



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR fcien.edu.uy

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

Tesis para optar al Título de Licenciada en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
FACTORES DE VIRULENCIA DEL VIRUS ORF
EN URUGUAY**

NATALIA LUCÍA LARNAUDIE PLACHOT

Tutora: Mabel Berois.

Co-tutora: Natalia Olivero.

Montevideo, Uruguay

2017

Agradecimientos

En primer lugar agradecer al Laboratorio de Virología por haberme aceptado para realizar mi tesina de grado. En particular a Mabel Berois y Natalia Olivero por haberme acompañado en este proceso como tutora y co-tutora respectivamente.

También agradecer al Dr. Santiago Mirazo y al Dr. Rodrigo Puente por haber aceptado formar parte del tribunal de evaluación de esta tesina.

A mi familia, por haberme aguantado todos estos años, con mis días enteros de estudio y de estrés previo a los exámenes. En especial a mi padre, por haberme apoyado en todo momento y haberme ayudado económicamente para poder estudiar más tranquila.

A todos mis amigos por haberme acompañado en esta etapa que está finalizando, bancándome los meses sin salir por estudiar o escribir.

Al LVM por abrirme las puertas, estar siempre dispuestos a ayudarme y haberme acompañado en esta última etapa de la tesina.

Por último agradecer a Eddie por su apoyo incondicional, por estar finalizando esta etapa conmigo todos los días, y por haber sido mi profesor particular este último tiempo.

Lista de abreviaturas:

2-5 A	2-5 adenilato sintetasa
aa	Aminoácidos
ADN	Ácido Desoxi-Ribonucleico
AR o ANK	Repeticiones de anquirina
ARNm	ARN mensajero
ARN	Ácido RiboNucleico
ARNasaL	Ribonucleasa L
BPSV	Virus de la estomatitis papular bovina
C	Citosina
CBP	Proteínas de unión a quimioquinas
DC	Células dendríticas
dh	Doble hebra
EC	Ectima Contagioso
EFC	Complejo de entrada y fusión
EtOH	Etanol
EV	Virión extracelular
G	Guanina
GIF	Factor inhibidor de la proteína GM-CSF
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
GTR	General Time Reversible
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
ITRs	Repeticiones terminales invertidas
kb	Kilobases
kDa	kilo dalton
mac	Macrófagos
MHC-II	Complejo de histocompatibilidad mayor de clase II
MPM	Marcador de peso molecular
MV	Virión maduro
NK	Natural killer
nm	Nanómetro
ORF	Open reading Frame (marco abierto de lectura)
ORFV	Virus Orf
pb	Pares de bases
PCPV	Pseudoviruela

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIGF	Factor de crecimiento de la placenta
PKR	Proteína kinasa R
PPV	Parapoxvirus
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
RNC	Región no conservada
T5NT	Motivo de terminación temprana
Th1	T-helper tipo 1
Tm	Temperatura de fusión
TNF	Factor de necrosis tumoral
VACV	Virus Vaccinia
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
vIL	Interleuquina viral
VIR	Proteína de resistencia al interferón
vVEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular viral
WVs	Viriones envueltos

Contenido

Lista de abreviaturas:.....	2
1. Introducción.....	5
1.1 Resumen.....	6
1.2 Virus Orf.....	7
1.2.1 Generalidades.....	7
1.2.2 Morfología.....	8
1.2.3 Ciclo de replicación.....	9
1.2.4 Genoma.....	13
1.2.6 Detección.....	16
1.3 La enfermedad.....	17
1.3.1 Generalidades.....	17
1.3.2 Lesiones.....	19
1.3.3 Aspectos epizootiológicos.....	20
1.3.4 Transmisión.....	21
1.3.5 Vacunación.....	21
1.4 Respuesta inmune.....	22
1.4.1 Generalidades.....	22
1.4.2 Mecanismos de evasión del sistema inmune.....	24
1.4.3 Factores de virulencia.....	25
1.5 Distribución geográfica.....	34
1.6 Antecedentes en Uruguay.....	35
2. Hipótesis y objetivos.....	37
2.1 Hipótesis.....	38
2.2 Objetivo general.....	38
2.3 Objetivos específicos.....	38
3. Materiales y métodos.....	39
3.1 Muestras.....	40
3.2 Extracción del ADN genómico viral.....	42
3.3 Oligonucleótidos empleados.....	43
3.4 Amplificación por PCR de los genes ORF020 y ORF117.....	44
3.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	45
3.6 Análisis de las secuencias y análisis filogenéticos.....	45
4. Resultados.....	46
4.1 Extracción de ADN genómico viral.....	47
4.2 Resultados de la amplificación por PCR.....	48
4.2.1 Gen ORF020.....	48
4.2.2 Gen ORF117.....	50
4.3 Secuenciación de productos de PCR.....	53
4.4 Análisis filogenético.....	53
4.4.1 Gen ORF020.....	53
4.4.2 Gen ORF117.....	57
4.5 Análisis de secuencia aminoacídica.....	64
4.5.1 Secuencia aminoacídica completa de VIR.....	64
4.5.2 Secuencia aminoacídica parcial de GIF.....	67
5. Discusión.....	71
5.1 Gen ORF020.....	73
5.2 Gen ORF117.....	78
6. Conclusiones.....	79
7. Referencias Bibliográficas.....	79



1. Introducción

1.1 Resumen

Ectima contagioso (EC) es una enfermedad de origen viral muco-cutánea altamente contagiosa de ovejas y cabras generada por el virus Orf (ORFV). Se encuentra ampliamente distribuida en nuestro país, y hasta el año 2008 la única evidencia de la presencia de ORFV fue realizada por microscopía electrónica de transmisión y el diagnóstico era clínico. A partir de dicho año en Uruguay se comenzó el estudio de los mecanismos genéticos implicados en la variabilidad de ORFV, utilizando para ello genes como ORF011, ORF132, ORF005 y ORF007. Una caracterización más precisa de las cepas virales circulantes en el país es necesaria ya que la enfermedad producida por ORFV es endémica en todo el mundo. Además, un amplio conocimiento del patrón de aminoácidos deducido de más regiones genómicas de ORFV es importante para la comprensión de la circulación del virus, la epidemiología y la evolución con el fin de ampliar nuestro conocimiento en la biología de ORFV.

Este estudio se realizó con el objetivo de profundizar en el conocimiento de cepas de ORFV vacunales y circulantes en Uruguay en el período 1979-2014 mediante la caracterización molecular de dos factores de virulencia: ORF020 que codifica una proteína de resistencia al interferón (VIR), y ORF117 el cual codifica un factor inhibidor de la proteína GM-CSF (GIF). Se realizaron estudios filogenéticos y análisis de las secuencias aminoacídicas que permitieron obtener información sobre dichas cepas y establecer relaciones y comparación entre las mismas.

En suma, para ambos genes no se observó ninguna correlación de origen geográfico, o temporal, lo que también se ha visto en varios estudios anteriores. Los análisis filogenéticos para dichos genes revelaron que los brotes recientes en ovinos uruguayos son causados por ORFVs que están estrechamente relacionados con los ORFVs encontrados en brotes anteriores y que los mismos han estado circulando en ovinos durante un largo período.

El estudio de factores de virulencia que no han sido blanco de atención en estudios anteriores en el país como los son ORF020 y ORF117 permite una mayor comprensión de la patogénesis viral y podría conducir a nuevas estrategias antivirales.

Palabras Clave

Ectima contagioso; Virus Orf; Ovinos; ORF020; ORF117; VIR; GIF.

1.2 Virus Orf

1.2.1 Generalidades

El virus Orf (ORFV), es el prototipo del género Parapoxvirus (PPV), subfamilia Chordopoxvirinae, familia *Poxviridae*, el cual también integran el virus de la estomatitis papular bovina (BPSV) , pseudoviruela (PCPV) y parapoxvirus de ciervo en Nueva Zelanda. Este virus es el agente etiológico causante de la enfermedad Ectima Contagioso (EC) (Damon, 2013). Otro miembro importante de la familia *Poxviridae* es el virus vaccinia (VACV), el cual se ha utilizado a nivel mundial como una vacuna para erradicar la viruela, una enfermedad devastadora causada por el virus de la viruela que es actualmente una importante amenaza del bioterrorismo (Cohen, 2001).

ORFV infecta ovejas y cabras y otros rumiantes a través de heridas en la piel, se replica en células epidérmicas en regeneración e induce lesiones pustulosas que se convierten en costras. Estas costras son la vía de eliminación del virus (Haig et al., 1996; 1998).

Una importante particularidad del ORFV es su alta resistencia a las condiciones medio ambientales, pudiendo sobrevivir y mantener su infectividad por más de un año, aún en condiciones de extrema sequedad y calor particularmente si se mantiene asociado al material de las costras (se estima que un gramo de costra tiene aproximadamente 1×10^{11} partículas infectivas). La temperatura afecta considerablemente la infectividad del virus, especialmente si éste es separado de las costras (Tórtora, 1987).

El tropismo y la patogenicidad de este virus frecuentemente dependen de las propiedades de los genes de defensa, los cuales pueden ser específicos de género y de especie.

Además, para mejorar su replicación ORFV puede estimular ciertas vías del hospedero, como por ejemplo, la proteína quinasa activada por mitógenos [MAPK] y phosphoinositide 3 - quinasa (PI3K) / Akt) (Moss, 2013).

1.2.2 Morfología

Hace 57 años se realizaron los primeros estudios descriptivos del virus por microscopía electrónica con tinción negativa, pudiéndose apreciar que ORFV presenta forma ovoide, con un patrón de “ovillo de estambre” en la superficie del virión y, un tamaño de 260 nm de largo por 160 nm de ancho (Figura 1) (Tórtora, 1987; Damon, 2013)

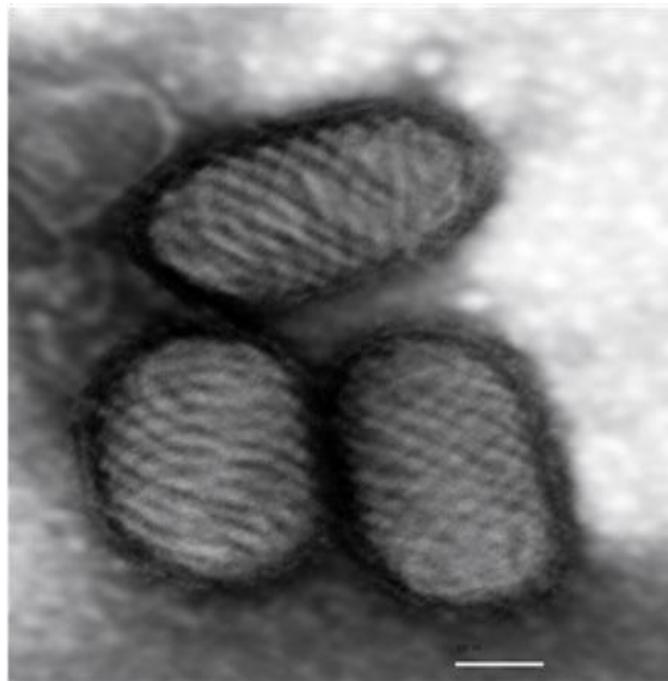


Fig. 1. Microfotografía electrónica de partículas virales de ORFV purificadas. Se observa el patrón de “ovillo de estambre” característico en los viriones con forma ovalada/ovoide (aprox. 200 nm de longitud) (**Extraído de Olivero, 2012**).

Para VACV que ha sido el integrante más estudiado de esta familia viral, se ha determinado que tiene una forma infecciosa, el virión maduro (MV), en el que la membrana externa deriva del retículo endoplásmico. Además, también se producen los viriones envueltos (WVs) en los cuales dos membranas adicionales derivadas de la red trans-Golgi envuelven al MV. La membrana exterior de esta forma se pierde durante la salida del virus para producir el virión extracelular (EV) (Figura 2). La secuencia completa del genoma ORFV reveló que tiene homólogos de la mayoría de las proteínas estructurales de VACV, lo que sugiere que su morfogénesis y su estructura pueden ser similares. Sin embargo, hay algunas excepciones notables, incluyendo genes que codifican proteínas

asociadas con las envolturas WV y EV, que sugieren posibles diferencias en su morfogénesis, el movimiento intracelular y la transmisión célula-célula (Tan, Ueda, Mercer, & Fleming, 2009).

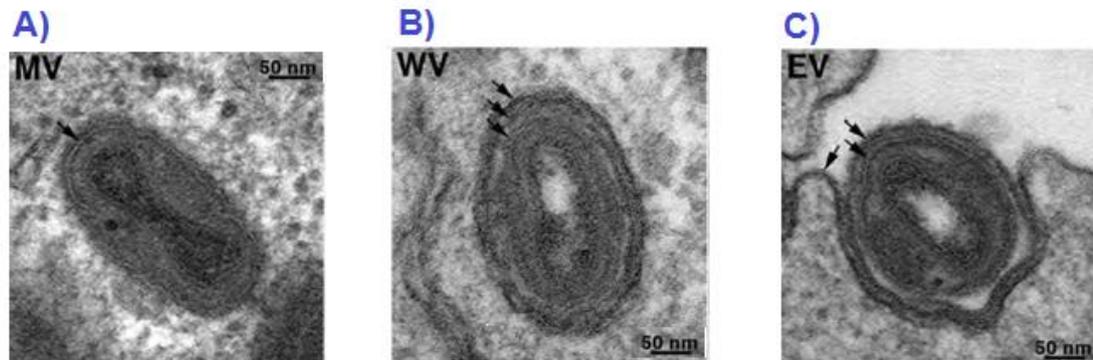


Fig. 2. Etapas de la morfogénesis en VACV. Células infectadas fueron criofracturadas y vistas por microscopía electrónica de transmisión. A) Se puede visualizar el virión maduro (MV), la flecha apunta a la única membrana externa. B) Se observa el virión envuelto (WV), la flecha interna apunta a la membrana MV y las dos flechas exteriores a la membrana de doble envoltura. C) Se muestra el virión envuelto extracelular (EV), una flecha apunta a la membrana de envoltura externa que se ha fusionado con la membrana plasmática; las otras flechas apuntan a la membrana de MV y a la envoltura EV restante. Adaptada de (Moss, 2013).

Se ha demostrado que ORFV también tiene al menos dos tipos de partículas infecciosas, MV y EV y las proteínas específicas codificadas por el virus están asociadas con estas envolturas. Partículas de ORFV semejantes a las partículas MV y WV de VACV se han descrito en secciones ultrafinas de las células infectadas. Las partículas EV se producen generalmente en niveles muy bajos en comparación con MV, pero son las que le permiten propagarse de célula a célula en el huésped infectado (Tan et al., 2009)

1.2.3 Ciclo de replicación

Al igual que otros miembros de la Familia *Poxviridae*, el ciclo replicativo de ORFV ocurre en su totalidad en el citoplasma de la célula hospedera y por lo tanto codifica para toda la maquinaria necesaria para llevar a cabo la transcripción y replicación del ADN viral, dependiendo mínimamente de factores de la célula hospedera. (Figura 3) (Haig et al., 2002). Como se mencionó previamente, existen dos formas infectivas del virus: MVs y EVs (Tan et al., 2009), que difieren en cuanto a la composición

proteica de la superficie, y por lo tanto poseen diferentes formas de ingresar a las células.

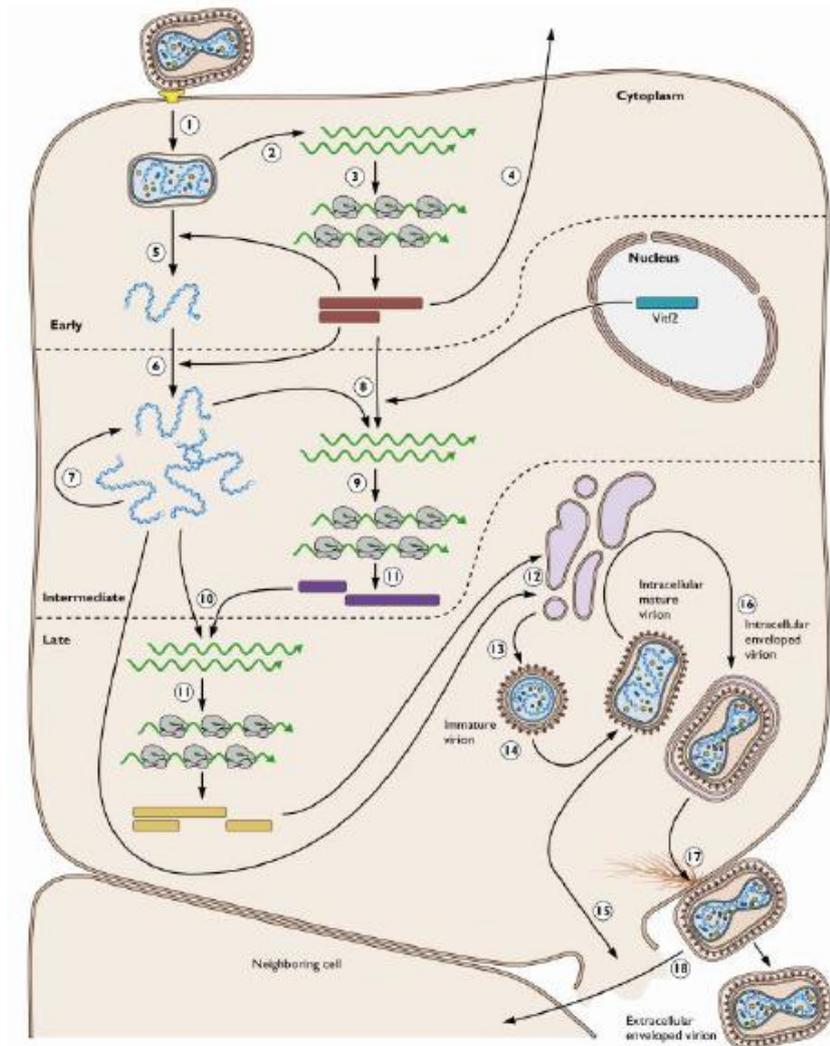


Fig. 3. Esquema del ciclo viral de los Poxvirus.
 Extraído de (Flint et al., 2003).

MV

Al ser envueltos, estos viriones ingresan a las células por fusión con la membrana plasmática o por endocitosis. La interacción de MV con la superficie celular dispara una cascada de señales que resulta en rearrreglos de la membrana y en la formación de estructuras que son

importantes para la entrada y replicación del virus. La acidificación endosomal promueve la entrada del “core” del virus al citoplasma. Muchos virus envueltos contienen una o dos proteínas que median tanto la unión como la fusión con las membranas celulares. VACV codifica al menos cuatro proteínas de unión y doce dedicadas a la entrada. Los glicosaminoglicanos y laminina presentes en la superficie celular pueden mediar la unión de los MVs (Tan et al., 2009; Moss, 2013).

Individualmente, las proteínas de unión no son esenciales, algunas de ellas (A27L y H3L) tienen dominios de unión a heparán sulfato, y éste parece tener un mayor efecto inhibitorio competitivo en cepas que preferentemente entran por un mecanismo a pH neutro (Tan et al., 2009; Moss, 2013).

La mayoría o todas las proteínas de entrada son componentes del complejo de entrada y fusión (EFC) o se encuentran asociadas a él. Éstas no son necesarias para la unión de los viriones a las células, pero la mayoría son necesarias para la fusión inicial de los virus y las membranas celulares. Esta forma de virus únicamente puede ser liberado por lisis celular (Moss, 2013).

EV

Por otro lado, como ha sido descrito anteriormente, las partículas EV son una forma extracelular de la familia Poxviridae que consiste esencialmente en un MV con una membrana adicional frágil, la cual posee composición proteica diferente y que es importante en la diseminación del virus. Esta membrana adicional generalmente se forma por un proceso de envoltura de un MV intracelular seguido por exocitosis, aunque también puede haber brotamiento del MV en la membrana plasmática. La proteína A36R de VACV presente en partículas EV induce en la célula la formación de microvellosidades (constituidas por polímeros de actina), en cuyos extremos se unirán estas partículas virales para conseguir una correcta adhesión a la superficie celular. Existen EVs que son adquiridos por las células vía endocitosis al igual que los MVs. Sin embargo, en ORFV no existe un homólogo de la A36R de VACV, lo que puede explicar por qué no se ha observado la formación de la cola de actina en células infectadas con ORFV.

Las proteínas de entrada descritas anteriormente son requeridas para la dispersión célula-célula de EVs y para la formación de sincitios. Solamente la membrana de MV es fusogénica, por lo cual la remoción de la membrana externa de EV con la exposición de la membrana MV ocurre

antes del paso de fusión. Todavía no han sido identificados los receptores proteicos específicos requeridos para la penetración del virus y podrían variar según el tipo celular (Tan et al., 2009; Moss, 2013).

Una vez ocurrida la entrada al citoplasma, el "core" del virus es transportado en microtúbulos a sitios de transcripción donde la síntesis de ARNm es detectada veinte minutos después. La expresión de los genes tiene lugar de forma ordenada. En primer lugar, un complejo de transcripción presente en el "core" de las partículas virales, permite la síntesis de ARNm virales tempranos poco tiempo después de la infección. Estos ARNm tempranos codifican enzimas y factores necesarios para la síntesis de ADN viral y para la transcripción de otros genes de la fase intermedia. El cese de la expresión génica temprana coincide con la ruptura del "core" del virus, un proceso conocido como "desnudamiento". Luego cuando comienza la transcripción de genes intermedios, estos codifican enzimas y factores para la expresión de genes tardíos. Los productos de los genes tardíos incluyen los factores de transcripción temprana, que se empaquetan con la ARN polimerasa y otras enzimas en los viriones correspondientes a la progenie. Los pasos iniciales del ensamblaje de los viriones ocurren en áreas granulares electrón-densas del citoplasma que contienen al ADN viral, y que son denominadas fábricas virales (Tan et al., 2009; Moss, 2013).

El movimiento de MVs a los sitios de envoltura depende de microtúbulos, pero la proteína viral de anclaje al mismo no se conoce. Nunca se ha visto que ORFV salga por brotamiento, lo que sugiere que el mecanismo de salida de la célula infectada es a través de la fusión con la membrana plasmática. Cuando los viriones envueltos (WV_s) llegan cerca de la periferia de la célula, la más exterior de las dos membranas de envoltura se fusiona con la membrana plasmática para liberar el EV con una membrana más que un MV. Sólo una minoría del virus liberado al exterior se encuentra en el medio, mientras que la mayoría se adhieren a la superficie celular.

1.2.4 Genoma

Del género Parapoxvirus, los genomas de los virus PCPV, ORFV y BPSV han sido totalmente secuenciados (Hautaniemi et al., 2010). Actualmente hay al menos diez genomas completos disponibles de ORFV, si bien la primeras cepas de ORFV que han sido completamente secuenciadas fueron NZ2, SA00 e IA82 (Mercer et al., 2006).

