

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΓΡΙΠΗ ΙΠΠΟΕΙΔΩΝ:
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ
ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ ΑΠΟ
ΤΙΣ ΕΠΙΖΩΟΤΙΕΣ 2003 ΚΑΙ 2007 ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**

Μαρία Θ. Μπουντούρη

Συμβουλευτική Επιτροπή:
Ξυλούρη Ε., Αναπλ. Καθηγήτρια- Εισηγήτρια
Εξηντάρη Μ., Επ. Καθηγήτρια
Παπαναστασοπούλου Μ., Αναπλ. Καθηγήτρια,

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ
ΖΩΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΓΡΙΠΗ ΙΠΠΟΕΙΔΩΝ:
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ
ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ ΑΠΟ ΤΙΣ
ΕΠΙΖΩΟΤΙΕΣ 2003 ΚΑΙ 2007 ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**

Μαρία Θ. Μπουντούρη

Εξεταστική Επιτροπή:

Ξυλούρη Ε., Αναπλ. Καθηγήτρια

Παπαναστασοπούλου Μ., Αναπλ. Καθηγήτρια

Εξηγτάρη Μ., Επ. Καθηγήτρια

Δεληγεώργης Σ., Καθηγητής

Ζέρβας Γ., Καθηγητής

Χατζόπουλος Π., Καθηγητής

Οικονομόπουλος Ι., Επ. Καθηγητής

Αθήνα, 2011

Ευχαριστίες

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσά μου κ. Ευτυχία Ξυλούρη, για την καθοδήγηση και υπομονή της με ενθάρρυναν καθόλη την διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής, ενώ οι πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές της συντέλεσαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής μου, την κ. Μαρία Παπαναστασοπούλου και κ. Μαρία Εξηντάρη για την άμεση ανταπόκρισή τους σε κάθε μου πρόβλημα, την υποστήριξη και την εποικοδομητική καθοδήγησή τους. Θερμές ευχαριστίες εκφράζω στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, του κ.κ. Καθηγητές του ΓΠΑ Ζέρβα Γ., Δεληγεώργη Σ., Χατζόπουλο Π., καθώς και στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Οικονομόπουλο Ι., για τις υποδείξεις τους για τη διόρθωση του κειμένου και για την πολύτιμη βοήθειά τους για την επίλυση διάφορων προβλημάτων. Επίσης είμαι ευγνώμων προς τη Dr. Janet Daly τόσο για τις επιστημονικές συμβουλές της όσο και για την παραχώρηση του θετικού και αρνητικού μάρτυρα, καθώς και γνωστών αντιορών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Δεν έχω λόγια για να εκφράσω τις πολύτιμες ευχαριστίες μου στους συναδέλφους Δρ. Βασίλη Ντάφη και Δρ. Εμμανουήλ Λιανδρή, για τις ατελείωτες επιστημονικές συζητήσεις και τη θετική κριτική τους. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους κτηνιάτρους, υπεύθυνους του ιπποφορβείου από όπου προήλθαν τα παθολογικά υλικά, για την πολύτιμη και πρόθυμη συνεργασία τους στη λήψη και αποστολή των δειγμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Ανατομίας & Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων του ΓΠΑ και ιδιαίτερα τον κ. Θεόδωρο Βαγγελή και τους φίλους μου και φοιτητές του Γ.Π.Α για την αμέριστη υποστήριξη και ενθάρρυνσή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, το μεγαλύτερο και βαθύτερο ευχαριστώ το εκφράζω στους γονείς μου και στην οικογένειά μου, τον άντρα μου και την κόρη μου. Η συμπαράστασή τους και η απέραντη αγάπη τους αποτέλεσαν και αποτελούν το κίνητρο της ζωής μου.

Στο σύζυγο μου Πάρη και στην κόρη μου Ιωάννα

Είσαστε το κίνητρο και η έμπνευση της ζωής μου...

