepa equina H-2 (Tabla R1.2).

Tabla R1.2. Límite de detección de los métodos analizados.

Ensayo	Cepas de RVA	Título viral en FFFU/ml				
		1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2	1×10^1
Pathfinder™ Rotavirus	H2	+	+	+	-	-
	Indiana	+	+	+	-	-
FASTest Rota® Strip	H2	+	+	+	+	-
	Indiana	+	+	+	+	-
ELISA KERI	H2	+	+	+	-	-
	Indiana	+	+	+	+	-

Diluciones seriadas en base 10 de una suspensión viral de la cepa H2 (G3P[12]) 1×10^5 FFFU/ml e Indiana (G6P[5]) 1×10^5 FFFU/ml.

Rendimiento de los métodos: Sensibilidad y especificidad para la detección de RVA en materia fecal de potrillos con diarrea.

Los 3 métodos diagnósticos fueron comparados y el rendimiento se muestra en la figura R1.4.

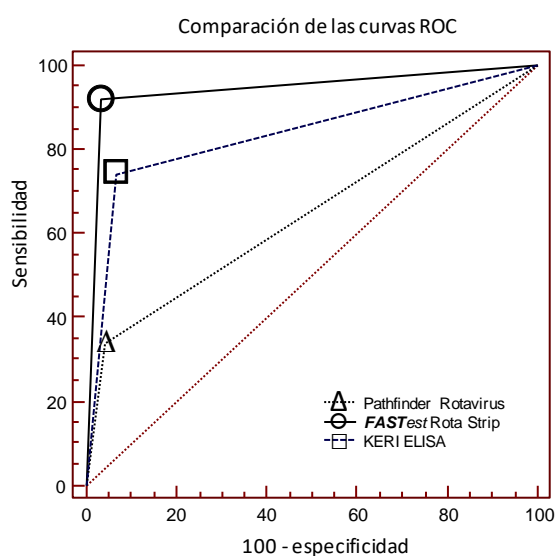


Figura R1.4 La figura muestra el promedio de los resultados obtenidos para todas las muestras del análisis ROC ("Receiver Operating Characteristics") en cada uno de los métodos comparados (Δ Pathfinder™ Rotavirus; ○ FASTest® Rota STRIP; □ ELISA KERI), ($n=50$ verdaderos positivos; $n=122$ verdaderos negativos).

El equipo Pathfinder™ Rotavirus detectó RVA equino en 17 de las 50 muestras positivas (34%), lo que muestra una baja sensibilidad pero con una especificidad del 96%. El índice AUC fue 65%, y sólo el 77% de las muestras fueron correctamente clasificadas (Tabla R1.1, Figura R1.5). Con este método se detectaron todas las muestras de genotipo G14P[12]-I2, inclusive cuando se trató de infecciones mixtas, pero no se detectaron los RVA genotipo G3P[12]-I6 (Figura R1.5). De las 33 muestras positivas que resultaron negativas por este método, el 85% (28/33) fueron de genotipo G3P[12]-I6 y el 15% (5/33), muestras positivas por FASTest® Rota strip y ELISA KERI que no se pudieron genotipificar por RT-PCR. El valor del estadístico κ para este método fue 0,358, indicando una baja concordancia para detectar las muestras positivas a RV de la población de referencia.

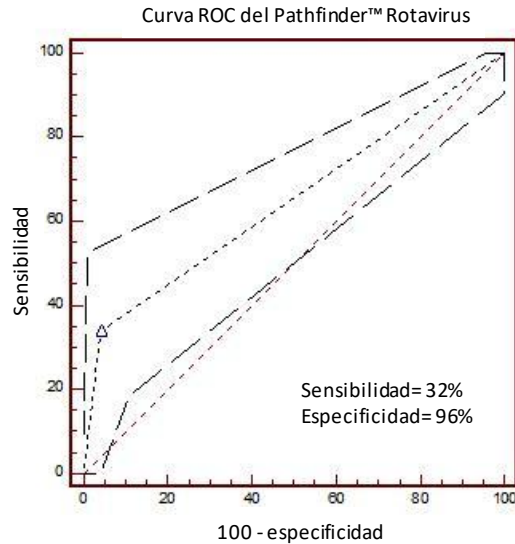


Figura R1. 5 La figura muestra la curva ROC del método Pathfinder™ Rotavirus cuando se analiza la población completa. Las líneas (– –) indican el intervalo de confianza de las mediciones realizadas.

En cambio, cuando solo se consideraron las muestras genotipo G14P[12]I2 la especificidad del Pathfinder™ se mantuvo alta (95%), y su sensibilidad se incrementó del 34 al 65% (Figura R1.6), además de mostrar un valor del estadístico κ de 0,723 lo que indica una concordancia substancial del método para clasificar correctamente la población de referencia.

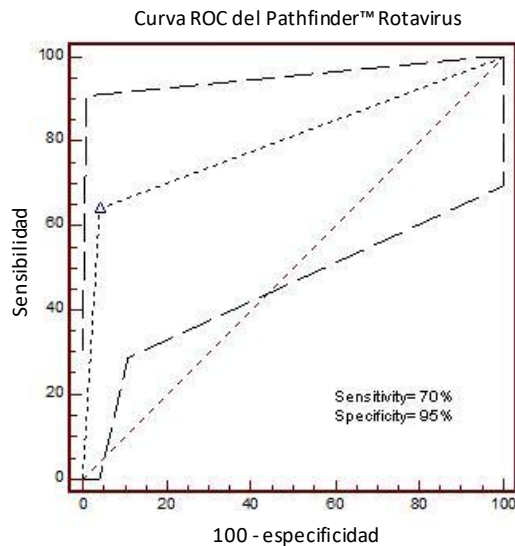


Figura R1. 6 La figura muestra la curva ROC del Pathfinder™ Rotavirus cuando se analiza solamente la población G14P[12]-I2. El recuadro (– –) indica el intervalo de confianza de las mediciones realizadas.

Por otra parte, con el *FASTest*® Rota strip se detectaron un 92% (46/50) de las muestras de RVA equinas, con una sensibilidad y especificidad del 97% (Tabla R1.1). Además, el ensayo mostro un índice AUC de 95% y clasificó correctamente, positivas y negativas, un 95% de las muestras (Figura R1.4). Por este método se detectaron los dos genotipos de RVA equino (G3P[12]-I6 y G14P[12]-I2), quedando solo 4 muestras positivas por ELISA KERI y RT-PCR que no fueron detectadas por este ensayo. Dos de ellas fueron genotipificadas como G3P[12]-I6 y en las dos restantes, el genotipo no se pudo determinar. El valor del estadístico κ para este método fue de 0,887 indicando una concordancia casi perfecta con la población de referencia (Tabla R1.1).

El tercer método incluido en este trabajo, fue el ELISA KERI, en el cual se realizó un ajuste en el valor de punto de corte para aumentar su sensibilidad para detectar RVA equino. De acuerdo al criterio optimizado, las muestras fueron consideradas positivas si el ΔOD (R1-R2) fue igual o superior a 0,082 y la OD en R1 fue igual o superior a 0,213 (Figura R1.7).

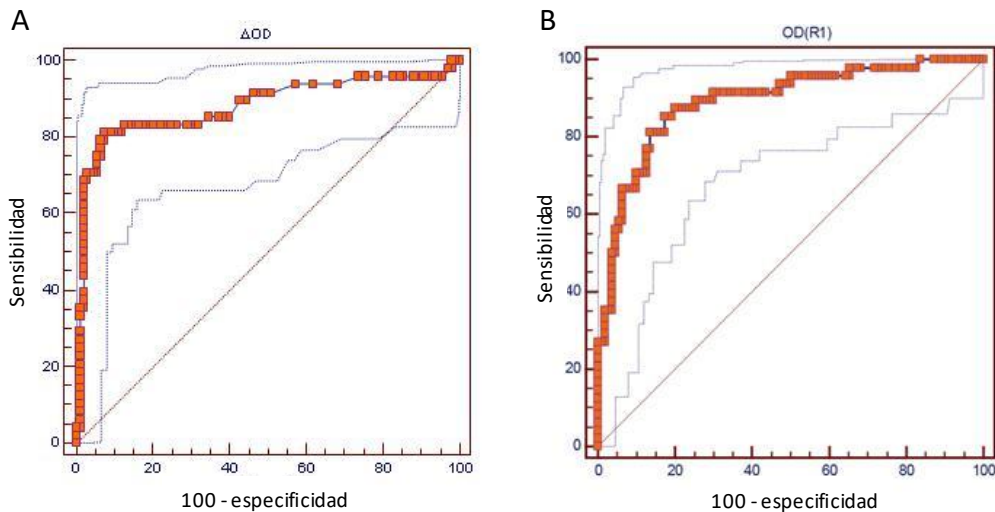


Figura R1.7 A: Análisis ROC utilizando los datos de absorbancia corregida (ΔOD). B los datos de la absorbancia en la captura positiva (R1).

En base a este nuevo valor de corte el ensayo mostró una sensibilidad de 76% (38/50) y una especificidad de 93% (114/122). El índice AUC fue de 88%, lo que coincide con el porcentaje de muestras correctamente clasificadas por este método

(88%). El valor del estadístico κ fue de 0,695, indicando una concordancia substancial con respecto a la población de referencia (Figura R1.8; Tabla R1.3).

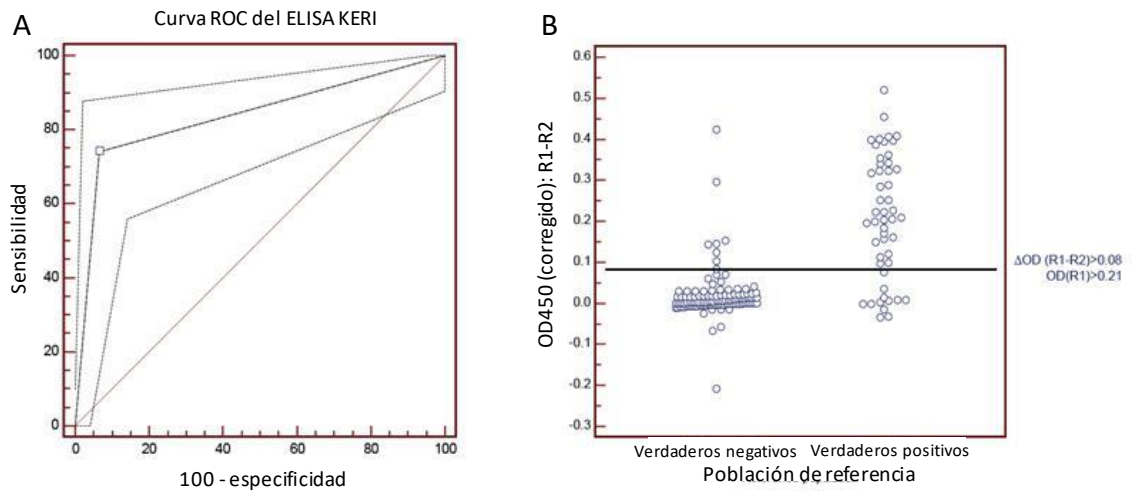


Figura R1.8 A: Curva ROC (sensibilidad respecto a 100-especificidad "0") con el intervalo de confianza. B: Punto de corte utilizado en base a la población de referencia.

Tabla R1.3. Análisis del ELISA KERI.

	Valor de corte	AUC	Sensibilidad	Especificidad	MCC
OD(R1)	0,213	89%	87.5%	80%	89%
$\Delta OD (R1-R2)$	0,082	88%	79%	94%	88%

AUC: Area bajo la curva ROC; OD(R1)= densidad óptica en R1; $\Delta OD (R1-R2)$: Diferencia de la densidad óptica entre R1 y R2; ΔOD : densidad óptica corregida.

MCC: índice de muestras correctamente clasificadas fue calculado como el cociente de la sumatoria de las muestras verdaderas positivas clasificadas como positivas y verdaderas negativas clasificadas como negativas dividido el total y multiplicado por 100.

Del total de muestras clasificadas como positivas (76%, 38/50) por ELISA KERI, 47% (18/38) fueron genotipificadas como G3P[12]I6, 16% (6/38) como G14P[12]I2 y un 13% (5/38) fueron infecciones mixtas (G3P[12]I6/G14P[12]I2). De las restantes, 4 muestras resultaron positivas por RT-PCR pero no pudieron ser secuenciadas y 5 fueron negativas por RT-PCR. De las 12 muestras positivas que el ELISA KERI no detectó, 7 fueron genotipo G3P[12]-I6, 2 fueron infecciones mixtas G3/G14, una si bien fue positiva por RT-PCR no pudo ser secuenciada y dos muestras fueron negativas por RT-PCR (material suplementario R1.S1-S2).

Con el fin de tratar de explicar las diferencias de detección encontrada entre los métodos, se analizó la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína VP6. Los cambios en los aminoácidos de la proteína VP6 encontrados entre las cepas analizadas, se detallan según el dominio en el cual se producen. Así el dominio B mostró 17 sitios con cambios (Tabla R1.4), mientras que el dominio H mostró 21 sitios con cambios (Tabla R1.5).

Tabla R1.4. Cambios de aminoácidos en el dominio B de VP6.

Aminoácido	VP6: Dominio B																
	2	7	11	38	39	53	60	83	86	89	92	101	115	340	341	350	371
GRB/H-2/1976	D	L	L	V	I	N	N	N	D	V	V	V	S	A	S	S	D
Arg/G14-I2*	D	L	F	V	I	N	N	N	D	V	V	V	S	A	S	S	D
Arg/G3-I6*	E	I	L	I	V	T	T	T	E	I	I	T	A	S	N	A	E

* Secuencia de aminoácidos consenso realizada en base a todas las cepas de RVA de Argentina, incluyendo las analizadas en este estudio.

Tabla R1.5. Cambios de aminoácidos en el dominio H de VP6.

Aminoácido	VP6: Dominio H																				
	151	172	174	175	199	217	225	244	253	254	272	281	295	299	300	307	312	314	317	329	332
GRB/H-2/1976	T	A	D	N	I	V	L	T	I	F	N	I	M	P	Q	A	N	P	E	E	I
Arg/G14-I2*	T	A	D	N	I	V	L	T	V	F	N	V	I	P	P	A	N	P	E	E	I
Arg/G3-I6*	V	L	N	D	F	A	I	A	I	L	T	I	M	-	-	N	Q	Q	Q	D	V

* Secuencia de aminoácidos consenso realizada en base a todas las cepas de RVA de Argentina, incluyendo las analizadas en este estudio.

Discusión

Rotavirus Grupo A es un patógeno asociado a diarreas en potrillos en todo el mundo y también en Argentina, con una tasa de detección del 21% (Garaicoechea *et al.*, 2011), siendo similar a la tasa de detección reportada en el resto del mundo (Papp *et al.*, 2013).

A pesar de que se utiliza, desde 1996, la vacunación sistemática como medida preventiva, la diarrea por RVA continua siendo un problema en los establecimientos de cría de caballos deportivos en nuestro país (Barrandeguy *et al.*, 1998; Garaicoechea *et al.*, 2011).

Actualmente existen numerosos métodos accesibles comercialmente para el diagnóstico de RVA, sin embargo, la mayoría de ellos han sido desarrollados y validados para el diagnóstico de RVA humanos, y solo unos pocos fueron diseñados para su uso veterinario, en muestras de diferentes especies de animales (Eing *et al.*, 2001; Greiner *et al.*, 2000; Matthijnsens *et al.*, 2008; Monini *et al.*, 2011; Slovis *et al.*, 2013). Este trabajo fue realizado para comparar dos métodos comerciales y un método “*in-house*” para detectar RVA equino. En relación a los métodos comerciales evaluados, uno de ellos había sido diseñado para detectar RVA humanos y otro para RVA animales (bovinos). El método de ELISA KERI fue desarrollado en nuestro laboratorio, y se utiliza en el diagnóstico de RVA en muestras de materia fecal de bovinos, porcinos, camélidos y potrillos con diarrea (Cornaglia *et al.*, 1989).

El mejor rendimiento para detectar RVA equino, fue obtenido con el *FASTest*® Rota strip. Este equipo fue diseñado y aprobado para el uso en diagnóstico veterinario, mostrando una sensibilidad y especificidad de 72% y 95% respectivamente para detectar RVA en muestras de terneros (Klein *et al.*, 2009). Su eficacia en la detección de RVE no había sido estudiada y fue motivo de este estudio, siendo la sensibilidad y especificidad del 92% y 97% respectivamente, superior a la encontrada en bovinos. Además, se comprobó también que pueden detectarse los dos genotipos presentes en las muestras de equinos (G3P[12]I6 y G14P[12]I2) (Figura R1.3). Por este método se clasificaron apropiadamente, como negativas y positivas, el 95% de las muestras analizadas.

El método Pathfinder™ Rotavirus ha sido diseñado para su uso en diagnóstico de RVA humanos, se utiliza un anticuerpo monoclonal contra VP6 genotipo I2 como anticuerpo detector. La sensibilidad y especificidad de este ensayo es de 100% y 98% respectivamente cuando se lo utiliza con muestras de materia fecal de humanos (Dennehy *et al.*, 1988; Dennehy *et al.*, 1994). En cuanto a su uso en el campo veterinario, fue utilizado como método diagnóstico de RVA en muestras de bovinos, sin embargo su sensibilidad y especificidad no fue analizada (Badaracco *et al.*, 2014). En el presente estudio, este ensayo sólo detectó el 34% de las muestras positivas analizadas. Esto es particularmente importante dado a que hay una aceptación universal de que los métodos de diagnóstico desarrollados para la detección de RVA en humanos son igualmente eficientes para el diagnóstico de RVA de importancia veterinaria (Fushuku and Fukuda, 2006; Maes *et al.*, 2003; Nemoto *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en el presente trabajo no avalan esa información, por el contrario, evidencia la necesidad de realizar análisis de validación previos para determinar la capacidad diagnóstica de RVA en diferentes regiones y en distintas especies animales.

El tipo de anticuerpos utilizados en los diferentes inmunoensayos puede influir fuertemente en la eficiencia en la detección de RVA. El uso de anticuerpos monoclonales generalmente está asociado a elevada especificidad. Esto representa una ventaja cuando se trabaja con muestras complejas como muestras de materia fecal, donde los enteros patógenos deben ser detectados en el contexto de la micro flora intestinal y otros antígenos proteicos que incrementan la probabilidad de una reacción cruzada, falsos positivos o inhibición de la reacción. Sin embargo, en este trabajo, los anticuerpos monoclonales utilizados por el método Pathfinder™ Rotavirus generaron una disminución de la eficiencia para detectar RVA en materia fecal de potrillos con diarrea. Con este método se detectaron todos los RVA genotipo G14P[12]I2, incluso cuando se encontraban en infecciones mixtas (G3I6/G14I2) y en baja carga del genotipo G14 en la muestra (en comparación con el amplicon obtenido para G3), pero no se detectaron los RVA equinos que poseen el genotipo G3I6, sugiriendo que las mutaciones presentes en la variante de VP6 I6 poseen cambios en los sitios de reconocimiento de este anticuerpo. De hecho, el análisis de las secuencias mostró que VP6-I6 posee 36 cambios de aminoácidos y dos deleciones en comparación con VP6-I2. El mapeo de estos cambios en la estructura molecular mostró que la mayoría de ellos se encuentran en la superficie expuesta, en el dominio H de la molécula (residuos 151 al

331), en la parte superior del trímero de VP6 o cerca de los sitios antigénicos, y que tres mutaciones (A244, M295 y N307) y 2 deleciones (P299 y P300) están situadas en un sitio de interacción con VP7 (Tablas R1.4 y R1.5). Alguno de estos cambios podría estar involucrados en los sitios reconocidos por los anticuerpos utilizados por el método Pathfinder™ Rotavirus. Este tema se aborda en profundidad en el capítulo 5 de esta tesis.

El análisis filogenético y de secuencias mostró que la VP6-I6 tiende a asociarse con VP7 G3 mientras que VP6-I2 tiende a hacerlo con VP7 G14. Inicialmente dos cepas no cumplían esta regla, la primera de ellas, la cepa RVA/Horse-tc/H-2/1976/G3P12 (D00324) mostraba una combinación de G3-I2. Sin embargo, se demostró que la misma había sido erróneamente caracterizada y un estudio confirmatorio realizado a partir de la muestra original mostró que la misma posee el genotipo G3-I6, cumpliendo así con la tendencia de asociación (Ma *et al.*, 2015). Finalmente, la única cepa de RVA equinos que escapa a la regla de que las VP7 G3 tiende asociarse con VP6 I6 es la cepa de Japón RVA/Horse-tc/JPN/BI/1981/G3P12, la que muestra una combinación de G3-I2 en su constelación genómica (Nemoto *et al.*, 2015). Las relaciones estructurales que explican la tendencia de esta asociación entre VP6/VP7 (G3/I6 y G14/I2) se muestran en detalle en el apartado de análisis estructural de este mismo trabajo (capítulo de resultados 4).

La evidencia obtenida en el presente trabajo, y el hecho de que hasta la fecha se han descrito 18 genotipos de VP6 dentro de RVA (Matthijssens and Heylen, 2013; Matthijssens *et al.*, 2012b), refuerza la necesidad de que los ensayos diagnósticos desarrollados para RV humanos, sean validados antes de su aplicación en medicina veterinaria.

Finalmente, el ELISA KERI ensayo diseñado en base a anticuerpos policlonales contra la cepa de RVA bovino Indiana (G6P[5]-I2) y utilizado rutinariamente para la detección de RVA en muestras de heces de bovinos y equinos fue evaluado. Para optimizar su uso en muestras de materia fecal de equinos, el valor de corte original, que si bien garantizaba el 100% de especificidad en la detección de RVA jugaba en detrimento de su sensibilidad, fue recalculado. Este valor de corte se ajustó entonces a $OD (R1)=0,200$ y $\Delta OD=0,08$ de modo de maximizar la eficiencia del ensayo, obteniéndose una sensibilidad y especificidad de 76% y 93% respectivamente para la detección de RVA en muestras de equinos, clasificando de manera correcta al 88% de

las muestras analizadas. La utilización de anticuerpos policlonales tanto como captura, así como también de anticuerpo secundario detector, maximiza la capacidad de reactividad cruzada contra distintas cepas de RVA, garantizando la detección de diferentes genotipos de VP6, incluyendo el genotipo I6. Sin embargo, del mismo modo, el uso de anticuerpos policlonales podría explicar la baja sensibilidad de este ensayo respecto a los ensayos comerciales encontrada en el presente trabajo.

El límite de detección del *FASTest*® Rota strip y del ELISA KERI fue mayor que el del Pathfinder™ Rotavirus. La razón de esto no está clara, pero podría ser debido a diferencias en los anticuerpos monoclonales utilizados en cada uno de los ensayos.

Finalmente, algunas muestras fueron reactivas por los métodos de Pathfinder™ Rotavirus, *FASTest*® Rota strip o ELISA KERI, pero no por RT-PCR. Resultados similares fueron observados por Adlhoch et al. (2011), una posible explicación a esto es que el antígeno viral se encontraría en elevada cantidad en comparación con la carga de ARN, y, adicionalmente la mayor labilidad del ARN en comparación con las proteínas. Además, algunas muestras de materia fecal podrían contener sustancias inhibitoras inespecíficas de la reacción de RT-PCR (Adlhoch *et al.*, 2011). La presencia de partículas, compatibles en tamaño y morfología con Rotavirus, observadas en materia fecal mediante microscopía electrónica confirma la especificidad de detección de los métodos analizados en este trabajo.

Consideraciones

Este trabajo fue publicado como: S. Miño, A. Kern, M. Barrandeguy, V. Parreño. Comparison of two commercial kits and an in-house ELISA for the detection of equine rotavirus in foal feces. *Journal of Virological Methods* 222 (2015) 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.05.002>.

Tabla suplementaria R1.S1

ID Muestras	Pathfinder™	FASTest Rota®	ELISA KERI					Genotipo	Población de Referencia	
			Old	New	R1 OD	R2 OD	ΔOD			
1	E/4323/2009	0	1	1	1	0,251	0,092	0,159	G3-P[12]-I6	1 ^a
2	E/4841/2009	1	1	1	1	0,537	0,131	0,406	G14-P[12]-I2	1 ^a
3	E/5638-6/2009	0	1	0	1	0,345	0,226	0,119	0	1
4	E/5721/2009	1	1	0	1	0,223	0,111	0,112	G14/G3-P[12]-I6	1 ^a
5	E/5749-2/2009	0	0	1	1	0,269	0,114	0,155	G3-P[12]-I6	1 ^a
6	E/5749-4/2009	1	1	1	1	0,455	0,171	0,284	G3/G14	1 ^a
7	E/5749-6/2009	1	1	1	1	0,395	0,144	0,251	G3/G14	1 ^a
8	E/5755-1/2009	0	1	0	1	0,251	0,154	0,097	G3-P[12]-I6	1 ^a
9	E/5755-2/2009	0	1	1	1	0,263	0,114	0,149	G3-P[12]-I6	1 ^a
10	E/6000/2009	1	1	0	1	0,666	0,571	0,095	G3/G14	1 ^a
11	E/6094-1/2009	1	1	0	0	0,080	0,082	-0,002	1	1
12	E/6094-2/2009	1	1	0	0	0,134	0,099	0,035	1	1
13	E/6094-3/2009	1	1	1	1	0,300	0,105	0,195	G3/G14	1 ^a
14	E/8540-2/2010	1	1	1	1	0,411	0,094	0,317	0	1
15	E/8689-1/2010	1	1	1	1	0,296	0,093	0,203	G14-P[12]-I2	1 ^a
16	E/8689-3/2010	1	1	1	1	0,352	0,154	0,198	G14-P[12]-I2	1 ^a
17	E/9234-1/2010	0	1	0	0	0,097	0,085	0,012	1	1
18	E/9314-3/2010	1	1	1	1	0,490	0,165	0,325	G14-P[12]-I2	1 ^a
19	E/9314-5/2010	1	1	1	1	0,51	0,189	0,321	G14-P[12]-I2	1 ^a
20	E/9402-1/2010	0	1	1	1	0,375	0,170	0,205	G3-P[12]-I6	1 ^a
21	E/9402-2/2010	0	1	1	1	0,379	0,158	0,221	G3-P[12]-I6	1 ^a
22	E/9562-3/2010	0	1	1	1	0,386	0,217	0,169	G3-P[12]-I6	1 ^a
23	E/0098/2011	1	1	1	1	0,748	0,395	0,353	G14-P[12]-I2	1 ^a
24	E/0641/2011	0	1	0	0	0,684	0,609	0,075	1	1
25	E/0795-1/2011	1	1	0	0	0,141	0,175	-0,034	0	1
26	E/0795-2/2011	1	1	0	0	0,184	0,177	0,007	0	1
27	E/0964/2011	0	1	0	0	0,223	0,222	0,001	G3-P[12]-I6	1 ^a
28	E/1112-3/2011	0	1	0	1	0,494	0,312	0,182	G3-P[12]-I6	1 ^a
29	E/1139-1/2011	0	1	1	1	0,749	0,364	0,385	G3-P[12]-I6	1 ^a
30	E/1139-3/2011	0	1	1	1	0,779	0,374	0,405	G3-P[12]-I6	1 ^a
31	E/1139-5/2011	0	1	1	1	0,601	0,394	0,207	G3-P[12]-I6	1 ^a
32	E/1154-2/2011	0	0	1	1	0,634	0,346	0,288	G3-P[12]-I6	1
33	E/1154-3/2011	0	1	1	1	0,673	0,278	0,395	G3-P[12]-I6	1 ^a
34	E/1154-5/2011	0	1	1	1	0,661	0,436	0,225	0	1
35	E/1154-7/2011	0	0	1	1	0,893	0,439	0,454	1	1
36	E/1154-8/2011	0	0	1	1	0,742	0,344	0,398	1	1
37	E/1224-1/2011	0	1	1	1	0,848	0,448	0,400	0	1
38	E/1224-2/2011	1	1	1	1	0,943	0,721	0,222	G3/G14	1 ^a
39	E/1261-1/2011	0	1	0	0	0,217	0,210	0,007	G3-P[12]-I6	1
40	E/1261-2/2011	0	1	0	1	0,901	0,508	0,393	0	1
41	E/1261-3/2011	0	1	1	1	0,553	0,192	0,361	G3-P[12]-I6	1 ^a
42	E/1261-4/2011	0	1	0	0	0,276	0,271	0,005	G3-P[12]-I6	1
43	E/1263-2/2011	0	1	0	0	0,517	0,553	-0,036	G3-P[12]-I6	1
44	E/1292-2/2011	0	1	1	1	0,521	0,270	0,251	G3-P[12]-I6	1 ^a
45	E/1373-1/2011	0	1	0	0	0,465	0,468	-0,003	G3-P[12]-I6	1
46	E/1373-2/2011	0	1	1	1	0,776	0,258	0,518	G3-P[12]-I6	1 ^a
47	E/1453/2011	0	1	0	0	0,198	0,214	-0,016	G3-P[12]-I6	1 ^a
48	E/1460-2/2011	0	1	1	1	0,751	0,411	0,340	G3-P[12]-I6	1 ^a
49	E/1536-4/2011	0	1	1	1	0,820	0,479	0,341	G3-P[12]-I6	1 ^a
50	E/1536-6/2011	0	1	1	1	0,763	0,442	0,321	G3-P[12]-I6	1 ^a

0: Negativo; 1: Positivo; old: valor de corte inicial ELISA KERI; new: valor de corte recalculado ELISA KERI; R1: R1 Densidad óptica (OD); R2: R2 OD; ΔOD: diferencia entre la OD de R1 y R2 (R1-R2). G3/G14: Infección mixta.

^a Números de acceso (VP6): KJ628058 – KJ628088.

Tabla suplementaria R1.S2. Verdaderos Negativos

	ID Muestras	Pathfinder™ Rotavirus	FASTest Rota® Strip	ELISA KERI			Población de referencia
				old	new	R1 OD R2 OD ΔOD	
1	E/5278/09	0	0	0	0	0,072 0,073 -0,001	0
2	E/5393/09-1	0	0	0	0	0,185 0,156 0,029	0
3	E/5393/09-2	0	0	0	0	0,173 0,167 0,006	0
4	E/5393/09-3	0	0	0	0	0,220 0,203 0,017	0
5	E/5393/09-4	0	0	0	0	0,160 0,170 -0,010	0
6	E/5421/09	0	0	0	0	0,082 0,079 0,003	0
7	E/5430/09	0	0	0	0	0,084 0,096 -0,012	0
8	E/5486A/09	0	0	0	0	0,210 0,179 0,031	0
9	E/5522/09	0	0	0	0	0,078 0,081 -0,003	0
10	E/5536/09	0	0	0	0	0,135 0,137 -0,002	0
11	E/5558/09-1	0	0	0	0	0,080 0,080 0,000	0
12	E/5558/09-2	0	0	0	0	0,098 0,157 -0,059	0
13	E/5559/09-1	0	0	0	0	0,209 0,225 -0,016	0
14	E/5559/09-2	0	0	0	0	0,104 0,103 0,001	0
15	E/5638/09-1	0	1	0	0	0,489 0,460 0,029	0
16	E/5638/09-2	0	0	0	0	0,160 0,146 0,014	0
17	E/5638/09-3	0	0	0	0	0,426 0,406 0,020	0
18	E/5638/09-4	1	0	0	0	0,124 0,118 0,006	0
19	E/5638/09-5	0	0	0	0	0,119 0,135 -0,016	0
20	E/5638/09-7	0	0	0	0	0,166 0,097 0,069	0
21	E/5638/09-8	0	0	0	0	0,130 0,102 0,028	0
22	E/5708/09	0	0	0	0	0,128 0,121 0,007	0
23	E/5749/09-1	0	0	0	0	0,108 0,112 -0,004	0
24	E/5749/09-3	0	0	0	0	0,246 0,187 0,059	0
25	E/5749/09-5	0	0	0	0	0,422 0,428 -0,006	0
26	E/5749/09-7	0	0	0	0	0,192 0,200 -0,008	0
27	E/5833/09	0	0	0	0	0,313 0,312 0,001	0
28	E/6066/09	0	0	0	0	0,091 0,096 -0,005	0
29	E/6085/09-2	0	0	0	0	0,254 0,219 0,035	0
30	E/6085/09-3	0	0	0	0	0,199 0,190 0,009	0
31	E/6085/09-4	0	0	0	0	0,147 0,142 0,005	0
32	E/6085/09-5	0	0	0	0	0,163 0,123 0,040	0
33	E/6113/09-Duo	1	0	0	0	0,092 0,097 -0,005	0
34	E/6113/09-Yey	1	0	0	0	0,088 0,089 -0,001	0

0: Negativo; 1: Positivo; old: antiguo valor de corte ELISA KERI; new: nuevo valor de corte ELISA KERI; R1: R1 OD; R2: R2 OD; ΔOD: diferencia entre R1 y R2 (R1-R2).