NZ2 fue aislada en Nueva Zelanda a partir de costras ovinas, y purificada en cultivo primario de células de testículos bovinos. La cepa SA00 fue aislada en Texas, Estados Unidos a partir de costras de cabra y fue propagada en células de riñón de ovino Madin-Darby. La cepa IA82 fue aislada en Iowa, Estados Unidos a partir de costra de corderos y propagada en células de feto ovino. De éstas 3 cepas, NZ2 es la más ampliamente estudiada de las tres y dentro del género Parapoxvirus (Mercer et al., 2006).

ORFV NZ2 posee un genoma ADN doble hebra lineal de aproximadamente 138kb, que se encuentra cerrado covalentemente al final. En los extremos de su genoma presenta regiones de repeticiones terminales invertidas (ITRs), las cuales consisten en secuencias idénticas pero de orientación contraria que varían en su longitud debido a las deleciones, repeticiones y transposiciones. Se observa una región central de aproximadamente 80.000 pb, en la cual se localizan 88 genes esenciales (ORFs 009-111), los cuales están presentes en todos los chordopoxvirus analizados y participan en funciones esenciales como la codificación de la maquinaria de replicación y transcripción. Esta conservación no se mantiene en los extremos del genoma donde se han producido inserciones, deleciones y translocaciones por lo cual se pueden diferenciar regiones de genes no esenciales (región no conservada). (Figura 4A) (Haig et al., 2002; Damon, 2013; Martins et al., 2014)

Este genoma presenta 132 genes putativos (Figura 4B), y la comparación del mismo con los genomas de SA00 e IA82 reveló que estos últimos también llevan los 132 genes, pero hay variaciones sustanciales de secuencia entre las cepas en un número significativo de genes ubicados en las regiones terminales, incluyendo 9 con identidad de secuencia aminoacídica inter-cepas de solamente 38%-79%. Si bien cada genoma tiene un promedio de 64% de G + C, cada uno tiene un patrón distintivo de desviación sustancial de la media en determinadas regiones del genoma (Mercer et al., 2006; Olivero, 2008; Moss, 2013)

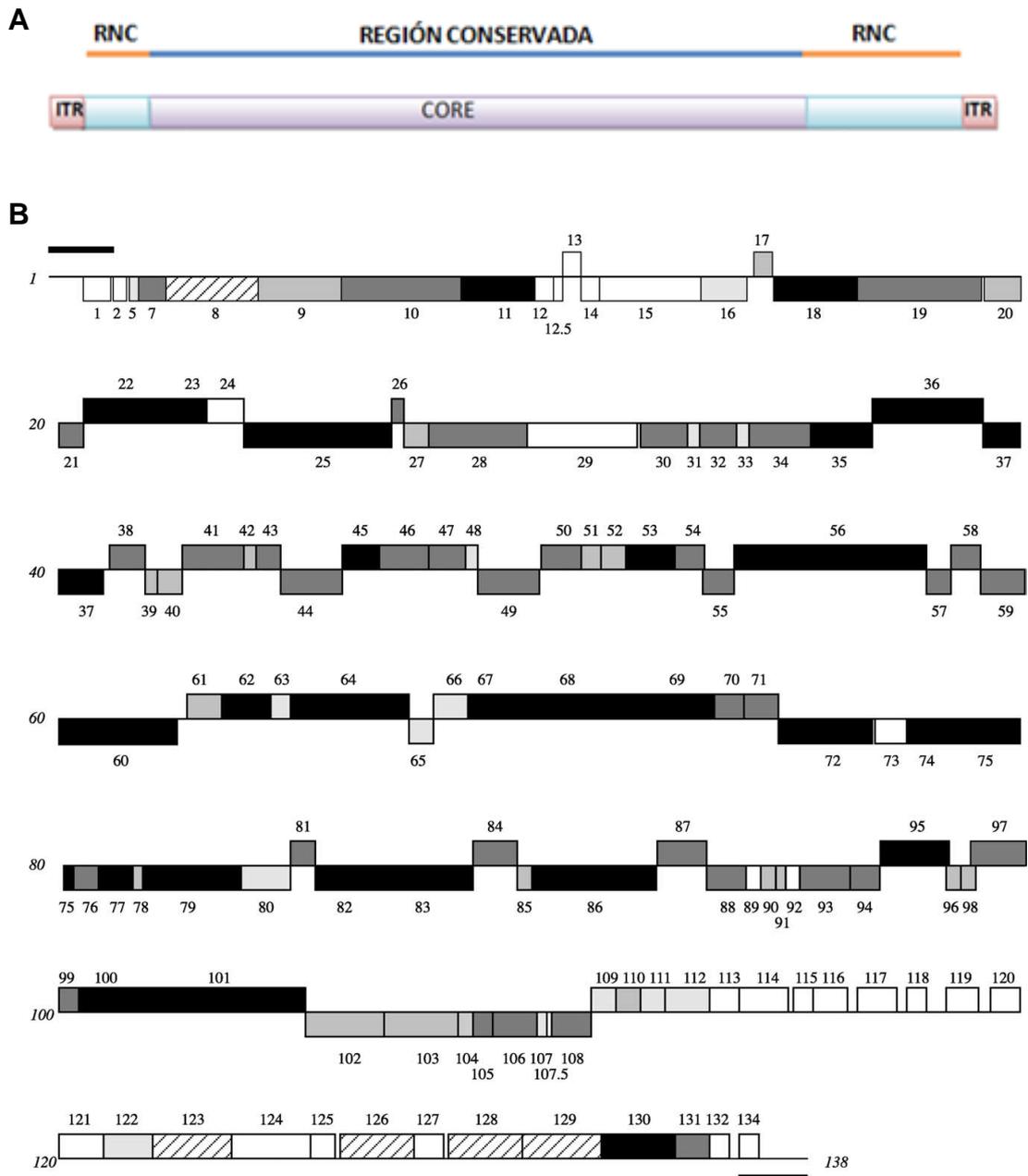


Fig. 4. A. Representación esquemática del genoma de ORFV. Se indica, ITRs (rojo), la región conservada central, y la región de genes no esenciales (región no conservada: RNC). (Extraído de Haig & McInnes, 2002). **B. Mapa genético de ORFV cepa N22.** Los genes asignados de ORFV se muestran como recuadros en una línea que representa el genoma. Aquellos recuadros que se encuentran por encima de la línea representan los genes transcritos hacia la derecha y aquellos por debajo de la línea se transcriben hacia la izquierda. Cada línea, salvo la última, corresponde a 20 kpb como lo indican los números en cursiva en la parte izquierda de cada línea. Los recuadros están sombreados para indicar la puntuación aproximada de BLASTP con el gen ortólogo en VACV. Los cuatro tonos de gris desde el más oscuro al más claro corresponden a las puntuaciones de bits superiores a 300, 100-300, 55-99 y 30-54, respectivamente. Los recuadros vacíos son aquellos genes de ORFV para los que no se detectó coincidencia significativa por BLASTP con una proteína VACV. Aquellas que poseen un rayado transversal representan los genes que codifican las proteínas con repetidos de anquirina (AR) (Extraído de Mercer et al., 2006).

En las regiones no conservadas se encuentran genes variables que tienden a ser género específico, o incluso especie específicos. Éstos no son esenciales para el crecimiento *in vivo* y participan en las interacciones con el hospedero. Entre ellos se encuentran los relacionados con la patogenicidad, incluyendo factores de virulencia y proteínas que interactúan con componentes del sistema inmune del huésped (Haig et al., 2002; Delhon et al., 2004; Moss, 2013). Estos últimos incluyen un gen que codifica a una proteína de resistencia a interferón (VIR) y posee un homólogo en VACV; un gen que codifica a un homólogo de la interleuquina 10 (vIL-10), y uno que codifica a un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), entre otros. La asociación de algunos de estos genes con la virulencia de ORFV ha sido demostrada mediante el estudio de cepas virales de campo con diferente grado de virulencia donde cepas con deleciones o mutaciones en estos genes mostraron una atenuación marcada y produjeron una pobre proliferación, resolviendo las lesiones rápidamente (Martins et al., 2014).

Además, los extremos del genoma de ORFV contienen cinco genes que codifican proteínas que contienen repeticiones de anquirina (AR o ANK). El gen ORF008, que codifica la proteína G1L fue mapeado en el extremo de la izquierda, mientras que otros cuatro genes AR codificantes de proteínas de ORFV (ORF123, 126, 128 y 129) se encuentran en el extremo derecho del genoma (Figura 4) (Lacek et al., 2014)

Si bien las proteínas de AR son comunes entre Chordopoxvirus, no se han encontrado con frecuencia en los virus, pero un gran número de proteínas celulares AR tienen un rol importante en diversos procesos biológicos como la señalización célula-célula, la integridad del citoesqueleto, regulación de la transcripción y del ciclo celular, la respuesta inflamatoria, o el transporte de proteínas (Lacek et al., 2014).

Las proteínas ANK de ORFV han demostrado ser funcionalmente activas, interactuando con componentes del complejo celular de la ubiquitina-ligasa E3. Dichas proteínas celulares facilitan la degradación de proteínas a través de la vía proteosoma-ubiquitina, aumentando la posibilidad de que las proteínas ANK de los poxvirus dirijan la eliminación de las proteínas de la célula huésped no deseadas con el fin de favorecer la replicación viral (Hautaniemi et al., 2010).

Entre las veinte proteínas más variables codificadas por ORFV, 12 son únicas del género PPV. Las 5 más variables son vVEGF (ORF132),

glicoproteínas de envoltura (ORFs 109 y 110), una proteína no caracterizada (ORF116) y proteína de inclusión tipo-A (ORF103). Las mismas muestran sólo un 38-52% de similitud de secuencia (Mercer et al., 2006).

ORFV al igual que los otros miembros de la familia *Poxviridae*, posee al menos dos clases de genes, aquellos que producen transcritos tempranos en la infección o los que producen los transcritos tardíos (genes intermedios y finales). La transcripción de los genes tempranos da lugar a ARNm de tamaño definido y hay al menos 30 de ellos principales expresados en la infección. Estos ARNm tempranos son en general monocistrónicos, no obstante se han observado algunos ARNm policistrónicos, pero se desconoce si más de una proteína es traducida a partir de estos transcritos. Muchos de estos genes parecen codificar proteínas implicadas en la expresión o replicación, mientras que otros codifican proteínas que se cree confieren al virus una ventaja replicativa “*in vivo*” frente a la respuesta inmune del huésped. También hay un número de proteínas predichas de función desconocida. Varios de estos genes, en particular de la región que contiene proteínas no esenciales, están recibiendo algo de atención como posibles factores de virulencia (Haig et al., 2002).

Los genes intermedios y finales son heterólogos en longitud. Esto se debe a que la transcripción comienza en un punto determinado corriente abajo del promotor, pero la terminación es al azar con el motivo de terminación temprana (T5NT) al parecer no reconocido. Como resultado, estos ARNm tardíos por lo general contienen secuencias de varios genes, pero no se sabe si más de un gen es traducido en proteína en estos transcritos (Haig et al., 2002).

1.2.6 Detección

Tradicionalmente la detección de ORFV ha implicado la caracterización por microscopía electrónica de transmisión de viriones ovales que presentan un patrón de tejido de cesta característico a partir de material de costras. Por otro lado también han sido útiles diferentes técnicas como la prueba de fijación por complemento, el ensayo de precipitación en gel y la inmunocitología para la detección del ORFV (Inoshima et al., 2000). La purificación de ADN viral y análisis de RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) del genoma viral también se han

utilizado como método de detección, pero el uso combinado de pruebas de sero-neutralización y de RFLP puso en evidencia que las técnicas serológicas son de escasa utilidad para distinguir las variantes del virus e incluso para separar las especies de este género (Inoshima et al., 2000). Más recientemente, el diagnóstico se realiza mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fragmento del gen B2L (ORF011). Esta PCR permite discriminar infecciones producidas por PPV, de otras generadas por otros agentes etiológicos (Inoshima et al., 2000).

1.3 La enfermedad

1.3.1 Generalidades

Boquera, dermatitis pustulosa cutánea y EC son todos sinónimos de una enfermedad de origen viral muco-cutánea altamente contagiosa de ovejas y cabras (Tórtora, 1987; Haig et al., 1996) aunque también ha sido encontrada en otros rumiantes domésticos y silvestres (Olivero, 2008; Inoshima et al., 2010).

Las infecciones son generalmente agudas, pero ha habido casos de infecciones crónicas y no se produce una infección sistémica, aunque, en muy raras ocasiones, lesiones similares a las de ORFV han sido registradas en los tractos respiratorio y gastrointestinal en corderos gravemente afectados. Si bien ORFV puede infectar repetidamente corderos previamente expuestos e inducir lesiones, no hay evidencia de la latencia del virus. La replicación viral es máxima entre los primeros 5 a 7 días y normalmente no se detecta al día 14 (Haig et al., 1996; 1998).

EC es una enfermedad debilitante que provoca un descenso en el rendimiento de los animales infectados y puede ser fatal, ya que las lesiones presentes en la boca llevan a la reducción de la ingesta de alimentos, a infecciones bacterianas o fúngicas secundarias (Haig et al., 1998; 2002).

Si bien la enfermedad rara vez es mortal, las lesiones proliferativas primarias pueden ser graves (Haig et al., 1996). Se han descrito cuadros generalizados, calificados como “septicémicos”, en corderos criados con sistemas artificiales, en Inglaterra y Alemania, en los que el virus parece

exacerbar su virulencia, presentándose lesiones graves en órganos internos con elevados porcentajes de mortalidad (Tórtora, 1987).

La inmunidad del huésped es importante en la contención de la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de una respuesta inmune vigorosa del huésped frente a la infección, el virus puede infectar a los animales varias veces. Estas re-infecciones provocan lesiones de menor tamaño que se resuelven en menos tiempo. En ausencia de infecciones secundarias, las lesiones suelen ser auto-limitadas y pueden ser graves con lesiones contiguas a menudo de gran tamaño que normalmente se resuelven dentro de 4-6 semanas. Por esta razón, la enfermedad es más grave en los animales que no han sido expuestos previamente (Haig et al., 1996; 2002; Martins et al., 2014)

La mortalidad es generalmente menor al 5%, pero la morbilidad es de hasta 90 % de la manada, y afecta preferentemente a corderos. Si bien la enfermedad es relativamente benigna, su presencia en el rebaño supone pérdidas económicas importantes. Existe interés a nivel sanitario ya que la presencia de esta enfermedad puede ser fatal durante el envío de un rebaño en la exportación de animales en pie a regiones lejanas, y puede generar grandes pérdidas económicas (Tórtora, 1987).

Los factores que influyen en la presentación clínica, el curso y la gravedad de esta enfermedad asociadas a ORFV son diversos e incluyen el estado inmunológico, la edad, la predisposición genética, la cría del huésped y los factores ambientales como el estrés y el pastoreo de animales en pastos abrasivos (Martins et al., 2014).

Diferencias en la virulencia de cepas de ORFV pueden explicar, en parte, la variación en la gravedad y la presentación clínica reportadas en algunos brotes de EC (Martins et al., 2014). EC es una zoonosis, asociada en humanos con actividades ocupacionales en contacto con ovejas y cabras infectadas, o menos comúnmente, con fómites; y consiste principalmente en lesiones cutáneas agudas que se resuelven después de 4-8 semanas (Figura 6B) (Haig et al., 2002; Damon, 2013). Las consecuencias de las proteínas inmunomoduladoras de ORFV que están activas en las ovejas, pero no están activas en el hombre son de interés pero no se conocen (Deane et al., 2000).

1.3.2 Lesiones

La enfermedad es usualmente caracterizada por la presencia de pústulas altamente infecciosas en los labios, lengua, y alrededor de la boca, así como también lesiones menos comunes en las patas, genitales, mamas, ombligo, intestinos y tracto respiratorio (Figura 5A) (Tórtora, 1987).

Las lesiones se producen por la hipertrofia y proliferación de células epidérmicas y por la infiltración de leucocitos. Las lesiones progresan a través de las etapas clínicas de mácula eritematosa, pápulas, vesículas, pústulas y la formación de costras (Figura 5 C y D).

El examen histológico muestra muchas vesículas pequeñas multiloculares dentro de la dermis. En las primeras 2 semanas, la dermis muestra vasos sanguíneos de paredes finas recién formados con un infiltrado inflamatorio. A medida que la infección progresa, en 2 a 3 semanas se observan en algunos casos las vesículas intraepidérmicas descritas anteriormente y en otros casos aparecen lesiones ampollosas intraepidérmicas. En este punto, el material queratósico puede ser visualizado sobre la superficie de la piel. Las partículas virales solamente son detectables y se visualizan en la epidermis y están presentes en mayor número en las primeras 2 semanas después de la infección (Haig et al., 1996; Damon, 2013).

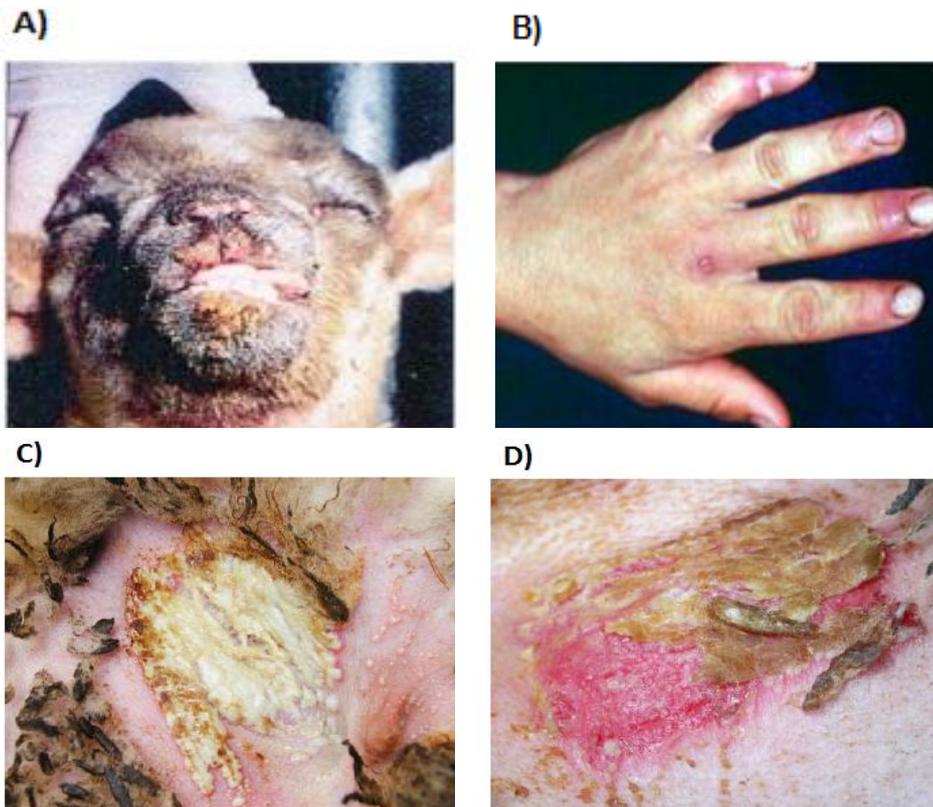


Fig. 5. A) Lesiones de una infección por ORFV típica alrededor de la boca y las fosas nasales de un cordero joven, mostrando elevadas lesiones pustulosas y costras. Figura adaptada de (Haig & McInnes, 2002). B) Lesiones características en el hombre. Se aprecia un importante eritema y lesiones postulares en los cinco dedos. Adaptado de (Olivero, 2008). C) Reproducción de la enfermedad con muestra diagnóstico al 5to día. Se pueden observar las vesículas y pápulas. Adaptado de (Olivero, 2008). D) Formación de costras y desprendimientos al final del proceso. Adaptado de (Olivero, 2008).

1.3.3 Aspectos epizootiológicos

A pesar de que la enfermedad puede presentarse en cualquier época del año, los reportes son más frecuentes en primavera y verano. Esta tendencia se explica por el aumento de la población de jóvenes susceptibles, por los partos en primavera, el destete de los corderos y la presencia de pasturas duras y lacerantes. La enfermedad se considera actualmente de distribución mundial. Sin embargo, resulta indudable que la mejoría de las condiciones higiénico-sanitarias, han reducido considerablemente su incidencia (Tórtora, 1987).

1.3.4 Transmisión

La transmisión del ORFV ocurre por contacto directo, o indirecto a través de fómites y pastos contaminados (Tórtora, 1987).

Después de la entrada a través de epitelio lesionado, el virus se replica en los queratinocitos de la epidermis en regeneración.

Independientemente de la forma de infección, diferentes elementos permiten suponer la posibilidad de que el virus se mantenga en forma latente en los animales, manifestándose el cuadro clínico cuando existen factores que causan una depresión de la respuesta inmune. Esta hipótesis es sustentada por la presencia de lesiones en los pezones de las cabras cuando comienzan a ser ordeñadas manualmente. Tanto la descamación y recambio del epitelio de la piel como el estrés de la ordeña son factores que colaboran con la depresión del sistema inmune, permitiendo que el virus que estaba en forma latente, se active (Tórtora, 1987).

1.3.5 Vacunación

Las vacunas disponibles para ORFV se basan en liofilizado de costras obtenidas a partir de pasajes del virus “in vivo” o en cultivos celulares y se han utilizado con relativo éxito para reducir las pérdidas asociadas con la infección por ORFV. Las cepas utilizadas en las vacunas deben estar relacionadas con las cepas circulantes para ser efectivas (Haig & McInnes, 2002; Fleming & Mercer, 2007; Peralta et al., 2015). De manera general, las vacunas si bien son exitosas en reducir la severidad de la enfermedad, debido a que son a virus vivo pueden mediante su utilización diseminar las cepas vacunales y de esta forma causar brotes en animales previamente vacunados. Nuevas estrategias vacunales apuntan a producir vacunas a virus no vivo y que protejan corderos y cabras, reduciendo la replicación viral, así como también el tamaño de las lesiones y el tiempo de resolución. En Uruguay, VIRBAC-Santa Elena lleva a cabo la producción de una vacuna nacional (ECTISAN), la cual es realizada a partir de aislamientos nacionales. Las cepas son pasadas en corderos antes de su utilización en la producción de la vacuna y si bien son de baja virulencia, no son atenuadas (Olivero, 2008).

Las vacunas existentes pueden producir el tipo correcto de respuesta inmune antiviral, pero mientras que el virus pueda producir proteínas

inmunomoduladoras, la inmunidad completa a la infección será poco probable (Haig & McInnes, 2002).

Podría ser posible fusionar genéticamente antígenos a proteínas estructurales de ORFV para el desarrollo de vacunas. Los estudios han demostrado que la fusión de epítopes inmunogénicos de virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 con las principales proteínas antigénicas de la envoltura de VACV (B5R, A27L y la proteína del core A4L) provoca una lectura de absorbancia con mayor especificidad y una fuerte actividad neutralizante (Tan et al., 2009).

1.4 Respuesta inmune

1.4.1 Generalidades

Algunos miembros de la familia Poxviridae han sido estudiados en detalle y se sabe que exhiben una amplia variedad de mecanismos para la evasión y desestabilización del sistema inmune del hospedero. Muchos de estos mecanismos han evolucionado gracias a la captura por los virus de genes involucrados en la respuesta inmune del hospedero, su posterior adaptación para proteger al virus de la inmunidad del huésped, y la capacidad de actuar como factores de virulencia (Haig et al., 2002).