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

aa (aminoacid)	Αμινοξύ
bp (base pair)	Ζεύγος Βάσεων
c DNA	Συμπληρωματικό DNA
CPE (Cytopathic effect)	Κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα
CTL	κυτταροτοξικά Τα λεμφοκύτταρα
DMEM	Dulbecco's MEM υπόστρωμα για καλλιέργεια κυττάρων <i>in vitro</i>
dNTPs	Δεοξυτριφωσφορικά νουκελοτίδια
EI	Γρίπη Ιπποειδών (Equine Influenza)
EIV	Ιός γρίπης των ιπποειδών
ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	Δοκιμασία ELISA
HA	Αιμοσυγκολλητίνη
IFN (Interferon)	Ιντερφερόνη
IL	Ιντερλευκίνη
kDa (kiloDalton)	Χίλιο-Dalton (Μονάδα μοριακού βάρους)
M RNA	Αγγελιοφόρο RNA
M1	Θεμέλια πρωτεΐνη M1
M2	Θεμέλια πρωτεΐνη M2
NCR	Περιοχές που δεν κωδικοποιούν πολυπεπτίδια
NS1 Non-structural protein 1	Μη δομική πρωτεΐνη 1
NS2/NEP (Non-structural protein 2/Nuclear export protein)	Μη δομική πρωτεΐνη 2
OIE	Διεθνές Γραφείο Επιζωοτιών
ORF (Open Reading Frame)	Ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο
PBS (Phosphate Buffer Saline)	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Αλάτων
PCR (Polymerase Chain Reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RBC (Red blood cell)	Ερυθρά αιμοσφαίρια
RBD (Receptor Binding Domain)	Θέσεις υποδοχέων σύνδεσης
RT (Reverse Transcription)	Αντίστροφη μεταγραφή
v RNA	Ιικό RNA

Γρίπη Ιπποειδών

MDCK (Madin- Darby canine kidney)	Κυτταρική σειρά προέλευσης νεφρών σκύλου
NA	Νευραμινιδάση
NK	Φυσικά φονικά κύτταρα ή φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα
NP	Νουκλεοπρωτεΐνη
PB2 (Polymerase Basic 2)	Πολυμεράση (Πολυμεράση Βασική 1)
PA (Polymerase Acidic)	Πολυμεράση (Όξινη Πολυμεράση)
PB1 (Polymerase Basic 1)	Πολυμεράση (Πολυμεράση Βασική 2)
TAE	Αιθυλαινο-διαμινικό-τετραοξικό-νάτριο
TCID 50	Μέση λοιμογόνος δόση ιού για την κυτταροκαλλιέργεια
TNF (Tumor necrosis factor)	Παράγοντας νέκρωσης όγκων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<i>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</i>	4
<i>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ</i>	5
<i>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ</i>	6
<i>A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</i>	7
<i>B. ABSTRACT</i>	9
<i>1. ΙΟΙ ΓΡΙΠΗΣ</i>	12
1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	12
1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ	13
1.3 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ	15
1.4 ΤΟ ΓΕΝΩΜΑ ΤΩΝ ΙΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ	16
1.5 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ- ΑΝΤΙΤΥΠΩΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ	23
1.6 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ	27
1.7 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΥΠΟΔΟΧΕΑ	28
1.8 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΙΩΝ	30
2. ΓΡΙΠΗ ΙΠΠΟΕΙΔΩΝ (Equine Influenza, EI)	35
2.1 Παθογένεια	36
2.2 Ανοσολογική Απάντηση	37
2.3 Κλινική Εικόνα- Παθολογοανατομικές Αλλοιώσεις	40
2.4 Επιζωοτιολογία	42
2.5 Εξέλιξη των στελεχών του ιού της γρίπης των ιπποειδών	46
2.6 Μετάδοση του ιού της γρίπης των ιπποειδών σε άλλα είδη ξενιστών	49
2.7 Διάγνωση	51
2.8 Θεραπεία	54
2.9 Πρόληψη και Έλεγχος	54
2.10 Η Νόσος στην Ελλάδα	56
<i>ΣΚΟΠΟΣ</i>	59
<i>1. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ</i>	60
1.1 Ζώα & Δειγματοληψία	60
1.2 Απομόνωση Ελληνικών στελεχών ιού γρίπης των ιπποειδών σε κυτταροκαλλιέργειες	60
1.3 Έλεγχος ζωτικότητας κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan blue	62
1.4 Τιτλοποίηση απομονωθέντων στελεχών του ιού	63
1.5 Ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών του ιού	63
1.5.1 Δοκιμασία αιμοσυγκόλλησης και δοκιμασία αναστολής της αιμοσυγκόλλησης	64
1.5.1.1 Δοκιμασία αιμοσυγκόλλησης	64
1.5.1.2 Δοκιμασία αναστολής της αιμοσυγκόλλησης	65
1.6 Υλικά για την εκχύλιση του ιικού RNA	67
1.7 Εκκινητές	67
1.8 Αντίστροφη μεταγραφή - Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	70