Tabla suplementaria R1.S2. *continuación.*

	ID Muestras	Pathfinder™ Rotavirus	FASTest Rota® Strip	ELISA KERI			Población de referencia
				old	new	R1 R2 ΔOD	
35	E/6232/10	0	0	0	0	0,317 0,324 -0,007	0
36	E/6352/10	0	0	0	0	0,239 0,170 0,069	0
37	E/6680/10-1	0	0	0	0	0,088 0,070 0,018	0
38	E/8540/10-1	0	0	0	0	0,146 0,172 -0,026	0
39	E/8540/10-3	0	0	0	0	0,085 0,098 -0,013	0
40	E/8540/10-4	0	0	0	0	0,092 0,091 0,001	0
41	E/8689/10-2	0	0	0	0	0,202 0,213 -0,011	0
42	E/8689/10-4	0	0	0	0	0,092 0,091 0,001	0
43	E/8689/10-5	0	0	0	0	0,175 0,179 -0,004	0
44	E/8758/10	0	0	0	0	0,079 0,079 0,000	0
45	E/8788/10	0	0	0	0	0,087 0,091 -0,004	0
46	E/8798/10	0	0	0	0	0,085 0,061 0,024	0
47	E/8812/10	0	0	0	0	0,101 0,090 0,011	0
48	E/8884/10-1	0	0	0	0	0,096 0,097 -0,001	0
49	E/8888/10-1	0	0	0	0	0,070 0,070 0,000	0
50	E/9014/10-2	0	0	0	0	0,078 0,056 0,022	0
51	E/9016/10	0	0	0	0	0,073 0,082 -0,009	0
52	E/9023/11	0	0	0	0	0,064 0,063 0,001	0
53	E/9072/10-2	0	0	0	0	0,099 0,087 0,012	0
54	E/9088/10-1	0	0	0	0	0,068 0,069 -0,001	0
55	E/9088/10-2	0	0	0	0	0,154 0,155 -0,001	0
56	E/9088/10-4	0	0	0	0	0,079 0,074 0,005	0
57	E/9088/10-5	0	0	0	0	0,115 0,124 -0,009	0
58	E/9088/10-7	0	0	0	0	0,089 0,091 -0,002	0
59	E/9088/10-8	0	0	0	0	0,087 0,076 0,011	0
60	E/9088/10-9	0	0	0	0	0,099 0,082 0,017	0
61	E/9088/10-10	0	0	0	0	0,070 0,072 -0,002	0
62	E/9149/10-1	0	0	0	0	0,079 0,064 0,015	0
63	E/9149/10-2	0	0	0	0	0,071 0,061 0,010	0
64	E/9197/10-1	1	0	0	0	0,059 0,058 0,001	0
65	E/9197/10-2	0	0	0	0	0,083 0,091 -0,008	0
66	E/9197/10-3	0	0	0	0	0,147 0,140 0,007	0
67	E/9197/10-4	0	0	0	0	0,147 0,136 0,011	0
68	E/9197/10-5	0	0	0	0	0,099 0,105 -0,006	0
69	E/9197/10-6	0	0	0	0	0,066 0,077 -0,011	0
70	E/9197/10-7	0	0	0	0	0,075 0,083 -0,008	0
71	E/9197/10-8	1	0	0	0	0,079 0,077 0,002	0
72	E/9197/10-9	0	0	0	0	0,138 0,122 0,016	0
73	E/9234/10-2	0	0	0	0	0,124 0,108 0,016	0
74	E/9234/10-3	0	0	0	0	0,180 0,159 0,021	0
75	E/9234/10-4	0	0	0	0	0,203 0,182 0,021	0
76	E/9234/10-5	0	1	0	0	0,189 0,170 0,019	0
77	E/9234/10-6	0	0	0	0	0,153 0,124 0,029	0
78	E/9234/10-7	0	0	0	0	0,140 0,126 0,014	0
79	E/9234/10-8	0	0	0	0	0,100 0,109 -0,009	0
80	E/9260/10-A	0	0	0	0	0,093 0,092 0,001	0
81	E/9260/10-B	0	0	0	0	0,092 0,095 -0,003	0
82	E/9314/10-1	0	0	0	0	0,122 0,128 -0,006	0
83	E/9314/10-2	0	0	0	0	0,171 0,159 0,012	0
84	E/9314/10-4	0	0	0	0	0,242 0,224 0,018	0
85	E/9335/10	0	0	0	0	0,072 0,073 -0,001	0
86	E/9367/10-1	0	0	0	0	0,073 0,066 0,007	0
87	E/9379/10	0	0	0	1	0,287 0,205 0,082	0
88	E/9472/10-1	0	0	0	0	0,084 0,088 -0,004	0
89	E/9472/10-2	0	0	0	0	0,107 0,085 0,022	0
90	E/9472/10-3	0	0	0	1	0,231 0,109 0,122	0
91	E/9473/10	0	0	0	0	0,220 0,222 -0,002	0
92	E/9562/10-1	0	0	0	0	0,096 0,097 -0,001	0
93	E/9562/10-2	0	0	0	0	0,109 0,111 -0,002	0

0: Negativo; 1: Positivo; old: antiguo valor de corte ELISA KERI; new: nuevo valor de corte ELISA KERI; R1: R1 OD; R2: R2 OD; ΔOD: diferencia entre R1 y R2 (R1-R2).

Tabla suplementaria R1.S2. *continuación.*

	ID Muestras	Pathfinder™ Rotavirus	FASTest Rota® Strip	ELISA KERI			Población de Referencia		
				old	new	R1		R2	ΔOD
94	E/042/11-1	0	0	0	0	0,455	0,443	0,012	0
95	E/042/11-2	0	0	0	0	0,517	0,484	0,033	0
96	E/670/11	0	0	0	0	0,217	0,222	-0,005	0
97	E/1112/11-1	0	0	0	0	0,171	0,173	-0,002	0
98	E/1112/11-2	0	0	0	0	0,174	0,170	0,004	0
99	E/1112/11-4	0	0	0	0	0,290	0,290	0,000	0
100	E/1112/11-5	0	0	1	1	0,683	0,389	0,294	0
101	E/1134/11-1	0	0	0	0	0,175	0,180	-0,005	0
102	E/1134/11-2	0	0	0	0	0,454	0,440	0,014	0
103	E/1139/11-2	0	0	0	0	0,412	0,397	0,015	0
104	E/1139/11-4	0	0	0	0	0,513	0,478	0,035	0
105	E/1139/11-6	0	0	0	1	0,382	0,237	0,145	0
106	E/1139/11-7	0	0	0	0	0,337	0,335	0,002	0
107	E/1154/11-1	0	0	0	1	0,621	0,478	0,143	0
108	E/1154/11-4	0	0	0	1	0,457	0,356	0,101	0
109	E/1154/11-6	0	0	0	1	0,630	0,479	0,151	0
110	E/1219/11	0	0	0	0	0,166	0,166	0,000	0
111	E/1224/11-3	0	0	1	1	0,679	0,257	0,422	0
112	E/1225/11	0	0	0	0	0,188	0,185	0,003	0
113	E/1263/11-1	0	0	0	0	0,327	0,281	0,046	0
114	E/1263/11-3	0	0	0	0	0,423	0,491	-0,068	0
115	E/1263/11-4	0	1	0	0	0,551	0,500	0,051	0
116	E/1263/11-5	0	1	0	0	0,278	0,262	0,016	0
117	E/1292/11-1	0	0	0	0	0,487	0,475	0,012	0
118	E/1299/11	0	0	0	0	0,165	0,156	0,009	0
119	E/1460/11-1	0	0	0	0	0,213	0,201	0,012	0
120	E/1536/11-2	0	0	0	0	0,392	0,360	0,032	0
121	E/1536/11-5	0	0	0	0	0,191	0,400	-0,209	0
122	E/1536/11-7	0	0	0	0	0,478	0,494	-0,016	0

0: Negativo; 1: Positivo; old: antiguo valor de corte ELISA KERI; new: nuevo valor de corte ELISA KERI; R1: R1 OD; R2: R2 OD; ΔOD: diferencia entre R1 y R2 (R1-R2).

Capítulo 2

**Caracterización molecular
de los Rotavirus equinos
circulantes en potrillos de
Argentina durante el
período 2009 – 2014.**

Caracterización molecular de los Rotavirus equinos circulantes en potrillos de Argentina durante el período 2009 – 2014.

Introducción

Históricamente, G3P[12] y G14P[12] son los genotipos de RVA equinos más frecuentemente hallados en estudios epidemiológicos realizados en poblaciones equinas alrededor del mundo (Matthijnssens *et al.*, 2015; Papp *et al.*, 2013a). Además, el análisis de genomas completos evidencia que los mismos poseen un gran nivel de conservación en su constelación genómica, con 8 de los 11 segmentos conservados, el mismo genotipo, en todas las poblaciones estudiadas. Sólo los genes de VP6, VP7 y NSP4 poseen dos variantes, genotipos, VP6: I2/I6, VP7: G3/G14 y NSP4: E2/E12 (Ghosh *et al.*, 2013; Matthijnssens *et al.*, 2012).

En nuestro país, el primer hallazgo comunicado de diarrea por Rotavirus en potrillos fue realizado en el año 1985 (Valle, 1990). Desde 1992, el Instituto de Virología del INTA Castelar ha estudiado los Rotavirus circulantes en equinos, confirmando la elevada incidencia de la enfermedad, especialmente en haras de cría de equinos sangre pura de carrera. Este grupo de trabajo desarrolló una vacuna a virus inactivado, que incluye las cepas RVA/Horse-tc/GBR/H-2/1976/G3P[12], RVA/Simian-tc/SA11-H96/G3P[2] y RVA/Cow-tc/USA/NCDV-Lincoln/1967/G6P[1], formulada con adyuvante acuoso (gel de hidróxido de aluminio); su aplicación sistemática a las hembras preñadas, desde 1996, ha reducido drásticamente la incidencia de la diarrea por RVA equino en Argentina (Barrandeguy *et al.*, 1998; Garaicoechea *et al.*, 2011).

En nuestro país, la prevalencia de RVA equino ha sido descripta luego de un período de vigilancia de 17 años (1992-2008), encontrándose que un 39% de los brotes de diarrea registrados en 35 haras de equinos deportivos se asociaron a RVA. La caracterización de las cepas dio como resultado que el genotipo de VP7

predominante fue G3 (51%) seguido por G14 (33%) y por un 11% de infecciones mixtas. Además, todas las cepas analizadas poseían el genotipo P[12] para el gen de VP4 y el genotipo E12 para NSP4. Aunque la población de caballos deportivos muestra una alta tasa de movimiento internacional, los RVA detectados en este estudio fueron genéticamente homogéneos (Garaicoechea *et al.*, 2011). Sólo se detectó una variante de RVA atípica en un potrillo con diarrea en el año 2008. Dicha cepa fue caracterizada como G3P[3] y el análisis del genoma completo mostró que el mismo tiene una estructura típica de los RVA felinos o caninos, sugiriendo que dicho evento fue el resultado de un caso puntual de transmisión interespecie (Miño *et al.*, 2013).

El objetivo de este capítulo del presente trabajo de tesis fue evaluar la tasa de detección de los RVA equinos circulantes en la Argentina en el período 2009 – 2014.

Materiales y Métodos

Muestras clínicas

Se analizaron muestras de materia fecal de potrillos con diarreas enviadas al servicio de diagnóstico del Laboratorio de Virus Equinos (Instituto de Virología, CICV y A, INTA-Castelar), provenientes de brotes de diarrea en haras de equinos deportivos ubicados en la provincia de Buenos Aires. Para el análisis de los datos, se consideró que las muestras recibidas de potrillos con diarrea provenientes de un mismo establecimiento, dentro de la misma temporada de parición, correspondían a un único brote. Cuando sólo una muestra fue enviada, esta se considera como un caso aislado o único de diarrea.

Identificación de las muestras

Las muestras de materia fecal (MF) de equinos recibidas en el servicio se ingresaron a una base de datos iniciada en 1992, cada muestra se denomina como E/XXXX/AA, donde la E indica que se trata de una MF equina, las XXXX corresponden a un número correlativo asignado a todas las muestras que ingresan y AA es el año de ingreso de las mismas. Así, la muestra E/4206/09 es la muestra equina, número 4206 que ingreso en el año 2009.

Diagnóstico de RVA

Todas las muestras fueron analizadas para detectar la presencia de RVA mediante los ensayos de FASTest[®] Rota strip (MEGACOR, Diagnostk GmbH, A-6912 Hörbranz, Austria) y ELISA KERI (KERI: Kit ELISA Rotavirus INTA) según lo descrito en el capítulo de resultados 1 (Miño *et al.*, 2015).

Genotipificación de los RVA

Todas las muestras positivas fueron analizadas por RT-PCR para los genes codificantes de las proteínas estructurales VP6, VP7 y VP8* y la proteína no estructural NSP4. Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados para determinar el I-, G-, P-, E- y H-genotipo de las cepas circulantes (Matthijnsens *et*

al., 2012). Brevemente, el producto de PCR fue purificado con ExoStar (Illustra, GE) siguiendo las especificaciones del fabricante y enviado para su secuenciación a la “Unidad de Genómica, Instituto de Biotecnología, CICV y A, INTA-Castelar”. Para establecer los genotipos de VP6, VP7, VP8* y NSP4 se siguieron las recomendaciones del “Rotavirus Classification Working Group (RCWG)” (Matthijssens *et al.*, 2008), utilizando la herramienta informática RotaC v2 (<http://rotac.regatools.be/>) (Maes *et al.*, 2009).

Análisis Filogenético.

Con las secuencias de nucleótidos de VP7 y VP8* obtenidas en este estudio y de cepas previamente publicadas por nuestro laboratorio, conjuntamente con las de cepas de RVA equinos disponibles en el GenBank se construyeron matrices que fueron alineadas utilizando el programa CLUSTALX 2 (Larkin *et al.*, 2007), y subsecuentemente editadas con el programa Bioedit (Hall, 1999). El análisis filogenético fue realizando utilizando el método de Neighbor-Joining, con un soporte de 1000 réplicas realizado en el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2011).

Resultados

Epidemiología de RVA equinos en Argentina

Durante el período estudiado (2009-2014) se recibieron, para su análisis; 436 muestras de materia fecal, correspondientes a 124 brotes de diarrea ocurridos en 46 establecimientos de cría de caballos deportivos. La edad de los potrillos afectados varió desde 1 día (2 casos), hasta de 1 año (1 caso). De acuerdo a la anamnesis suministrada junto con las muestras, 5 potrillos murieron con signos clínicos de diarrea aguda severa arrojando un índice de mortalidad del 1,15% (5/436). El 31% (135/436) de las muestras analizadas resultaron positivas a RVA y un 34,7% (43/124) de los brotes ocurridos en el período 2009-2014 se asoció a RVA equino. Al considerar los datos disponibles para el período completo (1992-2014), se analizaron un total de 1.207 muestras de materia fecal, correspondientes a 240 brotes de diarrea, de las cuales un 25% (300/1.207) fueron positivas a RVA lo que indica que el 36,7% (88/240) de los brotes de diarrea en potrillos se asocia a la infección con RVA equino (Tabla R2.1).

Por otro lado, en el presente trabajo de tesis, se observó una importante fluctuación en la tasa de detección de RVA en función del tiempo. Durante los años 2009 y 2010, se registró una tasa de detección de RVA del 22% (13/60) y 12% (11/92) respectivamente; mientras que, fue más alta, 38% (31/81), 38% (30/78), 42% (29/69) y 41% (24/59), entre los años 2011 y 2014 (Figura R2.1).

Tabla R2.1. Brotes y muestras analizadas

Año	Haras	Brotes (RVA+)	Muestras (RVA+)
2009	13	20 (7)	60 (13)
2010	12	30 (3)	92 (11)
2011	14	26 (8)	81 (31)
2012	11	18 (11)	78 (30)
2013	8	11 (6)	69 (29)
2014	13	19 (8)	56 (21)
2009-2014	71	124 (43)	436 (135)
1992-2008 ^a		116 (45)	771 (165)
1992-2014 ^b		240 (88)	1.207 (300)

(RVA +): Positivo a rotavirus grupo A equino

^a: Datos tomados de Garaicoechea et al. (2011)

^b: Datos de todo el historial de muestras analizadas por nuestro laboratorio (22 años).

El análisis de los brotes de diarrea en potrillos y la presencia de RVA determinó que, durante el 2009 y 2010, un 21% (8/38 y 7/34 respectivamente) de los mismos fueron positivos, mientras que durante los años 2011 a 2014 entre un 48% y 65% (14/28, 16/27, 13/19 y 8/19) de los brotes fueron positivos a RVA (Figura R2.1).

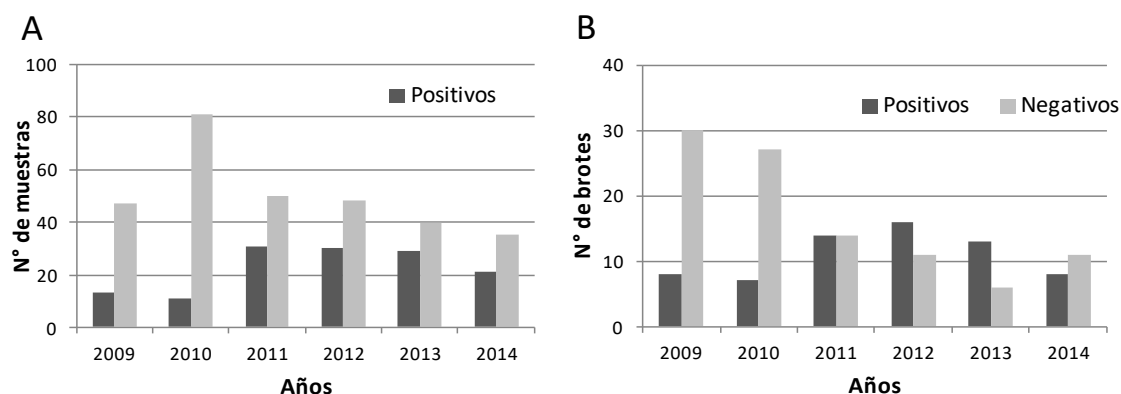


Figura R2.1 Histogramas de frecuencias correspondientes a la tasa de detección de RVA equino en muestras (A) y brotes de diarrea (B) en potrillos de nuestro país en función del tiempo (años).

Considerando toda la información [(1992-2008) + (2009-2014)], RVA equino fue detectado en el 25% de las muestras analizadas (Figura R2.2A). Del mismo modo, en el período completo 1992-2014, un 41% de los brotes analizados fueron positivos a RVA (Figura R2.2A).

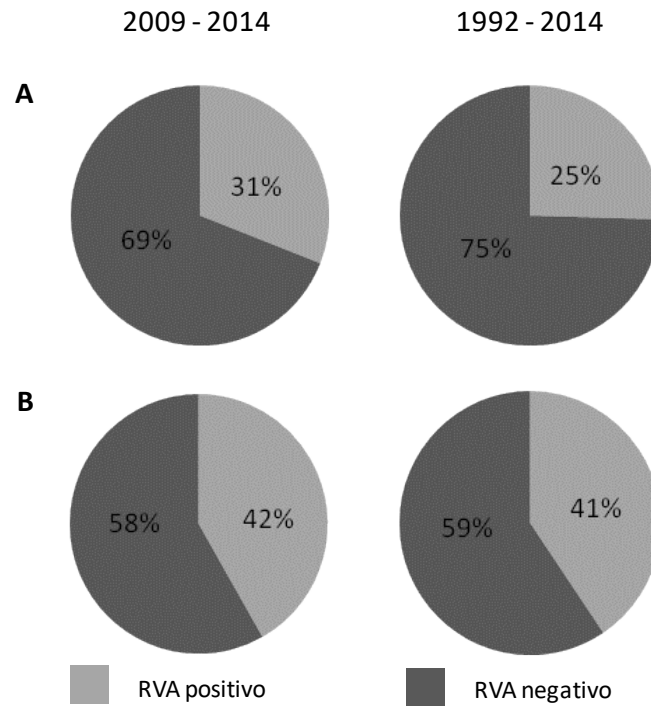


Figura R2. 2 Detección de RVA en muestras de materia fecal (A) y en brotes de diarrea en potrillos (B) durante el período estudiado (2009-2014) y en todo el período del cual se tienen registros (1992-2014).

Genotipificación de los RVA equinos

Las 135 muestras de materia fecal positivas a RVA fueron analizadas por RT-PCR seguida de secuenciación con el fin de determinar su G- (VP7) y P-genotipo (VP8). Se determinó el G-genotipo en el 42% (57/135) (Tabla R2.2) y el P-genotipo en el 33% (44/135) (Tabla R2.3) de las cepas de RVA equino detectadas. De las 57 muestras positivas secuenciadas para VP7 el 61% (35/57) fueron G3, el 39% (22/57) G14 y el 9% (5/57) infecciones mixtas G3/G14. Por su parte, las 45 secuencias de VP4 (VP8*) obtenidas fueron todas genotipo P[12].

Tabla R2.2. Resumen de las cepas de RVA equino genotipificadas.

Año	2009	2010	2011	2012	2013	2014
RVA Positivos	13	11	31	30	29	21
Genotipados (*)	10 (77%)	7 (64%)	16 (52%)	13 (43%)	7 (24%)	4 (19%)
G3	9	3	15	1	7	1
G14	1	4	1	12	0	3

*: porcentaje de muestras genotipificadas.

El análisis de la frecuencia de detección de uno y otro genotipo, G3 y G14, muestra una alternancia anual entre 2009 y 2014 (Figura R2.3).

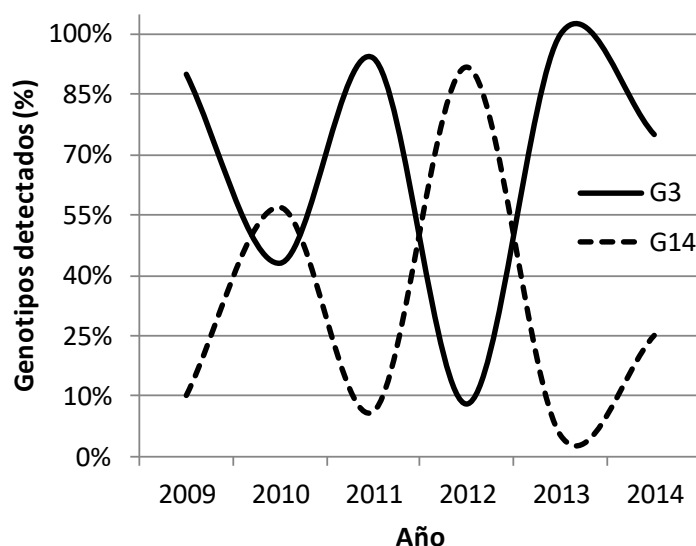


Figura R2.3 Frecuencia de detección de los P genotipos G3 y G14 (expresada en porcentaje) durante el período estudiado.

Además, se determinó el genotipo de VP6 en el 39% (53/135) de las muestras positivas. De estas, el 68% (36/53) presentaron el genotipo I6 mientras que el 32% (17/53) presentaron el genotipo I2. Todas las cepas con genotipo G3 portaron el genotipo I6, mientras que todas las cepas G14 portaron el genotipo I2. Finalmente, se lograron amplificar los genes codificantes de la proteína viral NSP4 en 20 de las 57 muestras RVA positivas, todas clasificadas como genotipo E12 (material suplementario R2.S1).

Análisis Filogenéticos

El análisis filogenético de los genes de VP7 (G3 y G14) y VP8 (P[12]) de las cepas Argentinas detectadas durante los años 2009 y 2014, muestra que las mismas agrupan en una misma rama junto a las cepas de Argentina previamente estudiadas por Garaicoechea y colaboradores (2011) (Figura R2.4).

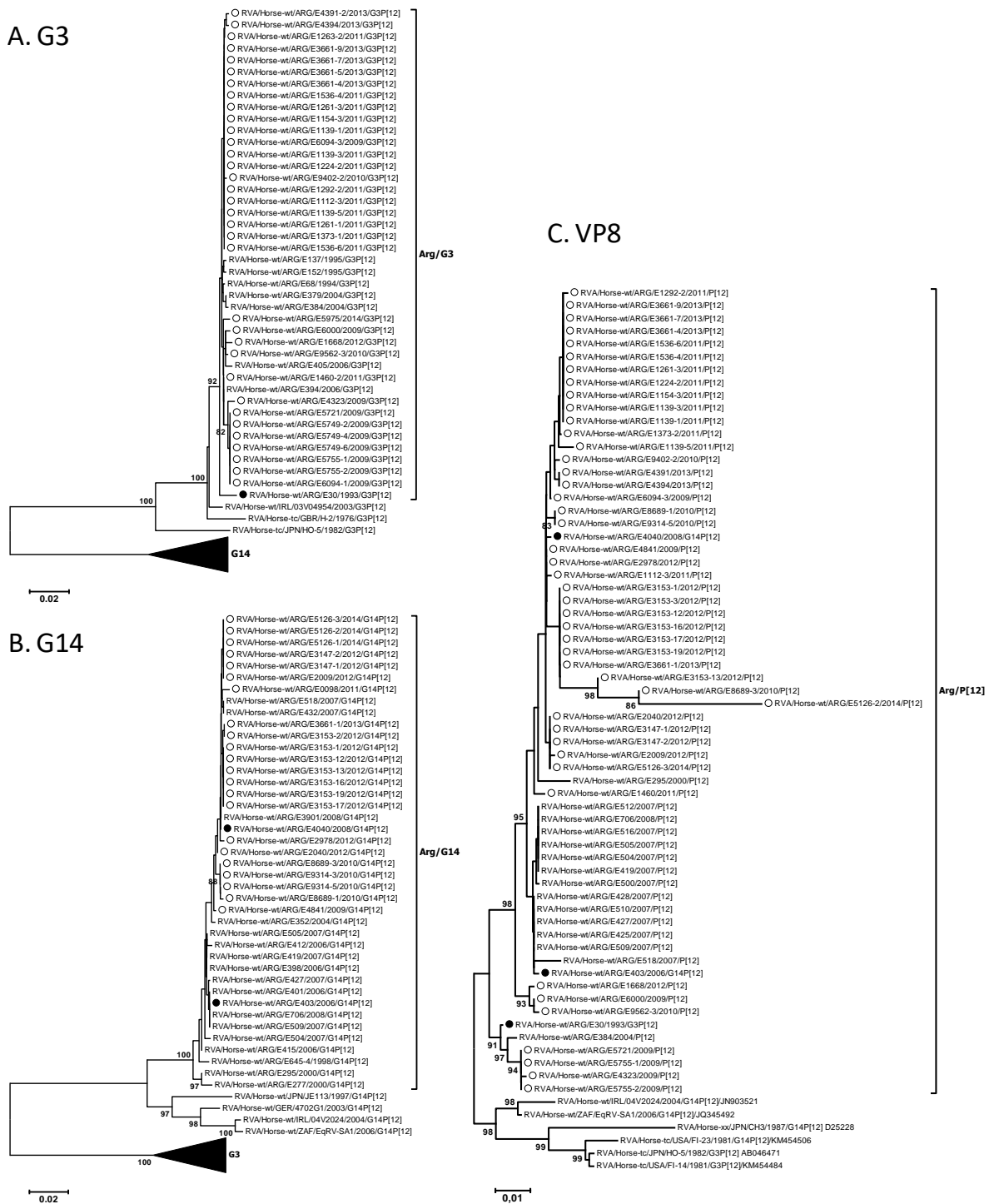


Figura R2. 4 *Arboles filogenéticos construidos con la secuencia nucleotídica del ORF de G3 (A), G14 (B) y P[12] (C). Las cepas analizadas en este estudio están identificadas con un círculo blanco, mientras que las secuencias Argentinas de referencia con un círculo negro.*

Discusión

La tasa de detección de RVA, 31%, en equinos en el período estudiado, está en concordancia con el 21% previamente comunicado en nuestro país (Garaicoechea *et al.*, 2011). Asimismo, la tasa de detección global fue del 25% y el porcentaje de brotes RVA positivos 41% (período 1992 – 2014), está en concordancia con los datos comunicados en todo el mundo (Papp *et al.*, 2013a). El presente estudio confirma la estacionalidad observada en nuestro país, donde los brotes de diarrea asociados a RVA en potrillos nacidos en establecimientos de cría de caballos se registran durante los meses de septiembre a diciembre de cada año, en concordancia con la elevada concentración de animales susceptibles (Garaicoechea *et al.*, 2011). Esta misma estacionalidad de brotes de diarrea ha sido descrita recientemente en Irlanda en la temporada de parición de Europa (Nemoto *et al.*, 2017).

En nuestro país, la vacuna para prevenir la diarrea por RVA en equinos se encuentra disponible comercialmente desde 1996, contiene las cepas RVA/Horse-tc/GBR/H-2/1976/G3AP[12], RVA/Simian-tc/SA11/1981/G3P[2] y RVA/Cow-tc/USA/NCDV/1967/G6P6[1] (Barrandeguy *et al.*, 1998). Desde la implementación de la vacunación sistemática en los establecimientos de cría de caballos de polo y pura sangre de carrera de nuestro país, los brotes de diarreas causados por RVA equinos disminuyeron drásticamente. De hecho, durante el período 2001-2002 no se detectó RVA en las muestras de los brotes remitidas a nuestro servicio de diagnóstico. Llamativamente, desde el año 2006 en adelante, los casos de diarrea asociados a RVA se fueron incrementado (Garaicoechea *et al.*, 2011), en este trabajo además se observó un patrón anual cíclico y alternado de la tasa de detección de ambos genotipos (G3 y G14), similar al observado en RVA humanos (Degiuseppe *et al.*, 2014).

De acuerdo a estudios publicados en las últimas dos décadas, G3P[12] y G14P[12] son los genotipos epidemiológicamente importantes en los equinos deportivos (Bailey *et al.*, 2013; Papp *et al.*, 2013). En nuestro estudio, G3P[12] fue el genotipo más prevalente, 61%, mientras que para el genotipo G14P[12] la

prevalencia fue significativamente menor, 39% (test de Exacto de Fisher; $p=0,0084$), en concordancia con lo observado en el resto del mundo (Matthijssens *et al.*, 2015; Nemoto *et al.*, 2015; Papp *et al.*, 2013b). El comportamiento cíclico observado en los genotipos predominantes, podría deberse a los cambios en inmunidad de la población año tras año, tal como se observa en humanos (Matthijssens *et al.*, 2009).

El genotipo P[12] fue el único genotipo de VP8* detectado en este estudio, lo cual es coincidente con lo reportado mundialmente (Matthijssens *et al.*, 2015; Nemoto *et al.*, 2015; Papp *et al.*, 2013b). Una explicación posible podría ser que el RVA genotipo P[12] posee una configuración particular de aminoácidos que reconocen a un receptor presente sólo en las células del epitelio intestinal equino; esta hipótesis se ve sustentada por el hecho de que no se ha reportado el genotipo P[12] en ninguna otra especie animal (Martella *et al.*, 2010). Un modelo estructural, obtenido *in silico*, de la proteína VP8* que podría explicar esta observación, será motivo de un trabajo futuro.

El hecho de que solo el 42% de las muestras positivas a RVA pudieron ser genotipificadas, también está dentro de los valores obtenidos por otros grupos de investigación (Adlhoch *et al.*, 2011; Matthijssens *et al.*, 2015; Nemoto *et al.*, 2015; Papp *et al.*, 2013b); una posible explicación de los casos en los que no es posible la genotipificación, sería que la elevada carga de antígeno viral, en comparación con la carga de ARN viral, haría que en muchas muestras pueda detectarse el RVA por ELISA pero no por PCR, dado que el ARN es más lábil en comparación con las proteínas. Además, algunas muestras podrían contener inhibidores para la reacción de RT-PCR (Adlhoch *et al.*, 2011).

El análisis filogenético mostró que para los tres genotipos, G3, G14 y P[12] las cepas de RVA equino detectadas en este trabajo forman grupos con el resto de las secuencias argentinas reportadas previamente (Garaicoechea *et al.*, 2011; Miño *et al.*, 2015). Dentro de VP7, ambos genotipos G3 y G14 forman un grupo monofilético y homogéneo, formado solamente por cepas de Argentina, con elevado valor de soporte (99-100%). Del mismo modo, dentro de VP4, un solo genotipo se encuentra presente (P[12]) y el análisis muestra que todas las cepas P[12] de Argentina se agruparon juntas también con un elevado valor de soporte

(Figura R2.4). Nuestros datos sugieren la hipótesis de que podrían existir diferencias o similitudes regionales en la distribución de los genotipos virales, las cuales podrían observarse realizando análisis filogenéticos más profundos, los mismos se describen en el capítulo de resultados 3 de esta tesis.

En conclusión, nuestros resultados evidencian que se producen cambios anuales en los genotipos prevalentes dentro la población estudiada. Esto podría deberse a la presión inmunológica provocada por la vacunación sistemática implementada o bien podría ser un ciclo natural de la enfermedad. La morbilidad de diarrea observada es aún muy alta, motivo de permanente preocupación para los productores, lo que justifica plenamente que se continúen los esfuerzos por obtener inmunógenos que incluyan una cepa de RVA G14, limitados hasta el momento por la dificultad (imposibilidad) de multiplicar esta cepa en cultivos celulares. Asimismo, reafirma la necesidad de la continua vigilancia para contar con información importante sobre la epidemiología de la enfermedad y la evolución del virus.