El interés inmunológico en ORFV es provocado por el hecho de que el virus puede infectar repetidamente ovejas, incluso el mismo sitio de la piel, a pesar de una respuesta inmune aparentemente normal como se mide por la producción de anticuerpos.

Debido a que las reinfecciones inducen lesiones más pequeñas con tiempos de resolución más rápidos que las lesiones primarias, se puede reconocer que existe una respuesta inmune específica, y se ha demostrado que la misma es mediada por células T, pero la misma no es eficaz durante un periodo de aproximadamente 4-6 días inmediatamente después de la reinfección. Los tipos de células reclutadas en el sitio de la infección y las citoquinas que producen cuando se activan, son de importancia crítica para la respuesta inmune del huésped de protección a los virus. La importancia de las citoquinas particulares incluyendo los

interferones antivirales, está resaltada por el hecho de que muchos virus han desarrollado mecanismos para inhibir éstas como parte de su estrategia de supervivencia (Haig et al., 1996).

La respuesta inmune a la infección por ORFV en ovejas tanto infectadas por primera vez como re infectadas han demostrado que existe una acumulación de neutrófilos, células T, células B y células dendríticas subyacentes y adyacente a las células epidérmicas infectadas por el virus (Haig et al., 2002).

Células T-CD4 son las células T predominantes en la piel tanto en la replicación primaria como en lesiones por re infección. La característica más inusual de la lesión de ORFV sin embargo, es una acumulación densa de células dendríticas MHC de clase II⁺, que carecen de los antígenos asociados a macrófagos, CD 11b y CD 11c. La replicación del virus es menor en las lesiones en una re infección, las cuales se resuelven con mayor rapidez que las primarias. En estas lesiones se da una rápida producción de la citoquina inflamatoria IL-1b y la quimioquina IL-8 después de la re infección, y un retraso en la producción de factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), IL-2 e interferón gamma (IFN-γ). Este último se encuentra implicado en la protección parcial contra la infección por el ORFV (Haig et al., 1996).

Las células T CD4, IFN-γ y en menor medida las células T CD8 son importantes en la protección parcial del huésped contra la infección. Se ha encontrado un efecto minoritario de los anticuerpos en la protección contra ORFV (Haig et al., 2002).

En las reinfecciones, la respuesta inmune de memoria asegura una rápida acumulación de moléculas efectoras inmunes del hospedero y el virus es contenido y eliminado más rápidamente que en las infecciones primarias (Haig et al., 1996; Haig & McInnes, 2002).

1.4.2 Mecanismos de evasión del sistema inmune

La evasión del sistema inmune por parte de ORFV se evidencia en la capacidad previamente mencionada del virus de re-infectar corderos que ya han sido expuestos anteriormente al patógeno, a pesar de que el hospedero presente una respuesta inmune e inflamatoria antiviral aparentemente normal (Deane et al., 2000). Esto sugiere que ORFV ha desarrollado diversos mecanismos para eludir o subvertir la inmunidad protectora, al menos temporalmente, mientras que mejora su replicación. En muchos casos, esto ha sido mediante la imitación o la adquisición de genes reguladores de la respuesta inmune del huésped incorporados en las regiones flanqueantes del genoma viral, los productos de los cuales inhiben proteínas de respuesta inmune del huésped (Haig et al., 1996). Si bien la habilidad que presenta ORFV de re-infectar animales está demostrada, y generalmente está asociada a la expresión de factores de evasión del sistema inmune como se mencionó anteriormente, es posible que la alta variación en secuencia que presentan las diferentes cepas, pueda ser una ventaja selectiva que pueda permitir la re-infección de los animales. Si bien algunos factores de virulencia como vVEGF exhiben una variación sustancial en sus secuencias, el factor inhibidor de la proteína GM-CSF (GIF) y la vIL-10, muestran una limitada variación en secuencia entre las diferentes cepas. La gran variación en secuencia entre algunos genes pueden también ser interpretados como un producto de recombinación entre las diferentes cepas y quizás también entre las diferentes especies (Olivero, 2008). Existe una interacción dinámica entre el ORFV con sus proteínas inmuno-moduladoras y la respuesta inmune del huésped a la infección. (Haig et al., 1996).

En las infecciones primarias, el virus es capaz de replicarse por un período de tiempo antes de que el huésped pueda montar una respuesta inmune efectiva. Esto significa que el virus puede producir una gran masa crítica de proteínas inmunomoduladoras y de virulencia antes de que el huésped pueda responder.

Interferencia con IFN y posiblemente otras respuestas innatas permiten que el virus pueda replicarse antes de que se desate una respuesta inmune adaptativa. Frente a una gran cantidad de proteínas virales inmuno-moduladoras y de virulencia, la respuesta inmune del huésped, aunque adecuadamente estimulada, es incapaz de eliminar el virus hasta que el huésped produzca más moléculas inmunes efectoras de las que el virus pueda bloquear o subvertir (Haig et al., 1996; Haig & McInnes,

2002). Sin embargo, la inmunidad del huésped tiene algún efecto, ya que como se mencionó anteriormente, el tamaño de las lesiones y el tiempo de resolución en reinfecciones se disminuyen en comparación con los de la infección inicial (Deane et al., 2000).

1.4.3 Factores de virulencia

El genoma de ORFV contiene varios genes de virulencia putativos inmuno–moduladores (Figura 6), la gran mayoría son ortólogos de genes celulares del huésped que se han adquirido y modificado por los virus. Mediante el estudio de estas proteínas inmunomoduladoras virales, se puede obtener una visión de la patogénesis de la enfermedad: los mecanismos de virulencia del virus y la inmunidad protectora del hospedero frente a la infección por ORFV (Haig et al., 1998; Deane et al., 2000; Haig & Mcinnes, 2002).

Dentro de los factores de virulencia más estudiados se encuentran: una proteína de resistencia al interferón (VIR), un ortólogo de la interleuquina IL-10(vIL-10), un factor inhibidor de la proteína GM-CSF (GIF), un ortólogo del factor del crecimiento endotelial vascular (vVEGF), una fosfatasa en tirosina homóloga de VH1 de Vaccinia (Haig & Fleming, 1999; Haig & Mcinnes, 2002, Harvey et al., 2015). También se ha sugerido que la enzima dUTPasa podría representar un factor de virulencia en ORFV (Cottone et al., 2002). A excepción de GIF, las proteínas inmunomoduladoras descubiertas hasta ahora son producto de la expresión de genes virales tempranos. GIF se expresa como un gen viral intermedio-tardío (Deane et al., 2000).

La expresión en ORFV de vIL-10, VIR y GIF representa una interferencia coordinada con la respuesta inflamatoria y respuestas inmunes de tipo 1 del huésped frente a la infección viral (Deane et al., 2000).

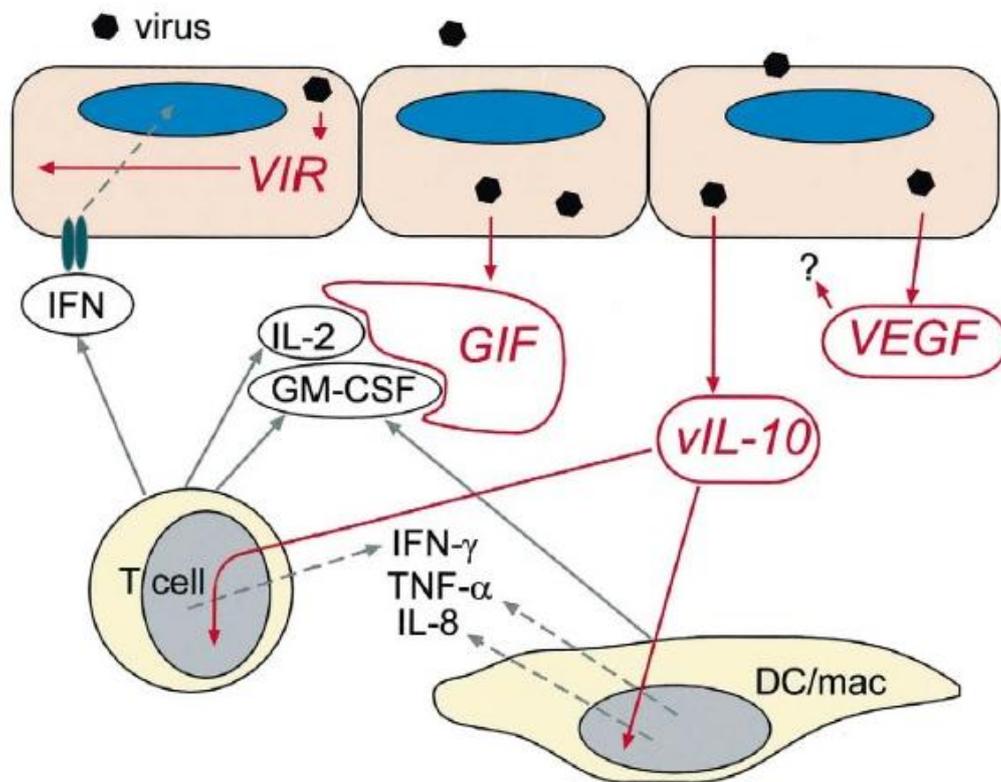


Fig. 6. Representación esquemática de las proteínas de ORFV que poseen un rol como factores de virulencia o inmunomoduladores y su posible función en la infección por ORFV. La infección por ORFV de los queratinocitos epidérmicos, conduce a la producción de GIF que se une e inhibe la actividad biológica de GM-CSF e IL-2 del hospedero producidos por las células T o GM-CSF producido por las células dendríticas y los macrófagos (DC /mac). La vIL-10 inhibe la función presentadora de antígeno de DC y la transcripción de una serie de citoquinas del huésped incluyendo IFN- γ , IL-8 y al factor de necrosis tumoral TNF- α (mostrado como flechas punteadas). VIR que se une a dsRNA. Esto bloquea el apagado de síntesis de proteínas mediado por ARN y la degradación del ARN inducidos como parte del estado antiviral en las células estimuladas con interferones. Las flechas de línea discontinua representan las vías de señalización afectadas. VEGF viral, que estimula la angiogénesis, pero que también pueden estar involucrados en la estimulación de la proliferación epidérmica (indicado por el "?" en la figura) y proporcionando más células diana para la infección del ORFV. Más detalles se encuentran en el texto. Figura adaptada de (Haig & McInnes, 2002).

1.4.3.1 Gen ORF132

Está ubicado cerca del ITR sobre el extremo 3' del genoma, es expresado temprano en el ciclo de vida del virus y es un ortólogo viral del VEGF de mamíferos (Haig et al., 1996).

La secuencia aminoacídica de vVEGFs de diferentes cepas de ORFV, coinciden en un 41% por lo que los genes tienen muy poca homología entre ellos. A pesar de esto, estudios han demostrado que provocan las mismas características patológicas (Ueda et al., 2007).

Debido a que ORFV se replica en la capa de la epidermis que se está regenerando, la función de vVEGF de ORFV podría ser estimular la hiperplasia epidérmica de queratinocitos e inhibir la apoptosis al menos temporalmente para proporcionar más células diana para la replicación del virus; así como inducir la permeabilidad y proliferación vascular y contribuir con la formación de las costras. Es por esto que la expresión de vVEGF en heridas que se están curando, ayuda a mantener el estado regenerativo (Haig & McInnes, 2002; Olivero, 2008). Por lo tanto se cree que este factor está involucrado en proliferación de células epiteliales, tanto normal como neoplásica, por ejemplo en la piel, riñón, órganos reproductivos y pulmones (Lyttle et al., 1994; Haig et al., 1996).

Existen varias isoformas de VEGF en mamíferos que median la permeabilidad vascular y la angiogénesis. En un modelo de la estructura del gen humano que codifica a VEGF se ha propuesto la existencia de al menos 4 intrones, y que las vías de empalme alternativo producen 4 péptidos maduros, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ (Lyttle et al., 1994).

1.4.3.2 Gen ORF127

Es el gen que codifica a la vIL-10, se localiza en el extremo 5' del genoma de ORFV (ORF127) y se transcribe tempranamente durante la infección. La vIL-10 es un ortólogo a la IL-10 codificada por los mamíferos (Haig & Fleming, 1999). La IL-10 tiene actividad inmunosupresora, anti-inflamatoria y anti-viral. A su vez inhibe la inducción de linfocitos Th1 (*T-helper* tipo 1), la producción de TNF- α e IL-8 por parte de macrófagos y queratinocitos; y la producción de INF- γ por linfocitos activados. Además inhibe la proliferación de las células T específicas de antígeno, al provocar, una disminución en la regulación del complejo de

histocompatibilidad mayor de clase II (MHC-II), así como también la disminución de células presentadoras de antígenos (por ejemplo DCs y monocitos) (Fleming et al., 1997; Haig & Fleming, 1999; Haig & McInnes, 2002).

1.4.3.3 Gen ORF007

Este gen codifica para la enzima dUTPasa la cual cataliza la hidrólisis de dUTP a dUMP y pirofosfato, previniendo así la incorporación de uracilo en el ADN. Se cree que la adquisición de este gen para ORFV fue vía transferencia horizontal de genes desde el genoma de la célula hospedera y por lo tanto, independiente de otros virus de la familia *Poxviridae*. Aún no se ha determinado si este gen temprano podría estar implicado en la patogénesis del virus (Cottone et al., 2002). Puede ser favorable para ORFV expresar su propia dUTPasa para evitar la incorporación del ribonucleósido uracilo en el genoma viral. Se demostró alta actividad dUTPasa en células cultivadas en activa división, lo que podría favorecer la selección de variantes de ORFV durante la adaptación de cultivo celular. Aquellos ORFV con baja actividad dUTPasa o con genes ORF007 eliminados, podrían ser menos virulentos *in vivo* debido a una posible deficiencia de la replicación. La generación de un mutante *knock out* dUTPasa, por ejemplo, ayuda a dilucidar el rol y la importancia de esta enzima para la atenuación de ORFV (Cottone et al., 2002).

1.4.3.4 Gen ORF020

Como me fue mencionado anteriormente, ORFV contiene un gen viral temprano (ORF020) que se localiza en el extremo izquierdo del genoma del virus, dentro de la región conservada y codifica un factor de resistencia al interferón (VIR) (Haig et al., 1998; Haig & Fleming, 1999). El largo de esta proteína, es de 183 aminoácidos para NZ2, IA82 y SA00 (Hautaniemi et al., 2010). ORF020 es un ortólogo del gen E3L de VACV, y las proteínas que codifican poseen un 31% de identidad aminoacídica y son bioquímicamente similares (Haig et al., 1998; Haig & Fleming, 1999). Independientemente de la baja identidad aminoacídica entre la proteína

VIR y E3L de VACV, su similitud estructural es suficiente para darles una función similar (McInnes et al., 1998). La proteína VIR actúa de manera similar a dicha proteína, ya que está implicada en la inhibición de la actividad antiviral de los IFNs del hospedero. Dicha acción se logra a través de la inhibición de la proteína kinasa R (PKR), por unión competitiva de ARNdh. Esto sugiere que el IFN es una importante citoquina que protege al hospedero frente a la infección por ORFV y que VIR se une al ARNdh producido por células como consecuencia de la infección por ORFV. Se previene así la activación de la PKR por el ARNdh, así como la producción de 2-5 adenilato sintetasa (2-5 A) llevada a cabo como una parte de la respuesta inducida por INF en las células. La PKR activa, normalmente se fosforila a sí misma y al factor de iniciación de la traducción eIF2. Esto inhibe la síntesis de proteínas como parte del estado antiviral inducido por el interferón en las células. Al prevenir esto, VIR permite que ORFV aproveche la síntesis de proteínas esencial para la generación de nuevos viriones. La PKR puede estar implicada en diferentes aspectos del estado antiviral inducidos por INF, y no sólo en la inactivación de eIF-2. Se sabe que posee un rol en la apoptosis, y que el escape de ella es ventajoso para el virus. La inhibición de 2-5A previene la activación de ARNasaL, la cual degrada ADN viral y celular como parte del estado antiviral inducido por INF en las células (Haig & Fleming, 1999; Haig et al., 2002).

El gen ORF020 presenta mayor variabilidad que el gen B2L, motivo por el cual el primero ha sido objeto de estudio en varias investigaciones (Peralta et al., 2015). Sin embargo, diferentes estudios sugieren que, a pesar de que el gen VIR se encuentra sometido a la presión inmune del huésped, puede ser utilizado como un marcador genético del género PPV (Kottaridi et al., 2006).

Varios estudios han puesto de manifiesto un alto grado de identidad nucleotídica entre los aislados (96-99% en Brasil, 96,9% en Argentina y 93-99% en Italia y Grecia) para el gen ORF020 (Kottaridi et al., 2006; Martins et al., 2014; Peralta et al., 2015). Los resultados de un estudio acerca de este gen revelaron muy pocas y dispersas mutaciones (posiciones 122, 153 y 182) producto de la variabilidad natural, ya que no se realizaron pasajes múltiples en cultivo celular que pudieran haber afectado dicho resultado. Además de la alta identidad, las pocas mutaciones identificadas no interferirían con la función de dicha proteína y el fenotipo "*in vivo*" (Martins et al., 2014).

La proteína VIR consta de dos dominios separados por una región hidrofílica que se encuentra entre los residuos de aminoácidos (aa) 70-80. La mitad C-terminal de la proteína es el sitio de unión de ARNdh y se requiere para la resistencia a IFN. Se han identificado cinco residuos de aa (Ácido Glutámico (E)-124, Fenilalanina (F)-148, Lisina (K)-167, Arginina (R)-168 y Lisina (K)-171) en el dominio C-terminal de la proteína E3L de VACV que son esenciales para la unión de ARNdh. La importancia de estos residuos se ve apoyada por la conservación de los mismos en un estudio con cepas de campo de ORFV y BPSV realizado por Kottaridi et al., 2006.

En dicho estudio, se identificaron doce sitios que presentan mutaciones no sinónimas. Si bien ORF020 es un gen conservado, este hecho plantea cuestiones acerca de las razones por las cuales la selección haya permitido tales cambios. El probable rol de VIR en la persistencia y la reinfección del virus sugiere que estas mutaciones pueden ser parte de la estrategia del virus para escapar de la respuesta inmune del huésped o que puede asociarse con un perfil diferente en la patogénesis (Kottaridi et al., 2006).

1.4.3.5 Gen ORF117

Codifica a la proteína GIF, un factor de inhibición del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), y que a diferencia de otros genes implicados en la virulencia, es un gen de transcripción intermedia o tardía en el ciclo de vida del virus (Haig et al., 2002). Corresponde a un gen localizado a 20,1 kb del extremo terminal derecho del genoma, cerca de la región ITR, motivo por el cual puede ser blanco de rearrreglos genéticos, implicados en el proceso evolutivo del virus (Haig et al., 1996; Deane et al., 2000; Olivero, 2008).

El gen ORF117 se cree que codifica una proteína de 265 aa (27,9 kDa) (Deane et al., 2000) para NZ2, IA82 y SA00 (Hautaniemi et al., 2010), de los cuales los primeros 19 aminoácidos constituyen un péptido señal putativo. Esta proteína posee un 32% de similitud aminoacídica con la proteína codificada por el gen A41L de VACV (Deane et al., 2000).

GIF es detectado en la linfa aferente en el momento de replicación viral máxima en la epidermis de las ovejas, entre los días 5 a 7 después de

una reinfección (Deane et al., 2000). Se une a la citoquina GM-CSF y también a IL-2, inhibiendo la actividad biológica de ambas, tanto en cultivo como "*in vivo*". Funciona como un dímero o como estructuras de orden superior, y se une con mayor afinidad a GM-CSF que a IL-2. Esto sugiere que el GM-CSF, junto con IFN- γ , IFN- α / β , y la IL-2, son importantes en la inmunidad del huésped frente a ORFV (Deane et al., 2000; Haig et al., 2002).

GM-CSF es producido por monocitos/macrófagos y células T. Dicho compuesto estimula la producción de neutrófilos, eosinófilos, y monocitos/macrófagos como parte de la respuesta inmune y participa en el reclutamiento y diferenciación de las DC presentadoras de antígenos. GM-CSF se expresa en las células pertenecientes a la lesión por ORFV y en los ganglios aferentes (mediante la migración de linfocitos). También es probable que las DCs en el sitio de la infección dependan, en parte, de GM-CSF para su reclutamiento (Haig et al., 1996; Deane et al., 2000; Haig et al., 2002) .

La IL-2 es producida por las células T y su función es estimular la proliferación y activación de las mismas y de las células NK (Haig & McInnes, 2002). También participan en la proliferación de las células B activadas y en estimular la producción de IFN- γ por las células T. La inhibición de esta respuesta inmune por parte del virus, previene la acumulación y/o activación de células inflamatorias o de DCs inmediatamente en el sitio de infección, aumentando así la supervivencia del virus (Haig et al., 2002).

El análisis de secuencias sugiere que la proteína GIF no se parece a ninguna proteína conocida de unión a GM-CSF o de unión a IL-2 en mamíferos, y de hecho, no hay reportes de ninguna otra proteína que posea la capacidad de unirse tanto a GM-CSF como a IL-2 (McInnes et al., 2005). La capacidad de unirse e inactivar múltiples citoquinas aparentemente no relacionadas, es una propiedad de algunas proteínas de la familia Poxviridae y representa una forma económica de controlar la inmunidad del huésped. GIF actúa en forma de dímeros y tetrámeros. La unión a quimioquinas se da a través de un dominio de unión quimiocina-heparina conservado. La unión de GIF tanto a GM-CSF como a IL-2 indica la existencia de un(os) dominio(s) de unión compartido(s) por ambas citoquinas (Deane et al., 2000). Estas citoquinas comparten poca homología a nivel primario de aminoácidos, pero sí presentan una topología estructural común caracterizada por cuatro hélices alfa (McInnes

et al., 2005), y son miembros de una familia de citoquinas que también incluye la IL-4. Sin embargo, ovlL-4 no se unió a GIF. Curiosamente, GM-CSF se ha demostrado que compite con IL-2 por la unión a receptores IL-2 en la línea celular de leucemia mieloide MO7e, lo que indica que puede haber un dominio de unión al receptor común en GM-CSF y IL-2 humanas (Deane et al., 2000).

Los receptores celulares para GM-CSF e IL-2 también están relacionados ya que son miembros de la superfamilia de receptores de citoquinas. Las regiones de unión a citoquinas de éstos contienen secuencias, lejanamente relacionadas con el dominio de fibronectina de tipo III, el cual forma una estructura genérica de “sándwich” antiparalelo. Los enlaces disulfuro y un motivo de secuencia conocida como la caja “WSXWS” son cruciales para mantener la integridad estructural de estos receptores (McInnes et al., 2005).