Γρίπη Ιπποειδών

1.8.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου (M) των πρωτεϊνών της βασικής μεμβράνης (M1 και M2)	70
1.8.2 Χαρακτηρισμός του τύπου του ιού βάσει της αιμοσυγκολλητίνης - Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της αιμοσυγκολλητίνης (HA).	71
1.8.3 Χαρακτηρισμός του τύπου του ιού βάσει της νευραμινιδάσης - Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της νευραμινιδάσης (NA).	71
1.8.4 Ενίσχυση των γονιδίων των πολυμερασών (PB1, PB2, PA)	72
1.8.5 Ενίσχυση του γονιδίου της νουκλεοπρωτεΐνης (NP)	73
1.8.6 Ενίσχυση του γονιδίου NS που κωδικοποιεί τις μη δομικές πρωτεΐνες NS1 και NS2.	74
1.9 Υλικά για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	74
1.10 Απομόνωση των προϊόντων των RT-PCR	75
1.11 Αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων των προϊόντων ενίσχυσης των RT-PCRs	75
1.12 Λογισμικά πολλαπλής στοίχισης και επεξεργασίας αλληλουχιών για φυλογενετική ανάλυση και ανάλυση των πρωτεϊνών	75
1.13 Συντήρηση παθολογικών υλικών και αντιδραστηρίων	76
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	76
2.1 Απομόνωση Ελληνικών στελεχών του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες, έλεγχος απόπτωσης κυττάρων και τιτλοποίηση του ιού	76
2.2 Αποτελέσματα αιμοσυγκόλλησης, αναστολής της αιμοσυγκόλλησης και ταυτοποίησης στελεχών με το εμπορικό kit Directigen Flu A+B.	80
2.3 Αποτελέσματα RT-PCR για ιούς γρίπης τύπου A (βάσει του γονιδίου M)	83
4.4 Συγκριτική μελέτη των μεθόδων διάγνωσης του ιού της γρίπης των ιπποειδών	83
2.5 Αποτελέσματα ένθετης RT-PCR για το χαρακτηρισμό του υποτύπου των Ελληνικών στελεχών (βάσει των γονιδίων HA και NA)	85
2.6 Αποτελέσματα RT-PCRs για την ενίσχυση των εσωτερικών γονιδίων (NP, NS, PB1, PB2, PA) των Ελληνικών στελεχών	88
2.7 Αποτελέσματα προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των απομονωθέντων στελεχών	91
2.8. Φυλογενετική ανάλυση των Ελληνικών στελεχών	104
2.9 Υπολογισμός εξελικτικής απόστασης των πρωτεϊνών HA, NA, NS, NP, PB1, PB2 και PA όπως αυτή προκύπτει από τα φυλογενετικά δέντρα	114
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	116
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	132

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Οι υπότυποι HA (H1-H16) και NA (N1-N9) των ιών της γρίπης A, που έχουν απομονωθεί από άνθρωπο, χοίρο, πτηνά και ιπποειδή.	13
Εικόνα 2. Το σωματίδιο του ιού της γρίπης τύπου A.	15
Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση των συντηρημένων άκρων των οκτώ γονιδίων της γρίπης.	17
Εικόνα 4. Δομή του γενόματος του ιού της γρίπης A και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες που αυτό κωδικοποιεί.	18
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του πολλαπλασιασμού του ιού της γρίπης.	24
Εικόνα 6. Αντιγονική μετάπτωση. Ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ δύο ή περισσότερων συγγενών ιών	32
Εικόνα 7. Η αποθήκη των ιών της γρίπης A.	34