Material suplementario tabla R2.S1.

Tabla R2.S1. Secuencias obtenidas				
Año	VP7	VP8	VP6	NSP4*
2009	E/4323/2009/G3 ^a E/4841/2009/G14^a E/5721/2009/G3 ^a E/5749-2/2009/G3 ^a E/5749-4/2009/G3 ^a E/5749-6/2009/G3 ^a E/5755-1/2009/G3 ^a E/5755-2/2009/G3 ^a E/6000/2009/G3 ^a E/6094-1/2009/G3 ^a E/6094-3/2009/G3 ^a	E/4323/2009/P[12] ^b E/4841/2009/P[12] ^b E/5721/2009/P[12] ^b E/5755-1/2009/P[12] ^b E/5755-2/2009/P[12] ^b E/6000/2009/P[12] ^b E/6094-3/2009/P[12] ^b	E/4323/2009/16 ^c E/4841/2009/12^c E/5721/2009/16 ^c E/5749-2/2009/16 ^c E/5749-4/2009/16 ^c E/5749-6/2009/16 ^c E/5755-1/2009/16 ^c E/5755-2/2009/16 ^c E/6000/2009/16 ^c E/6094-3/2009/16 ^c	E/4323/2009/E12 E/5755-2/2009/E12 E/6000/2009/E12 E/6094-3/2009/E12
2010	E/8689-1/2010/G14^a E/8689-3/2010/G14^a E/9314-3/2010/G14^a E/9314-5/2010/G14^a E/9402-2/2010/G3 ^a E/9562-3/2010/G3 ^a	E/8689-1/2010/P[12] ^b E/9314-5/2010/P[12] ^b E/9402-2/2010/P[12] ^b E/9562-3/2010/P[12] ^b	E/8689-1/2010/12^c E/8689-3/2010/12^c E/9314-3/2010/12^c E/9314-5/2010/12^c E/9402-1/2010/16 ^c E/9402-2/2010/16 ^c E/9562-3/2010/16 ^c	E/8689-1/2010/E12 E/9402-2/2010/E12 E/9562-3/2010/E12
2011	E/0098/2011/G14^a E/0964/2011/G3 E/1112-3/2011/G3 ^a E/1139-1/2011/G3 ^a E/1139-3/2011/G3 ^a E/1139-5/2011/G3 ^a E/1154-3/2011/G3 ^a E/1224-2/2011/G3 ^a E/1261-1/2011/G3 ^a E/1261-3/2011/G3 ^a E/1263-2/2011/G3 ^a E/1292-2/2011/G3 ^a E/1373-2/2011/G3 ^a E/1453/2011/G3 E/1460-2/2011/G3 ^a E/1536-4/2011/G3 ^a E/1536-6/2011/G3 ^a	E/1112-3/2011/P[12] ^b E/1139-1/2011/P[12] ^b E/1139-3/2011/P[12] ^b E/1139-5/2011/P[12] ^b E/1154-3/2011/P[12] ^b E/1224-2/2011/P[12] ^b E/1261-3/2011/P[12] ^b E/1292-2/2011/P[12] ^b E/1373-2/2011/P[12] ^b E/1460-2/2011/P[12] ^b E/1536-4/2011/P[12] ^b E/1536-6/2011/P[12] ^b	E/0098/2011/12 ^c E/0964/2011/16 ^c E/1112-3/2011/16 ^c E/1139-1/2011/16 ^c E/1139-3/2011/16 ^c E/1139-5/2011/16 ^c E/1154-3/2011/16 ^c E/1224-2/2011/16 ^c E/1261-3/2011/16 ^c E/1292-2/2011/16 ^c E/1373-2/2011/16 ^c E/1453/2011/16 ^c E/1460-2/2011/16 ^c E/1536-4/2011/16 ^c E/1536-6/2011/16 ^c	E/1139-3/2011/E12 E/1373-2/2011/E12 E/1460-2/2011/E12 E/1536-6/2011/E12
2012*	E/1668/2012/G3 E/2009/2012/G14 E/2040/2012/G14 E/2978/2012/G14 E/3147-1/2012/G14 E/3147-2/2012/G14 E/3153-1/2012/G14 E/3153-3/2012/G14 E/3153-12/2012/G14 E/3153-13/2012/G14 E/3153-16/2012/G14 E/3153-17/2012/G14 E/3153-19/2012/G14	E/1668/2012/P[12] E/2009/2012/P[12] E/2040/2012/P[12] E/2978/2012/P[12] E/3147-1/2012/P[12] E/3147-2/2012/P[12] E/3153-1/2012/P[12] E/3153-3/2012/P[12] E/3153-12/2012/P[12] E/3153-13/2012/P[12] E/3153-16/2012/P[12] E/3153-17/2012/P[12] E/3153-19/2012/P[12]	E/1668/2012/16 E/2009/2012/12 E/2040/2012/12 E/2978/2012/12 E/3147-1/2012/12 E/3147-2/2012/12 E/3153-1/2012/12 E/3153-3/2012/12 E/3153-5/2012/12 E/3153-12/2012/12	E/1668/2012/E12 E/2009/2012/E12 E/2978/2012/E12
2013*	E/3492/2013/ E/3661-1/2013/G14 E/3661-4/2013/G3 E/3661-5/2013/G3 E/3661-7/2013/G3 E/3661-9/2013/G3 E/4391-2/2013/G3 E/4394/2013/G3	E/3661-1/2013/P[12] E/3661-4/2013/P[12] E/3661-7/2013/P[12] E/3661-9/2013/P[12] E/4391-2/2013/P[12] E/4394/2013/P[12]	E/3661-1/2013/12 E/3661-4/2013/16 E/3661-5/2013/16 E/3661-7/2013/16 E/3661-9/2013/16 E/4394/2013/16	E/3661-1/2013/E12 E/3661-7/2013/E12 E/4394/2013/E12 E/4424/2013/E12
2014*	E/5126-1/2014/G14 E/5126-2/2014/G14 E/5126-3/2014/G14 E/5975/2014/G3	E/5126-2/2014/P[12] E/5126-3/2014/P[12]	E/5975/2014/16	
N=	57	44	52	20
En negrita se muestran las secuencias G14:12, para marcar la asociación entre G3:16 y G14:12. ^a Números de acceso VP7: KP116019-KP116049. ^b Números de acceso VP4: KR873107-KR873130 ^c Números de acceso VP6: KJ628058 – KJ628088. *Los números de acceso de las cepas correspondientes a estos años o genes serán publicadas en este trabajo.				

Capítulo 3

Análisis Evolutivo de los genes G3, G14, I2, I6, P[12] y E12 de Rotavirus Equino.

Análisis Evolutivo de los genes G3, G14, I2, I6, P[12] y E12 de Rotavirus Equino.

Introducción

Los Rotavirus grupo A (RVA) equinos pertenecen a la familia *Reoviridae* (género Rotavirus), son virus desnudos, con un genoma compuesto por 11 segmentos que codifican para 7 proteínas estructurales y 5/6 proteínas no estructurales (Estes and Greenberg, 2013).

Los mecanismos que utilizan los RVA para generar diversidad genética son muy variados, incluyendo, reasociación de segmentos entre cepas del mismo o distinto genotipo dentro de un huésped durante una co-infección (Martella et al., 2010; Matthijnssens et al., 2010; Mcdonald et al., 2009), recombinación inter o intra génica (Cao et al., 2008; Donker et al., 2011; Marthaler et al., 2014; Woods, 2015), mutaciones puntuales (Matthijnssens et al., 2010; Zeller et al., 2015b, 2012) y transmisión inter-especie (Dóro et al., 2015; Mcdonald et al., 2016).

La teoría de la coalescencia generó las bases para el estudio de las relaciones ancestro-descendiente de individuos en una población, la cual puede ser inferida a partir de la genealogía de un gen (árbol filogenético), y que está influenciada por la historia demográfica de la población (filodinámica poblacional). El concepto de filodinámica fue introducido por Grenfell y colaboradores en 2004 y combina la inferencia filogenética con la interacción entre evolución (mutación, selección, deriva) y ecología (dinámica poblacional y estocasticidad ambiental) (Grenfell *et al.*, 2004). Este nuevo concepto se utiliza para estudiar la evolución de virus de evolución rápida como el virus de la Inmunodeficiencia adquirida humana, virus de la Hepatitis C o virus Influenza (Grenfell *et al.*, 2004; Norström *et al.*, 2012; Volz *et al.*, 2013).

La acumulación de mutaciones puntuales en cada ciclo de replicación, debido a la naturaleza “no correctora” que posee la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) viral, provoca la deriva génica (*drift*) viral. Conocer la tasa de mutación de los genes nos permite estimar el tiempo en el cual las cepas evolucionan dentro de la población, esto ha sido estudiado para los genes de RVA humanos G9, G12 y P[8] OP354-like (Matthijnssens *et al.*, 2010; Zeller *et al.*, 2015b). Sin embargo, no se cuenta con datos de tasa de mutación para ningún gen de las cepas equinas. Además, la diversidad poblacional deja huellas en las secuencias nucleotídicas que pueden ser estudiadas mediante análisis de filodinámica poblacional (Grenfell *et al.*, 2004; Volz *et al.*, 2013). Por otra parte, los análisis filogenéticos con métodos bayesianos, además de permitirnos realizar los estudios de filodinámica poblacional, consideran la probabilidad de cada grupo formado, por tanto grupos con una probabilidad alta en el árbol tienen asimismo una elevada probabilidad de tener relaciones reales en la naturaleza, lo que constituye un análisis robusto para el estudio de posibles grupos o linajes de cepas virales (Norström *et al.*, 2012; Volz *et al.*, 2013).

El objetivo de este capítulo fue, estudiar las relaciones ancestro-descendientes de los genes característicos de RVA equinos (VP6, VP7, VP4 y NSP4), realizar un análisis filodinámico para estudiar la variabilidad poblacional y estudiar las relaciones entre las cepas de RVA equinas reportadas en todo el mundo.

Materiales y Métodos

Construcción de las matrices de Datos

En todos los casos se consideró solamente el ORF y todas las secuencias utilizadas están disponibles en la base de datos GenBank, excepto las secuencias de Argentina generadas en el presente estudio. Para la construcción de las matrices se utilizaron todas las secuencias de RVA equino disponibles hasta el 1 de diciembre de 2016 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/variation/rotavirus/>).

Las matrices de G3 y G14 de RVA equino fueron construidas con 78 y 84 secuencias respectivamente. Mientras que las matrices de I2 e I6 se construyeron con 40 secuencias en ambos casos. Del mismo modo, las matrices de VP4 (dominio VP8*) y NSP4 se construyeron con 113 y 93 secuencias respectivamente. En el caso de la matriz de G3, se utilizaron 3 cepas G14, y para la matriz de G14 se utilizaron 4 cepas G3 como grupos externos respectivamente. En el mismo sentido, se utilizaron 10 cepas I6 y 6 cepas I2 como grupos externos para las matrices de I2 e I6 respectivamente. En el caso de VP8* se utilizaron cepas de otro P-tipo y, en el caso de NSP4 se utilizaron algunas cepas E2 como grupo externo.

El alineamiento múltiple inicial se realizó con el programa ClustalX2 (Larkin *et al.*, 2007) utilizando los parámetros pre-establecidos, la corrección del mismo y la construcción del alineamiento final se realizó posteriormente con el programa Bioedit (Hall, 1999).

Modelo de sustitución nucleotídica

El modelo de sustitución fue inferido utilizando el programa JModel Test (Darriba *et al.*, 2012) utilizando el criterio de selección de Akaike. Los modelos seleccionados fueron: TN93+I+G para todos los genes analizados.

Probabilidades iniciales (*priors*)

Para determinar el punto de partida adecuado para el análisis se realizó una corrida exploratoria con una distribución constante de los parámetros iniciales (*priors*). Luego, en base a la corrida exploratoria se determinó la distribución inicial de los

parámetros, comenzando el análisis con la distribución más adecuada para cada parámetro.

Convergencia

El análisis inicial se realizó con 50 millones de generaciones tomando una muestra cada 5.000 generaciones (corrida exploratoria). En base a este análisis se ajustaron la cantidad de generaciones necesarias y el espaciado de la toma de muestras, considerando siempre un total de 1.000 muestras para efectuar los análisis. Las corridas se realizaron en el servidor online “Cipres Science Gateway” (Miller *et al.*, 2010). La *convergencia* de las corridas fue analizada utilizando el programa Tracer v1.6 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>).

Tasa de Mutación

El análisis de Cadenas de Markov – Monte Carlo (MCMC) implementado en el paquete BEAST v1.8.3 (Drummond *et al.*, 2012) (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/beast/>) nos permite calcular la tasa de mutación (μ) expresada en mutaciones por sitio por año. Para, esto en BEAUti, configuramos el análisis con el modelo evolutivo, estimando la frecuencia de bases, estimando también los sitios invariables (I) y la distribución gamma (G) con 4 categorías.

Tiempo del Ancestro Común Más Reciente (TMRCA)

La reconstrucción filogenética de coalescencia fue realizada utilizando el análisis de MCMC utilizando el programa BEAUti como consola para armar el archivo ejecutable (programa que forma parte del paquete BEAST). Para calcular el tiempo del ancestro común más reciente (TMRCA) se tomaron las edades de las cepas publicadas, considerando un reloj molecular relajado no correlacionado (*uncorrelated relaxed clock*), con una distribución *LogNormal* y utilizando *cuantiles de parametrización continuos*.

Análisis Filogenéticos

El árbol que maximiza la probabilidad de cada clado (Maximun Clade Credibility Tree [MCCT]) basado en el TMRCA fue calculado descartando el 10% de los estados iniciales (burn-in=10%) fue realizado con el programa TreeAnnotator

(programa que forma parte del paquete BEAST). En cada nodo del árbol se expresa la probabilidad de que dicho nodo se corresponda con la naturaleza. Todos los árboles fueron visualizados y editados con el programa FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). La probabilidad posterior (pp) (probabilidad de que el grupo observado sea real, varía entre 0 – 1, siendo 1= 100%) se muestra en cada caso. Valores de $pp \geq 0,85$ se consideran óptimos para definir linajes con métodos bayesianos.

Filodinámica

El cálculo de la diversidad poblacional en las secuencias estudiadas fue realizado asumiendo un modelo de *Bayesian Skyline*, con el método de escalado *piecewise constant* (*Skyline model= piecewise-constant*), utilizando un árbol de distancias calculado por agrupación de las secuencias que presentan la menor distancia genética entre sí (UPGMA), como árbol inicial. El gráfico de los cambios en la diversidad genética relativa a través del tiempo fue construido utilizando el programa Tracer v1.6 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>).

Resultados

Convergencia de las corridas

La convergencia de los análisis bayesianos se logró luego de 100 a 150 millones de generaciones y excepcionalmente, la corrida del gen de VP8 demandó 650 millones y la combinación de 3 corridas (Tabla R3.1).

TMRCA de los genes estudiados

El tiempo estimado en que las cepas fueron introducidas a nuestro país, fue calculado para las cepas de Argentina en todos los genes estudiados. Los resultados obtenidos para los genes G3, G14, I2 e I6 fueron 50,5; 29,7; 130,5 y 36,8 años respectivamente. Dado que este parámetro está altamente influenciado por el intervalo de tiempo muestreado, nuestros resultados indican que la información disponible no es suficiente para estimar correctamente el TMRCA de estos genes. En el caso de P[12] (210,5 años), el TMRCA no posee un elevado valor de tamaño efectivo de la muestra (ESS= 45), debido a que en el análisis de coalescencia el grupo de cepas Argentinas no forman un grupo monofilético.

Por otra parte, el gen E12 mostró un valor de TMRCA de 374,9 años, ubicándose en el año 1.638 (Intervalo de Confianza [IC95%]: 1.434 – 1.815), lo cual se corresponde con la introducción de los caballos a Sudamérica (Tabla R3.1-2).

Tabla R3.1. Valores en la convergencia de las corridas realizadas en BEAST.

Gen Analizado	G3		G14		I2		I6		P[12]		E12	
N° de Generaciones	150000000		100000000		100000000		150000000		675075000		150000000	
Parámetro/Sampling	Mean	ESS ^a	Mean	ESS ^a	Mean	ESS ^a	Mean	ESS ^a	Mean	ESS ^a	Mean	ESS ^a
Posterior*	-6283,17	821	-7257,22	462	-9878,71	630	-7139,34	208	-7757,77	22647	-5737,57	551
Priors	-2751,99	704	-2732,29	395	-2606,79	648	-2539,55	232	-2908,62	5407	-2856,77	517
Likelihood*	-3531,17	901	-4524,94	836	-7271,91	786	-4599,79	311	-4849,15	25452	-2880,80	811
TreeModel.RootHeigt	1165,03	786	348,12	264	1357,88	667	1524,40	256	480,18	156	374,92	665
TMRCA*	50,5	856	29,7	666	130,52	691	36,85	315	210,50	42	374,92	665
Kappa1	11,05	901	7,539	901	13,43	811	13,77	1351	2112	2485	25,71	868
Kappa2	-	-	-	-	14,65	901	-	-	2092	2815	31,13	747
Frecuencias1	0,336	901	0,340	901	0,376	807	0,362	1351	0,286	1296	0,398	896
Frecuencias2	0,165	901	0,158	901	0,161	840	0,167	1351	0,233	1370	0,152	613
Frecuencias3	0,158	901	0,167	901	0,133	827	0,154	1246	0,254	1201	0,188	785
Frecuencias4	0,341	886	0,335	901	0,330	838	0,317	1351	0,228	1408	0,263	867
Alpha	8,203	901	2,445	789	1,000	767	69,75	1351	500,00	4766	467,24	901
pInV	0,564	901	0,397	700	0,514	757	0,617	1303	0,204	4246	0,559	901
Ucl.d.Mean*	1,7x10 ⁻⁴	734	6,13x10 ⁻⁴	369	4,19x10 ⁻⁴	601	3,92x10 ⁻⁴	233	6,67x10 ⁻⁴	26920	5,12x10 ⁻⁴	576
Ucl.d.stdev	0,379	765	0,905	523	0,431	613	0,754	207	1,50	860	0,326	901
MeanRate*	1,6x10 ⁻⁴	679	5,15x10 ⁻⁴	278	4,14x10 ⁻⁴	583	4,33x10 ⁻⁴	295	5,65x10 ⁻⁴	24807	5,07x10 ⁻⁴	560
CoefficientOfVariation*	0,401	766	1,15	499	0,496	539	0,888	231	2,105	175	0,338	901
Covariance	8,57x10 ⁻⁴	808	9,79x10 ⁻²	332	3,75x10 ⁻²	729	5,72x10 ⁻³	1008	-3,15x10 ⁻³	1545	-2,26x10 ⁻³	802
TreeLikelihood	-3531,17	901	-4524,94	836	-7271,91	786	-4599,79	311	-4849,15	25452	-2880,80	811
Skyline*	-391,57	751	-381,18	390	-241,86	658	-181,39	216	-550,23	1552	-493,21	500

* Parámetros utilizados para realizar los gráficos y análisis de los árboles obtenidos.

^a: Valores superiores a 200 en el “effective simple size” (ESS) indican que la corrida llegó a la convergencia.

Los “**Posteriors**” y el “**Likelihood**” son medidas para evaluar la calidad de los datos y árboles obtenidos. El “**TMRCA**” es el tiempo del último ancestro común. Este dato se obtiene luego de definir previamente el/los grupo/s a ser analizados. El “**MeanRate**” es la tasa de sustitución/sitio/año observada en cada gen analizado. El “**CoefficientOfVariation**” es la variación observada dentro de la matriz analizada y; el “**Skyline**” es el valor de soporte de los gráficos poblacionales obtenidos (Filodinámica).

Priors: variables iniciales del análisis. **TreeModel.RootHeigt**: TMRCA calculado en el árbol. Kappa1 y Kappa2: **Frecuencias1-4**: Frecuencias de bases (A, C, T, G). **Alpha**:

Pendiente de la curva gamma. **pInV**: Proporción de sitios invariables. **Ucl.d.Mean**: Tasa de mutación. **Ucl.d.stdev**: Desvío estándar de la tasa de mutación. **Covariance**: Índice de co-variación. **TreeLikelihood**: valor de verosimilitud del mejor árbol encontrado.

Grupo	TMRCA (años)	IC95%
G3 ARG	50,55	30,28 – 76,3
G14 ARG	30,7	17,12 – 48,14
I2 ARG	1305,2	562,04 – 2239,9
I6 ARG	36,8	21 – 92,3
P[12]	–	–
NSP4	374,9	198,6 – 580,7

TMRCA: Tiempo del ancestro común más reciente
IC95%: Intervalo de confianza del 95%.

Tasa de mutación de VP6, VP7, VP8* y NSP4

La tasa de mutación (μ), sustituciones por sitio por año, fue calculada para cada uno de los genes estudiados, y cada uno posee su intervalo de confianza del 95% (HDP95%). G3 y G14 muestran el mismo orden de magnitud (10^{-4}) pero distinta μ . Así, G3 con una $\mu = 1,69 \times 10^{-4}$ muestra una menor velocidad de cambio respecto de G14 que posee una $\mu = 4,94 \times 10^{-4}$. Los demás genes estudiados, I2, I6, P[12] y NSP4 también muestran una μ del mismo orden de magnitud, que varía entre $3,56$ y $5,65 \times 10^{-4}$ (Tabla R3.3).

Tabla R3.3. Tasas de mutación de los genes estudiados.

Gen	Genotipo	μ	HPD 95%	CV	HPD 95%
VP7	G3-equina	$1,69 \times 10^{-4}$	$7,766 - 2,577 \times 10^{-4}$	0,401	$1,566 \times 10^{-3} - 0,7814$
	G14	$4,94 \times 10^{-4}$	$2,444 - 8,042 \times 10^{-4}$	1,150	0,702 – 1,655
VP8	P[12]	$5,65 \cdot 10^{-4}$	$2,295 - 8,630 \times 10^{-4}$	2,105	1,307 – 3,226
VP6	I6	$3,56 \times 10^{-4}$	$5,096 - 1,010 \times 10^{-4}$	0,888	$7,680 \times 10^{-3} - 1,704$
	I2-equina	$3,93 \times 10^{-4}$	$1,629 - 6,509 \times 10^{-4}$	0,414	$8,905 \times 10^{-3} - 1,027$
NSP4	E12	$4,93 \times 10^{-4}$	$3,264 - 7,736 \times 10^{-4}$	0,338	$1,064 \times 10^{-3} - 0,669$

μ : Tasa de mutación expresada en sustituciones por sitio por año.

CV: Coeficiente de Variación

HDP95%: Intervalo de probabilidades posteriores que incluyen el 95% de los resultados.

Linajes de RVA equinos

El MCCT de G3 muestra que las cepas de Argentina agrupan en una única rama formando un grupo monofilético ($pp = 1$). Del mismo modo, las cepas de Asia forman un único grupo ($pp = 1$), también monofilético; mientras que las cepas Europeas muestran un origen polifilético con 3 grupos soportados por valores de pp entre 0,91 –

1. Estos grupos se denominan linajes: linaje I (cepas Sudamericanas); linaje IIa, IIb y IIc (cepas Europeas) y linaje III (cepas Asiáticas) (Figura R3.1A).

El MCCT de G14, al igual que el árbol de G3, muestra a las cepas de Argentina en un grupo monofilético con una $pp= 1$ (linaje I, cepas de Sudamérica). Las cepas de Europa nuevamente muestran un origen polifilético formado por dos grupos con una $pp= 1$, linaje IIa, y $pp= 0,94$, linaje IIb. Las cepas de Asia también muestran un origen polifilético, donde las cepas modernas (años 2003-2010) forman un grupo, definido como linaje IIIa, relacionado al linaje IIb de Europa, mientras que las cepas de los años 1981-1997 forman el linaje IIIb, separado de los linajes europeos (Figura R3.1B).

El análisis de I6 muestra el mismo patrón observado en el árbol de G3, con las cepas de Argentina agrupando en un grupo monofilético ($pp= 0,97$), formando el linaje Sudamericano. Las cepas de Europa se agrupan en ramas separadas lo que sugiere un origen polifilético. En este caso no se puede definir un linaje dado que existen pocas secuencias disponibles. El análisis de las cepas de Asia muestra que estas forman un grupo monofilético, aunque las secuencias disponibles son pocas para definir un linaje (Figura R3.1C).

Finalmente, el análisis de I2 muestra la formación de los 3 linajes observados en G3 y G14, las secuencias de Argentina forman un grupo monofilético que conforma el linaje Sudamericano ($pp= 1$), las cepas de Europa también forman un grupo monofilético, constituyendo el linaje Europeo ($pp= 1$) y las secuencias de Asia forman el linaje Asiático, agrupando todas en un grupo monofilético ($pp= 1$) (Figura R3.1D).

La formación de linajes con asociación geográfica puede observarse en todos los genes estudiados en las cepas de Sudamérica (azul), Europa (verde) y Asia (rojo). Teniendo todos los grupos formados elevados valores de pp ($0,91 - 1$) (Figura R3.1). El Coeficiente de Variación (CV) nos indica la variación entre las ramas de un árbol. Así un CV de 0,401 nos indica una variación del 40,1% entre ramas. El CV observado en los genes: $G3=0,401$ (40,1%); $G14=1,15$ (115%); $I2=0,496$ (49,6%) e $I6=0,888$ (88,8%), nos indica que existe mucha variación entre las cepas de un linaje y otro. Estos datos apoyan la hipótesis de existencia de linajes con asociación geográfica (Tabla R3.2).

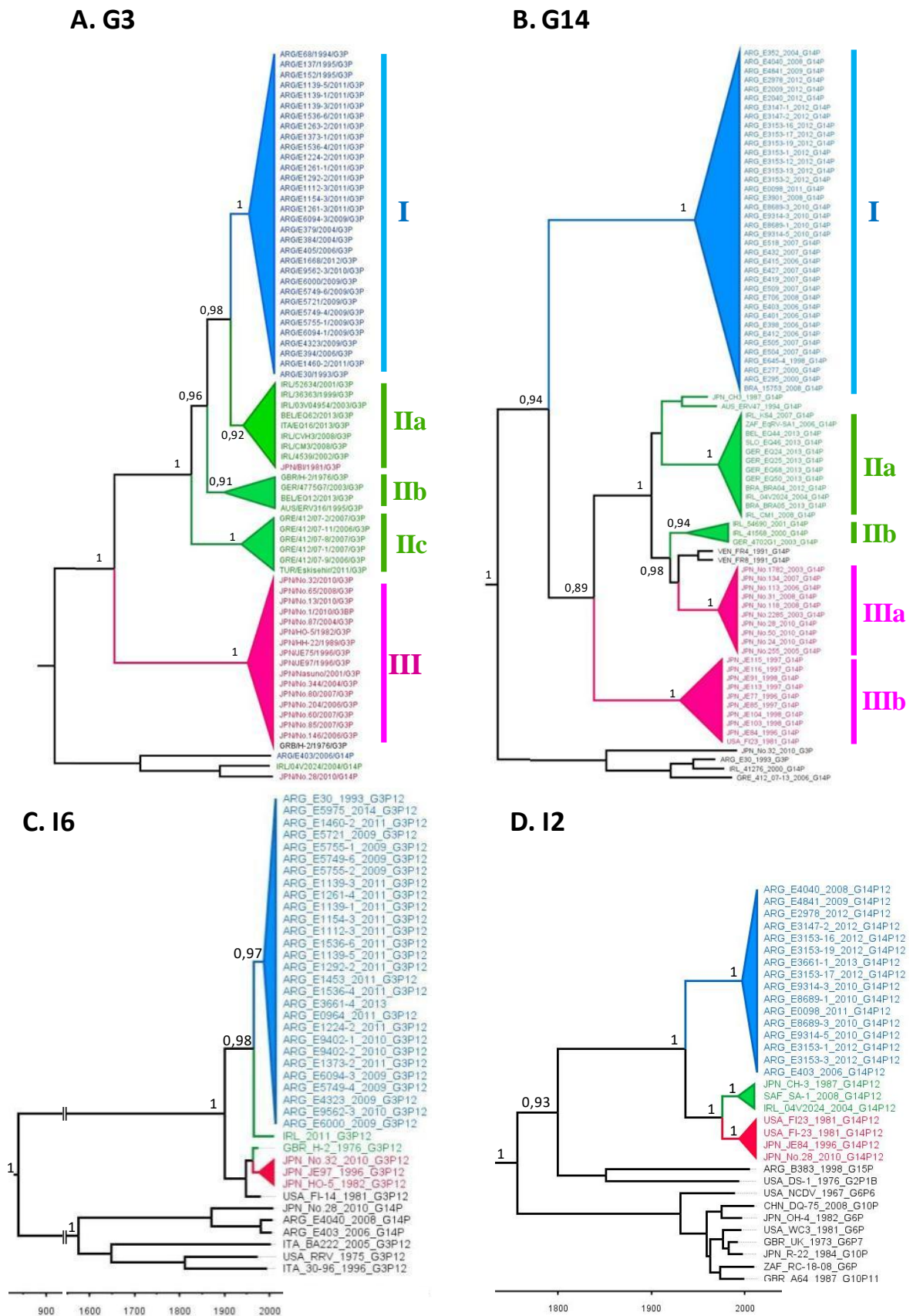


Figura R3. 1 Se muestran los MCCT de los segmentos de VP7 (G3 y G14) y VP6 (I6 e I2) obtenidos en el análisis. Se observa la formación de los linajes Sudamericanos (azul), Europeo (verde) y Asiático

(rojo) en todos los genotipos. En los nodos se muestran los valores de probabilidad posterior correspondiente.

El análisis del gen P[12] muestra la formación 3 grupos con valores de soporte alto ($pp=1$) para las cepas de Argentina, pero que no comparten un TMRCA (Figura R3.2). Los grupos observados, poseen un valor elevado del CV (210,5%) (Tabla R3.2). El árbol de MCCT muestra que las cepas de Argentina, al igual que las cepas de Europa y de Asia, no forman grupos monofiléticos, por tanto no pueden definirse los linajes.

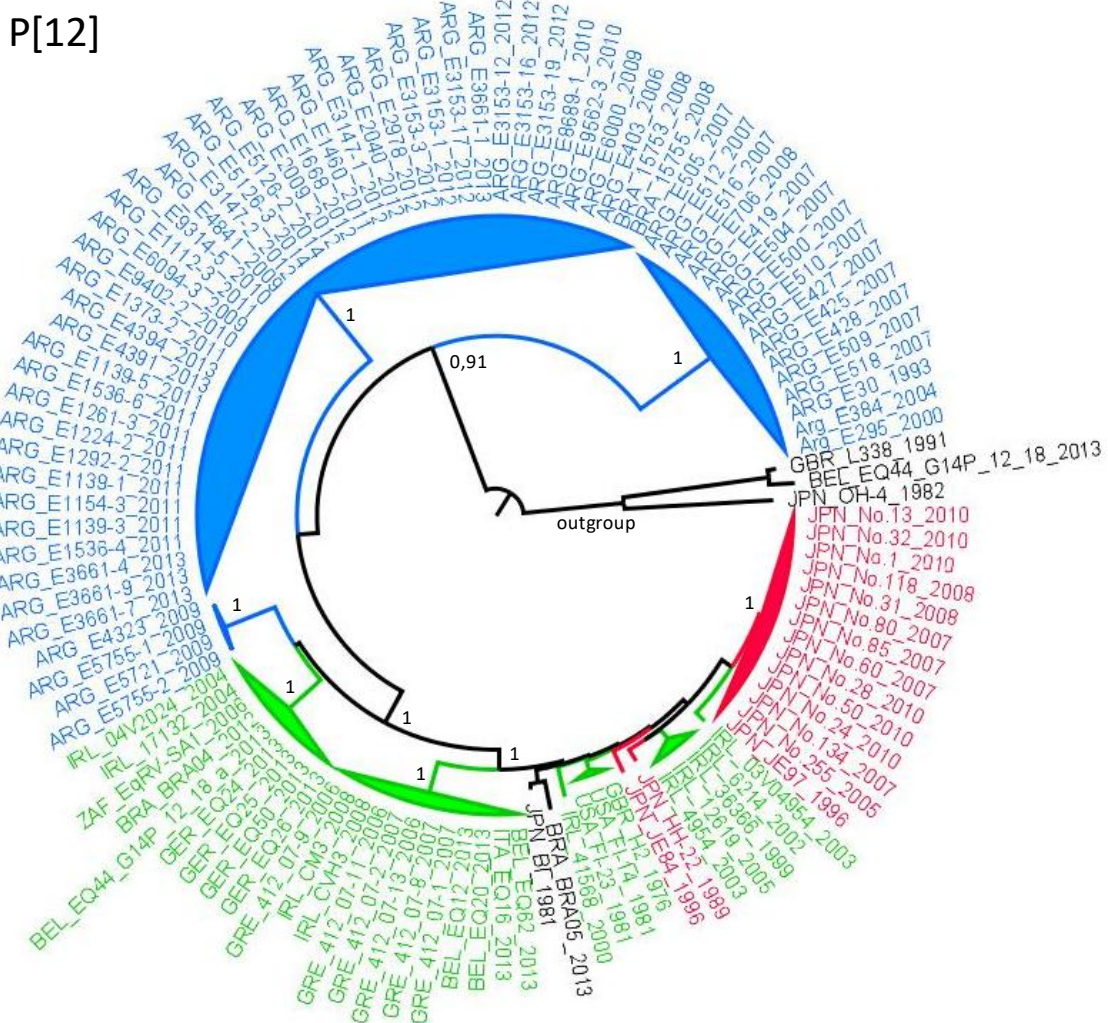


Figura R3.2 MCCT construido a partir del gen de VP8 genotipo P[12]. En azul se muestran las cepas de Argentina, en verde las cepas de Europa y en rojo las cepas de Asia. Los valores en los nodos corresponden a valores de probabilidad posterior (pp).