Recientemente, se ha sugerido que la proteína GIF es un miembro de la familia de proteínas poxvirales de unión a quimioquinas (CBP) de tipo II, aunque no se ha demostrado la actividad de unión de quimioquinas para GIF. Las CBPs de tipo II son una familia de proteínas relacionadas que se unen a quimioquinas C-C, pero que carecen de cualquier homología evidente con los receptores de quimioquinas celulares (McInnes et al., 2005). Es posible que en la coevolución del virus y el huésped, se hayan producido modificaciones radicales del gen hospedero adquirido, de manera que las proteínas del huésped y del virus ya no se parecen entre sí, excepto por tramos cortos de secuencia que son importantes para la unión del ligando (Deane et al., 2000). El análisis estructural de CBPs del tipo II del virus de la Viruela Bovina (en inglés llamado *Cowpox*) muestra también la formación de proteínas globulares que consisten en una estructura de “sándwich” antiparalelo, que está íntimamente involucrado en la interacción con sus ligandos (McInnes et al., 2005).

Recientemente se ha logrado obtener la cristalografía de GIF, y se ha observado que emplea una plataforma de unión dimérica que secuestra dos copias de sus citoquinas diana con alta afinidad y baja cinética de disociación para producir complejos distintos que presentan huellas de interacción mutuamente excluyentes. Se comprobó que GIF sirve como un receptor señuelo competitivo y que no comparte ninguna similitud estructural con los receptores de citoquinas (Felix et al., 2016).

Los residuos de cisteína (C) en la molécula GIF no tienen la misma disposición espacial que los de la superfamilia de receptores de citoquinas, aunque los experimentos de mutagénesis dirigida demostraron que, al menos, seis fueron absolutamente necesarias para mantener la actividad biológica. Estos seis residuos de C también se conservan en la proteína GIF de BPSV, mientras que los dos residuos de C restantes que no son importantes para la actividad biológica no son conservados. Se especula que los residuos de C que son importantes para la actividad biológica forman tres enlaces disulfuro intramoleculares. La interrupción de la correcta formación de enlaces disulfuro probablemente conduzca a que la proteína quede atrapada dentro de la célula, e interfiera con modificaciones postraduccionales de la proteína. Se requiere entonces del plegamiento correcto de la molécula antes de que se secrete de la célula, por lo que, mutaciones dirigidas a estos sitios afectaron el correcto plegamiento y el tráfico de la proteína GIF (McInnes et al., 2005).

La secuencia de aa predicha de la proteína GIF madura reveló la presencia de la secuencia WDPWV. Esto se asemeja a una secuencia, WSXWS, que se conserva a través de una serie de receptores de citoquinas que pertenecen a la superfamilia de los receptores de citoquinas y que está implicado en el mantenimiento de la expresión superficial de los receptores de membrana y la secreción de receptores solubles. La molécula de GIF tiene cuatro sitios potenciales de glicosilación en Asparagina (N). El bloqueo de la glicosilación en dichos sitios reduce el tamaño de la proteína GIF de 43 kDa a aproximadamente 33 kDa y resulta en una proteína que es tanto inactiva como retenida dentro de la célula (McInnes et al., 2005).

Se ha demostrado, que la formación de enlaces disulfuro, la glicosilación, y el motivo de secuencia WDPWV parecen ser importantes para la actividad biológica. Una comparación de la proteína GIF con su homóloga A41L de la misma familia viral reveló que la secuencia DPW del motivo "WDPWV" se conserva en estas proteínas pero no en las proteínas de unión a quimioquinas- CC, lo que refuerza aún más la sugerencia de que esta familia de proteínas ha desarrollado una función biológica separada (McInnes et al., 2005).

1.5 Distribución geográfica

La enfermedad se considera actualmente de distribución mundial, pero como se mencionó anteriormente resulta indudable que la mejoría de las condiciones higiénico-sanitarias, han reducido considerablemente su incidencia. EC se presenta en forma enzoótica en todo el mundo. (Tórtora, 1987; Haig & McInnes, 2002). Sin embargo, hay pocas descripciones de cepas de ORFV y comparaciones de estas cepas entre ellos (Billinis et al., 2012).

A nivel asiático, se han descrito en Japón varios brotes de EC en seraus japoneses (*Capricornis crispus*) entre los años 1985 a 2001 y más recientemente en 2007 y 2008 (Inoshima et al., 2010). También en 2008 se registró un brote agudo de EC en un rebaño de 180 ovejas en Jilin-China. Los descubrimientos patológicos del caso confirmaron la presencia de lesiones características ocasionadas por la infección por ORFV (Zhao et al., 2010). En dicho país han sido a su vez reportados brotes de EC en rebaños de cabras (Zhang et al., 2010). Entre otros, se han reportado brotes de EC en Taiwán (Chan et al., 2009), en cabras de Korea (Oem et al., 2009) y en cabras y ovejas de India (Hosamani et al., 2006).

En tanto que en Europa, se han estudiado casos de EC presentes en Grecia e Italia entre 1995 y 2004 (Kottaridi et al., 2006; Billinis et al., 2012). Las infecciones por ORFV se encuentran en todas partes donde se crían ovejas y cabras en Croacia, desde 1949, cuando se registró por primera vez (Lojkic et al., 2010). En Finlandia se registraron brotes de EC entre 1992-1994 (Tikkanen et al., 2017). En Reino Unido también se han registrados brotes de EC en diferentes rebaños (Smith et al., 2002)

En el continente americano también se han descrito brotes de EC. Un brote de larga duración que afectó a corderos y cabritos (los cuales desarrollaron lesiones proliferativas generalizadas, a veces presentando artritis supurativa, neumonía y la involución prematura del timo), se ha descrito en Estados Unidos (De La Concha-Bermejillo et al., 2003). En dicho país también se han descrito brotes de EC en ovejas con lesiones típicas en extremidades y cabeza persistentes por más de dos meses (Smith et al., 2002) entre otros casos (Guo et al., 2003). La infección por ORFV está muy extendida en la población ovina de Rio Grande do Sul, el estado más meridional de Brasil y también se han registrado brotes de EC ovino en el medio oeste de Brasil. La vacunación es incipiente y numerosos brotes de EC son reportados cada año. Un brote en cabras

con alta letalidad y presencia de lesiones nodulares y proliferativas multifocales de tamaño variado, diseminadas por todo el cuerpo se ha descrito en el norte de Brasil (Abrahão et al., 2009; Assis et al., 2012). En 2013, un brote de EC se produjo en un rebaño de ovejas en Argentina. En este estudio, nueve ovejas presentaron lesiones del tipo de verrugas con costras secas alrededor de la boca (Peralta et al., 2015).

Como se mencionó anteriormente, a nivel de Oceanía también se han registrado brotes de EC, por ejemplo la cepa NZ2, la cual ha sido ampliamente estudiada (Robinson et al., 1982)

1.6 Antecedentes en Uruguay

EC está ampliamente distribuido en nuestro país, y hasta el año 2008 la única evidencia de la presencia del virus fue realizada por microscopía electrónica de transmisión y el diagnóstico era clínico (Olivero, 2008).

Si bien existe vacunación en Uruguay, en el año 2007 coincidente con la introducción temporal de una vacuna extranjera a virus vivo, se reportaron un alto número de casos de animales afectados en rebaños previamente vacunados; lo que llevó a plantear la interrogante del surgimiento de estas infecciones (Olivero, 2008, 2012).

En el año 2008 se realizó en nuestro país el primer diagnóstico de la enfermedad con técnicas moleculares (PCR) y análisis a nivel molecular de cepas autóctonas. En el marco de este trabajo se estudiaron las poblaciones de ORFV en Uruguay, mediante la caracterización a nivel molecular de las cepas de ORFV presentes en la vacuna y en costras obtenidas a partir de animales infectados en rebaños que habían sido previamente vacunados o no vacunados.

En base a las características que presenta su genoma y trabajos publicados por otros equipos de investigación, su análisis genético se realizó en genes ubicados tanto en las zonas terminales del genoma, que son las que presentan mayor divergencia intra-específica, así como genes ubicados en zonas conservadas del genoma. Los dos genes seleccionados fueron: 1) el gen ORF011 (B2L), que codifica para la principal proteína de envoltura p42K y 2) el gen ORF132, que codifica vVEGF (Olivero, 2008).

A su vez, en el año 2012 se realizaron estudios acerca de los mecanismos genéticos implicados en la variabilidad de ORFV los cuales revelaron una diversidad genética en las cepas circulantes en nuestro país a través del abordaje de otros genes virales (ORF005 -E2L, ORF007 -dUTPasa) así como del análisis de los patrones de RFLP genómico y posibles eventos de rearrreglos genómicos (Olivero, 2012).

Hasta el momento han sido registrados casos de EC en 10 departamentos de Uruguay (Figura 7).



Fig. 7. Distribución geográfica de EC en Uruguay. Se muestran en color violeta los departamentos de Uruguay donde se han reportado casos de EC.



2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

Ectima contagioso genera pérdidas económicas, ya que posee una alta morbilidad y provoca un descenso en el rendimiento de los animales infectados pudiendo ser fatal.

No existen estudios en nuestro país acerca de los factores de virulencia ORF020 y ORF117. Por este motivo el estudio de dichos genes presentes en las cepas de ORFV uruguayas nos permitirá profundizar en la comprensión de las relaciones filogenéticas y los mecanismos de variabilidad que sobre ellas se ejerce.

2.2 Objetivo general

Profundizar en el conocimiento de cepas de ORFV vacunales y circulantes en Uruguay mediante la caracterización molecular de dos factores de virulencia (ORF020 y ORF117). De esta forma se podrá determinar la presencia o ausencia de mutaciones que puedan afectar la patogenicidad de ORFV.

2.3 Objetivos específicos

- Diseñar oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes ORF020 y ORF117.
- Poner a punto la amplificación por PCR de los genes ORF020 y ORF117, y amplificar los genes virales seleccionados.
- Secuenciar los productos genómicos amplificados y analizar las secuencias obtenidas.
- Realizar un análisis filogenético y comparar los datos obtenidos con los disponibles en otros países.
- Realizar un análisis comparativo de los factores de virulencia VIR y GIF, a partir de las secuencias proteicas deducidas de las secuencias genómicas obtenidas.

3. Materiales y métodos

3.1 Muestras

En este estudio fueron analizadas 5 muestras de costras ovinas y 40 muestras de ADN genómico viral obtenidas a partir de ovinos localizados en diferentes departamentos de Uruguay. Dichas muestras fueron cedidas por el Laboratorio Santa Elena (actualmente VIRBAC-Santa Elena) y se encuentran almacenadas en la Sección Virología de la Facultad de Ciencias. El Laboratorio VIRBAC-Santa Elena lleva a cabo la producción de una vacuna, la cual originalmente estaba integrada por las cepas UR07/79, UR08/79, UR09/79. Posteriormente UR01/07, UR03/07 y UR13/08 se incluyeron al pool vacunal original (Olivero, 2008). Los datos de las muestras estudiadas se encuentran detallados en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos de las muestras analizadas en este estudio.

Cepas	Región geográfica	Año de extracción	Animal	Zona de lesión	Vacunación
UR01/07*	Rivera	2007	Cordero y oveja de cría	Boca y patas	Si
UR02/07	Rivera	2007	Cordero y oveja de cría	Boca y patas	Si
UR03/07*	Rivera	2007	Cordero y oveja de cría	Boca y patas	Si
UR04/04	ND	2004	Corderos	ND	ND
UR05/04	Salto	2004	ND	ND	Si
UR06/86	ND	1986	ND	ND	ND
UR07/79*	ND	1979	ND	ND	ND
UR08/79*	ND	1979	ND	ND	ND
UR09/79*	ND	1979	ND	ND	ND
UR10 ⁺	ND	ND	ND	ND	ND
UR11/07	Florida	2007	Corderos	ND	No
UR12/07	Durazno	2007	ND	ND	Si
UR13/08*	Florida	2008	ND	ND	Si
UR14/07	Florida	2007	ND	ND	Si
UR15/09	Artigas	2009	Corderos	Boca	Si
UR16/09	Artigas	2009	Corderos	Patas	Si
UR17/09	Lavalleja	2009	ND	Boca	No
UR18a/09	Colonia	2009	ND	Entrepierna	Si
UR18b/09	Colonia	2009	ND	Boca	Si
UR18c/09	Colonia	2009	ND	ND	Si
UR19/10	Florida	2010	ND	Boca (lesión grande)	Si
UR20/10	Florida	2010	ND	Boca (lesión chica)	Si
UR21/10	Rocha	2010	ND	Boca	Si
UR22/10	Colonia	2010	Corderos, borregos y adultos	ND	Si
UR23/11	Florida	2011	Ovinos	ND	Si
UR24/11	Salto	2011	Ovinos	ND	No
UR25/11	San José	2011	Ovinos	ND	Si
UR26/12	Durazno	2012	Ovinos	ND	ND
UR27/12	Durazno	2012	Ovinos	ND	ND
UR28/12	Durazno	2012	Ovinos	ND	ND
UR29/12	Durazno	2012	Ovinos	ND	ND
UR30/12	Durazno	2012	Ovinos	ND	ND
UR31/12	Durazno	2012	Ovinos	ND	ND
UR32/13	ND	2013	Ovinos	ND	ND
UR33/13	ND	2013	Ovinos	ND	ND
UR34/13	ND	2013	Ovinos	ND	ND
UR35/13	ND	2013	Ovinos	ND	ND
UR36/13	ND	2013	Ovinos	ND	ND
UR37/14	Paysandú	2014	Borregos	ND	Si
UR38/14	Paysandú	2014	Corderos	ND	SI
UR39/14	Paysandú	2014	Ovinos	ND	Si

Datos no disponibles (ND). Se muestran aquellas cepas que integran la vacuna de Santa Elena (*), y la vacuna Rosenbusch (+).

3.2 Extracción del ADN genómico viral

Debido al aspecto zoonótico del ORFV, el procesamiento de las muestras y parte de la extracción del ADN genómico viral, fueron realizadas en una sala de bioseguridad nivel 2 con normas de nivel 3 (BSL2+). Se realizó la extracción del ADN viral de las muestras UR26/12, UR27/12, UR28/12, UR30/12 y UR31/12. Las extracciones de ADN viral del resto de las muestras fueron realizadas en años anteriores por Natalia Olivero y Danilo Segovia acorde a los protocolos descritos en este trabajo (Olivero, 2008, 2012).

El protocolo utilizado para la extracción fue adaptado del método publicado por Mazur et al. , 1991.

En primer lugar las costras fueron maceradas manualmente hasta alcanzar un estado en polvo y aproximadamente 2 gramos fueron resuspendidos en 1 ml de buffer de lisis (SDS 1%, 50 mM Tris HCl, 22µg/ml, Proteinasa K, 10 mM EDTA). Se homogeneizó con vortex y se incubó durante 2 horas a 56°C. Posteriormente se adicionó un volumen igual de fenol saturado/cloroformo/alcohol isoamílico (25: 24:1) y se agitó por inmersión 10 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm y se recuperó la fase acuosa. Se repite este paso una vez más. El ADN genómico fue precipitado con 2 volúmenes de etanol (EtOH) absoluto frío y 1/10 volúmenes de NaAc 3M pH 5.2. Se mezcló por inmersión y se lo dejó precipitando toda la noche a -20°C. Se centrifugó a 5°C durante 30 minutos a 14.000 rpm. El pellet obtenido se lavó con 800 µl de EtOH 70%. Se centrifugó a 5°C por 30 minutos a 14.000 rpm, y se dejó secar el pellet en estufa a 37°C. Finalmente el pellet se resuspendió en 50 µl de H₂O destilada y se guardó a -20°C hasta su análisis. Para analizar la calidad de material extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y se realizó la cuantificación por absorbancia a 260nm.

3.3 Oligonucleótidos empleados

El diseño de los oligonucleótidos se realizó utilizando el programa OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyze>) el cual muestra características como el contenido de GC, la Temperatura de fusión (T_m), así como la formación de homodímeros y heterodímeros entre los oligonucleótidos. Basándonos en estas características y en la secuencia de la cepa de referencia NZ2 (número de acceso: DQ184476) fueron diseñados los oligonucleótidos específicos para amplificar ambos genes en su totalidad.

Además, se realizó un alineamiento múltiple con genomas completos de ORFV pertenecientes a las cepas NZ2, IA82 y SA00, obtenidos a partir de GenBank para comprobar variabilidad (Tabla 4).

Tabla 4. Datos de las cepas utilizadas en el alineamiento múltiple.

	Origen	Animal	Modo de propagación	Nº acceso NCBI
NZ2	Nueva Zelanda	Ovejas	Cultivo celular en células de testículo ovino	DQ184476
IA82	Iowa, USA	Cabras	Cultivo celular en células de feto ovino	AY386264
SA00	Texas, USA	Corderos	Cultivo celular en células de riñón ovino	AY386263

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen ORF020 (VIR-FOR y VIR-REV) fueron diseñados para hibridar 76pb antes del codón de inicio ATG hasta 108pb después del codón de finalización, siendo el tamaño esperado del fragmento de 735pb, de los cuales 552pb corresponden al gen completo.

Para la puesta a punto de la PCR para el gen ORF117 se utilizaron dos juegos de cebadores, ambos conformados por un oligonucleótido diseñado en este trabajo y otro obtenido de la bibliografía. El par 117-F (Peralta et al., 2015) y GIF-REV (este trabajo) hibridan desde el codón de inicio hasta 92pb después del codón de finalización (Tabla 5). En este caso, el tamaño esperado del fragmento es de 890pb, de los cuales 798pb corresponden al gen completo. Por otro lado el par GIF-FOR (este estudio) y 117-R (Peralta et al., 2015) hibridan 91pb antes del codón de

inicio hasta el codón de finalización (Tabla 5). En estas condiciones el tamaño esperado del fragmento es de 889pb de los cuales 798pb corresponden al gen completo.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Polaridad	Referencias	Fragmento esperado (pb)
VIR-FOR	GGCGCTTATTTAATGTTATTGGCGG	sentido	Este trabajo	735
VIR-REV	CAGAACTTGGGAGGATTGAA	anti-sentido	Este trabajo	
117-F	ATGGCGTGCCTCAGGGTGTT	sentido	(Peralta et al., 2015)	890
GIF-REV	CGACGCCGTGGACCTTATCCTT	anti-sentido	Este trabajo	
GIF-FOR	AGCGTACACCGTCGCCTTGTCG	sentido	Este trabajo	889
117-R	TCAGCGCGCCGTCTGCAT	anti-sentido	(Peralta et al., 2015)	

3.4 Amplificación por PCR de los genes ORF020 y ORF117

Para la puesta a punto de la PCR del gen ORF020, se realizaron amplificaciones utilizando diluciones 1/10 y 1/50 de muestras a una temperatura de hibridación correspondiente a 50°C con los oligonucleótidos VIR-FOR y VIR-REV. En el caso del gen ORF117, se utilizaron muestras en dilución 1/10 a temperaturas de hibridación de 55°C y 60°C con los oligonucleótidos GIF-FOR y 117-R y por otro lado 117-F y GIF-REV.

El protocolo ha sido ajustado de acuerdo a las indicaciones del proveedor de la enzima a utilizar, así como las condiciones del ciclado de acuerdo a los oligonucleótidos empleados. La amplificación de ambos genes se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 50 µl conteniendo una mezcla de: 5µl de 10x buffer de PCR, 4µl de 25mM MgCl₂, 1µl de mezcla de dNTPs 10mM, 2,5 µl de cada oligonucleótido 10µM, 0,25µl de Taq ADN polimerasa Thermo Cientific (5U/µL), 1 µL de ADN en una dilución 1/10 (dicha dilución se realizó a partir de la solución stock del ADN extraído).

Las condiciones de la amplificación para el gen ORF020 fueron: 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto y 72°C durante 10 minutos. Para el caso del gen ORF117 las condiciones fueron las mismas excepto la temperatura de hibridación, que fue de 55° (únicamente en la puesta a punto) y de 60°C para todas las muestras.

3.5 Electroforesis en gel de agarosa

Cinco microlitros de cada producto de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Los geles fueron preparados en tampón TAE 1x (Tris acetato EDTA) conteniendo 1µl del agente intercalante Syber Safe (ThermoFisher-Scientific 10.000X) por cada 10 ml de gel. La visualización de los productos fue realizada bajo luz UV.

3.6 Análisis de las secuencias y análisis filogenéticos.

Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados en MacroGen (Korea). Para cada gen estudiado, las reacciones de secuenciación de ambas hebras fueron realizadas con los mismos oligonucleótidos que fueron utilizados en cada PCR en un secuenciador automático ABI3730XL (Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer).

Las secuencias obtenidas de ambas hebras se revisaron manualmente y se editaron utilizando el programa Lasergene- SeqMan versión 7.0.0. Las secuencias fueron alineadas con secuencias de género PPV previamente publicadas en GenBank utilizando el método Clustal W. El análisis filogenético de ambos genes fue llevado a cabo por el método de máxima verosimilitud basado en el modelo *General Time Reversible* (GTR+G+I) en MEGA versión 6. La confiabilidad estadística de los nodos se calculó a través de 1.000 réplicas de bootstrap.

4. Resultados

4.1 Extracción de ADN genómico viral

En este trabajo se realizó la extracción del ácido nucleico de las muestras UR26/12, UR27/12, UR28/12, UR30/12 y UR31/12 a partir del virus presente en las costras. Dichas extracciones fueron visualizadas en un gel de agarosa 0,8%. (Figura 9). El ADN viral del resto de las muestras fue extraído previamente (Olivero, 2008).



Fig. 9. Análisis de extracción del ADN genómico viral, mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM) utilizado 1kb GeneRuler- Fermentas (Thermo). Carriles 2-6: extracciones del ADN genómico de las cepas UR26/12, UR27/12, UR28/12, UR30/12 y UR31/12 respectivamente.

Como se puede ver en la figura 9, la extracción del ADN fue positiva para las cepas UR26/12, UR27/12, UR28/12 y UR30/12. En el caso de la cepa UR31/12 no se pudo apreciar una banda, lo cual indicaría una baja carga de material genético extraído, pero en la cuantificación por absorbancia 260nm esta cepa fue la que presentó mayor concentración de ADN. Los valores obtenidos rondaron entre los 871 y los 1.525 ng/ μ l, correspondiendo a las muestras UR28/12 y UR31/12 respectivamente.

Debido a que se utilizó Proteinasa K y fenol en el proceso de extracción, es de suponer que el ADN celular (el cual se encuentra fuertemente unido a proteínas), haya quedado en la fase fenólica, por lo cual podría concluirse que lo observado en la imagen correspondería al ADN viral.

4.2 Resultados de la amplificación por PCR

4.2.1 Gen ORF020

En una primera instancia se realizó la puesta a punto del protocolo de amplificación del gen ORF020. Para ello se utilizó el ADN genómico de la cepa UR07/79 previamente extraído por (Olivero, 2008) y acorde a lo observado en dicho estudio se emplearon las diluciones 1/10 y 1/50.

Tras la corrida electroforética se observó que una dilución 1/10 del extracto, era óptima para la amplificación con un temperatura de hibridación de 50°C, observando una banda de 735 pb que corresponde con al tamaño de banda esperado para el gen ORF020. No se observó banda para el caso de la dilución 1/50 (Figura 10).