<i>Εικόνα 8. Ανοσολογική απάντηση του ξενιστή μετά την είσοδο του ιού της γρίπης των ιπποειδών στο ρινικό βλεννογόνο για πρώτη φορά (Α) και σε περίπτωση επαναμόλυνσης (Β).</i>	38
<i>Εικόνα 9: Φυλογενετική ανάλυση των νουκλεοτιδίων του γονιδίου HA 40 στελεχών H3N8 που απομονώθηκαν από ενζωτίες του 21^{ου} αιώνα, καθώς και πρότυπων στελεχών αντιπροσωπευτικών των διαφορετικών εξελικτικών κλάδων.</i>	48
<i>Εικόνα 10. Απομόνωση Ελληνικών στελεχών σε κύτταρα MDCK</i>	78
<i>Εικόνα 11. Διαγνωστική RT-PCR για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου M.</i>	83
<i>Εικόνα 12. Ένθετη RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου HA του υπότυπου II (H3N8) των Ελληνικών στελεχών.</i>	87
<i>Εικόνα 13. RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου NA του υπότυπου II (H3N8) των Ελληνικών στελεχών.</i>	88
<i>Εικόνα 14. RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου PB1 των Ελληνικών στελεχών.</i>	89
<i>Εικόνα 15. RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου PB2 των ελληνικών στελεχών.</i>	89
<i>Εικόνα 16. RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου PA των ελληνικών στελεχών.</i>	90
<i>Εικόνα 17. RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου NS των ελληνικών στελεχών.</i>	90
<i>Εικόνα 18. RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου NP των ελληνικών στελεχών.</i>	91
<i>Εικόνα 19. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων » που αφορά στην πρωτεΐνη HA με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.</i>	106
<i>Εικόνα 20. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων » που αφορά στην πρωτεΐνη NA με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.</i>	107
<i>Εικόνα 21. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων » που αφορά στην πρωτεΐνη NS1 με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.</i>	108
<i>Εικόνα 22. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων » που αφορά στην πρωτεΐνη NP με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.</i>	109
<i>Εικόνα 23. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων » που αφορά στην πρωτεΐνη και PB1 με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.</i>	110
<i>Εικόνα 24. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων » που αφορά στην πρωτεΐνη PA με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.</i>	111
<i>Εικόνα 25. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων » που αφορά στην πρωτεΐνη M1 με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.</i>	112
<i>Εικόνα 26. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων » που αφορά στην πρωτεΐνη και PB2 με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.</i>	113
<i>Εικόνα 27. Υπολογισμός εξελικτικής απόστασης των πρωτεϊνών HA, NA, NS1, NP, PB1, PB2 και PA όπως αυτή προκύπτει από τα φυλογενετικά δέντρα.</i>	115

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Πίνακας 1. Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον μοριακό χαρακτηρισμό του ιού H3N8 της γρίπης των ιπποειδών.....</i>	68
<i>Πίνακας 2. Ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν για τον μοριακό χαρακτηρισμό του ιού H3N8 της γρίπης των ιπποειδών.....</i>	69
<i>Πίνακας 3. Αποτελέσματα απομόνωσης ιού σε κυτταροκαλλιέργειες MDCK ανά δίοδο και ανά δείγμα, καθώς και της τιτλοποίησής τους στην 3^η δίοδο.....</i>	79
<i>Πίνακας 4. Παρουσίαση αποτελεσμάτων ανίχνευσης του ιού της γρίπης των ιπποειδών.....</i>	82
<i>Πίνακας 5. Αποτελέσματα ανίχνευσης του ιού της γρίπης των ιπποειδών με RT-PCR, ενοφθαλμισμό κυτταροκαλλιεργειών και DFA.....</i>	85
<i>Πίνακας 6. Ποσοστό ομοιότητας του γονιδίου HA Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη</i>	92
<i>Πίνακας 7. Ποσοστό ομοιότητας του γονιδίου NA των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη</i>	93
<i>Πίνακας 8. Ποσοστό ομοιότητας του γονιδίου M των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη</i>	95
<i>Πίνακας 9. Ποσοστό ομοιότητας του γονιδίου PB1 των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη.....</i>	96
<i>Πίνακας 10. Ποσοστό ομοιότητας γονιδίου PB2 των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη.....</i>	97

<i>Πίνακας 11. Ποσοστό ομοιότητας γονιδίου PA των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη</i>	99
<i>Πίνακας 12. Ποσοστό ομοιότητας γονιδίου NP των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη</i>	100
<i>Πίνακας 13. Ποσοστό ομοιότητας του γονιδίου NS των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη</i>	102
<i>Πίνακας 14. Επαναλαμβανόμενες πρότυπες αντικαταστάσεις αμινοξέων στα Ελληνικά στελέχη</i>	103

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

<i>Γράφημα 1. Απεικόνιση της ζωτικότητας ενοφθαλμισμένων κυτταροκαλλιιεργειών ανά δείγμα και ανά δίοδο μετά από χρώση με Trypan blue</i>	78
<i>Γράφημα 2. Ποσοστά ανίχνευσης του ιού H3N8 των ιπποειδών με τις μεθόδους απομόνωση σε κυτταροκαλλιιεργειες και DFA, στο σύνολο των θετικών δειγμάτων.</i>	85

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γρίπη των ιπποειδών είναι μία οξεία, άκρως μεταδοτική λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος των ιπποειδών. Ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου είναι ιός του γένους *Influenzavirus A* της οικογένειας *Orthomyxoviridae*. Μέχρι σήμερα είναι γνωστοί δύο υπότυποι της γρίπης των ιπποειδών, ο υπότυπος 1 (H7N7) και ο υπότυπος 2 (H3N8). Ο υπότυπος 1 δεν έχει απομονωθεί από το 1977 σε καμία χώρα, και πιστεύεται ότι έχει αντικατασταθεί από τον υπότυπο 2, ο οποίος έχει προκαλέσει όλες τις επιζωοτίες των τελευταίων δεκαετιών παγκοσμίως. Αποτέλεσμα της έντονης γενετικής ποικιλομορφίας που χαρακτηρίζει τον ιό H3N8 ήταν η εμφάνιση δύο ξεχωριστών εξελικτικών κλάδων, τα στελέχη των οποίων συνεχίζουν να κυκλοφορούν παράλληλα στους πληθυσμούς των ιπποειδών.