Evidencias de un pasado probable

El análisis filogenético del gen NSP4 muestra que el genotipo E12 (solamente detectado en Sudamérica) forma un grupo monofilético e independiente (Figura R3.3A). El análisis del MCCT para E12 muestra que todas las cepas tienen el mismo ancestro común, datado en el año 1.638 (Tabla R3.2) y, que la cepa más primitiva es aquella detectada en un guanaco silvestre (Guanaco-wt/ARG/RíoNegro/1998/G8P[1]). Además se observa la formación de 3 grupos (todos con una $pp= 1$). Uno de estos grupos está formado exclusivamente por las cepas equinas (Eq), otro por cepas bovinas (Bo-1), y un tercer grupo (Bo-2) que contiene a cepas bovinas (mayoritariamente), cepas humanas detectadas en Paraguay y Brasil, cepas de cabra detectadas en Argentina y una cepa de guanaco en semi-cautiverio detectadas en Argentina (ARG/Chubut/G8P[14]) (Figura R3.3B). El CV para E12 es del 33,8% (0,338), indicando una variación moderada entre las ramas (Eq, Bo-1 y Bo-2) (Tabla R3.3).

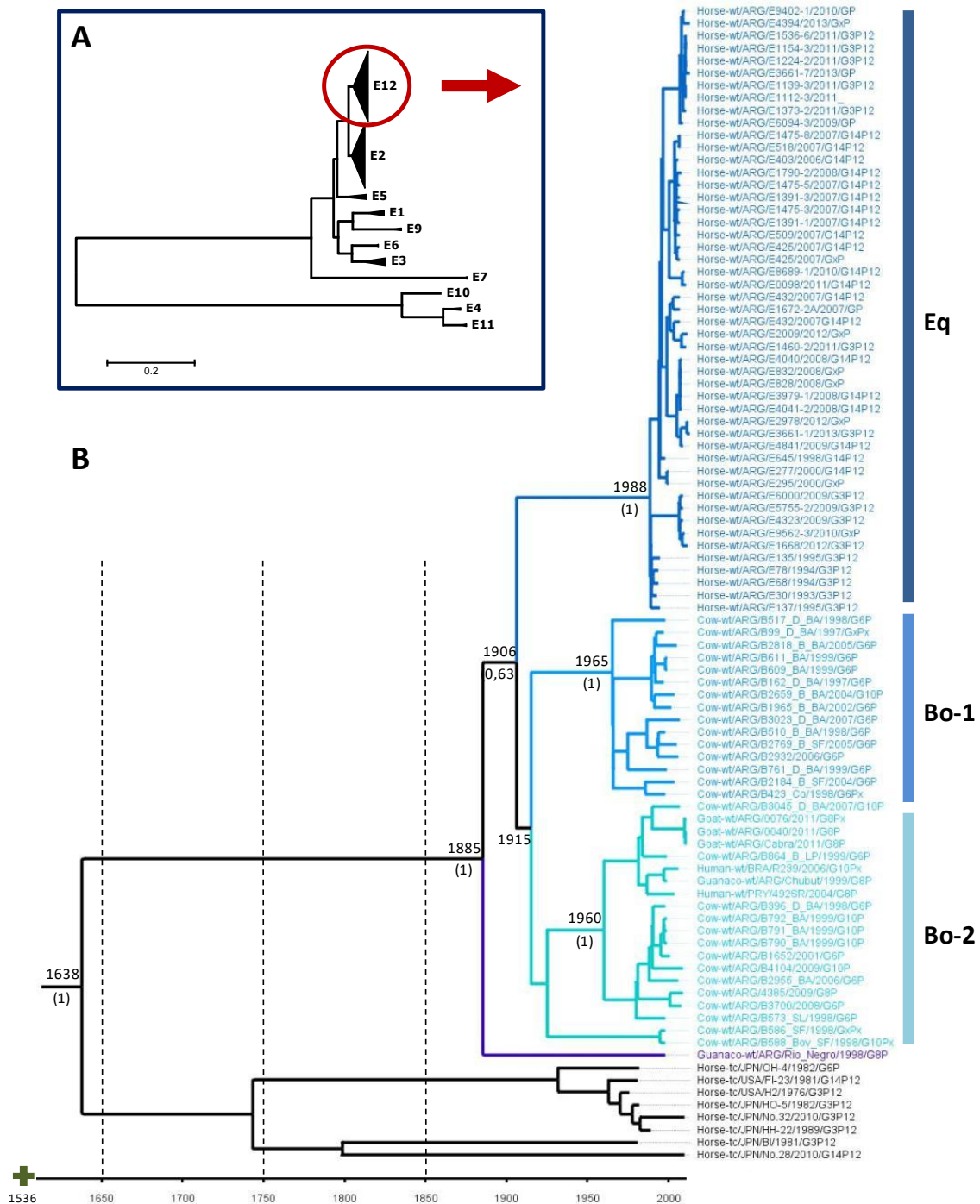


Figura R3.3 (A): Árbol filogenético de distancias construido con cepas de todos los genotipos de NSP4 reportados. El árbol fue construido utilizando el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013) con el modelo evolutivo TN93. (B): MCCT de las cepas E12, en azul oscuro (Eq) se observan las cepas equinas, en azul claro las cepas bovinas (Bo-1) y en celeste las cepas bovinas, caprinas, humanas y de guanaco en semi-cautiverio (Bo-2). En los nodos se grafica la edad del ancestro y la pp de cada nodo entre paréntesis. La barra inferior representa la edad expresada en años, marcada con una cruz verde se observa la fecha de la 1° fundación de Buenos Aires en 1536.

Filodinámica de las poblaciones de RVA equinos de Argentina

El análisis filodinámico de las matrices analizadas muestra que las poblaciones de G3, G14, I6, I2, P[12] y NSP4 presentan una estructura poblacional dada por la asociación geográfica entre las cepas (linajes geográficos). Además, la topología de los árboles nos muestra que la población posee un comportamiento demográfico constante a través del tiempo. Asimismo, la filogenia balanceada (topología no escalonada) observada en todos los genes estudiados, ocurre cuando los virus no están sujetos a fuerte presión inmune u otro factor de selección direccional (Figura R3.4).

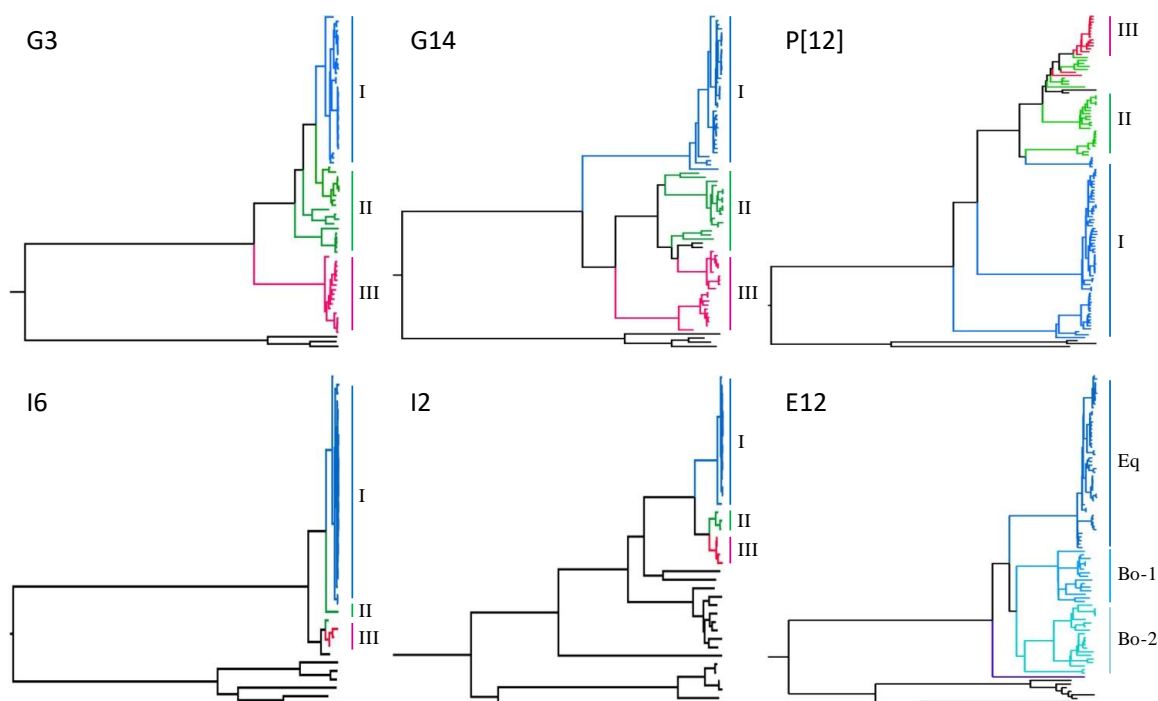


Figura R3.4 MCCT de los genes estudiados donde se indica la estructura geográfica. En azul se observan las cepas sudamericanas, en verde las cepas europeas y en rojo las cepas asiáticas. Los números romanos indican los linajes propuestos de acuerdo a su origen geográfico. Para el gen de NSP4 (E12) se muestra la estructura dada por especies (Eq= equinos, Bo= bovinos). A su vez, las poblaciones bovinas muestran 2 sub-poblaciones para este gen (Bo-1: exclusivamente cepas bovinas, y Bo-2: cepas bovinas, caprinas, humanas y de guanacos en semi-cautiverio).

Por otro lado, la diversidad genética, medida en tamaño efectivo de la población a través del tiempo, fue estimada con el método de *Bayesian Skyline* descrito en materiales y métodos. Esto se expresa en un gráfico que indica cuál es el

comportamiento de la población estudiada. En las cepas estudiadas, todos los genes G3, G14, I2, I6, P[12] y NSP4, mostraron una diversidad constante a través del tiempo (Figura R3.5).

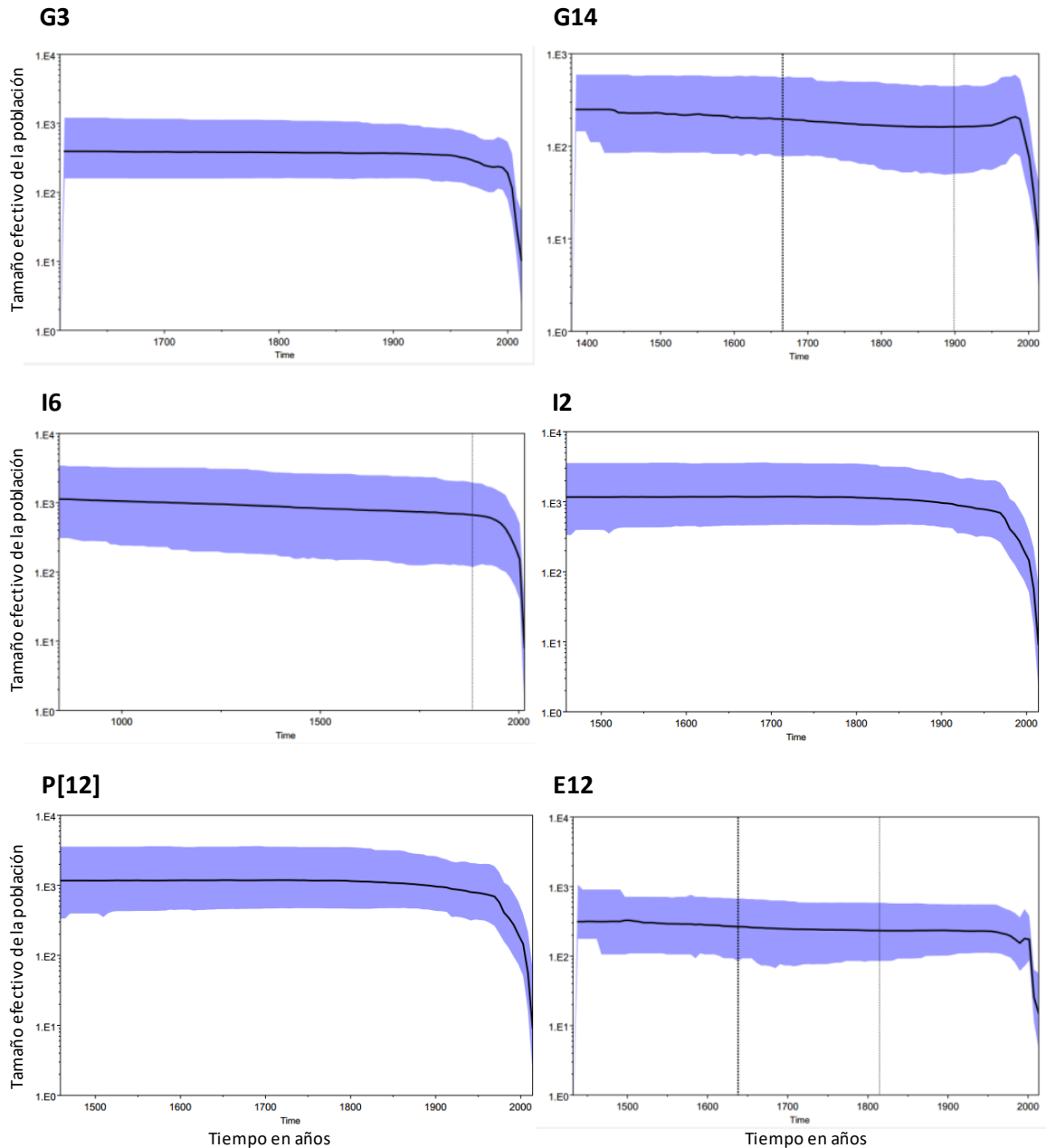


Figura R3.5 Gráficos de Skyline donde se observa que la población tiene un comportamiento constante a lo largo del tiempo. La línea negra indica la media estimada y la sombra azul representa el intervalo de confianza del 95%. Los gráficos fueron calculados utilizando los valores que se muestran en la Tabla R3.1.

Discusión

El análisis bayesiano basado en un algoritmo de simulación estocástico como el de las Cadenas de Markov–Monte Carlo (MCMC), permite obtener aproximaciones basadas en muestras tomadas de nuestra matriz de datos (alineamiento), donde varios parámetros pueden ser calculados a partir de las probabilidades posteriores obtenidas (Tabla R3.1). Además, el hecho de conocer la fecha de las muestras, nos permite estimar el TMRCA (Tabla R3.2), la tasa de mutación (Tabla R3.3), y la filodinámica de las cepas de RVA en estudio (Figura R3.5). Adicionalmente, las topologías de los MCMC generados nos permiten conocer si la población fue o no sometida a presiones inmunológicas (Figura R3.4) (Norström *et al.*, 2012; Volz *et al.*, 2013).

El TMRCA es uno de los resultados esperados cuando se realizan los análisis de filogenia bayesiana (Drummond *et al.*, 2012). Sin embargo, para las matrices de VP6 y VP7 el TMRCA obtenido en nuestro trabajo (Tabla R3.2), no parece tener un sentido biológico, lo cual podría ser debido a la falta de información sobre cepas más antiguas. Por otro lado, los genotipos P[12] de las cepas de Argentina no muestran un TMRCA en común, lo cual podría ser debido a que el dominio analizado corresponde al dominio VP8* del gen el cual es altamente variable (Figura R3.2).

La tasa de evolución ha sido calculada para otros genotipos de RVA humanos, G9, G12, P[8] OP354-like, NSP2 (N1) y todo el genoma de cepas G1P[8] de Australia y Bélgica y, nuestros resultados (Tabla R3.2) se encuentran dentro del rango esperado para RVA (Donker and Kirkwood, 2012; Matthijnsens *et al.*, 2010; Zeller *et al.*, 2015a, 2015b). Los valores elevados obtenidos para la tasa de mutación se encuentran dentro de los rangos esperados para las proteínas de la cápside externa (VP7 y VP4), dado que son las proteínas sometidas a presión inmunológica y por ende las más variables (Matthijnsens *et al.*, 2010). Sin embargo, VP6 y NSP4 (E12) también mostraron la misma tasa de evolución, lo que nos indica que estas proteínas podrían estar sometidas a presiones inmunológicas similares a la proteínas externas (Zeller *et al.*, 2015a). Esto debido a la presencia de partículas DLP en materia fecal (para el caso de VP6) y a que la proteína NSP4 es una proteína secretada al lumen intestinal.

La construcción del MCCT para cada gen, genera un árbol donde cada grupo representado tiene una determinada probabilidad de existir en la naturaleza (Norström *et al.*, 2012). En nuestros resultados, se puede observar que las secuencias de Argentina agrupan juntas con una probabilidad alta ($pp= 1$) en todos los genes (G3, G14, I2 e I6) excepto en el gen P[12]. Basados en estos resultados, es posible definir linajes en las cepas de RVA equino, dado que las mismas muestran una perfecta correlación geográfica (Figura R3.1). Así, las cepas de Argentina conforman el linaje I Sudamericano, las cepas Europeas el linaje II y las cepas Asiáticas el linaje III (Figura R3.1). Desde el punto de vista evolutivo, la formación de linajes evidencia que la acumulación de mutaciones puntuales otorga identidad a las poblaciones de cepas de RVA circulantes en equinos en diferentes regiones geográficas (Dennis *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos del análisis del gen E12 (proteína NSP4) podrían explicar porque este genotipo ha sido encontrado solo en RVA circulante en Sudamérica. En primer lugar, el MCCT muestra que los grupos de cepas de RVA equinas (Eq) y bovinas (Bo-1 y Bo-2) se relacionan ancestralmente con la cepa de RVA de guanacos silvestres Guanaco-wt/ARG/RíoNegro/1998 (Figura R3.3). En segundo lugar, el momento estimado para el TMRCA fue el año 1.636 (Tabla R3.2; Figura R3.3). Este valor se relaciona directamente con la llegada de los españoles a Sudamérica (Bernand, 2005; Cabrera, 1945). Por lo tanto, nuestros resultados permiten formular la hipótesis de que los caballos y vacas traídos durante la 1° fundación del Puerto de Nuestra Señora Santa María del Buen Ayre (actualmente ciudad de Buenos Aires), en 1536 por el primer adelantado Don Pedro de Mendoza, y que fueron liberados en la pampa húmeda en el momento del abandono de la ciudad en 1.541 (Bernand, 2005), se reprodujeron libremente, infectándose con cepas de RVA circulantes en especies autóctonas. No hay una certeza sobre la cantidad de caballos dejados en Buenos Aires (entre 7 y 40 animales), pero se conoce que en la segunda campaña de fundación de Buenos Aires, en el año 1.580, realizada por Juan de Garay, se encontraron con un gran número de caballos y vacas salvajes, recursos que utilizaron para pagar a los mercenarios de la expedición (Bernand, 2005; Cabrera, 1945). Además de los animales introducidos durante la fundación Buenos Aires, también ingresaron equinos a través del envío de misiones por Chile y por la ruta del altiplano (Cabrera, 1945). Así, los caballos abandonados por Pedro de Mendoza, los arrebatados por los pueblos originarios en los malones contra la Capitanía de Chile así como también a los

españoles en la ruta del altiplano, rápidamente se reprodujeron y poblaron lo que hoy es la Argentina. Estos caballos, en contacto con los animales autóctonos (principalmente los guanacos que poblaban toda la llanura patagónica y pampeana) (de Lamo, 2011), posiblemente se infectaron con un RVA autóctono y generaron un mosaico donde el gen E12 se fijó en la constelación genética de los RVA introducidos a Sudamérica (Figura R3.6). Este gen no solo se ha fijado en las cepas de RVA equinas, sino también en las cepas de RVA bovinas (Badaracco *et al.*, 2014), caprinas, ovinas (Louge *et al.*, 2014) y hasta ha sido detectado en algunas cepas humanas descritas en Paraguay (Martinez *et al.*, 2014), datos que soportan nuestra hipótesis.

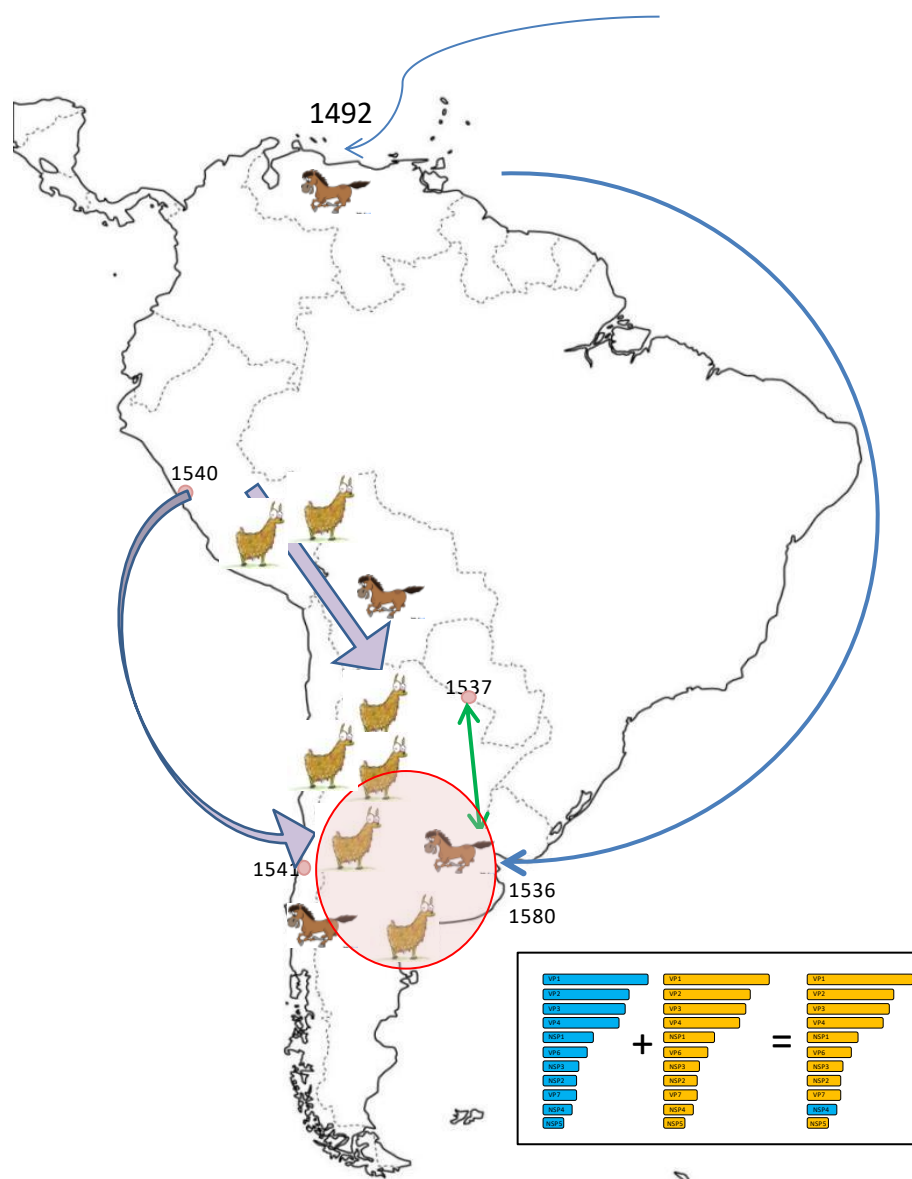


Figura R3.6 Hipótesis propuesta sobre la generación del genotipo E12. El gráfico muestra las rutas de conquista realizadas por los españoles desde su llegada al continente en 1492, mostrando las

fundaciones de Buenos Aires (1536 y 1580), la fundación de la Capitanía de Chila (1541) y la fundación de Lima (1540). El círculo rojo indica la zona donde probablemente se produjeron las infecciones mixtas entre cepas de RVA autóctonos y los RVA presentes en los animales introducidos. El recuadro muestra el mecanismo por medio del cual se podría haber generado la infección mixta entre cepas autóctonas (genoma azul) y cepas presentes en los caballos (genoma naranja), y el resultado obtenido de dicha infección, fijación del segmento de NSP4 genotipo E12.

Por otro lado, analizamos la estructura de las poblaciones de los genes estudiados en un contexto de dinámica poblacional. El análisis de las topologías de los MCCT obtenidos indica que los RVA equinos son patógenos sometidos a una presión inmunológica débil o ausente, siendo este un comportamiento probable dado a que es un patógeno que infecta potrillos jóvenes (1 día – 6 meses de vida) (Estes and Greenberg, 2013; Magdesian et al., 2014). Además, el hecho de que RVA sea un virus capaz de permanecer en el ambiente por períodos largos de tiempo, de una temporada de nacimientos a la siguiente, permite que sean las mismas poblaciones virales las que infectan los potrillos nacidos año tras año, estando las cepas cercanamente relacionadas entre sí; esto se pone de manifiesto en una topología típica de una población viral constante, con una estructura espacial fuerte apoyando la hipótesis de la existencia de linajes de RVA equinos (Figura R3.3-4) (Grenfell *et al.*, 2004; Volz *et al.*, 2013).

Finalmente, estudiamos la dinámica poblacional en base a la diversidad genética relativa, ésta nos muestra que en concordancia con las topologías observadas, la diversidad genética es constante a través del tiempo. Este comportamiento fue estudiado para otros genotipos de RVA humanos observándose un patrón similar (Zeller *et al.*, 2015a) y en otros virus segmentados, como ser el virus de Influenza equina (Murcia *et al.*, 2011).

En conjunto, nuestros resultados nos permiten conocer el comportamiento evolutivo y la dinámica poblacional de los RVA equinos tanto detectados en Argentina como en otros lugares del mundo. El análisis del genotipo E12 pone en evidencia la transmisión inter-especie entre una cepa de RVA autóctona (circulante en guanacos) y las especies de animales domésticas introducidas desde Europa a Sudamérica durante la conquista.

Capítulo 4

Ligamiento genético de los segmentos que codifican las proteínas VP6 y VP7 en Rotavirus equino.

Ligamiento genético de los segmentos que codifican las proteínas VP6:VP7 en Rotavirus equino

Introducción

Aunque en equinos ocasionalmente se han detectados RVA con combinaciones inusuales, como ser G3P[3], G5P[7], G6P[1], G8P[1], G10P[1], G10P[11] y G13P[18] (Browning et al., 1991; Ciarlet et al., 2001; Isa et al., 1996; Miño et al., 2013; Taniguchi et al., 1994), G3P[12] y G14P[12] son los genotipos más prevalentes asociados a diarrea en potrillos en todo el mundo (K Gary Magdesian et al., 2014; Papp et al., 2013a). Las cepas de RVA que poseen el genotipo G3 han sido detectadas en varias especies animales (Estes and Greenberg, 2013; Martella et al., 2010). En contraste, cepas G3 (equinas), G14 y P[12] nunca han sido detectadas como capaces de generar brotes de diarrea en otras especies animales diferente a los equinos (Bailey et al., 2013; Garaicoechea et al., 2011; Matthijnsens et al., 2015; Weinberg et al., 2013). Por otro lado, los genomas de RVA equinos G3P[12] y G14P[12] estudiados hasta el momento, son altamente conservados, solo 3 de los 11 segmentos (genes) presentan dos genotipos diferentes, I2 e I6 en VP6, G3 y G14 en VP7 y E2 y E12 en NSP4) (Ma et al., 2015; Matthijnsens et al., 2012; Nemoto et al., 2015).

Teóricamente, cada uno de los 11 segmentos de RVA puede segregarse de forma independiente durante una infección mixta, sin embargo, se ha encontrado un ligamiento genético para los genes de VP6, VP7, VP4 y NSP4 en algunas cepas de RVA (Martella et al., 2010; Mcdonald et al., 2009; Song and Hao, 2009). De acuerdo a las evidencias obtenidas hasta el presente, las interacciones entre las proteínas virales estructurales y no estructurales podrían dirigir la selección de cepas con mejor capacidad de replicación y diseminación en una especie determinada (M Iturriza-Gómara et al., 2003; Santos et al., 2003). Los RVA equinos poseen pocas variantes de las proteínas estructurales, siendo por esto candidatos apropiados para su estudio que permita comprender como se seleccionan las combinaciones de variantes de genes de RVA exitosas para infectar una especie animal determinada.

Los análisis estructurales de VP6 (la proteína más abundante del virión) demostraron que esta se pliega formando 2 dominios, el dominio B (aminoácidos desde 1 al 150 y del 335 al 397), el cual corresponde a la base de la molécula y el dominio H (aminoácidos desde el 151 al 334) que constituye la parte superior de la molécula (Mathieu et al., 2001). El dominio B de VP6 interactúa con la capa interna (VP2) (aminoácidos 31-39 y 64-76) (Charpilienne et al., 2002; McClain et al., 2010), mientras que el dominio H lo hace con la capa externa (VP7 y VP4). Para VP6 se propusieron 5 regiones posibles de interacción con VP7, denominadas regiones A (170-175), B (240-245), C (294-300), D (304-308) y E (310-315) (Li et al., 2009; Mathieu et al., 2001). Los monómeros de VP6 forman homotrímeros, los dominios B y H participan en los contactos entre monómeros que estabilizan el trímero y le dan su forma de “pera”. Seis trímeros de VP6 se agrupan alrededor de un trímero de VP4. De la misma manera, la proteína VP7 forman un homotrímero en forma de plato donde, cada trímero de VP7 interacciona directamente con un trímero de VP6 formando una estructura única, heterohexámero. Además esta estructura trimérica (heterohexámero VP6:VP7) forma canales acuosos en los virus completos que participan en el transporte del ARN mensajero durante el proceso transcripcional (Figura R4.1) (Charpilienne *et al.*, 2002; Li et al., 2009; Mathieu *et al.*, 2001).

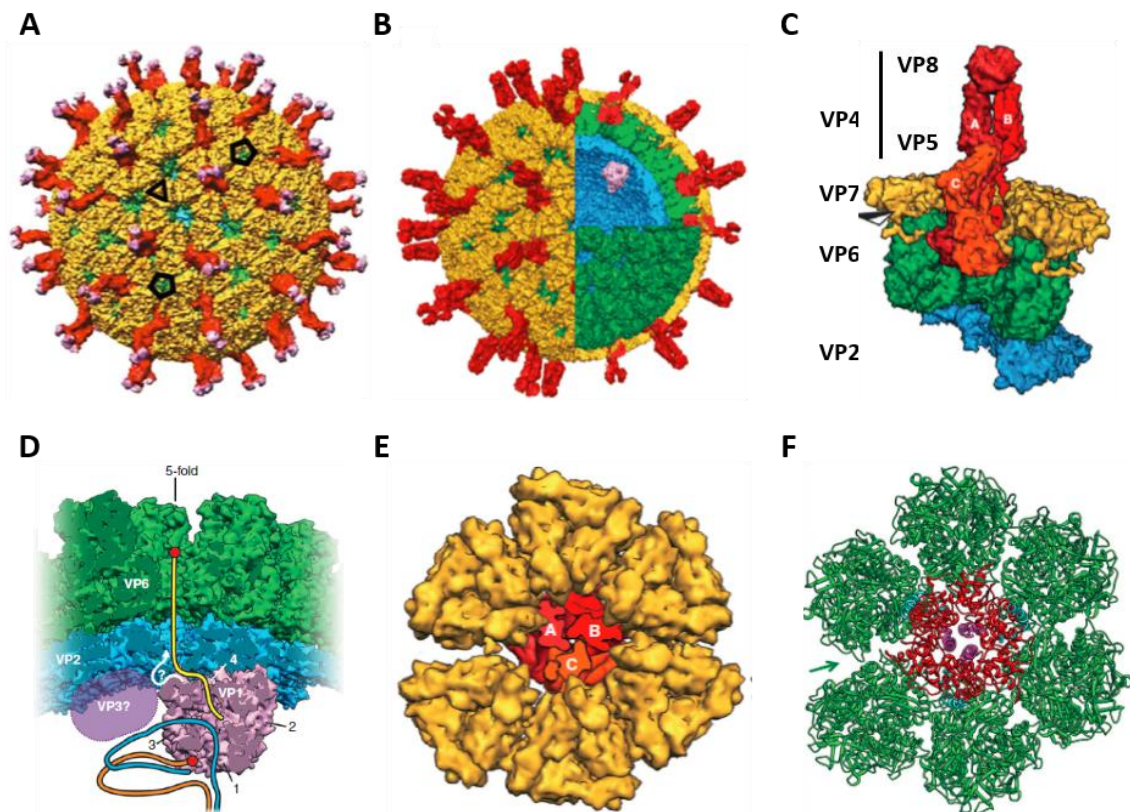


Figura R4. 1 A: Partícula de Rotavirus completa. Se muestran los canales que se forman (Tipo I y II). B: Esquema del virión donde se muestran las capas que lo componen, capa externa (VP7 [Amarillo] y VP4 [rojo]), capa intermedia (VP6 [verde]) y capa interna (VP2 [celeste]). C: Vista ampliada de las proteínas que componen las capas externa, intermedia e interna. D: Esquema donde se muestra como el ARN mensajero sale del virión para ser transcripto. E: Vista superior de un bloque de la capa externa donde se observan las proteínas VP4 en el centro y los 6 trímeros de VP7 a su alrededor. F: Vista superior de la capa intermedia donde se observan las proteínas VP4 en el centro y los seis trímeros de VP6 a su alrededor. En el centro del hexámero se observa el canal por donde se transporta el ARN mensajero (figuras tomadas de Mathieu et al., 2001 y Aoki et al., 2009).