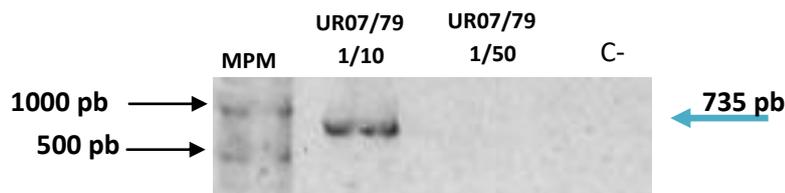


Fig. 10. Análisis del producto de amplificación del gen ORF020, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM) utilizado 100pb plus GeneRuler- Fermentas (Thermo). Carril 2: Cepa UR07/79, dilución 1/10. Carril 3: Cepa UR07/79, dilución 1/50. Carril 4: Control negativo

En base a este resultado, se decidió continuar con la amplificación del gen ORF020 del resto de las muestras de este estudio empleando una dilución 1/10 del ADN. La amplificación de las cepas UR04/04, UR08/79, UR10, UR18c/09 y UR19/10 resultaron negativas por lo que se ensayaron otras diluciones del ADN extraído acorde a lo sugerido por resultados obtenidos anteriormente por Olivero (Olivero, 2008, 2012). La amplificación de las cepas UR04/04 y UR10 fue realizada en diluciones 1/5 y 1/50; para estas repeticiones resultó positiva la amplificación de UR04/04 en la dilución 1/5, pudiéndose observar una banda tenue en la corrida electroforética. En el caso de las cepas UR08/79 y UR18c/09 se repitió la amplificación utilizando 1µl de la extracción pura, y los resultados fueron positivos para la última. Para la cepa UR19/10, la repetición

utilizando una dilución 1/50 no mostró resultados positivos (resultados no mostrados).

Los resultados en este caso fueron positivos para 31 de las 40 muestras estudiadas, observando una banda del tamaño esperado correspondiente a 735 pb. En la Figura 11 se muestra el resultado positivo para 24 de las muestras estudiadas a modo de facilitar su visualización y comparación. Estos resultados fueron obtenidos en múltiples PCR, cada una de ellas con su correspondiente control negativo (no se muestran en la imagen). Si bien se realizó la misma dilución de la muestra para todas las cepas, la presencia de bandas intensas y bandas tenues podría deberse a que el material genético del cual se partió se encontrara a diferentes concentraciones. Para algunas cepas se pueden observar bandas inespecíficas, correspondientes a dímeros de cebadores (Figura 11).

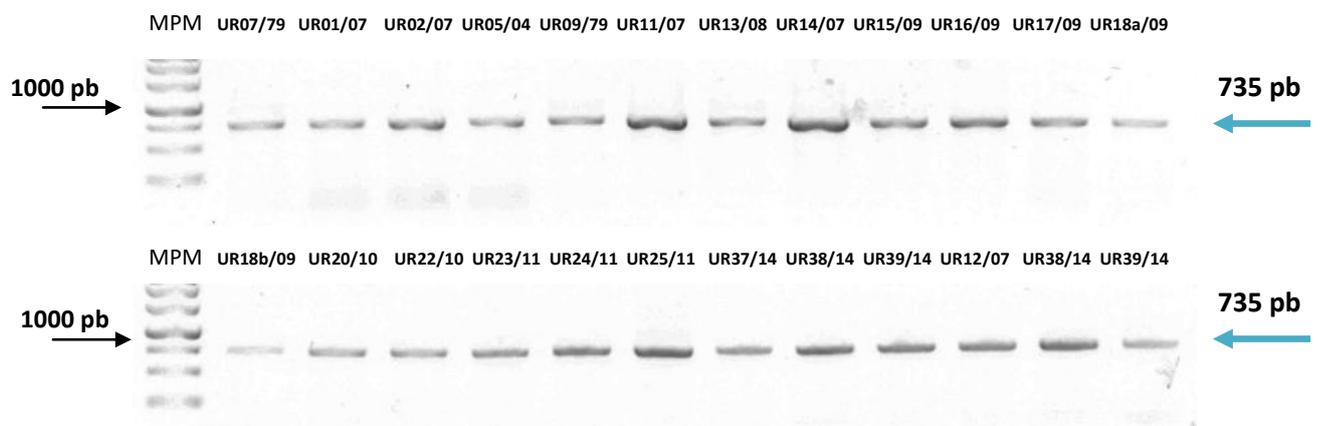


Fig. 11. Análisis de los productos de amplificación del gen ORF020 mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, amplificación total del gen ORF020. Carriles 1: Marcador de peso molecular (MPM) utilizado 1kb GeneRuler- Fermentas (Thermo). Carriles 2-13: Se observan los resultados de 24 de las 31 muestras positivas.

4.2.2 Gen ORF117

La puesta a punto de la amplificación por PCR del gen ORF117, se realizó en primera instancia con el juego de cebadores diseñados en este estudio GIF-FOR y GIF-REV. Para ello, se testaron diferentes temperaturas de hibridación (53, 56, 59, 62, 65 y 68 °C). Los resultados en todos los casos fueron negativos, por lo que se incluyeron los cebadores 117-F y 117-R en las pruebas posteriores. Se llevaron a cabo ensayos de PCR con combinaciones de los diferentes cebadores en un ciclado con temperatura de hibridación de 55°C o 60°C (Figura 12).

Para estos ensayos se utilizó una mezcla de las muestras UR37/14, UR38/14 y UR39/14. Los resultados mostraron una amplificación positiva (banda de tamaño esperado) para la combinación de cebadores 117-F y GIF-REV tanto a 55°C como a 60°C, mostrando esta última una mayor intensidad de amplificación. Para el juego de cebadores GIF-FOR y 117-R, se observó una banda tenue para la temperatura de hibridación de 60°C (Figura 12).

A partir de estos resultados para la amplificación del gen ORF117, se determinó el uso de los cebadores 117-F y GIF-REV y una temperatura de hibridación de 60°C.

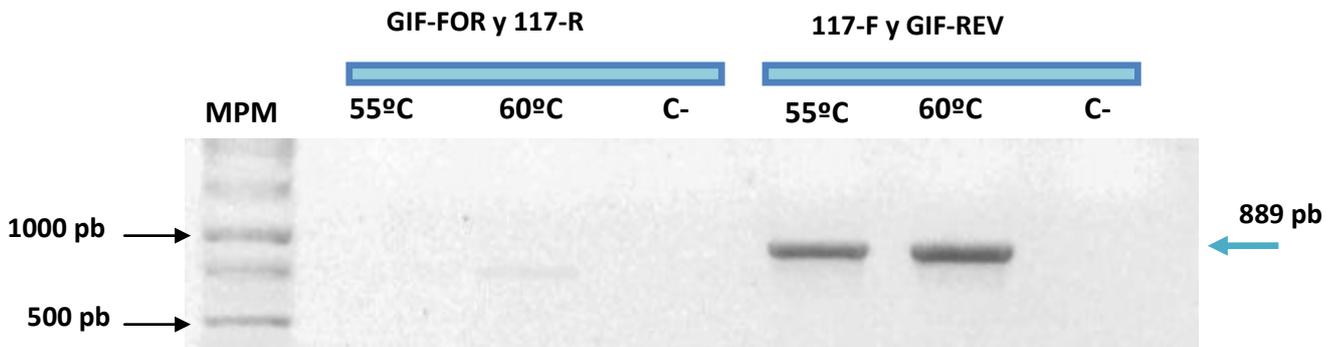


Fig. 12.. Análisis del producto de amplificación por PCR del gen ORF117, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM) utilizado 1kb GeneRuler-Fermentas (Thermo). Carriles 2-4: Amplificación con cebadores GIF-REV y 117-R con temperaturas de hibridación iguales a 55°C y 60°C respectivamente, y control negativo a 55°C. Carriles 5-7: Amplificación con cebadores 117-F y GIF-REV con temperaturas de hibridación iguales a 55°C y 60°C respectivamente y control negativo a 55°C.

Los resultados para el gen ORF117 fueron positivos para un 77% (31 de 40) de las muestras estudiadas (al igual que para el gen ORF020).

Además de la presencia de bandas intensas y bandas tenues, se encontraron bandas inespecíficas correspondientes a dímeros de cebadores (resultados no mostrados en la figura 13).

En la figura 13 se muestra el resultado positivo para 24 de las muestras estudiadas para el ORF117. Al igual que para ORF020 la presencia de bandas intensas y bandas tenues puede deberse a diferencias en las concentraciones de partida de cada una de las muestras.

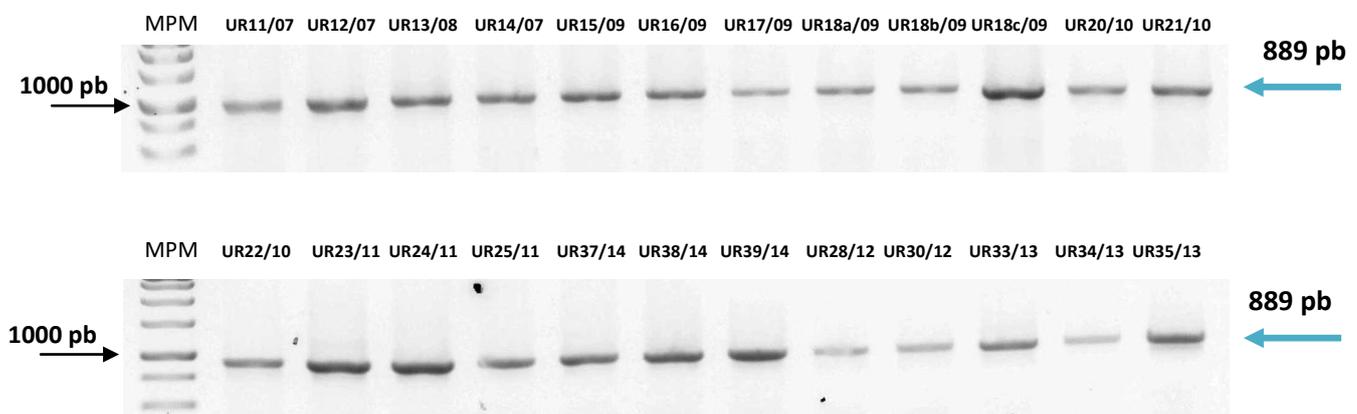


Fig. 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, amplificación total del gen ORF117. Carriles 1: Marcador de peso molecular (MPM) utilizado 1kb GeneRuler- Fermentas (Thermo). Carriles 2-13: Se observan los resultados de 24 de las 31 muestras positivas.

Para cada gen se lograron amplificar 31 cepas, de las cuales 29 fueron amplificadas exitosamente para ambos genes virales (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de las amplificaciones de ORF020 y ORF117 para las cepas estudiadas.

Cepas	ORF020	ORF117
UR01/07	+	+
UR02/07	+	+
UR03/07	+	+
UR04/04	+	-
UR05/04	+	-
UR06/86	-	-
UR07/79	+	+
UR08/79	-	+
UR09/79	+	+
UR10/07	-	-
UR11/07	+	+
UR12/07	+	+
UR13/08	+	+
UR14/07	+	+
UR15/09	+	+
UR16/09	+	+
UR17/09	+	+
UR18a/09	+	+
UR18b/09	+	+
UR18c/09	+	+
UR19/10	-	-
UR20/10	+	+
UR21/10	+	+
UR22/10	+	+
UR23/11	+	+
UR24/11	+	+
UR25/11	+	+
UR26/12	-	-
UR27/12	-	-
UR28/12	+	+
UR30/12	+	+
UR31/12	-	-
UR32/13	-	-
UR33/13	-	+
UR34/13	+	+
UR35/13	+	+
UR36/13	+	+
UR37/14	+	+
UR38/14	+	+
UR39/14	+	+

Se muestra si el resultado de la corrida electroforética fue positivo (+) o negativo (-).

4.3 Secuenciación de productos de PCR

En el caso del gen ORF020, los resultados de la secuenciación mostraron cromatogramas con buena calidad de señal, lo que permitió una correcta lectura de la totalidad del gen.

La amplificación y secuenciación del gen ORF117 en su totalidad fue exitosa. Sin embargo, el cebador 117F hibrida con la región inicial del gen, por lo cual la calidad del cromatograma en dicha región no aseguraba una correcta lectura. Por este motivo, se optó por descartar los primeros 18 nucleótidos correspondientes a una región del cebador, dejando un largo de secuencia de 780pb para los análisis filogenéticos posteriores.

4.4 Análisis filogenético

4.4.1 Gen ORF020

El grupo de secuencias utilizado en el análisis filogenético incluyó las secuencias obtenidas en este estudio para el gen ORF020 y secuencias presentes en una base de datos (*GenBank*), las cuales fueron elegidas tras realizar una búsqueda mediante el programa BLAST con secuencias obtenidas en este estudio (Tabla 7).

Dichas secuencias fueron alineadas mediante ClustalW y la filogenia se construyó bajo el método Máxima verosimilitud (utilizando el algoritmo GTR+G+I). La confiabilidad estadística de los nodos se calculó mediante 1.000 réplicas de bootstrap. Para el análisis filogenético del gen ORF020 se utilizó un fragmento de 552pb correspondiente al gen completo. A su vez, se incluyó una cepa externa BPSV integrante del género PPV, de manera de generar una raíz al árbol (Figura 14).

Tabla 7. Secuencias utilizadas en el análisis filogenético para el gen ORF020.

Cepa	Hospedero	País	N° de acceso
UR01/07	Cordero y oveja de cría	Uruguay	----
UR02/07	Cordero y oveja de cría	Uruguay	----
UR03/07	Cordero y oveja de cría	Uruguay	----
UR04/04	Corderos	Uruguay	----
UR05/04	Ovino	Uruguay	----
UR07/79	Ovino	Uruguay	----
UR09/79	Ovino	Uruguay	----
UR11/07	Corderos	Uruguay	----
UR12/07	Ovino	Uruguay	----
UR13/08	Ovino	Uruguay	----
UR14/07	Ovino	Uruguay	----
UR15/09	Corderos	Uruguay	----
UR16/09	Corderos	Uruguay	----
UR17/09	Ovino	Uruguay	----
UR18a/09	Ovino	Uruguay	----
UR18b/09	Ovino	Uruguay	----
UR18c/09	Ovino	Uruguay	----
UR20/10	Ovino	Uruguay	----
UR21/10	Ovino	Uruguay	----
UR22/10	Corderos, borregos y adultos	Uruguay	----
UR23/11	Ovinos	Uruguay	----
UR24/11	Ovinos	Uruguay	----
UR25/11	Ovinos	Uruguay	----
UR28/12	Ovinos	Uruguay	----
UR30/12	Ovinos	Uruguay	----
UR34/13	Ovinos	Uruguay	----
UR35/13	Ovinos	Uruguay	----
UR36/13	Ovinos	Uruguay	----
UR37/14	Borrego	Uruguay	----
UR38/14	Cordero	Uruguay	----
UR39/14	Ovinos	Uruguay	----
----	Buey almizclero	E.E.U.U	AY424974
----	Ovinos	E.E.U.U	AY424975
----	Takin de Sichuan	E.E.U.U	AY424976
OV-CE/Shoe	Caprinos	E.E.U.U	AY278211
OV-V	Caprinos	E.E.U.U	AY278210
OV-SA00	Caprinos	E.E.U.U	AF380126
sCh97	Ovinos	Argentina	KP244327
sPi13	Ovinos	Argentina	KP244326
SV820/10	Ovinos	Brasil	KF927111
SV269/11	Ovinos	Brasil	KF927109
SV252/11	Ovinos	Brasil	KF927108
NZ2	Ovinos	Nueva Zelanda	AF053969
IJS081	Serau japonés	Japón	AB492085
HIS	Serau japonés	Japón	AB522798
Hoping	Caprinos	Taiwán	EU935104
Taiping	Caprinos	Taiwán	EU327508
SBF/Goabal-01/Sheep	Ovinos	India	KU672680
MRCSG/Shuhama-01/Sheep	Ovinos	India	KU672686
TVCC/Shuhama-02/Sheep	Ovinos	India	KU672679
TVCC/Shuhama-01/Goat	Caprinos	India	KU672682
SX3	Caprinos	China	KJ139958
Xinjiang2	Caprinos	China	KF666564
ORFV/XinJiang/2011/China	Ovinos	China	JN565695
ORFV/2009/Korea	Caprinos	Corea del Sur	GQ328007
D1701	Ovinos	Alemania	HM133903
Orf-11	Ovinos	Reino Unido	AJ222702
MRI Scab	Ovinos	Reino Unido	AJ222701
BPSV	----	----	AY278213

Todas las secuencias de Uruguay provienen de este estudio. El resto de las secuencias fueron obtenidas de la base de datos GenBank.

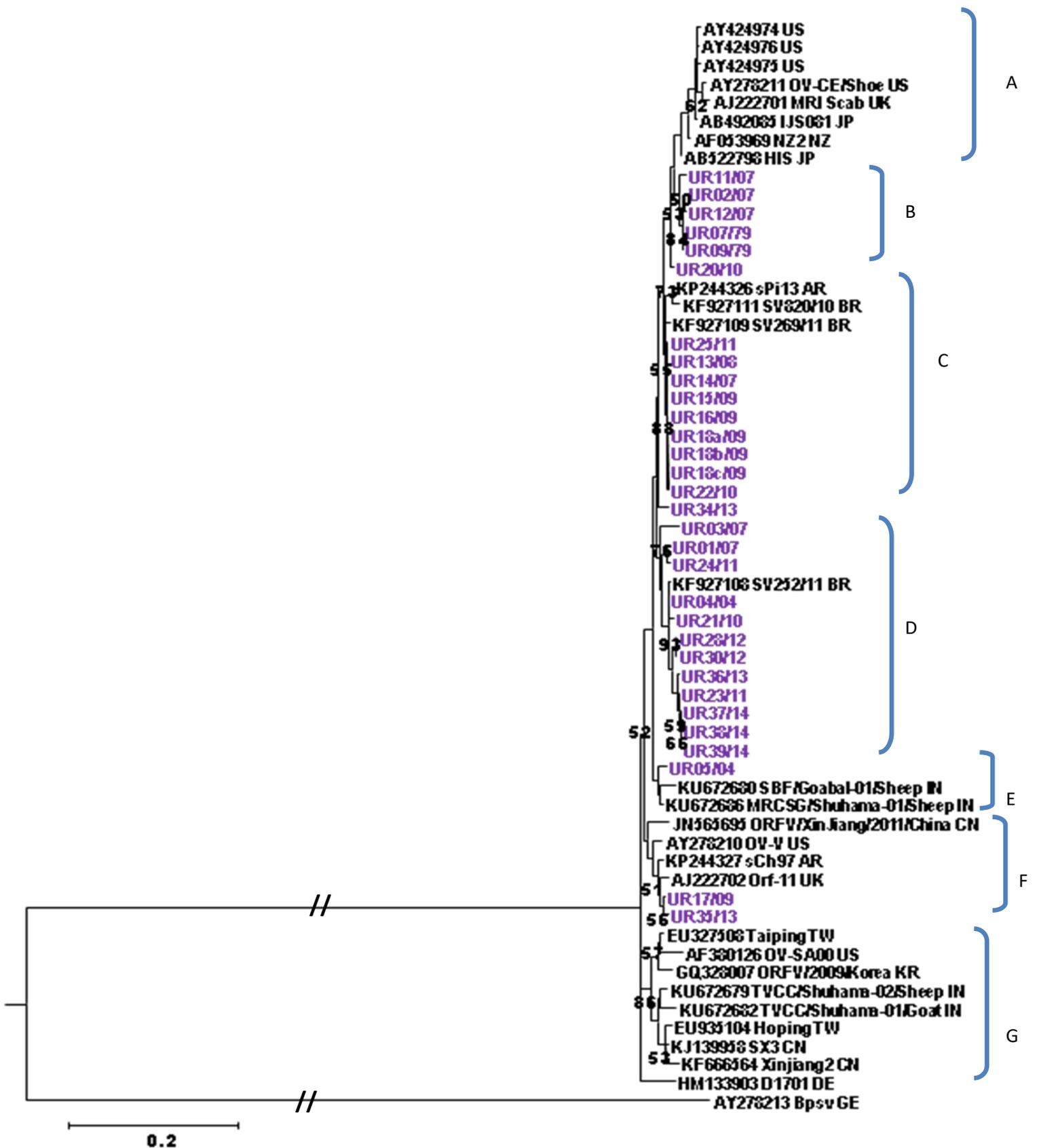


Fig. 14. Análisis filogenético del gen ORF020. Se utilizó el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo General Time Reversible (GTR+G+I). Se muestran los valores de bootstrap superiores a 50. El análisis incluyó 59 secuencias nucleotídicas y fue realizado en Mega 6.0. No se muestra el largo total de las ramas que separan al grupo externo (//), para generar una mejor visualización de las secuencias a analizar.

Ocho cepas provenientes de Estados Unidos, Reino Unido, Japón y Nueva Zelanda aisladas en el período 1982-2004 agruparon en el clado

A. De estas cepas, únicamente 3 fueron obtenidas de ovinos (AY424975; AJ222701 y AF053969), mientras que las 5 cepas restantes (AY424974; AY424976; AY278211; AB492085 y AB522798) fueron aisladas a partir de otras especies: buey almizclero, cabra antílope y caprinos respectivamente. Las últimas dos cepas fueron aisladas a partir de un brote en Serau Japonés (Figura 14).

EL clado B, se encontró constituido exclusivamente por cepas uruguayas, y en él se agruparon dos cepas obtenidas en el año 1979, UR07/79 y UR09/79, las cuales integran el pool vacunal original, junto con cepas extraídas en el año 2007: UR02/07 perteneciente a un brote en ovinos previamente vacunados; la cepa UR11/07, la cual pertenece a un brote espontáneo en un cordero no vacunado y UR12/07 proveniente de un animal previamente vacunado (Figura 14).

La cepa UR20/10 obtenida en el año 2010 a partir de un animal previamente vacunado, se encuentra próximo al clado B, pero no forma parte del mismo.

Se puede observar una agrupación de cepas uruguayas provenientes de ovinos previamente vacunados, correspondientes al período 2007-2011 (UR25/11; UR13/08; UR14/07; UR15/09; UR16/09; UR18a/09; UR18b/09; UR18c/09; UR22/10), con una Argentina y dos Brasileras presentes en ovinos en los años 2014-2015. Cabe destacar que las cepas UR18a/09; UR18b/09 y UR18c/09 fueron extraídas de un mismo animal, pero de lesiones ubicadas en diferentes zonas del cuerpo. (Figura 14).

Próxima a dicho *clado* pero sin formar parte de él se encuentra la cepa uruguaya UR34/13 obtenida a partir de un brote en ovinos ocurrido en 2013.

Las cepas UR01/07 y UR03/07, (integradas posteriormente al pool vacunal) fueron aisladas a partir de un brote ocurrido en un rebaño de ovinos previamente vacunados y agrupan en un mismo *clado* junto a 10 cepas más de Uruguay (UR24/11; UR04/04; UR21/10; UR28/12; UR30/12; UR36/13; UR23/11; UR37/14; UR38/14; UR39/14), y una cepa de un brote de ovinos en Brasil; en cambio la cepa UR13/08 la cual también fue integrada posteriormente al pool vacunal y fue aislada a partir de un brote ocurrido en un rebaño de ovinos previamente vacunados, agrupa de manera separada. Dentro de las 10 cepas uruguayas, 2 pertenecen a brotes de animales previamente vacunados, mientras que del resto de ellas no se posee información en ese aspecto (Figura 14).