Durante el ensamblado de la partícula viral, los monómeros de VP7, proteína glicosilada que forma la cápside externa del virus, forman una matriz de trímeros que estabiliza a la proteína VP4 en su lugar formando las espículas del virión (Li et al., 2009; Trask and Dormitzer, 2006). Así, las proteínas VP4 ancladas protruyen hacia la superficie a través de la capa de VP7, para interactuar con los receptores de las células del huésped durante la adsorción del virus a la célula (Estes and Greenberg, 2013; Liu et al., 2012). Para adquirir infectividad, las proteínas VP4 deben ser clivadas previamente por enzimas proteolíticas en dos dominios, VP5* y VP8*, siendo el

dominio VP8* el involucrado en el reconocimiento del receptor celular (Figura R4.1) (Aoki et al., 2009; Li et al., 2009).

Se han descrito interacciones fuertes entre las proteínas VP6, VP7 y VP4 que otorgan capacidad adaptativa al virión (Li et al., 2009; Mathieu et al., 2001). El ensamble de la capa externa del virión es un proceso muy delicado y debe ser exacto, la VP4 se agrega a la partícula de doble capa formada por VP2 (núcleo) y VP6 (capa intermedia) y luego, VP7 se ubica estabilizando a VP4 en su posición y completando así la partícula de triple cápside (TLP) (Trask et al., 2012). Los sitios probables de interacción para VP6 y VP7 y para VP7 y VP4 han sido propuestos para RVA humanos (Charpilienne et al., 2002; Li et al., 2009; Mathieu et al., 2001).

En este trabajo de tesis se profundizó el estudio de dicha interacción entre las dos combinaciones de VP7 (G3 y G14) y VP6 (I2 e I6), utilizando análisis genómicos y estructurales.

Materiales y Métodos

Muestras y secuencias de nucleótidos de los genes de VP6, VP7 y VP8

Un total de 30 muestras de materia fecal previamente clasificadas como positivas a RVA de potrillos con diarrea (1 día a 6 meses de edad) recibidas durante el período 2009-2011 en el servicio de diagnóstico del laboratorio de Virus Equinos del Instituto de Virología, fueron utilizadas en este estudio. De cada muestra se realizó la extracción de ARN y la RT-PCR para amplificar y luego secuenciar los genes de VP6, VP7 y VP8* siguiendo los protocolos de ensayo descritos previamente (Miño et al., 2015). Además, se utilizaron secuencias de nucleótidos de estos genes de cepas de RVA equino de Argentina previamente estudiadas (E30/1993, E403/2006 y E4040/2008) (Garaicoechea *et al.*, 2011; Matthijssens *et al.*, 2012b) (Tabla R4.1).

Análisis filogenéticos

Las matrices de datos fueron construidas con 43 secuencias de los 3 genes de RVA equinos analizados (VP6, VP7 y VP8*) (Tabla R4.1). Los alineamientos se construyeron con el programa CLUSTAL X2 (Larkin et al., 2007), se editaron con el programa Bioedit (Hall, 1999), y los análisis filogenéticos se realizaron utilizando el programa MEGA6 (Tamura et al., 2011). Las distancias genéticas fueron calculadas utilizando el modelo evolutivo TN93 + G (distribución gama) a nivel de nucleótidos y, los árboles filogenéticos se construyeron con el método de Máxima Verosimilitud y 1.000 réplicas de re-muestreo como método estadístico.

Tabla R4.1. Secuencias de RVA equino utilizadas en el análisis estructural.

	Cepa	año	VP6 (I-tipo) N de acc.	VP7 (G-tipo) N de acc.		
1	ARG/E30	1993	I6	JF712570	G3	JF712571
2	ARG/E403	2006	I2	JF712581	G14	JF712582
3	ARG/E4040	2008	I2	JN872869	G14	JN872870
4	ARG/E4323	2009	I6	KJ628058	G3	KP116019 ^a
5	ARG/E4841	2009	I2	KJ628059	G14	KP116020 ^a
6	ARG/5721	2009	I6	KJ628060	G3	KP116021 ^a
7	ARG/E5749-4	2009	I6	KJ628061	G3	KP116022 ^a
8	ARG/E5749-6	2009	I6	KJ628062	G3	KP116023 ^a
9	ARG/E5755-1	2009	I6	KJ628063	G3	KP116024 ^a
10	ARG/E5755-2	2009	I6	KJ628064	G3	KP116025 ^a
11	ARG/E6000	2009	I6	KJ628065	G3	KP116026 ^a
12	ARG/E6094-3	2009	I6	KJ628066	G3	KP116028 ^a
13	ARG/E8689-1	2010	I2	KJ628067	G14	KP116029 ^a
14	ARG/E8689-3	2010	I2	KJ628068	G14	KP116030 ^a
15	ARG/E9314-3	2010	I2	KJ628069	G14	KP116031 ^a
16	ARG/E9314-5	2010	I2	KJ628070	G14	KP116032 ^a
17	ARG/9402-1	2010	I6	KJ628071	G3	KP116033 ^a
18	ARG/9402-2	2010	I6	KJ628072	G3	+
19	ARG/E9562-3	2010	I6	KJ628073	G3	KP116034 ^a
20	ARG/E0098	2011	I2	KJ628074	G14	KP116035 ^a
22	ARG/E1112-3	2011	I6	KJ628076	G3	KP116036 ^a
23	ARG/E1139-1	2011	I6	KJ628077	G3	KP116037 ^a
24	ARG/E1139-3	2011	I6	KJ628078	G3	KP116038 ^a
25	ARG/E1139-5	2011	I6	KJ628079	G3	KP116039 ^a
26	ARG/E1154-3	2011	I6	KJ628080	G3	KP116040 ^a
27	ARG/E1224-2	2011	I6	KJ628081	G3	KP116041 ^a
28	ARG/E1261-4	2011	I6	KJ628082	G3	KP116043 ^a
29	ARG/E1263-2	2011	I6	+	G3	KP116044 ^a
30	ARG/E1292-2	2011	I6	KJ628083	G3	KP116045 ^a
31	ARG/E1373-2	2011	I6	KJ628084	G3	KP116046 ^a
33	ARG/E1460-2	2011	I6	KJ628086	G3	KP116047 ^a
34	ARG/E1536-4	2011	I6	KJ628087	G3	KP116048 ^a
35	ARG/E1536-6	2011	I6	KJ628088	G3	KP116049 ^a
36	GBR/H-2	1976	I6	KM454496	G3	KM454497
37	USA/FI-14	1981	I6	KM454485	G3	KM454486
38	USA/FI23	1981	I2	KM454507	G14	KM454508
39	JPN/HO-5	1982	I6	D82973	G3	AB046464
40	JPN/BI ^b	1981	I2	KC815684	G3	KC815685
41	JPN/CH-3	1987	I2	KC815697	G14	D25229
42	JPN/HH-22	1989	I6	KC815673	G3	KC815674
43	IRL/03V04954	2003	I6	JN903520	G3	JN903518
44	IRL/04V2024	2004	I2	JN903519	G14	JN903517
45	ZAF/EqRV-SA1	2008	I2	JQ345494	G14	JQ345496

Todas las cepas analizadas presentan el genotipo de VP8* P[12] (Números de acceso KR873107-30). +: Muestras positivas pero que la secuencia no pudo ser determinada. ^a: Secuencias publicadas en este trabajo. ^b: RVA/Horse-tc/JPN/BI/1983/G3P[12]-I2.

Modelado molecular y análisis estructural

El modelado molecular de las proteínas VP6 y VP7 (I2, I6, G3 y G14) se realizó con el servidor I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Roy et al., 2010), sin la modificación de ningún templado. Para construir los modelos se utilizaron las secuencias de las cepas E30/1993/G3P[12] y E4040/2008/G14P[12] de RVA de Argentina. La evaluación del modelo se realizó en base al índice C, siendo este un indicador de confianza que posee valores que varían entre -5 y 2. Los valores altos se corresponden con una confianza elevada. El índice C en nuestros modelos fue de 2.00 para ambas variantes de VP6 (I2 e I6) y de 0,57 para ambas variantes de VP7 (G3 y G14). Los modelos se construyeron utilizando como templado estructuras previamente cristalizadas de las proteínas VP7 y VP6 de cepas de RVA bovino (UK) y RVA de mono Rhesus (RRV), las cuales presentan una elevada similaridad con las cepas de RVA equinas (Tabla R4.2). Los trímeros de VP6 y VP7 fueron construidos utilizando el modelo atómico de la cepa RRV (G3P3, PDB: 4V7Q) con el programa UCSF-Chimera (Pettersen et al., 2004). Los potenciales electrostáticos de superficie fueron calculados con las opciones pre determinadas utilizando el método de *Coulumbic Surface Coloring* y, las cargas eléctricas de cada átomo fueron asignadas en base al método *Amber ff14SB* implementado en UCSF-Chimera.

Tabla R4.2. Valores de soporte del modelado molecular

Cepa modelada (Genotipo)	Molécula	C-score	Exp. TM-Score	Exp. RMSD	Templado experimentalmente resuelto (Genotipo, PDB)	Similitud en AA respecto al templado
E4040 (I2)	VP6	2.00	0.99+-0.03	2.1+-1.7	Cepa UK (I2, 3KZ4)	97%
E30 (I6)	VP6	2.00	0.99+-0.03	2.2+-1.7	Cepa UK (I2, 3KZ4)	92%
E4040 (G14)	VP7	0.57	0.79+-0.09	4.8+-3.1	Cepa RRV (G3, 3GZT)	90%
E30 (G3)	VP7	0.57	0.79+-0.09	4.8+-3.1	Cepa RRV (G3, 3GZT)	97%

TM-Score: Es una forma de medir la similitud estructural entre 2 modelos, varía entre 0-1.

Exp RMSD: El "root-mean-square deviation" es la forma tradicional de medir la similitud de 2 modelos.

PDB: código de la estructura proteica en la base de datos de proteínas.

AA: aminoácidos

Resultados

Caracterización de las cepas de RVA equino de Argentina

Inicialmente se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de los genes de VP6, VP7 y VP8* de las 30 cepas bajo estudio. Además, se utilizaron secuencias de otras 13 cepas de RVA equino disponibles en el GenBank (Tabla R4.1). El análisis filogenético de VP7 mostró que todas las cepas Argentinas G14P[12] agruparon juntas en una única rama, mostrando un origen geográfico común (Fig. R4.2).

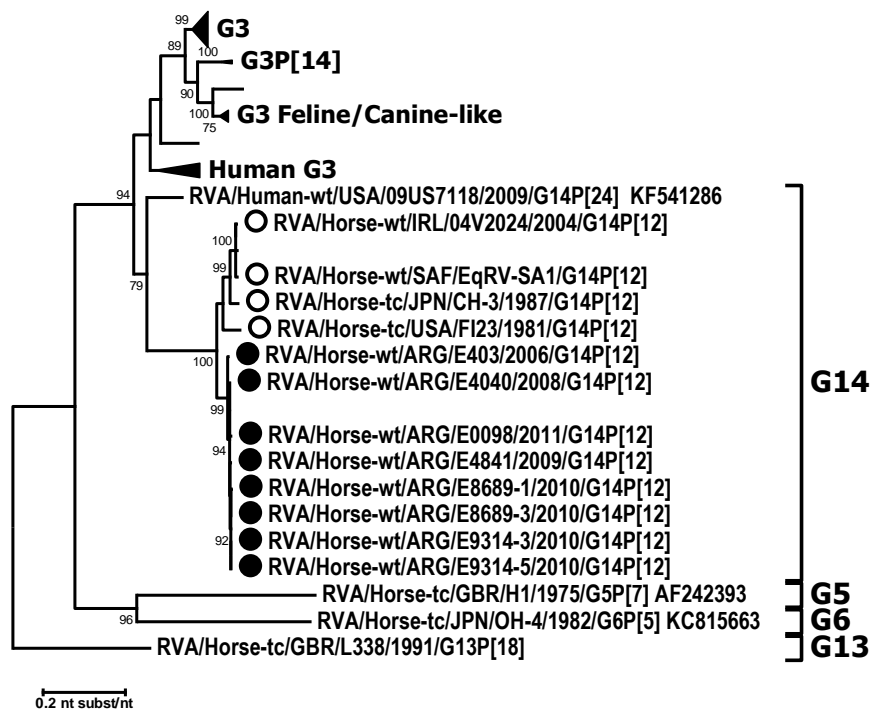


Figura R4. 2 Árbol filogenético construido con la secuencia nucleotídica del gen de VP7 de RVA equino. Las secuencias de Argentina se muestran marcadas con un círculo sólido, mientras que las demás cepas de RVA equino con un círculo vacío. Las cepas genotipo G3 se muestran comprimidas para un mejor análisis del genotipo G14.

Del mismo modo, todas las cepas Argentinas G3P[12] agruparon junto a las demás cepas G3P[12] de Argentina publicadas previamente, formando también una única rama (Fig. R4.3).

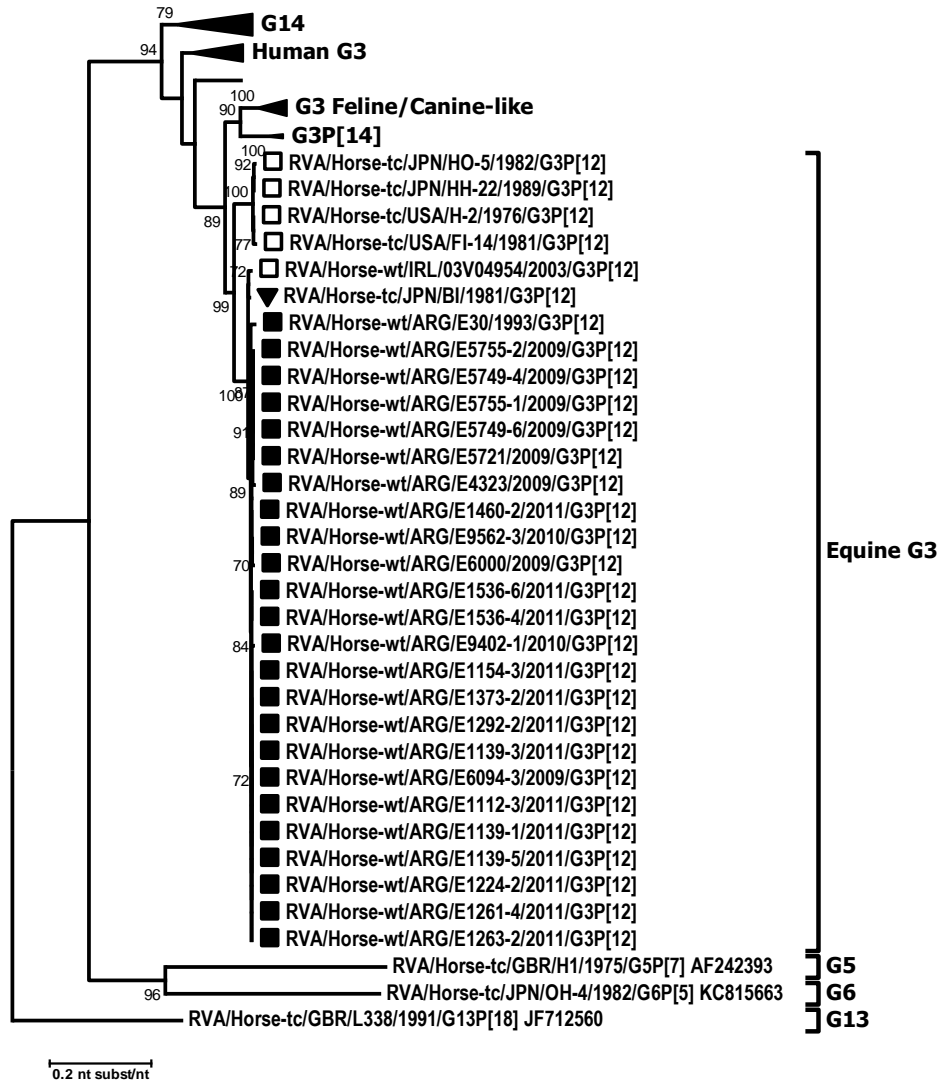


Figura R4. 3 Árbol filogenético construido con la secuencia nucleotídica del gen de VP7 de RVA equino. Las secuencias de Argentina se muestran marcadas con un cuadrado sólido, mientras que las demás cepas de RVA equino con un cuadrado vacío. Las cepas genotipo G14 se muestran comprimidas para un mejor análisis del genotipo G3.

El análisis filogenético de VP6 mostro que todas las cepas I2 se agrupan juntas, formando una única rama separada de las cepas I2 del resto del mundo (Fig. R4.4).



Figura R4. 4 Árbol filogenético construido con la secuencia nucleotídica del gen de VP6 de RVA equino. Las secuencias de Argentina se muestran marcadas con un círculo sólido, mientras que las demás cepas de RVA equino con un círculo vacío. Las cepas genotipo I6 se muestran comprimidas para un mejor análisis del genotipo I2.

Del mismo modo, todas las cepas I6 de Argentina agrupan junto a las demás secuencias I6 de Argentina y separadas del resto de las secuencias I6 publicadas y disponibles en el GenBank (Fig. R4.5).

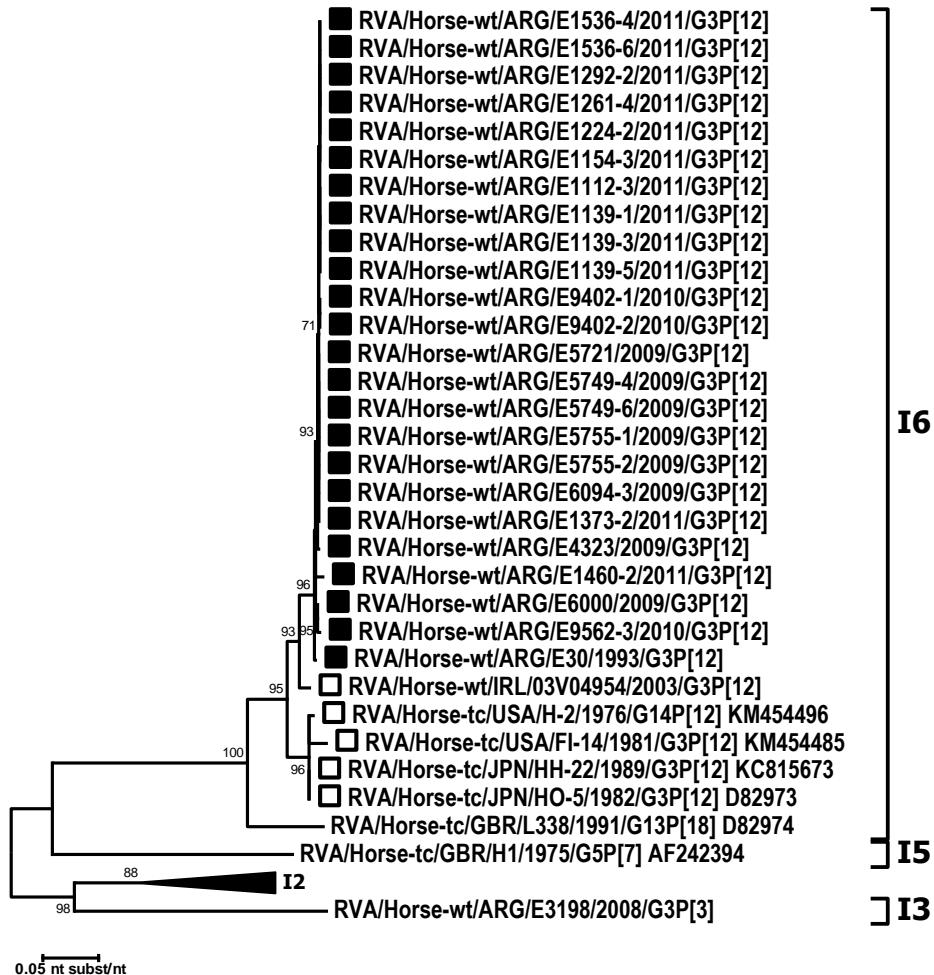


Figura R4. 5 Árbol filogenético construido con la secuencia nucleotídica del gen de VP6 de RVA equino. Las secuencias de Argentina se muestran marcadas con un cuadrado sólido, mientras que las demás cepas de RVA equino se muestran con un cuadrado vacío. Las cepas genotipo I2 se muestran comprimidas para un mejor análisis del genotipo I6.

En relación a las asociaciones entre genotipos, se pudo observar que todas las cepas G14P[12] poseen una VP6 genotipo I2 y todas las cepas G3P[12] una VP6 genotipo I6 (Tabla R4.3). La única excepción a esta dinámica de asociación entre VP6, VP7 y VP8, descrita hasta el momento, es la observada para la cepa JPN/BI/1983/G3P[12] que presenta una VP6 genotipo I2. Esta última, es una cepa aislada en Japón en 1981 de un potrillo con diarrea y aislada en cultivo celular (Nemoto *et al.*, 2015).

Por lo tanto, al analizar los datos filogenéticos en su conjunto, se evidencia una asociación ó ligamiento de los segmentos de ARN que codifican para las proteínas VP6 y VP7 de RVA equino.

Tabla R4.3. Distribución de genotipos de VP6 y VP7.

	G3	G14
I2	1 (3%)	12 (100%)
I6	34 (97%)	0%

Se muestra la asociación entre los genotipos I2:G14 e I6:G3 en las cepas de RVA equino analizadas.

Análisis de las proteínas VP6 y VP7

Todas las cepas genotipo I2 o I6 muestran una secuencia nucleotídica conservada dentro de cada genotipo. Por tal motivo se construyó una secuencia de aminoácidos deducida consenso para cada genotipo (I2 e I6) y las mismas fueron comparadas entre sí y con las demás secuencias utilizadas. Dentro del genotipo I2, las secuencias de aminoácidos de las cepas de RVA equino de Argentina difieren de las demás cepas estudiadas en 3 posiciones (L11F, M295I y Q300P). Comparando ambos genotipos (I2 y I6), se observan 38 diferencias, incluyendo la inserción de 2 residuos en las posiciones 299 y 300 presentes solamente en el genotipo I2 (Tabla R4.4).

Tabla R4.4. Diferencias de aminoácidos entre los genotipos I6 e I2.

Nº	2	7	11	30	38	39	53	60	83	89	92	101	115	151	172 ^a	174 ^a	175 ^a	199	217	225	244 ^b	253	254	261	272	295 ^c	299 ^c	300 ^c	307 ^d	312 ^e	314 ^e	317	329	332	340	341	350	371
ARG/G3P[12]-I6 [†]	E	I	L	I	I	V	T	T	T	I	I	T	A	V	L	N	D	F	A	I	A	V	L	V	T	M	-	-	N	Q	Q	Q	D	V	S	N	A	E
G3P[12]-I6 [‡]	E	I	L	I	I	V	T	T	T	I	I	T	A	V	L	N	D	F	A	I	A	I	L	V	T	M	-	-	N	Q	Q	Q	D	V	S	N	A	E
ARG/G14P[12]-I2 [*]	D	L	F	L	V	I	N	N	N	V	V	V	S	T	A	D	N	I	V	L	T	I	F	I	N	I	P	P	A	N	P	E	E	I	A	S	S	D
G14P[12]-I2 [‡]	D	L	L	L	V	I	N	N	N	V	V	V	S	T	A	D	N	I	V	L	T	I	F	I	N	M	P	Q	A	N	P	E	E	I	A	S	S	D

*: Secuencia consenso de las cepas Argentinas; ‡: Secuencia consenso de las cepas de RVA equino publicadas en el GenBank.

^{a, b, c, d, e}: Amino ácidos de VP6 en contacto con VP7.

Al analizar la ubicación de los cambios, se observa que la mayoría de las sustituciones se ubican en la superficie de la molécula (21/38). Además, 3 cambios (residuos 151, 340 y 341) se producen en la región de interacción intra trímero (VP6:VP6:VP6). Los cambios de aminoácidos en el dominio H, se ubican en o cerca de los sitios antigénicos y, 5 de ellos en una región propuesta como sitio de interacción VP6:VP7. De las diferencias observadas, 8 se ubicaron en las regiones de interacción con VP7, incluyendo la inserción de los 2 aminoácidos presentes en las cepas del genotipo I2 (Figura R4.6). Respecto a los aminoácidos de la VP6 que interaccionan con VP2, solo 2 sustituciones (I38V y V39I) fueron encontradas. Finalmente, la inserción de 2 aminoácidos (299 y 300) en el genotipo I2 se ubican en un bucle incluido dentro de la región D (Figura R4.6C).

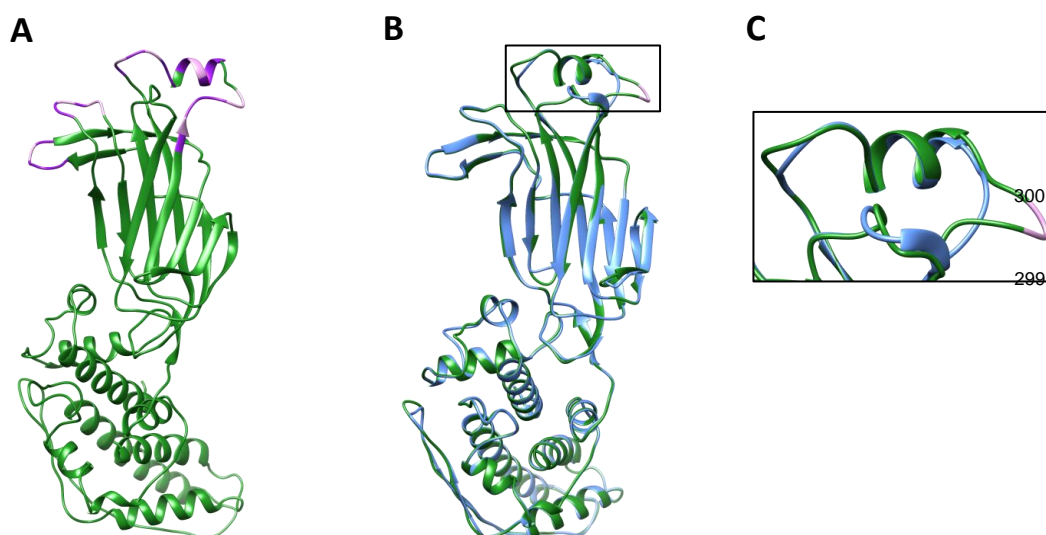


Figura R4. 6 Esquema de cintas de un monómero de VP6 donde se muestran las 5 regiones de contacto con VP7 propuestas por Mathieu y col. (2001) y Liu y col. (2009); B: Esquema de cintas de los genotipos de VP6 I2 (verde) y I6 (celeste) superpuestos, donde se aprecia la estructura idéntica y la ubicación de la inserción 299-300; C: Ampliación de la región de la inserción 299-300.

La estructura del trímero de VP6 y la ubicación de los cambios mencionados se muestra en la figura R4.7.

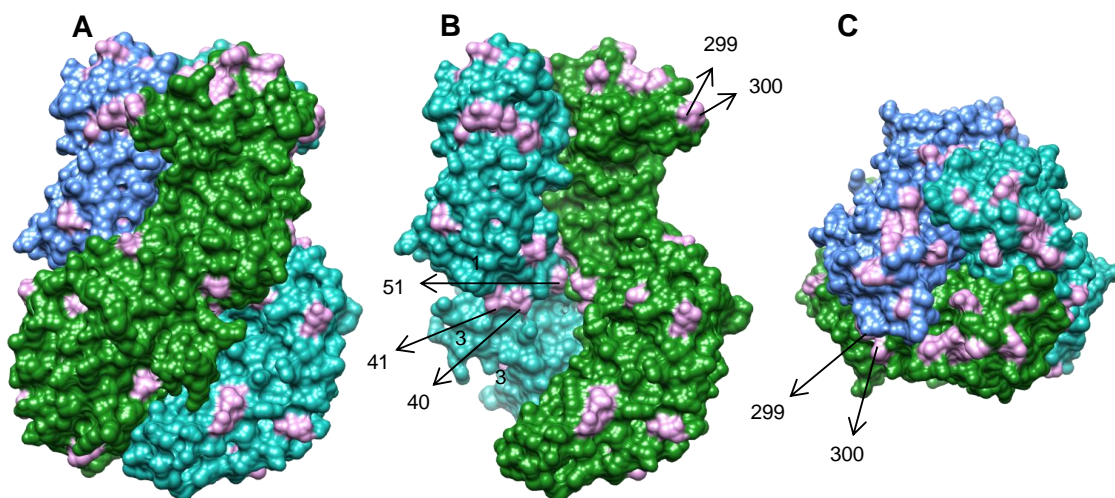


Figura R4.7 Estructura molecular del trímero de VP6 donde se muestran las diferencias entre ambos genotipos (I2 respecto de I6), cada monómero se muestra en verde, celeste y azul, las diferencias se muestran en rosado; B: Uno de los monómeros fue removido para observar los cambios que se producen en el interior del trímero; C: Vista superior del trímero donde se aprecian los cambios en, o cerca de, los sitios antigénicos.

Una situación similar a la observada en la secuencia de aminoácidos de la proteína VP6, sucede en la proteína VP7. Dentro de un mismo genotipo las secuencias aminoacídicas presentan elevada similitud, siendo del 100% en las cepas de RVA equino de Argentina. Por este motivo se originó una secuencia aminoacídica consenso de las cepas de Argentina, para ambos genotipos (G3 y G14), las cuales se compararon con las demás secuencias estudiadas. Así, se encontraron 33 diferencias de aminoácidos en los genotipos G3 con respecto a G14. Explicando las diferencias antigénicas detectadas por seroneutralización cruzada, 17 diferencias aminoacídicas se ubican en los sitios antigénicos de VP7, en línea con que a nivel antigénico, G3 y G14 son 2 serotipos diferentes (Tabla R4.5). Las diferencias en los sitios antigénicos además de los aminoácidos 118, 125 y 129, se ubican en la cara externa del trímero y en lugares accesible a los anticuerpos. Por otro lado, 8 diferencias (68, 74, 75, 267, 268, 281, 282 y 303) entre G3 y G14 se ubican en la cara interna del trímero, en el área de contacto con el dominio H del trímero de VP6 (Figura R4.8).

Tabla R4.5. Diferencias de aminoácidos entre los genotipos G3 y G14 de RVA equino de Argentina.

Sitios antigénicos	7a			7b			7c			7f																							
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*									
Aa	68	74	75	90	91	92	94	101	118	125	129	145	147	211	212	213	218	221	233	234	237	238	242	260	263	267	268	281	282	300	303	307	309
ARG/G3P[12] ^a	T	E	T	A	T	E	N	L	F	A	V	N	T	D	V	A	I	A	I	N	L	D	A	V	V	D	V	T	E	V	V	I	A
G3P[12] ^b	T/A	E	T	A/V	T/A	E	N	L/I	F	A	V	N	T	D	V/T	A/T	I/V	A	I/V	N	L	D	A/S	V	V/I	D	V/I	T	E	V	V	I	A
ARG/G14P[12] ^a	V	N	I	A	T	Q	D	I	L	A	I	D	A	N	V	A	V	S	V	D	I	N	T	I	V	N	I	I	G	V	I	V	V
G14P[12] ^b	V	N	I	A	T/A	Q	D/A	I	L	T	I	D	A	N	V	A/E/D	V	S	V	D	I [‡]	N [‡]	T	I	V/I	N [‡]	I	I	E [‡]	I [‡]	I	V	V

^a: Secuencia consenso de las cepas de Argentina; ^b: Secuencia consenso de las cepas equinas publicadas.

*: Aminoácidos característicos de los genotipos G3 o G14.

En **negrita** se muestran los aminoácidos en contacto con VP6.

En *italica*, se muestran los aminoácidos involucrados en las interacciones intratrímeros.

[‡]: Excepto en la cepa FI-23.

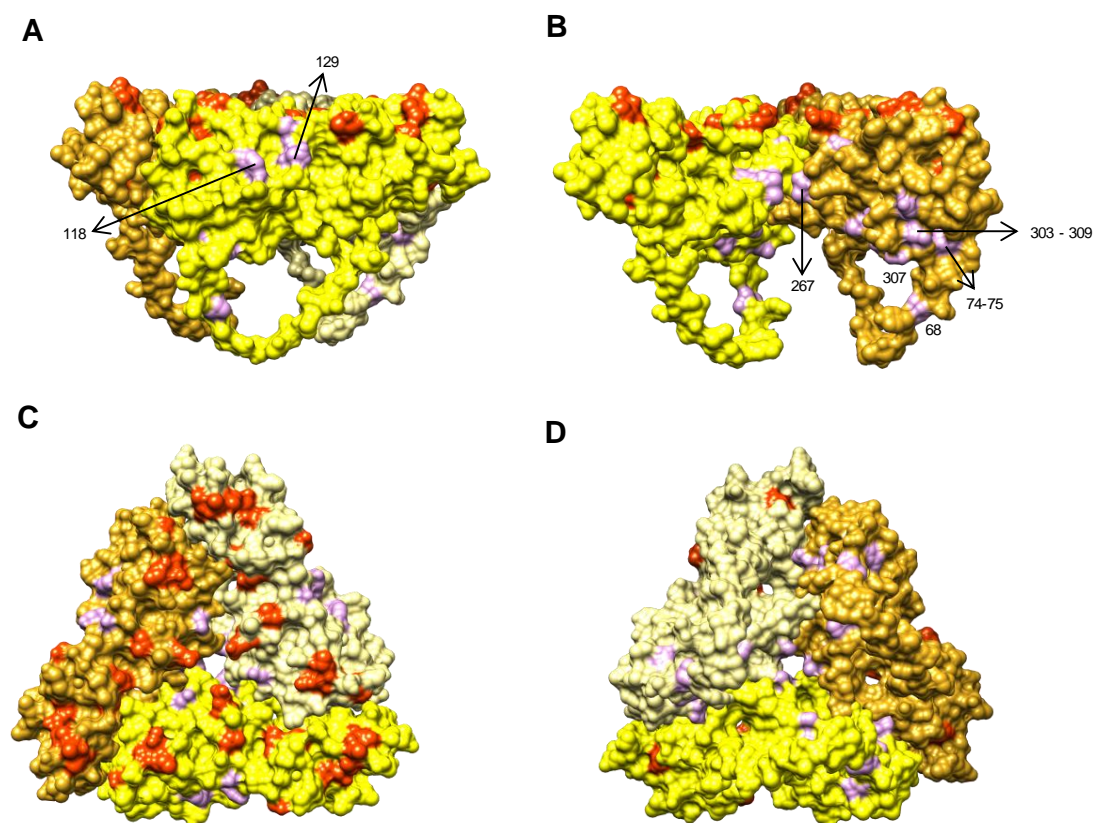


Figura R4.8 Estructura molecular del trímero de VP7 en diferentes vistas mostrando los cambios involucrados en la interacción con VP6. Cada monómero se muestra en amarillo patito, amarillo claro y dorado. A: Vista lateral. B: Un monómero fue removido para observar los cambios en el interior del trímero. C: Vista superior (cara externa) donde se aprecian los cambios en, o cerca de, los sitios antigénicos. D: Vista inferior (cara interna).

Interacción VP6:VP7

De las 5 regiones de VP6 propuestas como lugares de interacción con VP7, tres regiones específicas de interacción VP6:VP7 han sido reconocidas en nuestro estudio (Tablas R4.5 y R4.6). En VP6, además de las 8 sustituciones específicas que mapean dentro de las 5 regiones propuestas, otros 11 cambios (V151T, F191I, A217V, I225L, I253V, L254F, I261V, M295I, Q312N, D329E y V332I) se ubican en la superficie del dominio H, en el ápice de la molécula. En la proteína VP7, 6 sustituciones (F118L, A125T, V129I, V260I, D267N y I307V) se encuentran en la cara interna de la proteína, región que interacciona con VP6. Con el fin de explicar la razón estructural o termodinámica de estos cambios, estudiamos cómo estas sustituciones modifican la hidrofobicidad en términos de potencial electrostático de ambas proteínas. Encontramos que el potencial electrostático del trímero de VP6 genotipo I2 difiere considerablemente del trímero del genotipo I6 en el ápice del dominio H (región en contacto con VP7) y, de igual manera, el potencial electrostático de la cara interna (región en contacto con VP6) del trímero de VP7 difiere considerablemente entre los genotipos G3 y G14. Así, la asociación de los genotipos G3/I6 y G14/I2 hallada se explica porque los potenciales electrostáticos de las regiones de interacción entre los trímeros son complementarios unos a otros (Figura R4.9).

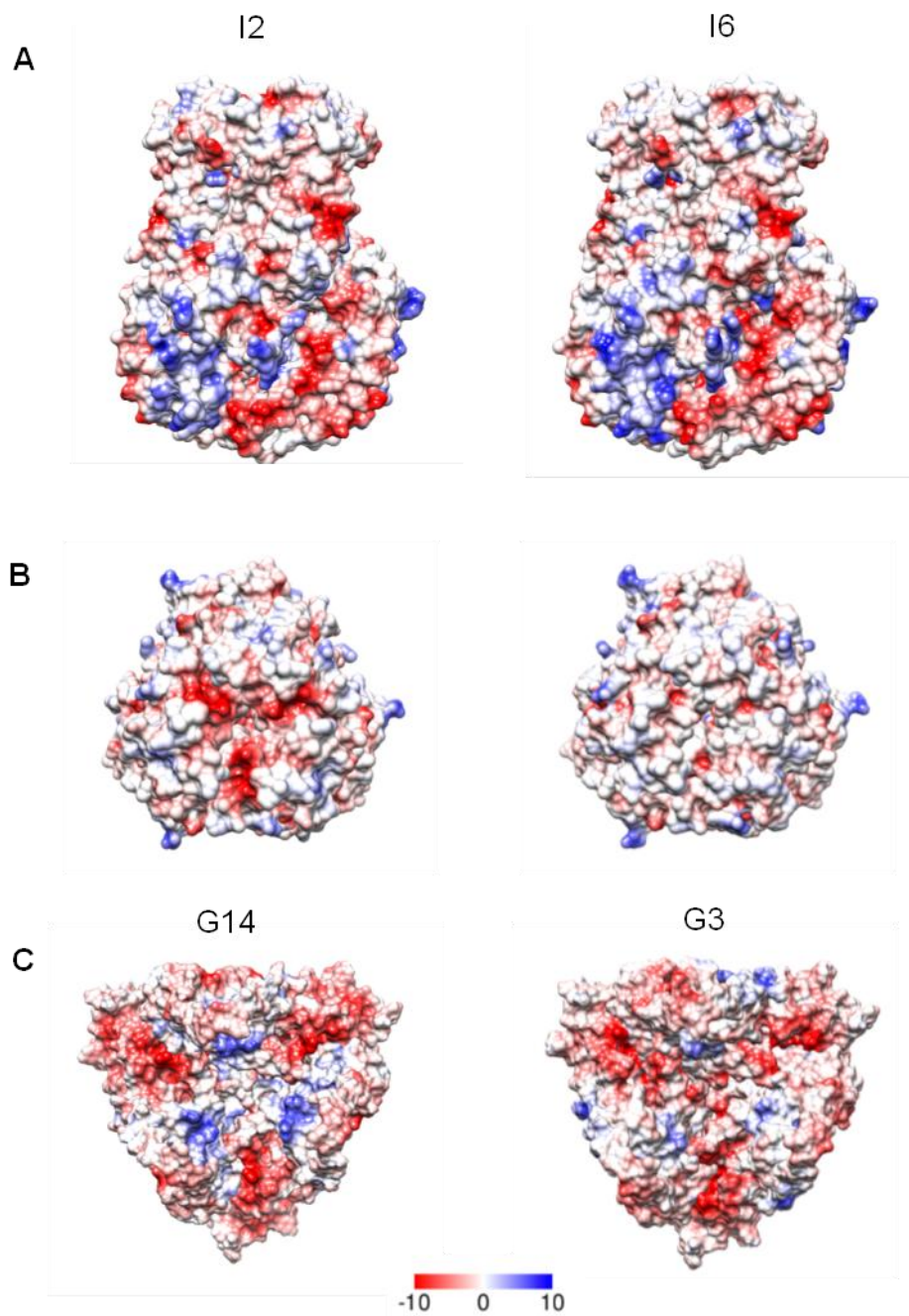


Figura R4. 9 Esquema molecular de los trímeros donde se muestran los potenciales electrostáticos de la superficie de las moléculas de VP6 (I2 y I6) y VP7 (G3 y G14). **A:** vista lateral de los trímeros de VP6 (I2 y I6). **B:** vista superior del trímero de VP6 (I2 e I6), **C:** Vista de la cara interna del trímero de de VP7 (G3 y G14). La barra de escala se muestra en Kcal/mol.

Discusión

Aunque los Rotavirus tienen el potencial de generar nuevas cepas virales por reasociación de los segmentos genómicos, los análisis de genomas completos de RV han demostrado que, estos virus en la naturaleza, tienden a presentar constelaciones de genes que se mantienen estables en el tiempo (Heiman et al., 2008; McDonald et al., 2009). Así, los RVA humanos pueden ser divididos en 3 grupos (GI - GII - GIII), cada uno con una constelación propia, GI derivado de cepas porcinas (Wa-like), GII derivado de cepas bovinas (DS1-like) y GIII de cepas de caninos y felinos (Au-1-like). Esta fuerte asociación de los genes (constelaciones genómicas) ha sido explicada por interacciones específicas entre las proteínas virales (Benati et al., 2010; Heiman et al., 2008; Miren Iturriza-Gómara et al., 2003). Ha sido descrito tanto para humanos como para animales que la proteína VP6 desempeña el rol más importante en la restricción de la reasociación de los genes porque, esta proteína, forma la cápside intermedia que interactúa por fuera con la cara interna de la cápside externa (VP7 y VP4) y por dentro con la cápside interna (VP2) (Heiman et al., 2008). Así, los genes de una constelación genómica específica, tienden a co-segregar, restringiendo el reordenamiento génico entre diferentes genotipos. Los RVA equinos, presentan un gran nivel de conservación en su constelación genómica, con solo 3 genes que presentan dos variantes de cada uno (VP6: I2 e I6, VP7: G3 y G14 y, NSP4: E2 y E12) (Ghosh et al., 2013; Nemoto et al., 2015). Interesantemente, solo un genotipo de VP4 (P[12]) ha sido encontrado en las cepas que causan brotes de diarrea en potrillos, indicando el alto nivel de restricción a nivel de especie. Además, todos los RVA equinos presentan un solo genotipo de VP2 (C2) (Ghosh et al., 2013; Nemoto et al., 2015). Esto se evidencia en el hecho de que solo 2 sustituciones (I38V y V39I) fueron encontradas en la zona de interacción VP6:VP2 y, dichas sustituciones se compensan mutuamente (Ile por Val y viceversa) y, dado que solo pocos cambios se producen en estas zonas, la misma proteína VP2 (C2) puede ser compartida por los genotipos G3P[12]-I6 y G14P[12]-I2. Nuestro trabajo evidencia fuertemente una asociación específica entre las proteínas VP7:VP6 generando genotipos propios de RVA equinos, G3/I6 y G14/I2. La detección de esta asociación entre G3/I6 y G14/I2 sugiere que ambas proteínas interactúan funcionalmente y co-evolucionan dentro de los RVA equinos, probando así el ligamiento genético en

proteínas virales. El estudio de la secuencia de aminoácidos y del modelo estructural de la proteína VP6 mostró que muchas de las diferencias (21/38) mapean en o cerca de los sitios antigénicos en el dominio H (ápice de VP6) explicando las diferencias antigénicas entre los genotipos I2 e I6. En este sentido, nuestro trabajo confirma la región de contacto e interacción VP6:VP7 (Chen et al., 2009; Li et al., 2009; Mathieu et al., 2001), estudia en detalle la misma y se describe la co-evolución de los residuos involucrados en la interacción G3/I6 y G14/I2 (Tabla 5.4 y 5.5). Aunque la inserción de 2 residuos en la proteína VP6 genotipo I2 podría contribuir en la interacción VP6:VP7, nuestros datos sugieren que son las interacciones específicas entre los potenciales electrostáticos de ambas moléculas en la zona de interacción los que están verdaderamente involucrados y determinan que combinaciones son las de mejor eficacia biológica en la naturaleza.

Las interacciones de proteínas virales juegan un rol en la co-evolución de los genes de los virus segmentados que generan partículas virales con la capacidad para infectar distintas especies animales (Dugan et al., 2008; Graham et al., 1987; Heiman et al., 2008; Lubeck et al., 1979; Nibert et al., 1996; Trask et al., 2012). Además, cepas con genoma reasociado obtenidas en estudios de infecciones mixtas entre cepas humanas y bovinas realizados en distintas líneas celulares han mostrado que existen determinantes genéticos y que los factores del huésped contribuyen o no, a la formación final de cepas reasociadas (Graham et al., 1987). Teniendo en consideración estas investigaciones y basándonos en métodos genómicos y estructurales, nuestro trabajo aporta evidencia del ligamiento genético entre las proteínas VP6 y VP7 de RVA equino. Este ligamiento genético puede ser explicado por interacciones proteína-proteína que definen la capacidad biológica y termodinámica del ensamblaje de los viriones de RVA, restringiendo la recombinación de cepas que infectan a un huésped determinado.

Capítulo 5

Estudio de Coronavirus y Norovirus como agentes causantes de diarrea en potrillos por métodos de rutina y por estudios de metagenómica.

Estudio de Coronavirus y Norovirus como agentes causantes de diarrea en potrillos por métodos de rutina y por estudios de metagenómica

Los Coronavirus equinos (CoVE) han sido diagnosticados por detección del agente mediante microscopía electrónica, cultivo celular, ELISA, RT-PCR y recientemente por real-time PCR en materia fecal de caballos con o sin enfermedad entérica (Masters & Perlman, 2013). La tasa de detección de CoVE es muy variada en los pocos reportes existentes. En Japón, un brote de enfermedad entérica ocurrido en 2009 afectó al 22% (132/600) de una población, donde se detectaron 3 materias fecales positivas a CoVE por RT-PCR (Oue *et al.*, 2011). Luego en USA, en estudios realizados en 4 poblaciones de caballos adultos, se detectó un 86% (38/44) de equinos enfermos positivos a CoVE, mientras que un 7% (7/96) de equinos sanos también fueron positivos a CoVE (Pusterla *et al.*, 2013). Finalmente, en Europa, la tasa de detección reportada es del 2% (12/595) y los 12 casos fueron co-infecciones con *Cryptosporidium spp.* (Miszczak *et al.*, 2014). En nuestro país no existen reportes de detección de CoV en materia fecal de potrillos con diarrea.

En relación a Norovirus (NoV), no existen evidencias de infección natural en equinos, a excepción de un estudio orientado a la búsqueda de otro miembro de la familia *Caliciviridae*, los Vesivirus, como posible agente causante de abortos en yeguas (Kurth *et al.*, 2006; Scipioni *et al.*, 2008).

Dada la ausencia de datos tanto para Coronavirus como para Norovirus en nuestro país, el objetivo de este capítulo del presente trabajo de tesis doctoral fue investigar la presencia de Coronavirus y Norovirus en muestras de materia fecal de potrillos con diarrea utilizando técnicas serológicas y moleculares convencionales y de nueva generación (metagenómica).

En la primera etapa se utilizaron las técnicas de rutina disponibles en nuestro laboratorio (ELISA y RT-PCR) y en conjunto con el laboratorio “Veterinary

Virology and Animal Viral Diseases Laboratory”, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Liège, con la colaboración del Dr. Axel Mauroy y la supervisión del Profesor Dr. Etienne Thiry.

La segunda etapa se realizó utilizando secuenciación de última generación (*Next Generation Sequencing*) en colaboración con la Dra. Viviana Parreño y la Dra. Celina Vega (IncuINTA, CICVyA), en el marco de un proyecto de cooperación bilateral Argentina-Bélgica con el grupo del Profesor Dr. Jelle Matthijnsens del “Laboratory of Clinical Virology, Hospital Universitario Sint-Rafaël, Leuven, Bélgica”, para estudiar el viroma presente en materia fecal de varias especies animales, entre ellas, los equinos.

Parte 1

Estudiar la presencia Coronavirus y Norovirus en muestras de materia fecal de potrillos con diarrea utilizando técnicas serológicas y moleculares convencionales

Materiales y Métodos

Muestras

En este estudio, fueron utilizadas muestras de materia fecal de potrillos con diarrea enviadas al servicio de diagnóstico del Laboratorio de Virus Equinos (Instituto de Virología, CICVyC, INTA-Castelar) durante el periodo 2009-2014.

Diseño experimental

Para el estudio de Coronavirus y Norovirus se aplicaron estrategias diagnósticas diferentes.

Dada la disponibilidad de un ELISA de captura monoclonal contra CoV bovino en nuestro laboratorio (cedido por la Dra. LJ Saif, The Ohio State University), se analizó la presencia de antígeno de CoV en materia fecal por esta metodología y luego, sobre las muestras que resultaron positivas, se realizaron RT-PCR dirigidas contra regiones conservadas del genoma de CoV.

En cambio, para el estudio de Norovirus, ante la ausencia de una técnica de tamizaje, se seleccionaron 100 muestras al azar, en las cuales se realizaron RT-PCR con distintas combinaciones de cebadores intentando detectar el genoma viral.

Detección de CoVE por un método serológico

La detección de CoVE en muestras de material fecal fue realizada mediante una técnica de ELISA indirecto descrito previamente (Smith *et al.*, 1996) y utilizado en nuestro laboratorio para el diagnóstico de Coronavirus bovino. Brevemente, placas de 96 pocillos (Maxisorp, NUNC, Thermo Fisher Scientific, 75 Panorama Creek Drive, Rochester, NY, USA) fueron sensibilizadas con 100 μ l de una dilución en buffer carbonato-bicarbonato (pH 9.6), de 4 anticuerpos monoclonales como anticuerpos de captura positiva (R1, en pocillos impares) y, anticuerpos IgG derivados del ascitis de un ratón inoculado con células SP2/0 como captura negativa (R2, en pocillos pares) e incubados a 4°C durante 16 ± 2 h. Los anticuerpos monoclonales utilizados (dilución 1:4000) dirigidos contra la Hemaglutinina (HE), la proteína de la nucleocápside (N) y la espícula (S) fueron: “BC21-F63C”, “BC22-F83C” anti-HE, “BC28-H1.2C” anti-N y “BC29-G72C” anti-S, desarrollados contra la cepa DB2 de CoV bovino (Smith *et al.*, 1996).

Luego de 2 lavados con PBS-Tween20 0.05%, pH: 7.4 (buffer de lavado), se realizó la reacción de bloqueo con 200 μ l por pocillo de leche descremada al 10% en PBS-Tween 0.05% durante 1 hora a 37 °C y, posteriormente se realizaron 4 lavados. Luego, se sembraron las muestras en dilución 1:10 y se incubaron durante 1 hora a 37 °C y, a continuación se realizaron nuevamente 4 lavados. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario (suero policlonal de cobayo anti CoV bovino) en una dilución 1:4000 y se incubó durante 1 hora a 37 °C, después de lo cual se realizaron 4 lavados. Finalmente, se incubó la placa con un anticuerpo de cabra anti-cobayo conjugado con peroxidasa en una dilución 1:3000 (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) durante 1 hora a 37 °C. Las placas fueron reveladas con H₂O₂/ABTS [2-2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonato)] como sistema sustrato/cromógeno. La reacción fue detenida por el agregado de 50 μ l/pocillo de SDS (dodecyl sulfato de sodio) al 5%. La densidad óptica (OD) fue leída a 405 nm (lector de ELISA, Multiskan Ex, Lab Systems®). Las muestras se consideraron positivas cuando la OD corregida de la muestra supera el valor de corte (Bok *et al.*, 2015).

Cálculo del valor de corte: Una muestra se considera positiva si la diferencia entre la OD medida a 405nm en la captura positiva (R1) y la captura negativa (R2) (ΔOD) es mayor a 0,100 unidades de OD ($\Delta OD = OD_{R1} - OD_{R2} \geq 0,1$), y si la OD en R1 es mayor a la media de OD en la captura positiva con PBS (blanco de reacción) más 2 desvíos estándar (DE) ($\bar{x}OD_{R1} > OD_{PBS} + 2DS$).

RT-PCR Coronavirus – Norovirus

Todas las muestras que resultaron positivas por ELISA a CoV fueron analizadas por RT-PCR contra distintos genes (M, N o S) de CoV (Bok *et al.*, 2015; Miszczak *et al.*, 2014; Pusterla *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2007). Del mismo modo, las muestras seleccionadas para la búsqueda de genoma de NoV fueron procesadas por RT-PCR de acuerdo a lo descrito por Mauroy *et al.*, 2009.

El ARN viral fue extraído utilizando reactivos comerciales, “QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN)” siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa (síntesis de ADNc) fue realizada a 42 °C por 60 min seguida de 94 °C por 5 min en una mezcla de reacción con 1X PCR Buffer (Invitrogen, Brasil), 0,5 mg de cebadores de secuencias al azar, 0,2 mM de dNTPs, 5 ul de ARN y 1,25 U de la enzima M-MLV RT (Invitrogen, Brasil) en un volumen final de 25 ul. Luego, 5 ul de DNase fueron agregados a la mezcla de PCR conformada con 1X Buffer (Invitrogen, Brasil), 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 mM de cada cebador (sentido y antisentido), 2 mM de MgCl₂, 13,2ul de agua ultrapura y 1,5 U de la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Brasil) en un volumen final de 25 ul. Los cebadores utilizados se detallan en la tabla R5.1. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 94 °C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 45-55 °C (de acuerdo al par de cebadores utilizado) por 1 min y 72 °C por 1 min, finalmente se realizó una extensión final a 72 °C por 5 min. Los amplicones se corrieron en un gel de agarosa al 2% utilizando “SYBR Safe DNA Gel Stain” (Invitrogen, Brasil) como colorante de ADN y se visualizaron bajo luz ultra violeta (UV) (Bok *et al.*, 2015).

Tabla R5.1. Cebadores utilizados.

Coronavirus			
Nombre	Secuencia	amplicon	Referencia
S1HS	CTATACCCAATGGTAGGA	885 pb	(Bok <i>et al.</i> , 2015)
S1HA	CTGAAACACGACCGCTAT		
S1NS	GTTTCTGTTAGCAGGTTTAA	488 pb	(Bok <i>et al.</i> , 2015)
S1NA	ATATTACACCTATC CCCTTG		
S1For	TTGTAATTTTAATATGAGCAGCC	908 pb	(Bok <i>et al.</i> , 2015)
S1Rev	TTCTGCCAACTATTATAATAAG		
S2For	TTATAATAGTTGGCAGAACC	672 pb	(Bok <i>et al.</i> , 2015)
S2Rev	ACCATTCATTAACTATTAGC		
ECoV-N-380f	TGGGAACAGGCCCGC	142 pb	(Pusterla <i>et al.</i> , 2013)
ECoV-N-522r	CCTAGTCGGAATAGCCTCATCAC		
ECoV-N-for	GCCAATCCGGCACTAGAAC	148 pb	(Miszczak <i>et al.</i> , 2014)
ECoV-N-r	ACCCCTTTTTCCAAAGCACT		
ECoV-M-for	GGTGGAGTTTCAACCCAGAA	156 pb	(Miszczak <i>et al.</i> , 2014)
ECoV-M-r	AGGTGCGACACCTTAGCAAC		

Tabla R5.1, continuación. Norovirus

Nombre	Secuencia	Amplicon	Referencia
p290-For	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	318 pb	(Jiang <i>et al.</i> , 1999)
p289-Rev	TGACAATGTAATCATCACCATA		
p290d-For	GATTACTCCASSTGGGAYTCMAC	318 pb	(Farkas <i>et al.</i> , 2004)
p289d-Rev	TGACGATTTTCATCATCMCCRTA		
JVI-12-For	ATACCACTATGATGCAGATTA	326 pb	(Vinjé, 2014)
JVI-13-Rev	TCATCATCACCATAGAAAGAG		
CeBCu-For	AGTTAYTTTTCTTYTAYGGBGA	532 pb	(Smiley <i>et al.</i> , 2003)
CeBCu-Rev	AGTGTCTCTGTCAGTCATCTTCAT		

Controles utilizados en la RT-PCR de NoV.

Dado que se desconoce la circulación de este agente en la población en estudio y para evaluar la especificidad de la técnica, se incluyeron controles de los agentes virales potencialmente presentes. Sin embargo, en algunos casos, al no contar con muestras positivas específicas, se utilizaron cepas de referencia.

- *Una materia fecal bovina positiva a NoV bovino previamente detectada en nuestro laboratorio (Ferragut et al., 2016).*
- *Una cepa de NoV humano genogrupo GII (cedido por Kim Green, NIH, USA).*
- *Una cepa de NoV humano genogrupo GI (cedido por Kim Green, NIH, USA).*
- *Una materia fecal equina RVA positiva, genotipo G3P[12].*
- *Una materia fecal equina RVA positiva, genotipo G14P[12].*
- *Una materia fecal bovina positiva a CoV bovino (cepa Mebus, cedido por Linda Saif, OSU, USA).*
- *Una materia fecal negativa a RVA y Coronavirus.*

Resultados

ELISA CoV

Un total de 367 muestras de potrillos de 1 día a 5 meses de edad, con diarrea fueron analizadas por ELISA de CoV durante el período 2009-2014. Del total, un 25% (92/367) de las muestras fueron positivas.

Al analizar los resultados año por año, podemos observar que en 2009 se observó la mayor tasa de detección (47%), mientras que en los años 2010 y 2012 fue de 34% y 31% respectivamente. En los años 2011 y 2013 fue de 17% y 14% respectivamente, mientras que la tasa de detección más baja se observó en el año 2014 (6%) (Tabla R5.2, Figura R5.1).

Tabla R5.2. Muestras equinas analizadas para CoVE por ELISA.

Año	N	Positivos (%)
2009	47	22 (47%)
2010	70	24 (34%)
2011	63	11 (17%)
2012	78	24 (31%)
2013	58	8 (14%)
2014	51	3 (6%)
2009-2014	367	92 (25%)

N: número de muestras analizadas.

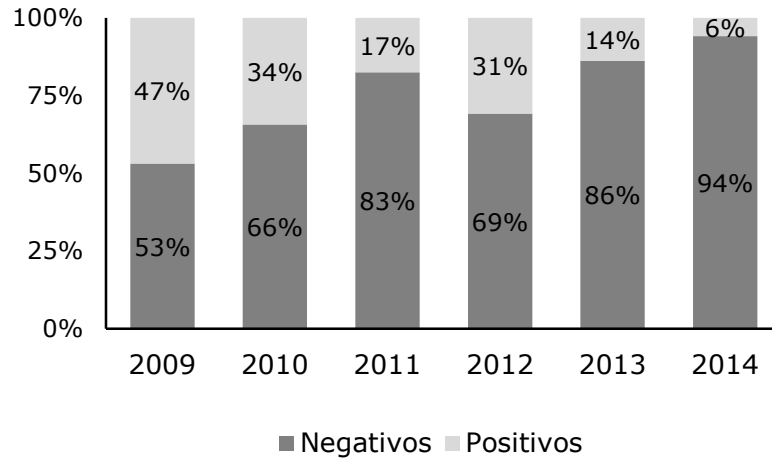


Figura R5. 1 Distribución de las muestras positivas a CoV por ELISA en el período estudiado.

RT-PCR para CoV

Todos los intentos de amplificar el genoma del virus por PCR a partir de las muestras de materia fecal que resultaron positivas por ELISA, así como la búsqueda del virus por microscopía electrónica, resultaron infructuosos.

Detección de NoV

Se analizaron 100 muestras de materia fecal de potrillos con diarrea recolectadas entre los años 2009 y 2012. Todas las muestras analizadas eran negativas a RVA y CoV.

Con la RT-PCR utilizada se logró amplificar las cepas de NoV de referencia y no se observó reacción inespecífica cruzada con RVA o CoV por lo que consideramos que el ensayo de PCR era adecuado para la detección de Norovirus en las muestras de materia fecal de potrillos con diarrea, sin embargo, no se obtuvo ninguna banda de DNA del tamaño esperado en ninguna de las 100 muestras equinas analizadas. En la muestra E/1883/2012 se visualizaron varias bandas luego de la reacción de PCR; incluida una banda del tamaño esperado para NoV. Esta última fue purificada y secuenciada. Curiosamente, se obtuvo una secuencia de 250pb que no presentó homología con ninguna secuencia nucleotídica publicada en la base de datos GenBank.

Conclusiones parciales

Mediante la utilización del ELISA de CoV bovino se obtuvieron resultados que evidenciaban la presencia de CoV en muestras de materia fecal de potrillos con diarrea, esto es, que anticuerpos monoclonales de captura y el anticuerpo policlonal secundario utilizados en el ELISA de CoV bovino reconocieron/reaccionaron con un 25% de las muestras analizadas. Sin embargo, el hecho de no detectar el genoma viral por PCR en ninguna muestra hizo que reconsideráramos los resultados obtenidos. Se concluye que con las técnicas disponibles en nuestro laboratorio y utilizando procedimientos diagnósticos publicados por otros autores, no se pudo confirmar la presencia de CoVE en las muestras de materia fecal equina analizadas.

Del mismo modo, al realizar la búsqueda de NoV no se detectó genoma viral en ninguna de las muestras de materia fecal de potrillos con diarrea analizadas con los ensayos utilizados.

En virtud de los resultados negativos obtenidos y teniendo como hipótesis la participación de otros agentes virales en la diarrea de los potrillos, se realizó un trabajo en colaboración con el Instituto REGA de Bélgica, con el fin de estudiar el viroma equino mediante secuenciación de nueva generación como se describe a continuación.

Parte 2

Metagenómica de materia fecal de potrillos con diarrea mediante *Next Generation Sequencing*

La secuenciación de tercera generación (en inglés “*next generation sequencing*” [NGS]) ha revolucionado el descubrimiento de nuevos virus, tanto en humanos como en animales, en ecosistemas variados. Generando el descubrimiento del viroma (conjunto de virus) presentes en las diferentes muestras analizadas (Bodewes *et al.*, 2014; Conceição-Neto *et al.*, 2015; Phan *et al.*, 2011). En contraste, el rol de los viromas en enfermedades se encuentra aún pobremente caracterizado, incluso cuando se han hecho muchos esfuerzos para comprender enfermedades como el síndrome de colon irritable, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida y los rechazos y contagios en el marco de transplantes de órganos (Kramná *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Norman *et al.*, 2015). Generalmente, la mayor parte del material genético de una muestra es de origen no-viral, lo que hace del estudio de los viromas un verdadero desafío (Reyes *et al.*, 2012). Además, los virus tampoco poseen regiones genómicas conservadas y son tanto genética como morfológicamente muy diversos, lo que dificulta su búsqueda (Koonin *et al.*, 2015). Así, los pasos claves en el estudio de viromas son, el enriquecimiento de la muestra en partículas virales y el rendimiento de la amplificación con cebadores de secuencia al azar, dado que la muestra de partida necesita ser amplificada antes de preparar la librería de ADN (Reyes *et al.*, 2012). Un estudio realizado por Conceição-Neto *et al.* (2015), evaluó el rendimiento en cada uno de los pasos del procedimiento para el análisis de viromas por NGS y logró obtener un protocolo reproducible.

El laboratorio del INTA dirigido por la Dra. Viviana Parreño generó una colaboración con el grupo que desarrolló la tecnología para estudiar los viromas por NGS. Ante esta oportunidad, nos propusimos estudiar el viroma de las materias fecales de potrillos que habían resultado positivas a CoV por ELISA y de muestras

seleccionadas donde se había analizado la presencia de NoV con resultado negativo.

Siendo entonces, el objetivo de este trabajo, evaluar el viroma equino obtenido mediante el método NetoVIR (“Novel Enrichment Technique Of VIRomes”), propuesto por Conceição-Neto y col. (2015).

Materiales y Métodos

Muestras de materia fecal equina

Se realizaron dos mezclas (“pooles”) con iguales cantidades de cada materia fecal para realizar el análisis (Tabla R5.3). Los dos grupos se formaron teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos en la búsqueda de agentes virales asociados a las diarreas neonatales. En todos los casos, las muestras provenían de potrillos con diarrea. Se combinaron muestras positivas a RVA que no habían podido ser genotipificadas por RT-PCR, muestras positivas por ELISA a CoV y muestras presuntamente positivas o con presencia de una amplicón del tamaño esperado por RT-PCR de NoV. También se incluyeron muestras negativas a los tres agentes virales con el fin de determinar la presencia de otros virus, asociados con la presencia de diarrea.

Tabla R5.3. Grupos de muestras analizadas por NGS.