La cepa UR05/04 obtenida a partir de ovinos previamente vacunados, agrupó en el *clado* E con dos cepas obtenidas en el año 2016 a partir de ovinos en India (Figura 14).

Las cepas uruguayas UR17/09 y UR35/13 agruparon en el *clado* F con cepas de China, Estados Unidos, Argentina y Reino Unido (JN565695, AY278210, KP244327 y AJ222702 respectivamente), las cuales fueron obtenidas entre 2001 y 2013. Todas ellas fueron aisladas a partir de ovinos, a excepción de AY278210 que fue obtenida a partir de caprinos (Figura 14).

Por otro lado, en el *clado* G no agrupó ninguna cepa uruguaya, sino que se pueden observar principalmente cepas pertenecientes al continente asiático, más específicamente de China (KJ139958 y KF666564), Corea del Sur (GQ328007), Taiwán (EU327508 y EU935104) e India (KU672682 y KU672679). En este *clado* también agrupó una cepa estadounidense (AF380126). Todas ellas fueron extraídas en el período 2003-2016 a partir de caprinos, a excepción de KU672679 que fue obtenida a partir de ovinos (Figura 14).

Próximo al *clado* G agrupó una cepa de un brote de ovinos en 2010 en Alemania. La cepa de BSPV agrupa en un *clado* diferente de las cepas pertenecientes a la especie ORFV, actuando como grupo externo.

4.4.2 Gen ORF117

El grupo de secuencias utilizado en el análisis filogenético del gen ORF117 incluyó las secuencias obtenidas en este estudio y secuencias presentes en *GenBank*, las cuales fueron elegidas tras realizar un BLAST con secuencias de este estudio (Tabla 9).

La cepa UR11/07 si bien amplificó correctamente, no fue incorporada al estudio filogenético. Esto se debió a que no se pudo obtener una secuencia consenso confiable entre ambas hebras, debido a que los cromatogramas fueron de mala calidad.

Tabla 9. Secuencias utilizadas en el análisis filogenético para el gen ORF117.

Cepa	Hospedero	País	N° de acceso
UR01/07	Cordero y oveja de cría	Uruguay	----
UR02/07	Cordero y oveja de cría	Uruguay	----
UR03/07	Cordero y oveja de cría	Uruguay	----
UR07/79	Ovino	Uruguay	----
UR08/79	Ovino	Uruguay	----
UR09/79	Ovino	Uruguay	----
UR12/07	Ovino	Uruguay	----
UR13/08	Ovino	Uruguay	----
UR14/07	Ovino	Uruguay	----
UR15/09	Corderos	Uruguay	----
UR16/09	Corderos	Uruguay	----
UR17/09	Ovino	Uruguay	----
UR18a/09	Ovino	Uruguay	----
UR18b/09	Ovino	Uruguay	----
UR18c/09	Ovino	Uruguay	----
UR20/10	Ovino	Uruguay	----
UR21/10	Ovino	Uruguay	----
UR22/10	Corderos, borregos y adultos	Uruguay	----
UR23/11	Ovino	Uruguay	----
UR24/11	Ovino	Uruguay	----
UR25/11	Ovino	Uruguay	----
UR28/12	Ovino	Uruguay	----
UR30/12	Ovino	Uruguay	----
UR33/13	Ovino	Uruguay	----
UR34/13	Ovino	Uruguay	----
UR35/13	Ovino	Uruguay	----
UR36/13	Ovino	Uruguay	----
UR37/14	Borrego	Uruguay	----
UR38/14	Cordero	Uruguay	----
UR39/14	Ovino	Uruguay	----
MUK59/05	Cabra	India	DQ922634
F07.3748S	Ovino	Finlandia	JF773690
F09.1160S	Ovino	Finlandia	JF773691
F07.808R	Reno	Finlandia	JF773686
F07.810R	Reno	Finlandia	JF773687
F07.816R	Reno	Finlandia	JF773688
F94.848R	Reno	Finlandia	JF773684
F92.849R	Reno	Finlandia	JF773685
xinjiang2	Cabra	China	KF666566
HB1	Cabra	China	KJ610834
HB	Cabra	China	KJ610835
GO	Cabra	China	KP010354
Yx	Cabra	China	KP010353
B029	Homo sapiens	Alemania	KF837136
NA1/11	Ovino	China	KF234407
D1701	Ovino	Alemania	HM133903
NZ2	Ovino	Nueva Zelanda	DQ184476
OV-SA00	Cabra	Estados Unidos	AY386264
OV-IA82_ORFA	Ovino	Estados Unidos	AY386263
Cam/09	Camello	India	GU460372

Todas las secuencias de Uruguay provienen de este estudio. El resto de las secuencias fueron obtenidas de la base de datos Genbank.

Dichas secuencias fueron alineadas con el programa *ClustalW* y la filogenia se construyó bajo el método *Máxima verosimilitud* (utilizando el algoritmo GTR+G+I). La confiabilidad estadística de los nodos se calculó mediante 1.000 réplicas de bootstrap. Para el análisis filogenético del gen ORF117 se utilizó un fragmento de 780 pb correspondiente a una amplificación parcial del gen. En primer lugar se realizó un árbol con BPSV como grupo externo, y en él se pudo determinar que una cepa de ORFV era lo suficientemente lejana filogenéticamente del resto como para generar una raíz y a su vez mejorar la visualización de las relaciones entre las cepas de este estudio. Entonces, como grupo externo se utilizó una secuencia de este gen perteneciente a ORFV aislada de un Camello en India (Figura 15).

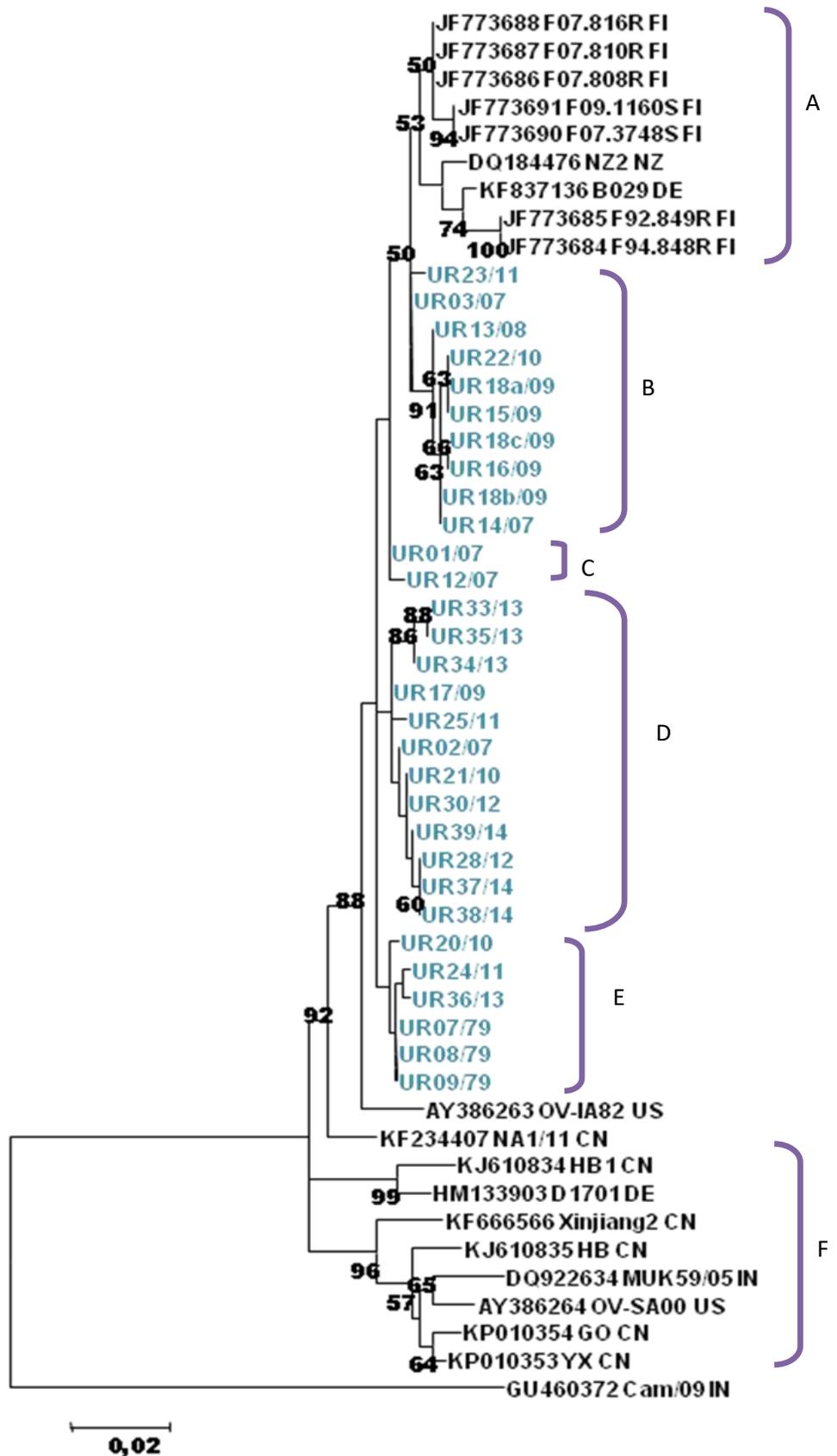


Fig. 15. Análisis filogenético del gen ORF0117. Se utilizó el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo General Time Reversible (GTR+G+I). Se muestran los valores de bootstrap superiores a 50%. El análisis incluyó 50 secuencias nucleotídicas y fue realizado en Mega 6.0.

En el *clado* A se encuentran agrupadas nueve cepas obtenidas en el período 1982-2009, de las cuales siete fueron obtenidas en Finlandia (JF773688; JF773687; JF773686; JF773691; JF773690; JF773685 y JF773684), una en Nueva Zelanda (DQ184476) a partir de ovinos y una en Alemania (KF837136) aislada a partir de un humano. De las siete cepas finlandesas, cinco fueron aisladas a partir de renos (JF773688; JF773687; JF773686; JF773685 y JF773684) y dos de ovinos (JF773691; JF773690) (Figura 15).

Todas las cepas uruguayas utilizadas en este estudio agruparon en cuatro clados, en los cuales no se encontró agrupada ninguna cepa de otro país (Figura 15. clados B, C, D y E).

Todas las cepas que agruparon en el clado B (UR23/11; UR03/07; UR13/08; UR22/10; UR18a/09; UR15/09; UR18c/09; UR16/09; UR18b/09 y UR14/07) fueron obtenidas entre los años 2007 y 2011 en Uruguay, y provienen de ovinos previamente vacunados (Figura 15).

Las cepas UR01/07 y UR12/07 agruparon juntas (clado C), habiendo sido ambas aisladas en el año 2007 a partir de ovinos previamente vacunados (Figura 15).

En el clado D agruparon doce cepas uruguayas obtenidas a partir de ovinos en el período 2007-2014. Tres de ellas (UR25/11; UR02/07 y UR21/10) fueron aisladas de ovinos previamente vacunados y UR17/09 se obtuvo a partir de un animal no vacunado. No se tienen datos acerca de la vacunación del resto de las cepas contenidas en este clado (UR33/13; UR35/13; UR34/13; UR30/12; UR39/14; UR28/12; UR37/14 y UR38/14) (Figura 15).

Las cepas uruguayas UR20/10, UR24/11, UR36/13, UR07/09, UR08/09 y UR09/79 obtenidas a partir de ovinos entre el año 1979 y 2013 agruparon juntas en un mismo clado (E).

Próximo a este clado pero fuera del agrupamiento se encuentra una cepa pertenecientes a Estados Unidos obtenida en el año 1982 y otra de China aislada en el año 2011 (AY386263 y KF234407 respectivamente).

En el clado F agruparon cepas principalmente asiáticas, pertenecientes a China (KJ610834; KF666566; KJ610835; KP010354 y KP010153) y a India (DQ922634). Entre ellas también agruparon una cepa estadounidense (AY386264) y una alemana (HM133903). Todas ellas

fueron obtenidas en el período 2000-2013, y se aislaron a partir de caprinos, a excepción de la cepa alemana.

La cepa de ORFV aislada a partir de camello en India agrupó por fuera del resto de las cepas de ORFV, actuando así como grupo externo.

Debido a que las secuencias argentinas sPi13 y sCh97 correspondían a un fragmento del gen de 667pb, se realizó otro análisis filogenético para dicho fragmento el cual incluyó a dichas cepas argentinas. En el árbol puede observarse que las cepas argentinas agrupan en clados con cepas uruguayas al igual que sucedió para el gen ORF020 (Figura 16).

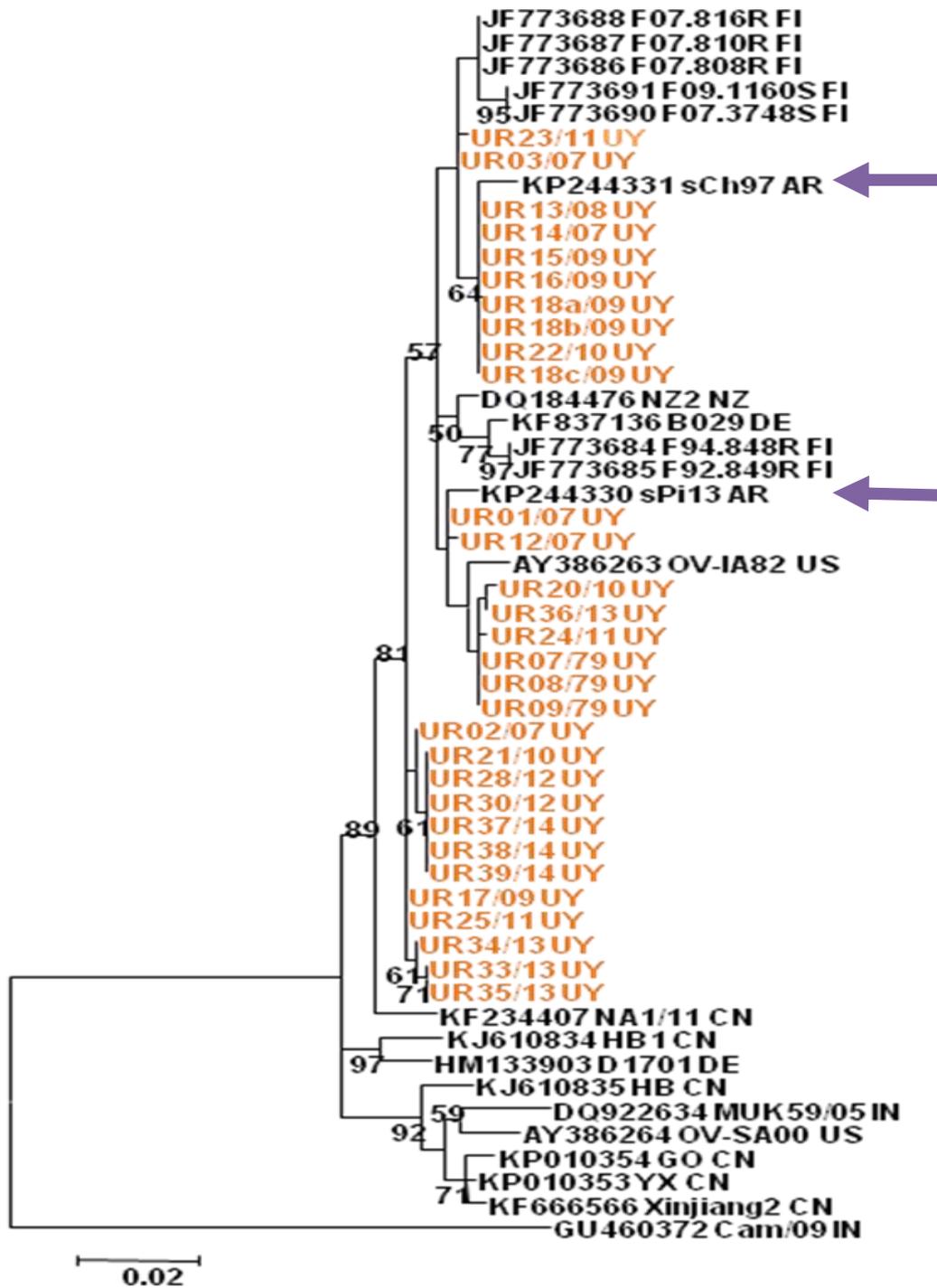


Fig. 16. Análisis filogenético del gen parcial ORF0117. Se utilizó el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo General Time Reversible (GTR+G+I). Se muestran los valores de bootstrap superiores a 50%. El análisis incluyó 52 secuencias nucleotídicas de 667pb y fue realizado en Mega 6.0. Se señalan con flechas violetas las cepas argentinas.

4.5 Análisis de secuencia aminoacídica

En este análisis y para ambos genes se muestran únicamente las secuencias obtenidas en este estudio. A modo de facilitar la visualización, aquellas secuencias aminoacídicas idénticas se representan como una única secuencia.

4.5.1 Secuencia aminoacídica completa de VIR

El múltiple alineamiento de la secuencia aminoacídica completa de la proteína VIR, deducida a partir de la secuencia nucleotídica del gen ORF020, muestra una alta identidad entre las diferentes muestras analizadas. A su vez pueden observarse sitios donde han ocurrido mutaciones únicas (indicadas en celeste en la Figura 17), y otros sitios donde cierta mutación se encuentra representada en más de una secuencia (indicados en verde en la Figura 17).

En este estudio se han determinado para varias cepas cambios aminoacídicos en VIR en los sitios 47, 48, 122, 124, 146, 153, 154 y 182, además del resto de los cambios identificados que se mencionarán a continuación.

Puede realizarse una distinción entre los cambios aminoacídicos similares (siendo aquellos que poseen similaridad en su carácter), y los cambios fuertes, o no similares (aquellos que no poseen similaridad de carácter).

Tres cepas poseen cambios aminoacídicos únicos con respecto a lo observado en las otras cepas estudiadas. La cepa UR03/07 posee dos cambios únicos siendo estos: 1) Lisina (K) 146 en lugar de Treonina (T), de carácter básico y polar neutro respectivamente. 2) Tirosina (Y) 183 en lugar de Fenilalanina (F), siendo de carácter polar neutro y apolar respectivamente. Ambos son cambios de carácter fuerte y se encuentran en el dominio C-terminal, el cual posee un rol importante en la unión al ARNdh. La cepa UR05/04 posee un cambio aminoacídico único presente en el dominio N terminal, que consiste en la presencia del aminoácido Alanina (A) 66 en vez del aminoácido Serina (S). Dichos aminoácidos son de carácter apolar y polar neutro respectivamente. La cepa UR35/13 posee 3 cambios aminoacídicos únicos; dos de ellos consisten en el cambio de las Leucinas (L) 12 y 13 por Isoleucinas (I), (siendo ambos de carácter apolar) y se encontraron en el dominio N-terminal, y el tercero es el cambio de la Alanina (A) 153 por una Serina (S), los cuales son de carácter apolar y polar neutro respectivamente, y fue observado en el dominio C terminal.

El resto de los cambios aminoacídicos observados se encontraron presentes en más de una cepa y puede observarse que todos ellos a excepción de (D48E), se encontraron en el dominio C-terminal.

Dentro de los cambios fuertes, uno fue dado por el cambio de un aminoácido de carácter apolar, por uno polar neutro: 1) Serina (S) 132 en lugar de Alanina (A), en las cepas UR21/10 y UR35/13.

Tres cambios aminoacídicos se dieron por el cambio de un aminoácido de carácter polar neutro por uno apolar: 1) Alanina (A) 166 en lugar de Treonina (T), 2) Alanina (A) 169 en lugar de Serina (S), 3) Isoleucina (I) 170 en lugar de Serina (S). En las cepas UR34/13 y UR35/13 se observó el cambio de Prolina (P) 124 por una Serina (S), correspondiendo a aminoácidos apolares y polares neutro

respectivamente. Este último cambio resulta de interés debido a que el aminoácido Prolina puede “marcar” cambios (*loops*) en la estructura proteica (Pandey et al., 2013)

Todos estos cambios fuertes fueron encontrados en el dominio C-terminal de la proteína.

El cambio aminoacídico de Serina (S) en lugar de Arginina (R) 14, (siendo de carácter polar neutro y básico respectivamente) y se encontró un Ácido aspártico (D) en lugar de Glicina (G) 47, siendo éstos de carácter ácido y polar neutro respectivamente. Éstos últimos dos cambios fueron encontrados en el dominio N-terminal de la proteína.

El aminoácido Histidina (H) se observó en lugar de Asparagina (N) 74, siendo de carácter básico y polar neutro respectivamente, y encontrándose en las cepas UR35/13 y UR34/13. Dicho cambio fue el único encontrado en la región hidrofílica ubicada entre los dos dominios de la proteína.

Los 5 aminoácidos en el C terminal descritos para VACV como esenciales para la unión a ARNdh (Kottaridi et al., 2006), se encontraron conservados en todas las cepas de este estudio, pero en el caso de R168 y de K171 ambos son de carácter ácido y se encuentran invertidos en dichas posiciones (indicados en amarillo en la Figura 17).