Pool	Muestras	RVA	CoV (ELISA)	NoV (RT-PCR)
1 GC012055	E/2718/12	positivo (sin genotipificar)	positivo	positivo
	E/9197-6/10	negativo	negativo	negativo
	E/1219/11	negativo	negativo	negativo
2 GC012056	E/1225/11	Negativo	positivo	negativo
	E/2717/12	positivo (sin genotipificar)	negativo	positivo
	E/2883/12	negativo	negativo	negativo

Procesamiento para Illumina HiSeq 2500

Todo el procesamiento de las muestras fue realizado en el REGA Institute siguiendo el protocolo de Conceição-Neto publicado en 2015 (Conceição-Neto *et al.*, 2015).

Brevemente, la suspensión de materia fecal fue homogeneizada por 1 minuto a 3.000 rpm en MINILYS homogenizer (Bertin Technologies, France). Luego se realizaron 3 filtraciones sucesivas a través de membranas (Millipore) de 100 μm , 10 μm y 0,8 μm . A continuación, el filtrado fue tratado con una mezcla de Benzonasa (Norovirusagen) y Nucleasa Micrococcal (New England Biolabs) a 37°C por 2h en un buffer de digestión (1M Tris, 100mM CaCl₂ y 30 mM MgCl₂) para eliminar los ácidos nucleicos libres (flotantes). La extracción de ARN y ADN se realizó con el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante, con la excepción de no utilizar el precipitador de ARN. La síntesis de las cadenas complementarias para generar ARN_{dc} y ADN_{dc} se realizó con cebadores de secuencia al azar, con 20 ciclos utilizando el “Whole Transcriptome Amplification (WTA) Kit” (Sigma-Aldrich), con una leve modificación del protocolo del fabricante; se realizó una desnaturalización a 95°C en lugar de 72°C, para permitir la desnaturalización de los ácidos nucleicos de doble cadena. Los productos obtenidos fueron purificados con “MSB Spin PCRapace spin columns” (Stratec) y acondicionados para la secuenciación en el equipo Illumina HiSeq 2500 utilizando “KAPA Library Preparation Kit” (Kapa Biosystems) (Figura R5.2). La librería se cuantificó con “KAPA Library Quantification kit Kapa” (Biosystems) y la secuenciación fue realizada con 201 ciclos (100 nucleótidos). De cada muestra, se realizaron aproximadamente un total de 1 millón de lecturas.

Procesamiento de los resultados

El análisis de los resultados es exclusivamente bioinformático. De los datos crudos (RAW) se removieron las secuencias de los adaptadores utilizando el programa Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014). Las secuencias resultantes se ensamblaron y se generaron “secuencias contigs” utilizando el programa SPAdes (Prjibelski *et al.*, 2014). Los fragmentos resultantes fueron clasificados mediante tBLASTx ([www.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)) contra toda la información disponible en la base de datos del GenBank tomando el valor $E=e^{-10}$ (E = error) como valor de corte. Los fragmentos con un valor E significativo fueron analizados con BLAST de nucleótidos. Las secuencias con homologías encontradas fueron

nuevamente analizadas por tBLASTx pero con un valor de corte $E=e^{-4}$ (Altschul et al., 1990).

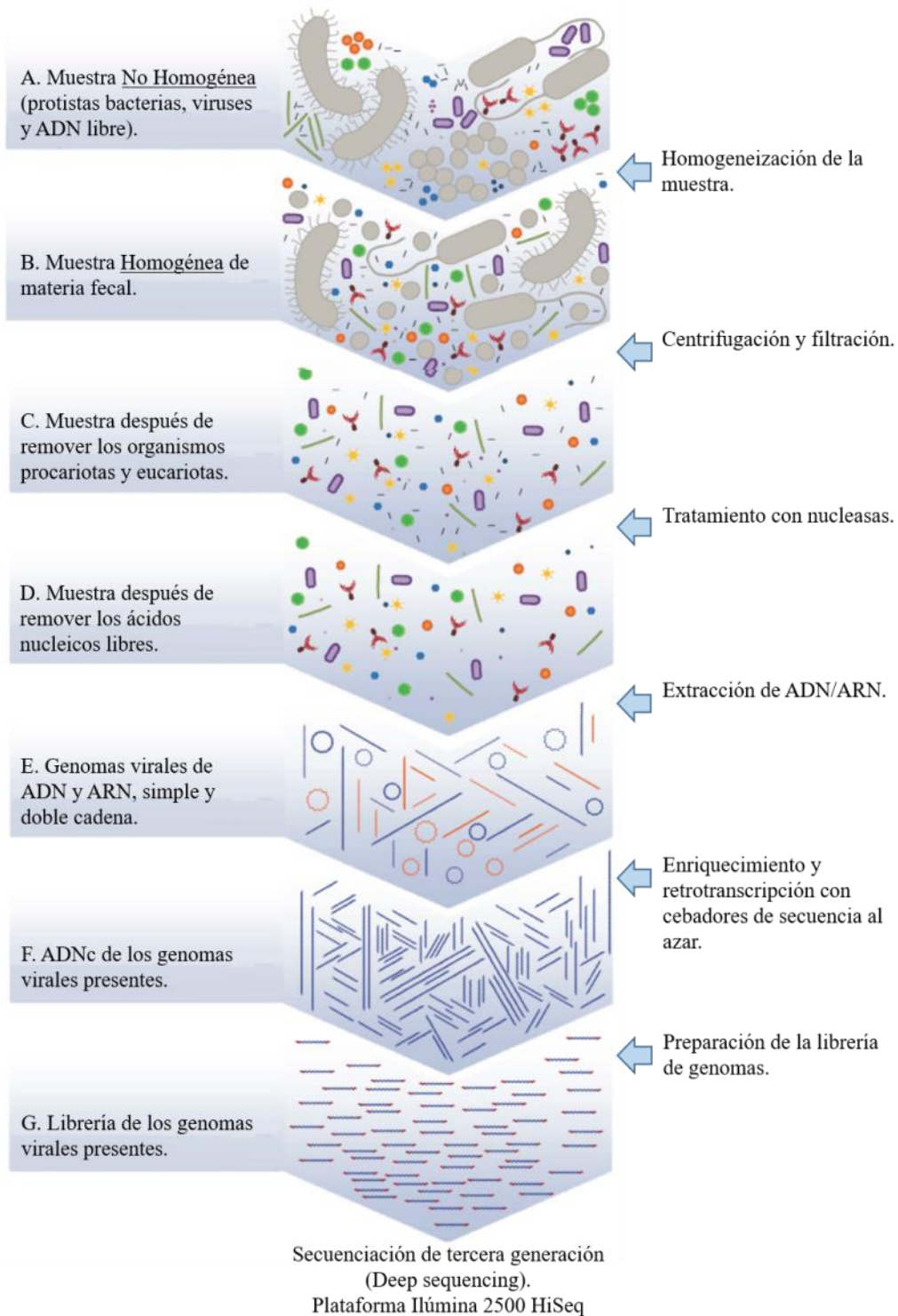


Figura R5.2 Esquema del procesamiento de las muestras para entrar al Illumina HiSeq 2500. Tomado de Conceição-Neto et al., 2015.

Resultados

Análisis de abundancia por *Phylum*

Para cada pool de muestras se obtuvo un porcentaje de abundancia relativo de secuencias virales dentro de los rangos esperados en relación a los otros *Phyla* presentes en las muestras originales. Esto es, para el Pool 1-GC012055- se obtuvo una abundancia relativa de secuencias virales del 57% del total de secuencias, mientras que para el Pool 2 -GC012056- la abundancia de secuencias virales fue del 37% del total de secuencias generadas. A su vez, dentro de la población viral, aproximadamente un 57% y un 45% de las secuencias correspondieron a bacteriófagos en cada pool, respectivamente (Figuras R5.3-4).

En el primer pool (GC012055), la diversidad total obtenida fue la siguiente: 57% virus, 36% bacterias, 5% organismos no cultivables, 1% arquea y 0,7% eucariota (Figura R5.3). Dentro de los virus analizados, Rotavirus A (12% de la abundancia relativa total de secuencias) fue el predominante, hecho esperado dado que una muestra positiva fue incluida como control interno. Respecto a los virus, en el pool 1 se observa la presencia de secuencias similares a Alphacoronavirus (2%) y Norovirus (2%), sin embargo, los fragmentos obtenidos fueron muy pequeños y sería necesario profundizar su análisis para confirmar la presencia de estos agentes.

Un resultado interesante fue la detección de Picornavirus (4% del total de las secuencias virales encontradas), donde los Kobuvirus fueron la especie predominante (representando un 67% de las secuencias adjudicables a Picornavirus). Además, se encontraron secuencias asociadas a Astrovirus (0,4% del total de las secuencias virales) (Figura R5.3).

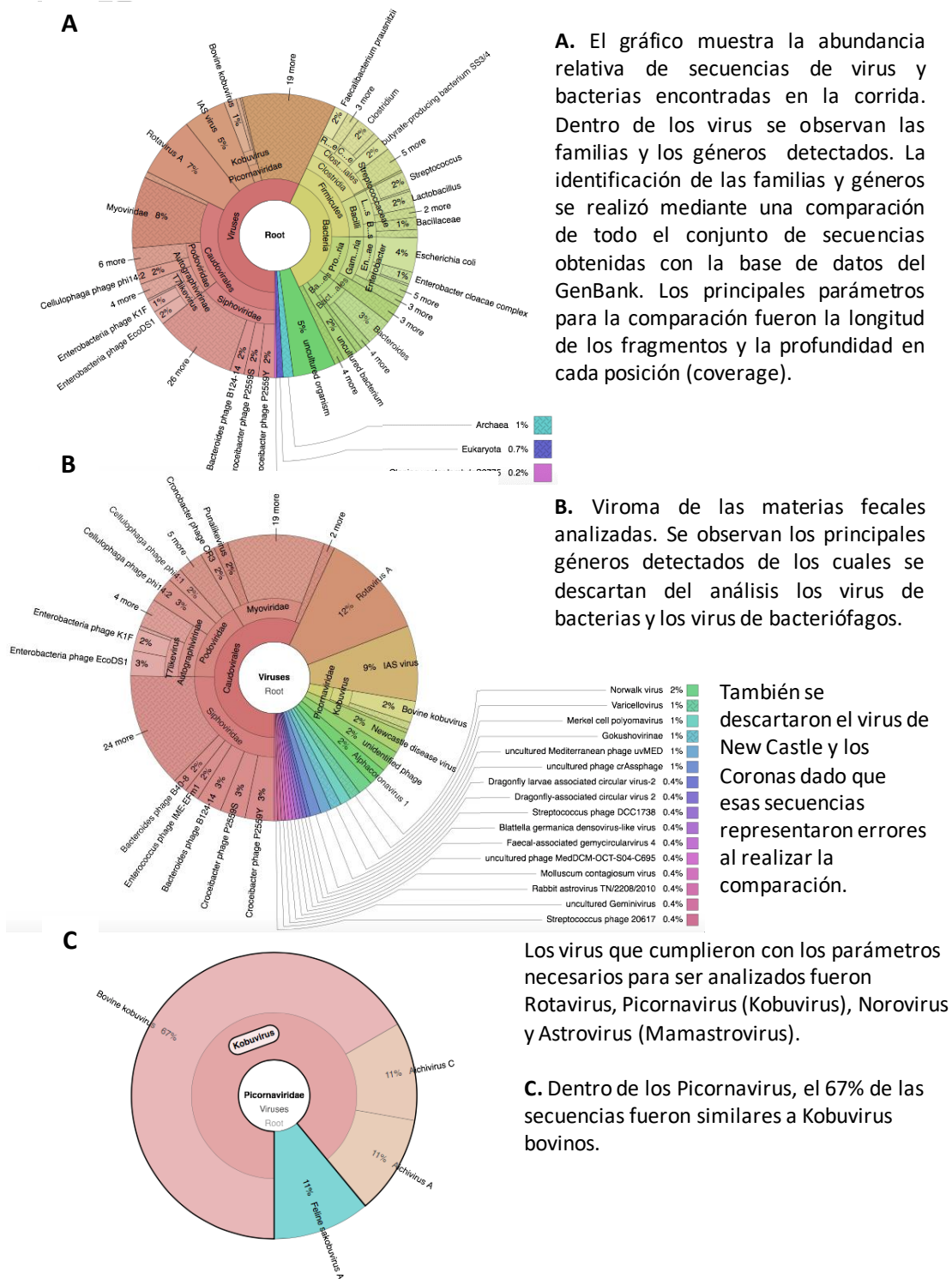


Figura R5.3 Análisis del viroma obtenido para el pool 1.

El segundo conjunto de materias fecales analizado (Pool 2: GC012056) arrojó los siguientes resultados: 37% de secuencias virales, 60% de secuencias

bacterianas y 1% de secuencias de mamíferos (Figura R5.4). Dentro del viroma (total de secuencias virales) obtenido, Rotavirus A (8% del total viral) fue el predominante, hecho esperado dado que una muestra positiva fue incluida como control interno. Nuevamente un resultado interesante fue la presencia de Picornavirus (3% de la abundancia total); Parvovirus (3%) y Mamastrovirus (2% del viroma).

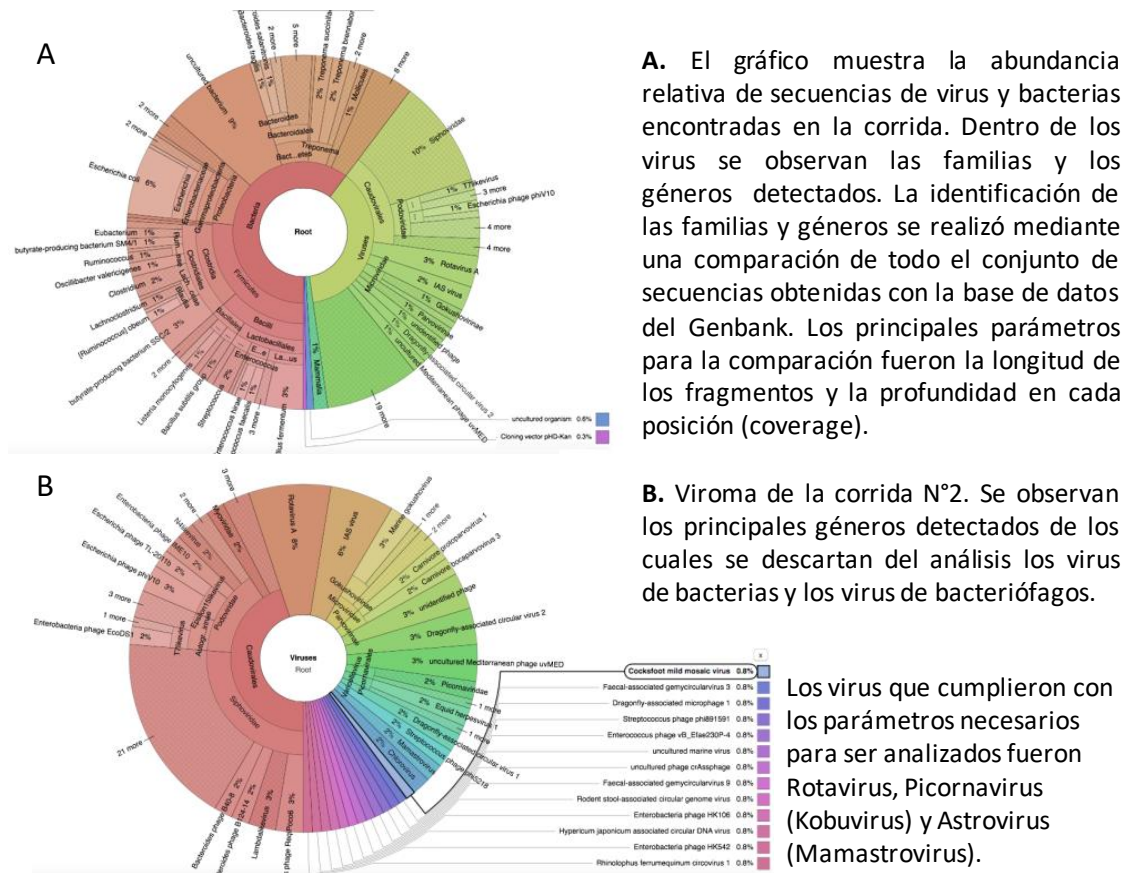


Figura R5.4 Análisis del viroma del pool 2.

Discusión

El estudio del viroma de las materias fecales de potrillos con diarrea evidencia que otros agentes virales que podrían estar involucrados en la generación de este síndrome clínico, como ser Alphacoronavirus, Norovirus, Picornavirus y Mamastrovirus, algunos de los cuales han sido detectados en otras especies animales o en humanos (Brugere-Picoux and Tessier, 2010; Munnink and Hoek, 2016)

Los Alphacoronavirus (familia: *Coronaviridae*), son virus descritos como causantes de enfermedad respiratoria o gastrointestinal en humanos, cerdos, felinos, caninos y murciélagos, pero no existen reportes en equinos (Gonzalez Arguedas, 2007; Woo et al., 2009). El genoma de los Alphacoronavirus es similar a los Betacoronavirus en cuanto a tamaño, pero poseen características antigénicas diferentes (Barros et al., 2013; Woo et al., 2009). Son virus que poseen tropismo tanto por células intestinales como respiratorias, por lo que podrían encontrarse en las muestras analizadas (Song et al., 2015). Sin embargo, los fragmentos obtenidos solo nos permiten considerar la hipótesis pero es necesario confirmar la detección del genoma viral por RT-PCR.

Los Norovirus han sido descritos como agentes causantes de diarreas en humanos y otras especies animales pero no en equinos (Mauroy et al., 2009; Mauroy and Scipioni, 2008; Scipioni et al., 2008; Yilmaz et al., 2011). Nuestros resultados podrían ser el primer reporte alertando sobre la probable participación de NoV en relación con la diarrea en equinos jóvenes. En el pool 1 se observa la presencia de un 2% de secuencias similares a Norovirus, esto coincide con los resultados previos dado que en la muestra E/2718/12 (incluida en este pool) se había visualizado una banda compatible con la esperada para Norovirus por RT-PCR. Sin embargo, es necesario diseñar una nueva estrategia para confirmar la presencia de los mismos, dado que estos virus probablemente posean características propias.

Los Kobuvirus (Familia: *Picornaviridae*), han sido reportados como agentes causantes de diarrea en humanos, bovinos, caprinos y porcinos (Bodewes et al., 2014; Candido et al., 2017; Melegari et al., 2016; Reuter et al., 2011). Sin embargo, hasta la fecha no se han reportado como causantes de diarrea en equinos, por lo

que nuestros resultados, al igual que para NoV, podrían ser el primer reporte sobre la posible relación entre Kobuvirus y la diarrea en potrillos. Los Kobuvirus representaron el 4% y 3% de la diversidad viral observada en el grupo 1 y 2, respectivamente. En el Pool 1 se obtuvieron secuencias que cubren el 90% del genoma de los Kobuvirus bovinos (8,25 kpb). En el Pool 2 se detectaron 3 fragmentos de 300pb, 350pb y 400pb, similares a genomas del género Kobuvirus (Figura 6.5).

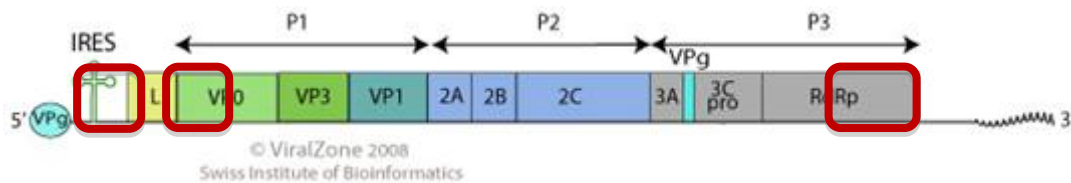


Figura R5. 5 Representación esquemática de los fragmentos hallados en el Pool 2 sobre un genoma de referencia de un Kobuvirus.

Los Mamastrovirus (Familia: *Astroviridae*) son virus que causan enfermedad gastroentérica en humanos, felinos, ovinos, porcinos, bovinos y visontes (Alfred et al., 2015; Brugere-Picoux and Tessier, 2010; Candido et al., 2015; Cho et al., 2014; Moser and Schultz-Cherry, 2005; Sharp et al., 2015; Thongprachum et al., 2016; Xiao et al., 2017), sin embargo, hasta el momento no han sido reportados en equinos. En los dos pools se detectó un conjunto de secuencias compatibles con Mamastrovirus. En el primer pool se obtuvo un grupo de secuencias de 2,2 kpb similares a los Astrovirus reportados en conejos (Brugere-Picoux and Tessier, 2010). Las secuencias corresponden a un fragmento del ORF1b y del ORF2, pero con una alta divergencia que hizo imposible la reconstrucción *in silico* del genoma completo mediante algoritmos bioinformáticos. En el segundo pool, se obtuvieron secuencias parciales del ORF1a y ORF1b, relacionadas filogenéticamente con Astrovirus bovinos y porcinos (Alfred et al., 2015; Xiao et al., 2017). Ambos grupos de secuencias evidencian la presencia de Mamastrovirus en las materias fecales equinas. Sin embargo, es necesario confirmar los resultados por RT-PCR y secuenciación convencional (Figura R5.6).

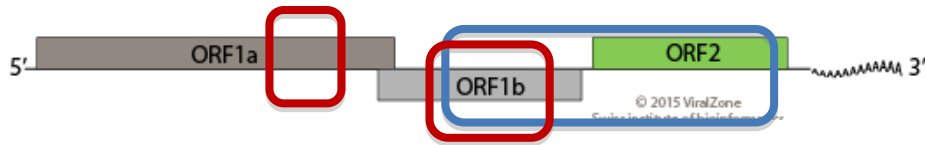


Figura R5.6 Representación esquemática del genoma de los Mamastrovirus con los 3 marcos abiertos de lectura. Los recuadros indican las secuencias obtenidas por NGS en azul para el Pool 1 y en rojo para el Pool 2.

Los CoV son patógenos que van cobrando cada vez más importancia como agentes causantes de diarrea en caballos. Sin embargo los estudios realizados aún continúan siendo escasos, por lo que analizar si estos virus están presentes en las poblaciones equinas de nuestro país es muy importante (Gonzalez Arguedas, 2007). El ELISA utilizado, basado en anticuerpos monoclonales contra diferentes proteínas estructurales de coronavirus bovino, indicó la presencia de CoV en las muestras de equinos bajo estudio, siendo el porcentaje de individuos positivos hallados similar a la incidencia hallada en otros lugares del mundo (Miszczak *et al.*, 2014; Pusterla *et al.*, 2013). Sin embargo, los resultados obtenidos por RT-PCR y los datos de NGS no confirmaron los hallazgos obtenidos por ELISA.

El conocimiento sobre CoVE es muy escaso, especialmente en lo referido a su prevalencia en animales jóvenes y a su significancia clínica. Por lo tanto, es necesario continuar el estudio de los mismos, podrían modificarse los métodos de extracción de RNA para no perder eficiencia en la detección de agentes virales que tienen RNA de simple cadena mediante los ensayos de RT PCR y NGS.

Los NoV son agentes bien conocidos relacionados con diarrea severa en el hombre y en varias especies animales, esto motivó el objetivo de investigar la presencia de los mismos como causantes de diarrea en potrillos en este trabajo de tesis. Sin embargo, tanto con la estrategia tradicional (RT-PCR) como con la secuenciación de última generación (NGS) no se encontraron indicios suficientes como para evidenciar la presencia de NoV y relacionarlos con el síndrome diarreico en potrillos. Al igual que lo sucedido con los CoVE, nuestros resultados indican que los NoV no estarían presentes en las muestras equinas analizadas, pero, no podemos asegurar esta observación dado que nuestro universo de trabajo

fue pequeño en relación con la población de equinos de nuestro país, por lo que el estudio de este agente viral podría continuar realizándose en futuros proyectos.

La metagenómica es una metodología de avanzada que nos permite explorar la muestra desde una perspectiva integral considerando todas las secuencias o genomas presentes. El estudio de los viomas fue facilitado por el desarrollo de un protocolo de enriquecimiento de los genomas virales presentes en la muestra, eliminando los de eucariotas superiores. Así, se lograron corridas con un alto porcentaje de genomas virales para analizar. Una de las ventajas de realizar NGS es que nos permiten detectar agentes no buscados o que se encuentran en una baja proporción dentro de la muestra y que se hacen visibles por el enriquecimiento de la misma. Este trabajo constituye el primer ensayo para determinar el vioma de las materias fecales equinas en condiciones de un cuadro diarreico. Los virus encontrados, tales como Astrovirus (Mamastrovirus) y Picornavirus (Kobuvirus bovino) constituyen un alerta y ponen en evidencia la necesidad de profundizar el estudio para alcanzar conclusiones definitivas sobre el papel que juegan estos agentes en las diarreas de los potrillos.

El género Kobuvirus ha sido descrito en gastroenteritis tanto en humanos como en ganado bovino. Esto hace que la presencia de estos virus pueda relacionarse con la diarrea observada en los potrillos de los que provenían las muestras. Hasta el momento, los Kobuvirus no habían sido descritos en relación a cuadros diarreicos en equinos, por lo que este sería el primer reporte en esta especie. Futuros análisis de estas muestras permitirán obtener el genoma completo del agente y así diseñar una RT PCR específica para comenzar a estudiar el mismo en la población equina.

Dado que los resultados de NGS nos brindan información de pequeños fragmentos que se ensamblan mediante análisis *in silico*, los hallazgos de virus encontrados por primera vez constituyen una evidencia que debe ser confirmada por otros métodos como por ejemplo PCR convencional y posterior secuenciación.

Conclusiones

Parte 1

No se detectaron CoV o NoV en las muestras analizadas, por las técnicas moleculares convencionales.

Parte 2

- *Se obtuvo el “Viroma” de materias fecales equinas de potrillos diarreicos.*
- *Se detectaron CoV o NoV mediante NGS, sin embargo es necesario continuar con su estudio para confirmar estos resultados.*
- *Se detectaron Picornavirus (Kobuvirus), Parvovirus yAstrovirus (Mamastrovirus), aunque se desconoce su implicancia como agentes etiológicos de las diarreas.*

Perspectivas

Como resultado de este trabajo se generó la necesidad de realizar el análisis profundo de los resultados de metagenómica, para luego realizar la búsqueda por (RT)-PCR en las materias fecales equinas y estudiar el posible rol de los agentes detectados como causantes de diarrea. El análisis propuesto incluye la reconstrucción por bioinformática de las secuencias encontradas y ante la confirmación de los resultados, la comunicación de los mismos a través de una publicación científica.

Discusión

Discusión

Las diarreas neonatales representan uno de los síndromes clínicos más relevantes y frecuentes en potrillos menores de 6 meses de edad (Magdesian et al., 2014). Estos cuadros diarreicos pueden deberse a etiología infecciosa y no infecciosa, dentro de las primeras, Rotavirus grupo A representa el principal agente viral asociado a diarreas en potrillos a nivel mundial (Frederick et al., 2009; Magdesian et al., 2014), reconocido como tal desde la década del '80 (Estes and Greenberg, 2013).

El laboratorio de Virus Equinos del Instituto de Virología de INTA, comenzó a estudiar las diarreas por RVA en potrillos de razas deportivas de Argentina, principalmente de raza Sangre Pura de Carrera, desde el año 1992 con la creación del Convenio de Vinculación Tecnológica INTA–Haras. A partir del servicio de diagnóstico brindado en este contexto, se formó una colección de muestras de materia fecal positivas y negativas para este virus desde 1992 a la fecha. En trabajos previos, se estableció que las variantes G3P[12] y G14P[12] constituyen las cepas prevalentes desde el punto de vista epidemiológico en Argentina (Garaicoechea et al., 2011); con el hallazgo puntual de un caso de diarrea en potrillos asociado a una cepa de RVA G3P[3], que representaría una infección inter especie con un virus de origen felino/canino (Miño et al., 2013). En colaboración con el Instituto Rega de Bélgica y el RCWG se realizó el estudio de los genomas completos de estas cepas, determinándose que el genoma de los RVA equinos es altamente conservado, conteniendo dos alelos sólo para las proteínas VP7 (G3, G14), VP6 (I2, I6) y NSP4 (E2, E12) (Matthijnssens et al., 2012). Continuando con esta línea de investigación, en el presente trabajo de tesis se profundizaron varios aspectos de la epidemiología, la evolución y la estructura de los Rotavirus que infectan a los equinos.

En el 1° capítulo se describió la validación de métodos de diagnóstico diseñados para humanos y bovinos para su uso con muestras equinas (Miño et al., 2015). Los ensayos de diagnóstico rápido de RVA permiten aplicar un tratamiento paliativo inmediatamente, para reducir el impacto negativo de la enfermedad y evitar que la infección se disemine (Magdesian et al., 2014; Nemoto et al., 2010).

Además, no se necesita de personal altamente entrenado, ni de equipo de laboratorio sofisticado para realizar este tipo de ensayos. Como resultado de este estudio, se determinó que el *FASTest*® Rota strip fue el más preciso, con la mayor sensibilidad y especificidad para la detección de RVA en materia fecal de potrillos con diarrea. Asimismo, nuestro ensayo ELISA KERI mostró una precisión aceptable (detrás del *FASTest*® Rota strip), en lo referido a sensibilidad y especificidad con la ventaja adicional que el costo es 10 veces más bajo que los reactivos comerciales y permite analizar un gran número de muestras simultáneamente bajo condiciones estándares de laboratorio (Miño et al., 2015). Por otra parte, el estudio de la secuencia de aminoácidos y del modelo estructural de la proteína VP6 mostró que muchas de las diferencias aminoacídicas mapean en o cerca de los sitios antigénicos en el dominio H (ápice de VP6). Estas diferencias explican las variaciones antigénicas entre los genotipos I2 e I6, las cuales tienen importantes implicancias al momento de realizar el diagnóstico de los RVA equinos (Miño et al., 2016).

En el 2° capítulo se describió la epidemiología molecular de los RVA equinos que han circulado en la Argentina desde 2009 a 2014, información complementaria a la descrita en estudios previos (Garaicoechea et al., 2011;), lo que permite profundizar el conocimiento de lo acontecido con esta infección viral desde la década del 90 hasta el presente. El estudio realizado confirma que G3P[12] y G14P[12] continúan siendo los genotipos predominantes en concordancia con lo observado previamente en Argentina (Garaicoechea et al., 2011; Miño et al., 2015) y en el resto del mundo (Bailey et al., 2013; Matthijnsens et al., 2015; Papp et al., 2013).

Durante el período estudiado se observó una fluctuación en la prevalencia anual entre los genotipos de RVA G3 y G14, tal como se describe en humanos (Degiuseppe et al., 2016). Este comportamiento, que bien podría deberse a la presión de selección ejercida por la vacunación sistemática con la cepa G3, también podría estar influenciado por las características intrínsecas naturales de la infección de acuerdo a lo que revelan los estudios filodinámicos realizados. Esto es que, los altos niveles de anticuerpos poblacionales generados por la infección de un genotipo en un año determinado promueven el aumento de la prevalencia del

otro genotipo al año siguiente, estableciéndose así una alternancia natural entre los genotipos virales que producen la enfermedad (Degiuseppe et al., 2016; Matthijnsens et al., 2015). Esta observación evidencia la importancia de mantener los programas de vigilancia epidemiológica constante de las enfermedades infecciosas, en este caso, permite visualizar la necesidad de contar con una herramienta de prevención específica de las infecciones con RVA G14P[12].

A partir de del estudio de RVA equinos de Argentina y en el resto del mundo, sumados a la información generada respecto de las cepas de RVA detectadas en otras especies de Sudamérica - incluyendo humanos, bovinos, caprinos y camélidos sudamericanos- en el 3° capítulo se realizó un análisis evolutivo y filodinámico de estos virus y de la infección. Este análisis dio como resultado varios hallazgos muy interesantes y novedosos respecto a la evolución de este virus; los datos obtenidos permitieron concluir que el origen de las cepas se remontan hasta el momento mismo de la introducción de los primeros equinos y bovinos a Sudamérica, específicamente a la región del Rio de la Plata, realizada durante la 1^{ra} Fundación de Buenos Aires en 1.536 por Pedro de Mendoza (Bernand, 2005; Cabrera, 1945).