4.5.2 Secuencia aminoacídica parcial de GIF

El múltiple alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína GIF, deducida a partir de la secuencia nucleotídica del gen ORF117, muestra una alta identidad entre las diferentes muestras analizadas. Para este gen no se encontraron cambios aminoacídicos únicos, sino que todos los cambios se encontraron representados en al menos dos cepas de las estudiadas.

aa 7

```

UR01/07_UY VLAVLALCGSVHSAQWIGERDFCTAHAQDVVFARLQVWMRIDRNVTAADNSSACALAIETP [67]
UR02/07_UY .....M.....I..... [67]
UR03/07_UY ..... [67]
* UR07/79_UY ..... [67]
UR12/07_UY .....W..... [67]
UR13/08_UY ..... [67]
* UR14/07_UY ..... [67]
* UR15/09_UY .....W..... [67]
* UR16/09_UY .....G..... [67]
UR17/09_UY .....M..... [67]
UR20/10_UY .....M..... [67]
* UR21/10_UY .....M.....I..... [67]
UR23/11_UY .....W..... [67]
UR24/11_UY .....L..... [67]
UR25/11_UY .....WG.....M..... [67]
* UR28/12_UY .....W.....M.....I..... [67]
* UR33/13_UY .....W.....M..... [67]
UR34/13_UY .....M..... [67]
UR36/13_UY .....L..... [67]
UR39/14_UY .....L.....M.....I..... [67]

```

```

UR01/07_UY PSNFDADVYVAAAGINVSVSAINCGFFNMQRQVETTYNTARRQMYVYMDSWDPWVLDDPQP [127]
UR02/07_UY ..... [127]
UR03/07_UY .....A..... [127]
* UR07/79_UY ..... [127]
UR12/07_UY ..... [127]
UR13/08_UY .....A..... [127]
* UR14/07_UY .....A..... [127]
* UR15/09_UY .....A..... [127]
* UR16/09_UY .....A..... [127]
UR17/09_UY ..... [127]
UR20/10_UY ..... [127]
* UR21/10_UY ..... [127]
UR23/11_UY .....A..... [127]
UR24/11_UY ..... [127]
UR25/11_UY ..... [127]
* UR28/12_UY ..... [127]
* UR33/13_UY ..... [127]
UR34/13_UY ..... [127]
UR36/13_UY ..... [127]
UR39/14_UY ..... [127]

```

```

UR01/07_UY LFSQEYENETLPYLLEVLRLARLYIRVGCTVPGEQPFVEVPGIDYPHTGMEFLQHVLRPN [187]
UR02/07_UY ..... [187]
UR03/07_UY ..... [187]
* UR07/79_UY ..... [187]
UR12/07_UY ..... [187]
UR13/08_UY ..... [187]
* UR14/07_UY .....EHI..... [187]
* UR15/09_UY .....EHI..... [187]
* UR16/09_UY .....EHI..... [187]
UR17/09_UY ..... [187]
UR20/10_UY ..... [187]
* UR21/10_UY ..... [187]
UR23/11_UY ..... [187]
UR24/11_UY ..... [187]
UR25/11_UY ..... [187]
* UR28/12_UY ..... [187]
* UR33/13_UY ..... [187]
UR34/13_UY ..... [187]

```

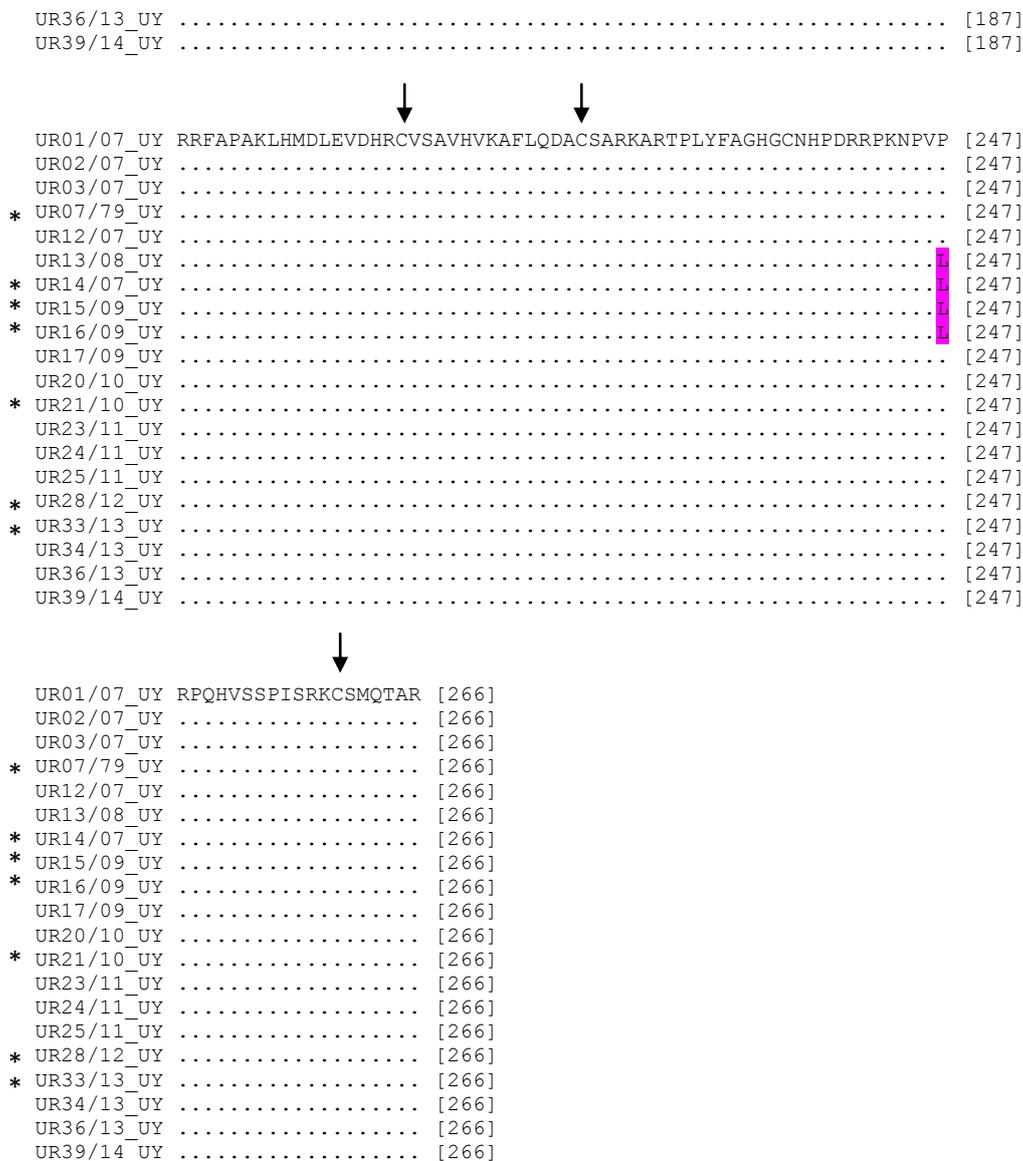


Fig. 18. Múltiple alineamiento de la secuencia aminoacídica parcial de la proteína GIF codificada por el gen ORF117.

Secuencias a partir del aa 7. La proteína secretada madura comienza en A²⁰, y los primeros 19 aminoácidos de GIF corresponden a un péptido señal de los cuales en esta imagen se muestran 13 (flecha violeta). En el análisis se utilizaron las cepas obtenidas en este estudio. Los sitios donde se dan cambios aminoacídicos se resaltan en color violeta. Se seleccionó un pool de secuencias representativas. Se señalan con * aquellas cepas que representan más de una secuencia:

*UR07/79=UR08/79= UR09/79; * UR14/07= UR18b/09; *UR15/09= UR18a/09= UR22/10; *UR16/09= UR18c/09;
 *UR21/10=UR30/12; *UR28/12= UR37/14=UR38/14; *UR33/13=UR35/13

Se señalan con flechas negras los residuos cisteína esenciales para la actividad de unión al ARNdh y con una barra naranja el motivo WDPWV. Los sitios potenciales de glicosilación se encuentran resaltados con color rojo (Deane et al., 2009)

Se encontraron conservados los residuos de C: C10, C40, C136, C185, C199 y C240 en todas las cepas uruguayas y se señalan con una flecha en la Figura 18. Cabe mencionar que debido a que la proteína secretada madura comienza en Ala20, las posiciones de las C son consideradas a partir de dicho aa.

La proteína GIF madura analizada en este estudio ha revelado la presencia del motivo importante para la actividad biológica WDPWV al igual que en estudios anteriores (McInnes et al., 2005). Sin embargo, dentro del mismo se puede identificar el cambio aminoacídico de V101 por A para 10 de las cepas uruguayas.

De los siete cambios encontrados, únicamente dos fueron similares:
1) Alanina (A) 114 en lugar de Valina (V), siendo ambos de carácter apolar,
2) Leucina (L) 240 en lugar de Prolina (P), siendo ambos de carácter apolar.

Dentro de los cambios aminoacídicos fuertes o no similares, encontramos cuatro que se dieron por el cambio de un aminoácido de carácter polar neutro por uno apolar:
1) Metionina (M) 24 en lugar de Treonina (T); 2) Isoleucina (I) 50 en lugar de Serina (S). Este cambio se ubicó en uno de los cuatro sitios potenciales de glicosilación, los cuales son importantes para la actividad biológica de la proteína (McInnes et al., 2005), el resto de los sitios de glicosilación están conservados, no encontrando mutaciones en las cepas uruguayas analizadas.

3) Fenilalanina (F) 165 en lugar de Tirosina (Y); 4) Triptófano (W) y Leucina (L) en lugar de Serina (S) 13. Este cambio es el único ubicado a nivel del péptido señal de la proteína (indicado con una flecha violeta en la Figura 18)

En las cepas UR16/09; UR18c/09 y UR25/11 se observó un cambio de Glicina (G) 14 en lugar de Alanina (A), siendo de carácter polar neutro y apolar respectivamente.



5. Discusión

En este trabajo se planteó profundizar en el conocimiento de cepas de ORFV vacunales y circulantes en Uruguay mediante la caracterización molecular de dos factores de virulencia poco estudiados en nuestro país anteriormente (ORF020 y ORF117), pudiendo así determinar la presencia o ausencia de mutaciones que puedan afectar la patogenicidad de ORFV.

Se logró con éxito el objetivo de profundizar en el conocimiento de cepas de ORFV vacunales y circulantes en Uruguay mediante la caracterización molecular de VIR y GIF.

A partir de la extracción de ADN se observó la presencia de material genético en casi todas las muestras y tras la cuantificación por absorbancia 260nm se comprobó la presencia del mismo. Para lograr una mejor visualización de los resultados de la extracción se cargó en cada pocillo la misma concentración de ADN según las mediciones en nanodrop. Cabe destacar que si bien se cargó la misma cantidad de ADN para todas las muestras, las intensidades de las bandas fueron diferentes y no correspondían con la cantidad supuesta seleccionada. Además se observaron bandas inferiores (datos no mostrados), las cuales se cree corresponden a contaminación de ARN. Por este motivo se podría explicar la falta de amplificación en ciertas cepas, ya que tras las amplificaciones por PCR para ORF020 y ORF117, las cepas que fueron amplificadas correctamente fueron UR28/12 y UR30/12. En resumen, si bien se observó la presencia de ADN en las muestras UR26/12, UR27/12 y UR31/12, la falta de amplificación puede deberse a la presencia de inhibidores, a la calidad de las muestras de las cuales se partió, así como a la sobreestimación de la cantidad de ADN en las muestras debido a la presencia de ARN en las mismas.

Se realizó de forma satisfactoria la puesta a punto de la PCR para amplificar los genes ORF020 y ORF117. El diseño de los cebadores fue correcto para el gen ORF020, ya que la amplificación dio resultados positivos. En el caso de ORF117 los cebadores diseñados en este trabajo no lograron en conjunto la amplificación del gen, por lo que se procedió a la utilización de un cebador de este estudio y uno obtenido a partir de la bibliografía (Peralta et al., 2015)

La amplificación para ambos genes fue de un 77,5% de las muestras. Para cada gen se lograron amplificar 31 cepas, de las cuales 29 fueron amplificadas en ambos ensayos. Esto sugiere que los resultados obtenidos en cuanto a la amplificación fueron muy buenos, y no debieron existir grandes errores en la manipulación.

El resultado negativo obtenido para la cepa UR06/86, tanto en la amplificación del gen ORF020 como ORF117, se puede atribuir al estado original de la muestra, la cual consistía en pelo con poco material costroso. Dicho resultado también se ha visto para los genes B2L y VEGF en estudios anteriores donde el resultado de la extracción del ADN genómico fue positivo, pero tal vez el material que se extrajo no fue suficiente para amplificar los genes seleccionados (Olivero, 2008).

En el caso de las muestras UR08/79 y UR33/13 el resultado negativo para el gen ORF020 puede deberse a una heterogeneidad en la zona donde hibridan los cebadores, ya que las mismas muestras fueron positivas para la amplificación de ORF117 en este estudio. Además, UR08/79 fue positiva para B2L en estudios anteriores (Olivero, 2008).

En el caso del gen ORF117 el resultado negativo obtenido para las cepas UR04/04 y UR05/04 puede ser también explicado por una posible heterogeneidad en la zona donde hibridan los cebadores, ya que las mismas muestras fueron positivas para la amplificación de ORF020 en este estudio.

5.1 Gen ORF020

En cuanto al análisis filogenético del gen ORF020, las cepas uruguayas se encontraron presentes en los cinco clados y en la mayoría de los casos agruparon con cepas provenientes de diferentes regiones del mundo. Los porcentajes de similitud encontrados en las cepas uruguayas para el gen ORF020 fueron de 96,3- 100% a nivel nucleotídico y de 96,7-100% a nivel proteico. Estos resultados concuerdan con varios estudios que han puesto de manifiesto un alto grado de identidad nucleotídica entre los aislados (96-99% en Brasil, 96,9% en Argentina y 93-99% en Italia y Grecia) para el gen VIR (Kottaridi et al., 2006; Martins et al., 2014; Peralta et al., 2015) Estos resultados sugieren que a pesar de que el gen ORF020 es un gen conservado localizado en la región central del genoma viral presenta variaciones a nivel nucleotídico que permiten discriminar los distintos clados observados.

Acerca de la regionalidad, cabe destacar que los resultados del análisis filogenético muestran la presencia de un clado constituido por cepas principalmente asiáticas, a excepción de una cepa estadounidense.

Si bien los clados C y D presentan cepas uruguayas agrupadas únicamente con cepas sudamericanas (Brasil y Argentina), en los clados E y F, las cepas de Uruguay agrupan con cepas provenientes de otros países del mundo. Por lo tanto, al igual que en varios trabajos previos (Inoshima et al., 2002; Kottaridi et al., 2006; Tikkanen et al., 2016) no se encontró una correlación geográfica en los resultados filogenéticos.

Las secuencias obtenidas en este estudio provienen de cepas extraídas en un amplio rango temporal ya que abarcan el período 1979-2014. Por este motivo, los resultados obtenidos a partir de su análisis nos proveen información acerca de las variaciones de este gen a lo largo del tiempo en nuestro país. Si se toma en cuenta el año de aislamiento de las cepas estudiadas, puede destacarse que las cepas uruguayas pertenecientes al año 1979 agruparon juntas, con algunas extraídas en el año 2007. A su vez, las cepas uruguayas extraídas en el año 2014 agruparon juntas, al igual que aquellas extraídas en el 2009. A pesar de estos resultados, si se consideran todas las cepas estudiadas, no se observa una correlación temporal en cuanto al aislamiento de las cepas con el análisis filogenético. Dicho resultado también se ha encontrado en otros estudios (Inoshima et al., 2002; Kottaridi et al., 2006; Tikkanen et al., 2016).

Si bien hay clados que se encuentran constituidos en su mayoría por un tipo de hospedero, no puede asegurarse una correlación entre el tipo de hospedero y el análisis filogenético. Esto puede apreciarse al notar que hay un clado que posee cepas provenientes de buey almizclero, cabra antílope, oveja, cabra común y cabra antílope japonesa. En el mismo sentido, en el clado G las cepas agrupadas provienen de caprinos, a excepción de una de ellas cuyo hospedero es un ovino. Cabe destacar de todas formas, que todas las cepas uruguayas agruparon con cepas obtenidas a partir de ovinos (acorde al origen de nuestras muestras).

Las cepas que conforman la vacuna (UR01/07; UR03/07; UR07/79; UR09/79 y UR13/08) no agruparon todas juntas para el gen ORF020, sino que agruparon UR01/07 Y UR03/07 en un clado; UR07/79 y UR09/79 en otro clado, y UR13/08 por separado. Esto mostró diferencias a lo observado en estudios anteriores para el gen VEGF (Olivero, 2008), donde UR01/07; UR03/07; UR07/79 y UR09/79 agruparon juntas y UR13/08 lo hizo aparte. El hecho de que se encuentren filogenéticamente distantes es razonable con el objetivo de cubrir con la vacuna diferentes variantes del virus.

Se ha observado que las cepas UR02/07, UR07/79, UR09/79, UR11/07 y UR12/07 agrupan dentro de un mismo clado y sufren pequeños cambios de aa entre ellas. Por otro lado, las cepas UR07/79 y UR09/79 son idénticas a nivel aminoacídico, y cada una de las otras cepas posee un único cambio aminoacídico con respecto a las mismas. Lo visto a nivel aminoacídico se correlaciona con lo observado a nivel nucleotídico.

Las cepas UR13/08, UR14/07, UR15/09, UR16/09 y UR18a/09, UR18b/09, UR18c/09, UR22/10 y UR25/11, según el análisis nucleotídico de ORF020 agrupan de manera independiente a las otras cepas uruguayas analizadas, sugiriendo diferencias a nivel nucleotídico con respecto a las últimas. Estas diferencias se ven reflejadas en el análisis de la secuencia aminoacídica, donde puede observarse que las primeras poseen un 100% de identidad, mientras que las otras cepas presentan cambios aminoacídicos con respecto a las mismas.

La cepa UR17/09 también presenta un 100% de identidad de secuencia aminoacídica con las cepas nombradas anteriormente, pero a pesar de los valores de bootstrap bajos agrupa por separado de éstas, junto a la cepa UR35/13. Este resultado es interesante, ya que entre estas dos cepas existen 8 cambios aminoacídicos. Era de esperarse que UR35/13 agrupara separado del resto debido a que posee tres cambios aminoacídicos únicos, pero este resultado no se esperaba de UR17/09.

En el clado D correspondiente al gen ORF020 se encuentran agrupadas las cepas UR01/07, UR03/07, UR04/04, UR21/10, UR23/11, UR24/11, UR28/12, UR30/12, UR36/13, UR37/14, UR38/14 y UR39/14. Dentro de ellas, encontramos secuencias aminoacídicas idénticas entre sí, como son UR23/11 y UR36/13; UR28/12 y UR30/12; UR37/14, UR38/14 y UR39/14. Entre dichos grupos y con el resto de las cepas pertenecientes al clado, se pueden observar ciertos cambios aminoacídicos. La cepa UR03/07 es la que se encuentra más distante filogenéticamente debido a que posee dos cambios aminoacídicos únicos. A pesar de los cambios que se observan, lo visto a nivel aminoacídico se correlaciona con lo observado a nivel nucleotídico.

Si bien la cepa UR05/04 en el análisis filogenético de ORF020 no agrupó con ninguna cepa uruguaya (al igual que se observó en estudios anteriores (Olivero, 2008); a nivel aminoacídico solo se pudo observar un cambio aminoacídico único.

En suma, no se observó ninguna correlación de origen geográfico, de origen animal o de fecha de aislamiento, lo que también se ha visto para el gen ORF020 en varios estudios previos (Inoshima et al., 2002; Klein & Tryland, 2005; Kottaridi et al., 2006; Tikkanen et al., 2016)

La mayoría de los resultados concuerdan con lo esperado, pero es necesario resaltar que los valores de *Bootstrap* para este análisis en general fueron bajos.

La Figura 17 muestra el alineamiento aminoacídico de las cepas uruguayas. En un alineamiento previo se tomaron en cuenta también las cepas argentinas sPi13 y sCh97 (KP244326 y KP244327 respectivamente) (Peralta et al., 2015) (datos no mostrados). Para estas dos cepas no se observó ningún cambio aminoacídico único, sino que las mutaciones presentes en dichas cepas se encontraron representadas al menos en una cepa uruguaya. Cabe destacar que un cambio aminoacídico único de UR35/13 (A153S) entre las cepas uruguayas, es observado en la cepa argentina sCh97, y que éstas dos cepas agrupan en un mismo clado. En cuanto a las cepas brasileras (Martins et al., 2014), tampoco se muestran resultados en la figura, pero también fueron consideradas para el análisis aminoacídico. En este caso, la cepa SV269/11 (KF927109) posee un cambio aminoacídico único, y cuatro cambios que se encuentran en más de una cepa uruguaya. En la cepa SV820/10 (KF927111) se pudieron observar dos cambios de aa únicos en comparación con las cepas uruguayas, y seis cambios compartidos con al menos una de ellas. Por último, la cepa SV252/11 (KF927108) no posee ningún cambio aminoacídico único, sino que comparte cuatro cambios con otras cepas uruguayas. Debido a las similitudes a nivel nucleotídico, estas 3 secuencias agruparon en dos clados formados por cepas uruguayas y por sPi13. Estos datos se correlacionan con los resultados del análisis aminoacídico.

Cabe destacar que cepas aisladas en el año 2007 y 2008 son idénticas a nivel aminoacídico a otra aislada en el año 2011, lo que muestra una alta conservación del gen en dichos casos.

De los 21 cambios aminoacídicos encontrados, 14 fueron localizados en el dominio C terminal de la proteína VIR. El hecho de que el dominio N-terminal se encuentre más conservado sugiere una patogénesis similar, mientras que la variabilidad encontrada a nivel del dominio C-terminal indica diferencias en la respuesta de IFN.

En estudios anteriores (Kottaridi et al., 2006; Martins et al., 2014) se han determinado cambios aminoacídicos en VIR. Dichos cambios se localizaron en los sitios 47, 48, 122, 124, 146, 153, 154 y 182. En este estudio también se registraron cambios aminoacídicos en dichas posiciones.

Se encontraron 6 cambios aminoacídicos únicos entre las cepas uruguayas de este trabajo, ubicados 3 de ellos en el dominio N terminal y 3 en el dominio C terminal, así como 7 cambios de carácter similar, y 8 cambios fuertes presentes en más de una cepa. ORF020 se encuentra en la región conservada del genoma de ORFV, por lo cual podría no esperarse una gran variabilidad a nivel nucleotídico y aminoacídico. La acumulación de estas nuevas mutaciones en un gen conservado lleva a cuestionarse el motivo por el cual la selección permitió dichos cambios. Sin embargo, hay que recordar que dicho gen codifica un factor de resistencia al interferón (VIR): una proteína que modula la respuesta inmune del huésped a la infección, con un papel probable en la persistencia y la reinfección del virus. Por lo tanto, dicho gen se encuentra sometido a la presión inmune del huésped, y presenta una tendencia a la variación. Se sugiere que estas mutaciones pueden ser parte de la estrategia del virus para escapar de la respuesta inmune del huésped o que puede referirse a una cepa probablemente con un perfil diferente en la patogénesis (Kottaridi et al., 2006).

Considerando la importancia del dominio C terminal en la unión de VIR con el ARNdh, estudios más profundos son requeridos acerca de los cambios aminoacídicos únicos, y aquellos de carácter fuerte que se encontraron en dicho dominio. Estos últimos fueron (A¹³²S), (T¹⁶⁶A), (S¹⁶⁹A), (S¹⁷⁰I) y (P¹²⁴S). Sin embargo, ninguno de ellos se correspondió con los 5 residuos conservados determinados en VACV como esenciales para dicha unión. Esto sugiere que las proteínas pueden estar variando por la presión inmune impuesta por el huésped, pero continúa conservando aquellos sitios esenciales para realizar su función.

En estudios posteriores se deberá profundizar acerca de la posible generación de cambios a nivel funcional de la proteína, o cual es la ventaja selectiva que los ha hecho fijarse en la población viral. Con estudios de modelado estructural de proteínas podría estudiarse la ubicación de los mismos en la estructura cuaternaria de la proteína para

poder dilucidar posibles interacciones espaciales con otros residuos aminoacídicos de importancia para la proteína.

5.2 Gen ORF117

En cuanto al análisis filogenético del gen ORF117, para el conjunto de cepas estudiadas se observó la presencia de seis clados. Las cepas uruguayas se encontraron presentes en cuatro de esos clados, y no agruparon con ninguna cepa proveniente de otro país en nuestro análisis. Las diferencias observadas en la forma de agrupar, muestran que dicho gen presenta variaciones a nivel nucleotídico. Sin embargo, los porcentajes de similitud encontrados en las cepas uruguayas para el gen ORF117 fueron de 98,2- 100% a nivel nucleotídico y de 97,2-100% a nivel proteico. Este resultado no era de esperarse debido a que este gen se encuentra localizado en un extremo del genoma, en donde pueden producirse inserciones, deleciones y translocaciones, por lo que en ellos se encuentran genes variables que tienden a ser género específico, o incluso especie específicos. Entre ellos se encuentran los relacionados con la patogenicidad, incluyendo factores de virulencia y proteínas que interactúan con componentes del sistema inmune del huésped.

En el análisis filogenético (Figura 15) no se pudieron incorporar las cepas argentinas sPi13 y sCh97 debido a que las secuencias de este gen para las mismas eran de menor tamaño al estudiado en este trabajo. Por este motivo se realizó un segundo árbol filogenético para este gen incluyendo dichas cepas argentinas, pero considerando un fragmento de 667pb de todas las cepas estudiadas (Figura 16). Por otro lado, las cepas brasileras utilizadas en el estudio de ORF020 tampoco pudieron incluirse debido a que no fue realizada la amplificación y posterior secuenciación de ORF117 para las mismas.

Si bien se encontraron tendencias de agrupamiento según el origen, no se puede asegurar una correlación geográfica en los resultados filogenéticos.

Como fue mencionado anteriormente, la riqueza de este trabajo radica entre otras cosas, en la posibilidad del análisis de las cepas uruguayas obtenidas en un amplio rango temporal. Si se toma en cuenta el año de aislamiento de las cepas estudiadas para ORF117, puede destacarse que al igual que para ORF020, las cepas uruguayas pertenecientes al año 1979 agruparon juntas (Figura 15, clado E). A su vez, también lo hicieron

las cepas uruguayas extraídas en el año 2014 (Figura 15, clado D), al igual que la mayoría extraídas en el 2009 (Figura 15, clado B). Dos cepas extraídas en el año 2007 agruparon juntas constituyendo un clado (Figura 15, clado C).

A pesar de estos resultados, si se consideran todas las cepas estudiadas, no se observa una correlación temporal en cuanto al aislamiento de las cepas con el análisis filogenético.

Por otro lado, en cuanto al tipo de hospedero, se pudo apreciar el clado A, donde agruparon cepas obtenidas a partir de Reno, Oveja, y *Homo sapiens*. Todas las cepas que agruparon en el clado F fueron obtenidas a partir de caprinos, a excepción de una que fue aislada a partir de un ovino. Las cepas uruguayas son todas provenientes de ovinos. Estos resultados muestran que al igual que para ORF020, si bien hay clados que se encuentran constituidos en su mayoría por un tipo de hospedero, no puede asegurarse una correlación entre el tipo de hospedero y el análisis filogenético.

A pesar de los valores bajos de bootstrap, se puso a apreciar que las cepas que conforman la vacuna (UR01/07; UR03/07; UR07/79; UR09/79 y UR13/08) no agruparon todas juntas en el análisis filogenético de ORF117, sino que agruparon UR13/08 Y UR03/07 en un clado; UR07/79 y UR09/79 en otro clado, y UR01/07 en otro. Esto mostró diferencias a lo observado en estudios anteriores para el gen VEGF (Olivero, 2008), donde UR01/07; UR03/07; UR07/79 y UR09/79 agruparon juntas y UR13/08 lo hizo aparte; y diferencias con lo observado a nivel de ORF020, mencionado anteriormente.

Las cepas UR03/07, UR13/08, UR14/07, UR15/09, UR16/09 y UR18a/09, UR18b/09, UR18c/09, UR22/10 y UR33/11, según el análisis nucleotídico agrupan de manera independiente a las otras cepas uruguayas analizadas. Estos resultados fueron muy similares a los encontrados para ORF020. A nivel aminoacídico, puede observarse que hay grupos de cepas idénticas, como son: UR14/07 y UR18b/09; UR15/09, UR18a/09 y UR22/10; UR16/09 y UR18c/09. Entre dichos grupos y el resto de las cepas, pueden observarse en el mayor caso tres cambios aminoacídicos. Estos resultados indican que lo visto a nivel aminoacídico se correlaciona con lo observado a nivel nucleotídico.

En el clado C agrupan las cepas UR01/07 y UR12/07, este resultado es acorde al análisis aminoacídico ya que entre ellas se puede observar un único cambio de aa, aunque éste es un cambio fuerte.

El análisis aminoacídico de las cepas que agrupan en el clado D mostró grupos de cepas que poseen una secuencia aminoacídica idéntica como son: UR33/13 y UR35/13; UR21/10 y UR30/12; y UR28/12, UR37/14 y UR38/14. Entre dichos grupos y el resto de las cepas, pueden observarse en el mayor caso 2 cambios aminoacídicos, mostrando concordancia entre el agrupamiento filogenético y el análisis aminoacídico.

Las cepas que agruparon en el clado E, UR07/79, UR08/79 y UR09/79 son idénticas a nivel aminoacídico, y el resto de las cepas contenidas en dicho clado poseen como máximo dos cambios aminoacídicos con respecto a las primeras. Estos resultados comprueban que existe una correlación entre el análisis filogenético y el aminoacídico para este agrupamiento también.

Se realizó un análisis aminoacídico de las cepas uruguayas y se incluyeron las dos cepas de ORFV argentinas sPi13 y sCh97. Debido a que las mismas correspondían a un fragmento del gen de 667 pb, el análisis se restringió a dicha región (no se muestra). Los resultados de este análisis mostraron que sPi13 y sCh97 poseen dos y un cambio/s único/s respectivamente con respecto a las cepas uruguayas.

El único cambio aminoacídico presente en el péptido señal de la proteína dio lugar a la sustitución por dos aminoácidos distintos: Triptófano (W) y Leucina (L) en lugar de Serina 13 (S). El hecho de que en un sitio se codificaron 3 aminoácidos diferentes, sugiere que no se espera que estos nuevos cambios sean seleccionados.

El motivo WDPWV es importante debido a que mutaciones dentro del mismo llevan a una disminución en la actividad biológica de GIF. Esto se debe a la producción de proteínas que quedan atrapadas dentro de la célula. El cambio encontrado en este estudio V101A en dicho motivo deberá ser estudiado para comprobar que no genere diferencias a nivel de la función de unión de la proteína a ligando. Ha sido comprobado en trabajos anteriores que el cambio W97A no genera efectos significativos en la unión a GM-CSF o a IL-2, mientras que los cambios en D98A y en W100A si lo hacen (McInnes et al., 2005).

En estudios previos se encontró que seis de los ocho residuos de C: C10, C40, C136, C185, C199 y C240 eran críticos para la actividad de unión al ligando debido a que forman tres enlaces disulfuro intramoleculares (McInnes et al., 2005). En este estudio, se encontraron conservados dichos residuos de C, los 4 sitios potenciales de glicosilación asociados a Asparagina (N) y el motivo WDPWV. Estos resultados concuerdan con lo observado en trabajos anteriores, donde se concluyó que dichas estructuras son importantes para la actividad biológica, ya que afectan el plegado y transporte de la proteína GIF (McInnes et al., 2005).

GIF, es una proteína con propiedades inusuales, que forma parte de un número creciente de patógenos inmunomoduladores, y su estudio será útil no sólo en la determinación de los mecanismos de la patogénesis viral y la naturaleza de la inmunidad antipatogénica del huésped, sino también como moldes para proteínas o péptidos potencialmente terapéuticos (Deane et al., 2000).

Un amplio conocimiento del patrón de aminoácidos deducido de más regiones genómicas de ORFV es importante para la comprensión de la circulación del virus, la epidemiología y la evolución con el fin de ampliar nuestro conocimiento en la biología del mismo.

Estudios posteriores deberán enfocarse en el rol de estos genes en la patogénesis de la enfermedad por ejemplo a través del uso de virus recombinantes suprimidos para dichos genes y/o el uso de mutagénesis dirigida en un sitio para definir con precisión los genes y/o secuencias implicados en la determinación de la virulencia de ORFV.

Para ambos análisis filogenéticos (ORF020 y ORF117) se observaron valores de bootstrap bajos o intermedios. Este efecto podría ser causado por el alto nivel de identidad observado dentro de estas muestras lo que resulta en una baja señal filogenética. Esto mismo fue evidenciado en trabajos anteriores (Peralta et al., 2015).

Previamente se ha observado una distribución filogenética según el animal de origen para B2L (De La Concha-Bermejillo et al., 2001; Kumar et al., 2014). En este estudio si bien se encontraron clados principalmente formados por un tipo de hospedero, no se ha podido evidenciar lo mismo. Esto sugiere que existen diferencias genéticas entre las cepas provenientes de diferentes organismos, pero que también podría plantearse la existencia de infecciones cruzadas de ORFV.

Para ambos genes no se encontró correlación con la distribución geográfica, animal de origen o fecha de aislamiento al igual que fue descrito en previas publicaciones (Inoshima et al., 2002; Klein & Tryland, 2005; Tikkanen et al., 2016)



6. Conclusiones

Siendo una línea de investigación en la cual hay pocos antecedentes de trabajo en Uruguay, se buscó una mejor resolución y apoyo a otras regiones del genoma viral estudiadas previamente. Esto se realizó con el fin de profundizar la comprensión de la relación filogenética y aminoacídica entre las cepas circulantes en la región y así aportar conocimiento sobre los mecanismos de variabilidad de ORFV.

Se realizó un análisis molecular por primera vez para ORF020 y ORF117 en Uruguay con el fin de lograr un acercamiento a la epidemiología y transmisión de ORFV en nuestro país. Los análisis filogenéticos para dichos genes revelaron que los brotes recientes en ovinos uruguayos son causados por ORFVs que están estrechamente relacionados con los ORFVs encontrados en brotes anteriores y que los mismos han estado circulando en ovinos durante un largo período.

En suma, para ambos genes no se observó ninguna correlación de origen geográfico, de origen animal o de fecha de aislamiento, lo que también se ha visto en varios estudios anteriores.

El estudio de factores de virulencia que no han sido blanco de atención en estudios anteriores en el país como los son ORF020 y ORF117 permite una mayor comprensión de la patogénesis viral y podría conducir a nuevas estrategias antivirales.

Perspectivas

En primer lugar, continuar aportando al conocimiento del ORFV mediante la caracterización molecular de más regiones del genoma de ORFV, con el fin de aportar a la comprensión de la circulación del virus, su epidemiología y evolución. También profundizar estos estudios tomando en cuenta las estructuras resueltas para algunos de estos genes o por modelado con proteínas homologas, a fin de evaluar las posibles repercusiones de ciertos cambios aminoacídicos ubicados en regiones fundamentales para la patogenicidad e interacción con el hospedero.

Por otra parte, lograr obtener con algunas de las cepas circulantes en Uruguay un modelo celular de infección viral a fin de evaluar su desempeño en cuanto a eficiencia de replicación y patogenicidad que nos permitan establecer correlaciones con las características moleculares previamente determinadas sobre todo en factores de virulencia.



7. Referencias Bibliográficas

- Abrahão, J. S., Campos, R. K., Trindade, G. S., Guedes, M. I. M., Lobato, Z. I. P., Mazur, C., ... Kroon, E. G. (2009). Detection and phylogenetic analysis of Orf virus from sheep in Brazil : a case report, *4*, 4–7. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-6-47>
- Assis, F. L., Neto, D. B., Oliveira, C. M. C., Silva, G. M., & Abraha, S. (2012). Multifocal Cutaneous Orf Virus Infection in Goats in the Amazon Region , Brazil, *12*(4), 336–340. <http://doi.org/10.1089/vbz.2011.0725>
- Billinis, C., Mavrogianni, V. S., Spyrou, V., & Fthenakis, G. C. (2012). Phylogenetic analysis of strains of Orf virus isolated from two outbreaks of the disease in sheep in Greece. *Virology Journal*, *9*(1), 24. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-9-24>
- Chan, K., Hsu, W., Wang, C., Yang, C., Lin, F., Chulakasian, S., & Wong, M. (2009). Differential diagnosis of orf viruses by a single-step PCR, *160*, 85–89. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.025>
- Cohen, J. (2001). SmalpoX Vaccinations: How Much Protection Remains?, *294*, 985.
- Cottone, R., Büttner, M., McInnes, C. J., Wood, A. R., & Rziha, H. J. (2002). Orf virus encodes a functional dUTPase gene. *Journal of General Virology*, *83*(5), 1043–1048. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-83-5-1043>
- Damon, I. K. (2013). No Title. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (6th ed., pp. 2160–2184).
- De La Concha-Bermejillo, A., Guo, J., Zhang, Z., & Waldron, D. (2003). Severe persistent orf in young goats, *431*, 423–431.
- De La Concha-Bermejillo, A., Guo, J., Zhang, Z., Waldron, D. (2001). Characterization of orf virus from goats with severe, persistent, proliferative dermatitis. In *Proceedings of the 82nd Conference of Research Workers in Animal Diseases, St. Louis, MO, 11–13 November*.
- Deane, D., Innes, C. J. M. C., Percival, A. N. N., Wood, A. N. N., Thomson, J., Lear, A., ... Irol, J. V. (2000). Orf Virus Encodes a Novel Secreted Protein Inhibitor of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-2, *74*(3), 1313–1320.
- Deane, D., Ueda, N., Wise, L. M., Wood, A. R., Percival, A., Jepson, C., ... McInnes, C. J.

- (2009). Conservation and variation of the parapoxvirus GM-CSF-inhibitory factor (GIF) proteins, (2009), 970–977. <http://doi.org/10.1099/vir.0.006692-0>
- Delhon, G., Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., de la Concha-Bermejillo, A., Lehmkuhl, H. D., ... Rock, D. L. (2004). Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus. *Journal of Virology*, 78(1), 168–77. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.1.168-177.2004>
- Felix, J., Kandiah, E., Munck, S. De, Bloch, Y., Zundert, G. C. P. Van, Pauwels, K., ... Savvides, S. N. (2016). by the viral decoy receptor GIF. *Nature Communications*, 7, 1–13. <http://doi.org/10.1038/ncomms13228>
- Fleming, S. B., Caughan, C. A. M. C., Andrews, A. E., Nash, A. D., & Mercer, A. A. (1997). A Homolog of Interleukin-10 Is Encoded by the Poxvirus Orf Virus, 71(6), 4857–4861.
- Fleming, S. B., & Mercer, A. (2007). Genus Parapoxvirus. *Poxviruses*, 127–166. http://doi.org/10.1007/978-3-7643-7557-7_7
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., & Skalka, A. M. (2003). *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*. (2nd Editio).
- Guo, J., Zhang, Z., Edwards, J. F., Ermel, R. W., & Taylor, C. (2003). Characterization of a North American orf virus isolated from a goat with persistent , proliferative dermatitis, 93, 169–179. [http://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00095-9](http://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00095-9)
- Haig, D. ., Mercer, A., McINNES, C. J., THOMSON, J., WOOD, A., & BUNYAN, K. (1998). The orf virus OV20.OL gene product is involved in interferon resistance and inhibits an interferon-inducible, double-stranded RNA-dependent kinase, 10.
- Haig, D. M., & Fleming, S. (1999). Immunomodulation by virulence proteins of the parapoxvirus orf virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72(1-2), 81–86. [http://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00119-1](http://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00119-1)
- Haig, D. M., Thomson, J., Mcinnes, C., Mccaughan, C., Imlach, W., Mercer, A., & Fleming, S. (2002). Orf virus immuno-modulation and the host immune response, 87, 395–399.
- Haig, D., McInnes, C., Deane, D., Lear, A., Myatt, N., Reid, H., ... Mercer, A. (1996). Cytokines and their inhibitors in orf virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 54(1-4), 261–267. [http://doi.org/10.1016/S0165-2427\(96\)05687-5](http://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05687-5)
- Haig, M., & Mcinnes, C. J. (2002). Immunity and counter-immunity during infection with the parapox v irus orf v irus. *Virus Research*, 88, 3–16.
- Hautaniemi, M., Ueda, N., Tuimala, J., & Mercer, A. A. (2010). The genome of

- pseudocowpoxvirus : comparison of a reindeer isolate and a reference strain, (2010), 1560–1576. <http://doi.org/10.1099/vir.0.018374-0>
- Hosamani, M., Bhanuprakash, V., Scagliarini, A., & Singh, R. K. (2006). Comparative sequence analysis of major envelope protein gene (B2L) of Indian orf viruses isolated from sheep and goats, *116*, 317–324. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.028>
- Inoshima, Y., Ito, M., & Ishiguro, N. (2010). Spatial and temporal genetic homogeneity of orf viruses infecting Japanese serows (*Capricornis crispus*). *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, *72*(6), 701–707. <http://doi.org/10.1292/jvms.09-0467>
- Inoshima, Y., Morooka, A., & Sentsui, H. (2000). Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, *84*(2), 201–208.
- Inoshima, Y., Murakami, K., Wu, D., & Sentsui, H. (2002). Characterization of Parapoxviruses Circulating among Wild Japanese Serows (*Capricornis crispus*), *46*(8), 583–587.
- Klein, J., & Tryland, M. (2005). Characterisation of parapoxviruses isolated from Norwegian semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*), *10*, 1–10. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-2-79>
- Kottaridi, C., Nomikou, K., Teodori, L., Savini, G., Lelli, R., Markoulatos, P., & Mangana, O. (2006). Phylogenetic correlation of Greek and Italian orf virus isolates based on VIR gene, *116*, 310–316. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.020>
- Kumar, N., Wadhwa, A., Chaubey, K. K., & Singh, S. V. (2014). Isolation and phylogenetic analysis of an orf virus from sheep in Makhdoom , India, 312–319. <http://doi.org/10.1007/s11262-013-1025-9>
- Lacek, K., Bauer, B., Bien, K., & Rziha, H. (2014). Orf virus (ORFV) ANK-1 protein mitochondrial localization is mediated by ankyrin repeat motifs, 68–79. <http://doi.org/10.1007/s11262-014-1069-5>
- Lojkic, I., Cac, Z., Beck, A., Bedekovic, T., Cvetnic, Z., & Sostaric, B. (2010). Phylogenetic analysis of Croatian orf viruses isolated from sheep and goats, 1–7.
- Lyttle, D. J., Fraser, K. M., Fleming, S. B., Mercer, A. A., & Robinson, A. J. (1994). Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *Journal of Virology*. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=236267&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Martins, M., Cargnelutti, J. F., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2014). Pathogenesis in lambs

- and sequence analysis of putative virulence genes of Brazilian orf virus isolates. *Veterinary Microbiology*, 174(1-2), 69–77.
<http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.09.005>
- Mazur, C., Rangel Filho, F. B., & Galler, R. (1991). Molecular analysis of contagious pustular dermatitis virus: a simplified method for viral DNA extraction from scab material. *Journal of Virological Methods*, 35(3), 265–272.
- McInnes, C. J., Deane, D., Haig, D., Percival, A., Thomson, J., & Wood, A. R. (2005). Glycosylation , Disulfide Bond Formation , and the Presence of a WSXWS-Like Motif in the Orf Virus GIF Protein Are Critical for Maintaining the Integrity of Binding to Ovine Factor and Interleukin-2, 79(17), 11205–11213.
<http://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11205>
- McInnes, C. J., Wood, a R., & Mercer, a a. (1998). Orf virus encodes a homolog of the vaccinia virus interferon-resistance gene E3L. *Virus Genes*.
- Mercer, A. A., Ueda, N., Friederichs, S. M., Hofmann, K., Fraser, K. M., Bateman, T., & Fleming, S. B. (2006). Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation. *Virus Research*, 116(1-2), 146–158. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.09.011>
- Moss, B. (2013). Fields Virology. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (6th. ed., pp. 2129–2159).
- Oem, J., Roh, I., Lee, K., Lee, K., Kim, R., Jean, Y., & Lee, O. (2009). Phylogenetic analysis and characterization of Korean orf virus from dairy goats : case report, 5(April), 1–5. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-6-167>
- Olivero, N. (Facultad de C. U. (2008). Caracterización a nivel Molecular de Cepas Uruguayas del Virus causante del Ectima Contagioso en Ovinos. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
<http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Olivero, N. (Facultad de C. U. (2012). Estudio de los Mecanismos Genéticos Implicados en la Variabilidad del Virus Causante del Ectima Contagioso en Ovinos.
- Pandey, A., Naduthambi, D., Thomas, K., & Zondlo, N. (2013). Proline Editing: A General and Practical Approach to the Synthesis of Functionally and Structurally Diverse Peptides. Analysis of Steric versus Stereoelectronic Effects of 4-Substituted Prolines on Conformation within Peptides, 135(11), 4333–4363.
<http://doi.org/10.1021/ja3109664>.Proline
- Peralta, A., Robles, C., Martínez, A., Alvarez, L., Valera, A., Calamante, G., & König, G. A. (2015). Identification and molecular characterization of Orf virus in Argentina. *Virus*

Genes, 50(3), 381–388. <http://doi.org/10.1007/s11262-015-1189-6>

- Robinson, A. J., Ellis, G., & Balassu, T. (1982). The genome of orf virus: restriction endonuclease analysis of viral DNA isolated from lesions of orf in sheep.
- Smith, G. W., Scherba, G., Constable, P. D., Hsiao, V., Behr, M. J., & Morin, D. E. (2002). Atypical Parapoxvirus Infection in Sheep, 287–292.
- Tan, J. L., Ueda, N., Mercer, A. A., & Fleming, S. B. (2009). Investigation of orf virus structure and morphogenesis using recombinants expressing FLAG-tagged envelope structural proteins: Evidence for wrapped virus particles and egress from infected cells. *Journal of General Virology*, 90(3), 614–625. <http://doi.org/10.1099/vir.0.005488-0>
- Tikkanen, M. K., McInnes, C. J., Mercer, A. A., Neuvonen, E., & Huovilainen, A. (2016). Communication Recent isolates of parapoxvirus of Finnish reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) are closely related to bovine pseudocowpox virus, (2004), 1413–1418. <http://doi.org/10.1099/vir.0.79781-0>
- Tikkanen, M. K., McInnes, C. J., Mercer, A. A., Neuvonen, E., & Huovilainen, A. (2017). Communication Recent isolates of parapoxvirus of Finnish reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) are closely related to bovine pseudocowpox virus, (2004), 1413–1418. <http://doi.org/10.1099/vir.0.79781-0>
- Tórtora, J. L. (1987). ECTIMA CONTAGIOSO DE OVINOS Y.
- Tórtora, J. L. (1987). Ectima contagioso de ovinos y caprinos.
- Ueda, N., Inder, M. K., Wise, L. M., Fleming, S. B., & Mercer, A. A. (2007). Parapoxvirus of red deer in New Zealand encodes a variant of viral vascular endothelial growth factor, 124, 50–58. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.09.012>
- Zhang, K., Lu, Z., Shang, Y., Zheng, H., Jin, Y., He, J., & Liu, X. (2010). Diagnosis and phylogenetic analysis of Orf virus from goats in China : a case report, 1–5.
- Zhao, K., Song, D., He, W., Lu, H., Zhang, B., Li, C., ... Gao, F. (2010). Identification and phylogenetic analysis of an Orf virus isolated from an outbreak in sheep in the Jilin province of China. *Veterinary Microbiology*, 142(3-4), 408–415. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.10.006>