Los Rotavirus tienen la capacidad de generar cambios en su genoma por medio de tres mecanismos generales, las mutaciones puntuales, las cuales se acumulan y producen el cambio gradual de las cepas, la reasociación de segmentos en la infección simultánea con dos cepas distintas, y la interacción entre proteínas virales que favorece las combinaciones que poseen mejor eficacia biológica. (McDonald et al., 2016). Los análisis evolutivos muestran que las cepas de RVA G3 y G14 equinas presentan linajes con correlación geográfica, siendo las cepas de Sudamérica monofiléticas para los genotipos de VP7 (G3, G14) y VP6 (I2 e I6), lo que pone en evidencia que estas cepas poseen un único ancestro común, el cual por medio de las mutaciones puntuales (primer mecanismo evolutivo), fue adquiriendo una identidad que los distingue de los RVA equinos Europeos o Asiáticos. Además, los análisis de topologías mostraron que la población viral no se encuentra sometida a presiones selectivas (inmunológicas), lo que se observa también en los análisis filodinámicos que muestran que la diversidad genética de la población se mantiene constante a través del tiempo (Norström et al., 2012; Volz et

al., 2013). Interesantemente, el análisis filogenético de la proteína NSP4 (E12), muestra una correlación perfecta con la época en que los caballos fueron introducidos a nuestro continente. Este, podría constituir un modelo de cómo un gen primitivo (E12) fue tomado de los RVA circulantes en una especie autóctona de la región (los guanacos) (de Lamo, 2011), y fue fijado en la población de RVA de los equinos de Sudamérica hasta la actualidad (segundo mecanismo evolutivo). El gen de NSP4, podría considerarse un gen marcador ya que permite diferenciar los RVA equinos de Sudamérica de los Europeos ó Asiáticos. Más interesante aun es el hecho de que este gen ha sido fijado no sólo en equinos sino en la mayoría de las especies introducidas en el continente americano como caprinos (Louge et al., 2014), bovinos (Badaracco et al., 2014), y hasta ha sido detectado en humanos (Martinez et al., 2014). Este resultado abre un conjunto de nuevos interrogantes y una línea de investigación del estudio de interacción de esta enterotoxina viral con los receptores celulares presentes en cada especie.

A partir del hallazgo de variantes virales que escapaban a su detección en los métodos de ELISA monoclonal (capítulo 2), en el 4^{to} capítulo se realizaron estudios estructurales que describen la interacción entre variantes específicas de VP6 y VP7 (G3:I6 y G14:I2), que portan los RVA equinos (Miño et al., 2016). Conociendo el hecho de que las interacciones de proteínas virales juegan un rol en la co-evolución de los genes (tercer mecanismo evolutivo) de los virus con ARN segmentado (Dugan et al., 2008; Graham et al., 1987; Heiman et al., 2008; Lubeck et al., 1979; Nibert et al., 1996; Trask et al., 2012; McDonals et al., 2016), los cuales restringen la generación de partículas virales viables y la capacidad para infectar distintas especies animales. Teniendo en consideración estas investigaciones y basándonos en métodos genómicos y estructurales, nuestro trabajo aporta evidencia del ligamiento genético entre las proteínas VP7 y VP6 (G3:I6 y G14:I2) de los genes de RVA equino, los cuales pueden ser explicados por interacciones proteína-proteína que definen la capacidad biológica de los viriones de RVA, restringiendo la recombinación de cepas que infectan el mismo huésped (Miño et al., 2016).

Finalmente, dado que del total de casos de diarrea que ingresan al servicio diagnóstico, alrededor del 75% permanecen sin diagnóstico etiológico (capítulo 2),

y que esta situación es similar en otros laboratorios de Argentina, de Estados Unidos y Europa (Frederick et al., 2009; Matthijnssens et al., 2015), en el 5^{to} capítulo de este trabajo de tesis, se realizó la búsqueda de otros agentes potenciales causantes de diarrea en equinos. En una primera etapa, se utilizaron métodos de uso cotidiano en el laboratorio (ELISAs y RT-PCR) (Mauroy et al., 2009; Miszczak et al., 2014; Oue et al., 2011; Pusterla et al., 2013). Esta aproximación diagnóstica arrojó resultados no concluyentes o negativos en cuanto a los agentes estudiados, Norovirus y Coronavirus. Por tal motivo, se realizaron estudios de metagenómica (*next generation sequencing*) de un pool de las materias fecales equinas (Conceição-neto et al., 2015). Como resultado se obtuvo el *viroma* de las materias fecales equinas en condiciones de diarrea, detectando varios agentes virales (Coronavirus, Norovirus, Picornavirus, Parvovirus y Mamastrovirus), que podrían estar relacionados con el cuadro de diarrea de los potrillos. Estos resultados, si bien preliminares, abren un área de investigación que se iniciará con la confirmación del hallazgo de cada agente y la reconstrucción de los genomas completos de los mismos. Luego, a partir del diseño de métodos diagnósticos específicos para cada uno, podremos estudiar su implicancia real en las diarreas de los potrillos, así como su rol epidemiológico. Este conocimiento permitirá la toma de decisiones respecto de la prevención y control de las diarreas en potrillos, hasta el momento focalizados únicamente en Rotavirus.

Los resultados de este trabajo de tesis aportan conocimiento sobre los métodos diagnósticos utilizados para detectar RVA en equinos y explican la razón por la cual algunos reactivos comerciales fallan en detectar a uno de los RVA equinos predominantes. Además, describen la evolución de los RVA en equinos, aportando datos sobre relaciones geográficas y ancestrales que permiten plantear teorías históricas de cómo se generaron estas características moleculares. Explican la asociación de las proteínas estructurales y describen el mecanismo por medio del cual se produce el ligamiento genético. Finalmente también se aportan datos sobre otros agentes que podrían estar implicados en la generación de este síndrome clínico a través del conocimiento del viroma de las materias fecales en condiciones de diarrea de los potrillos de la Argentina.

Perspectivas

Si bien este trabajo de tesis aportó considerablemente al conocimiento de la infección por RVA en potrillos, sobre todo en la epidemiología y en la estructura y evolución viral, son también numerosos los interrogantes que quedan sin respuesta y que constituyen hipótesis de trabajo muy interesantes para explorar.

Instrumentar en forma permanente la vigilancia epidemiológica de RVA, de modo de detectar inmediatamente la circulación de nuevos genotipos y cepas antigénicamente distintas.

Continuar con los esfuerzos para obtener una cepa de RVA G14P[12] adaptada a la multiplicación en cultivos celulares para ser incorporada en la vacuna y de ese modo contribuir en la prevención de las diarreas en potrillos.

Analizar mayor número de muestras para estudiar el “viroma” de la materia fecal de potrillos con diarrea y profundizar el análisis de los resultados de metagenómica, para establecer definitivamente el rol de los agentes virales detectados como causantes de diarrea.

Referencias

- Adlhoch, C., Kaiser, M., Hoehne, M., Mas Marques, A., Stefas, I., Veas, F., Ellerbrok, H., 2011. Highly sensitive detection of the group A Rotavirus using Apolipoprotein H-coated ELISA plates compared to quantitative real-time PCR. *Virol J* 8, 63. doi:1743-422X-8-63 [pii]\r10.1186/1743-422X-8-63
- Alfred, N., Liu, H., Li, M.L., Hong, S.F., Tang, H.B., Wei, Z.Z., Chen, Y., Li, F.K., Zhong, Y.Z., Huang, W.J., 2015. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of diverse bovine astroviruses associated with diarrhea in cattle and water buffalo calves in China. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 643–651. doi:10.1292/jvms.14-0252
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Aoki, S.T., Settembre, E.C., Trask, S.D., Greenberg, H.B., Harrison, S.C., Dormitzer, P.R., 2009. Structure of Rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science* (80-.). 324, 1444–1447. doi:10.1126/science.1170481
- Badaracco, A., Garaicoechea, L., Matthijnsens, J., Parreño, V., 2014. Epidemiology of Rotavirus Infection in cattle, small ruminants and horses, in: Zeni, C. (Ed.), *Rotavirus Infections*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 79–116.
- Bailey, K.E., Gilkerson, J.R., Browning, G.F., 2013. Equine rotaviruses—Current understanding and continuing challenges. *Vet. Microbiol.* 167, 135–144. doi:10.1016/j.vetmic.2013.07.010
- Barrandeguy, M., Parreno, V., Lagos Marmol, M., Pont Lezica, F., Rivas, C., Valle, C., Fernandez, F., 1998. Prevention of rotavirus diarrhoea in foals by parenteral vaccination of the mares: field trial. *Dev Biol Stand* 92, 253–257.
- Barros, I.N., Silva, S.O.S., Neto, F.S.N., Asano, K.M., Souza, S.P., Richtzenhain, L.J., Brandao, P.E., 2013. A Multigene Approach for Comparing Genealogy of Betacoronavirus from Cattle and Horses. *Sci. World J.* 1–6.
- Benati, F.J., Maranhao, A.G., Lima, R.S., da Silva, R.C., Santos, N., 2010. Multiple-gene characterization of rotavirus strains: evidence of genetic linkage among the VP7-, VP4-, VP6-, and NSP4-encoding genes. *J Med Virol* 82, 1797–1802.
- Bernand, C., 2005. *Historia de Buenos Aires*. S.L. FONDO DE CULTURA ECONOMICA DE ESPAÑA, Buenos Aires.
- Bodewes, R., Ruiz-Gonzalez, A., Schapendonk, C.M., van den Brand, J.M., Osterhaus, A.D., Smits, S.L., 2014. Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. *Virol. J.* 11, 89. doi:10.1186/1743-422X-11-89
- Browning, G.F., Chalmers, R.M., Fitzgerald, T.A., Snodgrass, D.R., 1991. Serological and genomic characterization of L338, a novel equine group A rotavirus G serotype. *J. Gen. Virol.* 72, 1059–1064.
- Brugere-Picoux, J., Tessier, P., 2010. [Viral gastroenteritis in domestic animals and zoonoses]. *Bull. Acad. Natl. Med.* 194, 1439–49.
- Cabrera, Á., 1945. *Caballos de América*. Editorial Sudamericana, Buenos Aires.
- Candido, M., Alencar, A.L.F., Almeida-Queiroz, S.R., Buzinaro, M. da G., Munin, F.S., de Godoy, S.H.S., Livonesi, M.C., Fernandes, A.M., de Sousa, R.L.M., 2015. Molecular detection and phylogenetic analysis of bovine astrovirus in Brazil. *Arch. Virol.* 160, 1519–1525. doi:10.1007/s00705-015-2400-8
- Candido, M., Batinga, M.C.A., Alencar, A.L.F., de Almeida-Queiroz, S.R., da Glória Buzinaro, M., Livonesi, M.C., Fernandes, A.M., de Sousa, R.L.M., 2017. Molecular characterization and genetic diversity of bovine Kobuvirus, Brazil. *Virus Genes* 53, 105–110. doi:10.1007/s11262-016-1391-1
- Cao, D., Barro, M., Hoshino, Y., 2008. Porcine Rotavirus Bearing an Aberrant Gene Stemming from an Intergenic Recombination of the NSP2 and NSP5 Genes Is Defective and Interfering. *J. Virol.* 82, 6073–6077. doi:10.1128/JVI.00121-08

- Charpilienne, A., Lepault, J., Rey, F., Cohen, J., 2002. Identification of Rotavirus VP6 Residues Located at the Interface with VP2 That Are Essential for Capsid Assembly and Transcriptase Activity. *J. Virol.* 76, 7822–7831. doi:10.1128/jvi.76.15.7822-7831.2002
- Chen, J.Z., Settembre, E.C., Aoki, S.T., Zhang, X., Bellamy, A.R., Dormitzer, P.R., Harrison, S.C., Grigorieff, N., 2009. Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 10644–10648. doi:10.1073/pnas.0904024106
- Cho, Y.-Y., Lim, S.-I., Kim, Y.K., Song, J.-Y., Lee, J.-B., An, D.-J., 2014. Molecular characterisation and phylogenetic analysis of feline astrovirus in Korean cats. *J. Feline Med. Surg.* 16, 679–683. doi:10.1177/1098612X13511812
- Ciarlet, M., ISA, P., Conner, M.E., Liprandi, F., 2001. Antigenic and Molecular Analyses Reveal that the Equine Rotavirus Strain H-1 is Closely Related to Porcine, but not Equine, Rotaviruses: Interspecies Transmission from Pigs to Horses? *Virus Genes* 22, 5–20.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772.
- de Lamo, D.A., 2011. Camélidos Sudamericanos, historia, usos y sanidad animal. SENASA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Degiuseppe, J.I., Reale, E.A., Stupka, J.A., Argentine Rotavirus Surveillance Network, 2016. Rotavirus epidemiology and surveillance before vaccine introduction in Argentina, 2012–2014. *J. Med. Virol.* doi:10.1002/jmv.24650
- Dennis, A.F., Mcdonald, S.M., Payne, D.C., Mijatovic-rustempasic, S., Esona, M.D., Edwards, K.M., Chappell, J.D., Patton, J.T., 2014. Molecular Epidemiology of Contemporary G2P [4] Human Rotaviruses Cocirculating in a Single U.S. Community: Footprints of a Globally. *J. Virol.* 88, 3789–3801. doi:10.1128/JVI.03516-13
- Donker, N.C., Boniface, K., Kirkwood, C.D., 2011. Phylogenetic analysis of rotavirus A NSP2 gene sequences and evidence of intragenic recombination. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1602–1607. doi:10.1016/j.meegid.2011.05.024
- Donker, N.C., Kirkwood, C.D., 2012. Infection, Genetics and Evolution Selection and evolutionary analysis in the nonstructural protein NSP2 of rotavirus A. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1355–1361. doi:10.1016/j.meegid.2012.05.002
- Dóro, R., Farkas, S.L., Martella, V., Bányai, K., 2015. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 13, 1337–1350. doi:10.1586/14787210.2015.1089171
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–1973. doi:10.1093/molbev/mss075
- Dugan, V.G., Chen, R., Spiro, D.J., Sengamalay, N., Zaborsky, J., Nolting, J., Swayne, D.E., Runstadler, J.A., Happ, G.M., Dennis, A., Wang, R., Slemmons, R.D., Holmes, E.C., Taubenberger, J.K., 2008. The Evolutionary Genetics and Emergence of Avian Influenza Viruses in Wild Birds. *Plos Pathog.* 4, e1000076. doi:10.1371/journal.ppat.1000076
- Estes, M.K., Greenberg, H.B., 2013. Rotaviruses, in: Knipe, D.M., Howley, P. (Eds.), *Fields Virology*. Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins, 2001 Market Street, Philadelphia, PA 19103, USA., pp. 1347–1401.
- Ferragut, F., Vega, C.G., Mauroy, A., Conceição-Neto, N., Zeller, M., Heylen, E., Uriarte, E.L., Bilbao, G., Bok, M., Matthijnsens, J., Thiry, E., Badaracco, A., Parreño, V., 2016. Molecular detection of bovine Noroviruses in Argentinean dairy calves: Circulation of a tentative new genotype. *Infect. Genet. Evol.* 40, 144–150. doi:10.1016/j.meegid.2016.02.034
- Flewett, T.H., Bryden, A.S., Davies, H., 1975. Letter: Virus diarrhoea in foals and other animals. *Vet Rec* 96, 477.
- Frederick, J., Giguere, S., Sanchez, L.C., 2009. Infectious Agents Detected in the Feces of Diarrheic Foals: A Retrospective Study of 233 Cases (2003–2008). *J. Vet. Intern. Med.* 23, 1254–1260. doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0383.x

- Garaicoechea, L., Miño, S., Ciarlet, M., Fernández, F., Barrandeguy, M., Parreño, V., 2011. Molecular characterization of equine rotaviruses circulating in Argentinean foals during a 17-year surveillance period (1992-2008). *Vet. Microbiol.* 148, 150–160.
- Ghosh, S., Taniguchi, K., Aida, S., Ganesh, B., Kobayashi, N., 2013. Whole genomic analyses of equine group A rotaviruses from Japan: Evidence for bovine-to-equine interspecies transmission and reassortment events. *Vet. Microbiol.* 166, 474–485. doi:10.1016/j.vetmic.2013.07.016
- Gonzalez Arguedas, M., 2007. Coronavirus Infections, in: Sellon, D.C., Long, M.T. (Eds.), *Equine Infectious Diseases*. Saunders Elsevier, 11830 Westline Industrial line, St. Louis, Missouri 63146, USA., pp. 184–185.
- Graham, A., Kudesia, G., Allen, a M., Desselberger, U., 1987. Reassortment of human rotavirus possessing genome rearrangements with bovine rotavirus: evidence for host cell selection. *J. Gen. Virol.* 68 (Pt 1), 115–22. doi:10.1099/0022-1317-68-1-115
- Greiner, M., Pfeiffer, D., Smith, R., 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45, 23–41. doi:10.1016/S0167-5877(00)00115-X
- Grenfell, B.T., Pybus, O.G., Gog, J.R., Wood, J.L.N., Daly, J.M., Mumford, J.A., Holmes, E.C., 2004. Unifying the Epidemiological and Evolutionary Dynamics of Pathogens. *Science* (80-.). 303, 327–332. doi:10.1126/science.1090727
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Heiman, E.M., McDonald, S.M., Barro, M., Taraporewala, Z.F., Bar-Magen, T., Patton, J.T., 2008. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J. Virol.* 82, 11106–11116.
- Isa, P., Wood, A.R., Netherwood, T., Ciarlet, M., Imagawa, H., Snodgrass, D.R., 1996. Survey of equine rotaviruses shows conservation of one P genotype in background of two G genotypes. *Arch Virol* 141, 1601–1612.
- Iturriza-Gómara, M., Anderton, E., Kang, G., Gallimore, C., Phillips, W., Desselberger, U., Gray, J., 2003. Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3566–3573.
- Iturriza-Gómara, M., Anderton, E., Kang, G., Gallimore, C., Phillips, W., Desselberger, U., Gray, J., 2003. Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3566–3573. doi:10.1128/JCM.41.8.3566-3573.2003
- Jockey Club Argentino [WWW Document], 2015. . Nacimientos 2014. URL www.studbook.com.ar
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
- Li, Z., Baker, M.L., Jiang, W., Estes, M.K., Prasad, B.V. V., 2009b. Rotavirus Architecture at Subnanometer Resolution. *J. Virol.* 83, 1754–1766. doi:10.1128/jvi.01855-08
- Liu, Y., Huang, P., Tan, M., Biesiada, J., Meller, J., Castello, A.A., Jiang, B., Jiang, X., 2012. Rotavirus VP8*: Phylogeny, Host Range, and Interaction with Histo-Blood Group Antigens. *J Virol* 86, 9899–9910. doi:10.1128/jvi.00979-12
- Louge, E.L., Badaracco, A., Matthijnssens, J., Ranst, M. Van, Heylen, E., Manazza, J., Min, S., Parren, V., Produccio, D., 2014. The first caprine rotavirus detected in Argentina displays genomic features resembling virus strains infecting members of the Bovidae and Camelidae. *Vet. Microbiol.* 171, 189–197. doi:10.1016/j.vetmic.2014.03.013
- Lubeck, M.D., Palese, P., Schulman, J.L., 1979. Nonranom association of parental genes in influenza A virus recombinants. *Virology* 95, 269–274. doi:10.1016/0042-6822(79)90430-6
- Ma, Y., Wen, X., Hoshino, Y., Yuan, L., 2015. Cloning and nucleotide sequence analyses of 11 genome

- segments of two American and one British equine rotavirus strains. *Vet. Microbiol.* 176, 172–178. doi:10.1016/j.vetmic.2015.01.008
- Magdesian, K.G., Dwyer, R.M., Gonzalez Arguedas, M., 2014. Viral Diarrhea, in: Sellon, D.C., Long, M.T. (Eds.), *Equine Infectious Diseases*. Saunders, Elsevier Inc., 3251 Riverport Lane St. Louis, Missouri 63043, pp. 198–203.
- Magdesian, K.G., Dwyer, R.M., Gonzalez Arguedas, M., 2014. Viral Diarrhea, in: Sellon, D.C., Long, M.T. (Eds.), *Equine Infectious Diseases*. Saunders Elsevier, 3251 Riverport Lane, St. Louis, Missouri 63043, pp. 198–203.
- Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 140, 246–255. doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.028
- Marthaler, D., Suzuki, T., Rossow, K., Culhane, M., Collins, J., Goyal, S., Tsunemitsu, H., Ciarlet, M., 2014. VP6 genetic diversity, reassortment, intragenic recombination and classification of rotavirus B in American and Japanese pigs. *Vet. Microbiol.* 172, 359–366. doi:10.1016/j.vetmic.2014.05.015
- Martinez, M., Gia, T., Eugenia, M., Russomando, G., Parreno, V., Delwart, E., Parra, G.I., 2014. Genomic characterization of a rotavirus G8P [1] detected in a child with diarrhea reveal direct animal-to-human transmission. *Infect. Genet. Evol.* 27, 402–407. doi:10.1016/j.meegid.2014.08.015
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B. V., Cohen, J., Rey, F.A., 2001. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO J.* 20, 1485–1497.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P.C., Nakagomi, O., Patton, J.T., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol* 153, 1621–1629. doi:10.1007/s00705-008-0155-1
- Matthijnssens, J., Heylen, E., Zeller, M., Rahman, M., Lemey, P., Van Ranst, M., 2010. Phylogenetic Analyses of Rotavirus Genotypes G9 and G12 Underscore Their Potential for Swift Global Spread. *Mol. Biol. Evol.* 27, 2431–2436. doi:10.1093/molbev/msq137
- Matthijnssens, J., Miño, S., Papp, H., Potgieter, C., Novo, L., Heylen, E., Zeller, M., Garaicoechea, L., Badaracco, A., Lengyel, G., Kisfali, P., Cullinane, A., Collins, P.J., Ciarlet, M., O’Shea, H., Parreño, V., Bányai, K., Barrandeguy, M., van Ranst, M., 2012. Complete molecular genome analyses of equine rotavirus strains from different continents reveal several novel genotypes and a largely conserved genotype constellation. *J. Gen. Virol.* 93, 866–875.
- Matthijnssens, J., Ons, E., De Coster, S., Conceição-Neto, N., Gryspeerdt, A., Van Ranst, M., Raue, R., 2015. Molecular characterization of equine rotaviruses isolated in Europe in 2013: Implications for vaccination. *Vet. Microbiol.* 176, 179–185. doi:10.1016/j.vetmic.2015.01.011
- Matthijnssens, J., Theuns, S., 2015. Rotavirus Classification Working Group (RCWG) 7th meeting, in: Minutes of the 7th Rotavirus Classification Working Group (RCWG). 12th International Double Stranded RNA Virus Symposium. Goa Marriot Beach Resort & Spa, Goa, India, pp. 1–7.
- Mauroy, A., Scipioni, A., 2008. Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. *Arch Virol* 153, 1927–1931. doi:10.1007/s00705-008-0189-4
- Mauroy, A., Scipioni, A., Mathijs, E., Thys, C., Thiry, E., 2009. Molecular detection of kobuviruses and recombinant noroviruses in cattle in continental Europe. *Arch Virol* 154, 1841–1845. doi:10.1007/s00705-009-0518-2
- McClain, B., Settembre, E., Temple, B.R.S., Bellamy, A.R., Harrison, S.C., 2010. X-ray Crystal Structure of the Rotavirus Inner Capsid Particle at 3.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 397, 587–599. doi:10.1016/j.jmb.2010.01.055
- McDonald, S.M., Aguayo, D., Gonzalez-Nilo, F.D., Patton, J.T., 2009. Shared and Group-Specific Features of the Rotavirus RNA Polymerase Reveal Potential Determinants of Gene Reassortment Restriction. *J Virol* 83, 6135–6148. doi:10.1128/jvi.00409-09

- Mcdonald, S.M., Matthijssens, J., Mcallen, J.K., Hine, E., Overton, L., Wang, S., Lemey, P., Zeller, M., Ranst, M. Van, Spiro, D.J., Patton, J.T., 2009. Evolutionary Dynamics of Human Rotaviruses : Balancing Reassortment with Preferred Genome Constellations. *Plos Pathog.* 5, e1000634. doi:10.1371/journal.ppat.1000634
- Mcdonald, S.M., Nelson, M.I., Turner, P.E., Patton, J.T., 2016. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 303498822. doi:10.1038/nrmicro.2016.46
- Melegari, I., Di Profio, F., Sarchese, V., Martella, V., Marsilio, F., Di Martino, B., 2016. First molecular evidence of kobuviruses in goats in Italy. *Arch. Virol.* 161, 3245–3248. doi:10.1007/s00705-016-3017-2
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees., in: *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, Nov 14th. New Orleans, LA, pp. 1–8.
- Miño, S., Barrandeguy, M., Parreño, V., Parra, G.I., 2016. Genetic linkage of capsid protein-encoding RNA segments in group A equine rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 97, 912–921. doi:10.1099/jgv.0.000397
- Miño, S., Kern, A., Barrandeguy, M., Parreño, V., 2015. Comparison of two commercial kits and an in-house ELISA for the detection of equine rotavirus in foal feces. *J Virol Methods* 222, 1–10. doi:S0166-0934(15)00179-2 [pii] 10.1016/j.jviromet.2015.05.002
- Miño, S., Matthijssens, J., Badaracco, A., Garaicoechea, L., Zeller, M., Heylen, E., 2013. Equine G3P [3] rotavirus strain E3198 related to simian RRV and feline / canine-like rotaviruses based on complete genome analyses. *Vet. Microbiol.* 161, 239–246. doi:10.1016/j.vetmic.2012.07.033
- Moser, L.A., Schultz-Cherry, S., 2005. Pathogenesis of Astrovirus Infection. *Viral Immunol.* 18, 4–10. doi:10.1089/vim.2005.18.4
- Munnink, B., Hoek, L., 2016. Viruses Causing Gastroenteritis: The Known, The New and Those Beyond. *Viruses* 8, 42. doi:10.3390/v8020042
- Murcia, P.R., Wood, J.L.N., Holmes, E.C., 2011. Genome-scale evolution and phylodynamics of equine H3N8 influenza A virus. *J. Virol.* 85, 5312–5322. doi:10.1128/JVI.02619-10
- Nemoto M., Evelyn Ryan, Pamela Lyons, Ann Cullinane, 2017. Molecular characterization of equine group A rotaviruses circulating in Ireland from 2011 to 2015. *The Veterinary Journal*, YTVJL-D-16-00572R1 in press.
- Nemoto, M., Nagai, M., Tsunemitsu, H., Omatsu, T., Furuya, T., Shirai, J., Kondo, T., Fujii, Y., Todaka, R., Katayama, K., Mizutani, T., 2015. Whole-genome sequence analysis of G3 and G14 equine group A rotaviruses isolated in the late 1990s and 2009–2010. *Arch Virol* 160, 1171–1179. doi:10.1007/s00705-015-2374-6
- Nemoto, M., Tsunemitsu, H., Murase, H., Nambo, Y., Sato, S., Orita, Y., Imagawa, H., Bannai, H., Tsujimura, K., Yamanaka, T., Matsumura, T., Kondo, T., 2012. Antibody response in vaccinated pregnant mares to recent G3BP[12] and G14P[12] equine rotaviruses. *Acta Vet. Scand.* 54, 5. doi:http://www.actavetscand.com/content/54/1/63
- Nibert, M.L., Margraf, R.L., Coombs, K.M., 1996. Nonrandom Segregation of Parental Alleles in Reovirus Reassortants. *J. Virol.* 70, 7295–7300.
- Norström, M.M., Karlsson, A.C., Salemi, M., 2012. Towards a new paradigm linking virus molecular evolution and pathogenesis : experimental design and phylodynamic inference. *New Microbiol.* 35, 101–111.
- Papp, H., László, B., Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijssens, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., 2013a. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet Microbiol* 165, 190–199. doi:10.1016/j.vetmic.2013.03.020
- Papp, H., Matthijssens, J., Martella, V., Ciarlet, M., Bányai, K., 2013b. Global distribution of group A rotavirus strains in horses: A systematic review. *Vaccine* 31, 5627–5633. doi:10.1016/j.vaccine.2013.08.045
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004.

- UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084
- Powell, D.G., Dwyer, R.M., Traub-Dargatz, J.L., Fulker, R.H., Whalen Jr., J.W., Srinivasappa, J., Acree, W.M., Chu, H.J., 1997. Field study of the safety, immunogenicity, and efficacy of an inactivated equine rotavirus vaccine. *J Am Vet Med Assoc* 211, 193–198.
- Reuter, G., Boros, Á., Pankovics, P., 2011. Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev. Med. Virol.* 21, 32–41. doi:10.1002/rmv.677
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5, 725–738. doi:10.1038/nprot.2010.5
- Santos, N., Volotão, E.M., Soares, C.C., Albuquerque, M.C.M., da Silva, F.M., Chizhikov, V., Hoshino, Y., 2003. VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR. *Virus Res.* 93, 127–138. doi:10.1016/s0168-1702(02)00318-0
- Scipioni, A., Mauroy, A., Vinjé, J., Thiry, E., 2008. Animal noroviruses. *Vet. J.* 178, 32–45. doi:10.1016/j.tvjl.2007.11.012
- Sharp, C.P., Gregory, W.F., Mason, C., Bronsvort, B.M. deC, Beard, P.M., 2015. High prevalence and diversity of bovine astroviruses in the faeces of healthy and diarrhoeic calves in South West Scotland. *Vet. Microbiol.* 178, 70–76. doi:10.1016/j.vetmic.2015.05.002
- Slovic, N.M., Elam, J., Estrada, M., Leutenegger, C.M., 2013. Infectious agents associated with diarrhoea in neonatal foals in central Kentucky: A comprehensive molecular study. *Equine Vet. J.* 46, 311–316. doi:10.1111/evj.12119
- Song, D., Moon, H., Kang, B., 2015. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 4, 166. doi:10.7774/cevr.2015.4.2.166
- Song, X., Hao, Y., 2009. Adaptive evolution of rotavirus VP7 and NSP4 genes in different species. *Comput. Biol. Chem.* 33, 344–349. doi:10.1016/j.compbiolchem.2009.07.008
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Taniguchi, K., Urasawa, T., Urasawa, S., 1994. Species specificity and interspecies relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine, feline, and canine rotavirus strains. *Virology* 200, 390–400. doi:10.1006/viro.1994.1203
- Thongprachum, A., Khamrin, P., Maneekarn, N., Hayakawa, S., Ushijima, H., 2016. Epidemiology of gastroenteritis viruses in Japan: Prevalence, seasonality, and outbreak. *J. Med. Virol.* 88, 551–570. doi:10.1002/jmv.24387
- Trask, S.D., Dormitzer, P.R., 2006. Assembly of Highly Infectious Rotavirus Particles Recoated with Recombinant Outer Capsid Proteins. *J. Virol.* 80, 11293–11304. doi:10.1128/JVI.01346-06
- Trask, S.D., Ogden, K.M., Patton, J.T., 2012. Interactions among capsid proteins orchestrate rotavirus particle functions. *Curr. Opin. Virol.* 2, 373–379. doi:10.1016/j.coviro.2012.04.005
- Viera, A; Garret, J., 2005. Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic 360–363.
- Volz, E.M., Koelle, K., Bedford, T., 2013. Viral Phylodynamics. *PLOS Comput. Biol.* 9, e1002947. doi:10.1371/journal.pcbi.1002947
- Weinberg, G.A., Teel, E.N., Mijatovic-rustempasic, S., Payne, D.C., Roy, S., Foytich, K., Parashar, U.D., Gentsch, J.R., Bowen, M.D., 2013. Rotavirus Strain by Vaccine Surveillance. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1321–1323.
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Huang, Y., Yuen, K.-Y., 2009. Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping. *Exp. Biol. Med.* 10, 1117–1127. doi:10.3181/0903-MR-94

- Woods, R.J., 2015. Intrasegmental recombination does not contribute to the long-term evolution of group A rotavirus. *Infect. Genet. Evol.* 1–7. doi:10.1016/j.meegid.2015.03.035
- Xiao, C.-T., Luo, Z., Lv, S.-L., Opriessnig, T., Li, R.-C., Yu, X.-L., 2017. Identification and characterization of multiple porcine astrovirus genotypes in Hunan province, China. *Arch. Virol.* 162, 943–952. doi:10.1007/s00705-016-3185-0
- Yilmaz, H., Turan, N., Altan, E., Bostan, K., Yilmaz, A., Helps, C.R., Cho, K.O., 2011. First report on the phylogeny of bovine norovirus in Turkey 143–147. doi:10.1007/s00705-010-0833-7
- Zeller, M., Donato, C., Donker, N.C., Mcallen, J.K., Akopov, A., Kirkness, E.F., Lemey, P., Ranst, M. Van, Matthijnsens, J., Kirkwood, C.D., 2015a. Genome-Wide Evolutionary Analyses of G1P[8] Strains Isolated Before and After Rotavirus Vaccine Introduction 7, 2473–2483. doi:10.1093/gbe/evv157
- Zeller, M., Heylen, E., Damanka, S., Pietsch, C., Donato, C., Tamura, T., Kulkarni, R., Arora, R., Cunliffe, N., Maunula, L., Potgieter, C., Tamim, S., Coster, S. De, Zhirakovskaya, E., Bdour, S., Shea, H.O., Kirkwood, C.D., Seheri, M., Nyaga, M.M., Mphahlele, J., Chitambar, S.D., Dagan, R., Armah, G., Tikunova, N., Ranst, M. Van, Matthijnsens, J., 2015b. Emerging OP354-Like P [8] Rotaviruses Have Rapidly Dispersed from Asia to Other Continents 32, 2060–2071. doi:10.1093/molbev/msv088
- Zeller, M., Patton, J.T., Heylen, E., Coster, S. De, Ciarlet, M., Ranst, M. Van, Matthijnsens, J., 2012. Genetic Analyses Reveal Differences in the VP7 and VP4 Antigenic Epitopes between Human Rotaviruses Circulating in Belgium and Rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J. Clin. Microbiol.* 50, 966–976. doi:10.1128/JCM.05590-11
- Zheng, D.-P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312–323. doi:10.1016/j.virol.2005.11.015