Οι μεγάλες επιζωοτίες που έχουν καταγραφεί παγκοσμίως μέχρι σήμερα οφείλονται στην υψηλή μεταδοτικότητα της νόσου, ενώ η θνησιμότητα είναι πολύ χαμηλή, εκτός αν υπάρχει δευτερογενής επιπλοκή. Οι καταστροφικές οικονομικές απώλειες που έχουν αναφερθεί λόγω της προσβολής ζώων αναπαραγωγής και αγώνων από τη γρίπη των ιπποειδών, κατέστησαν επιτακτική την ανάγκη εμβολιασμού των ζώων. Παρά τη χρήση εμβολίων όμως, συνέχισαν να καταγράφονται κρούσματα. Συγκεκριμένα, το 2003 καταγράφηκαν μεγάλες επιζωοτίες γρίπης τόσο σε εμβολιασμένους όσο και σε ανεμβολίαστους ίππους, αρχικά στην Ευρώπη και ακολούθως τα επόμενα έτη παγκοσμίως, ακόμα και σε χώρες που δήλωναν απαλλαγμένες της νόσου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν, η απομόνωση και η μοριακή και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών που κυκλοφορούσαν στην Ελλάδα, κατά τη διάρκεια δύο επιζωοτιών του παρελθόντος (2003 και 2007). Για το σκοπό αυτό εξετάστηκαν 30 βαμβακοφόροι στυλεοί ρινικών εκκρινμάτων από ανεμβολίαστους ίππους με εμπύρετο γριπώδες σύνδρομο. Η εξέταση των δειγμάτων έγινε αρχικά με τη χρήση ταχείας διαγνωστικής μεθόδου ανοσοπροσδιορισμού (Directigen), για τη διαπίστωση του ιού της γρίπης A, και στη συνέχεια με RT-PCR που ανιχνεύει μία περιοχή του γονιδίου M, η οποία επιβεβαίωσε την παρουσία του εν λόγω ιού. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ιού στην ευαίσθητη για το ιό κυτταρική σειρά MDCK. Η ανάπτυξη του ιού στα κύτταρα επιβεβαιώθηκε τόσο με τη δοκιμασία της αιμοσυγκόλλησης,

χρησιμοποιώντας ερυθρά αιμοσφαίρια ινδόρνιθας, όσο και με τη χρήση της RT-PCR για το γονίδιο M. Η τυποποίηση των στελεχών ως υπότυπος H3N8 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αντιδράσεων RT-PCR ειδικών για τμήματα των γονιδίων H3 και N8. Ειδικά ζεύγη εκκινητών σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση τμημάτων των γονιδίων NP, PA, PB1, PB2 και NS του H3N8. Έτσι, με τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τμημάτων όλων των γονιδίων έλαβε χώρα η μοριακή και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών που απομονώθηκαν, οι οποίες επιβεβαίωσαν ότι τα Ελληνικά στελέχη ήταν ιοί γρίπης ιπποειδών H3N8. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι τα Ελληνικά στελέχη προέκυψαν από ανασυνδυασμό γενετικά διαφορετικών στελεχών του ιού H3N8, καθώς ως προς την αιμοσυγκολλητίνη τους προσομοιάζαν με στελέχη που απομονώθηκαν τη δεκαετία του 1990 στην Ευρώπη, ενώ ως προς τα υπόλοιπα γονίδια προσομοιάζαν με πιο πρόσφατα στελέχη που απομονώθηκαν την τελευταία δεκαετία (2000-2010) στην Ευρώπη και στην Ασία. Επομένως, τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι πληροφορίες για την προέλευση ή και την παθογόνο δράση των στελεχών H3N8 μπορούν να δώσουν όχι μόνο ο χαρακτηρισμός του γονιδίου της αιμοσυγκολλητίνης (HA), στον οποίο περιορίζονταν μέχρι σήμερα οι περισσότερες μελέτες, αλλά και η μοριακή και φυλογενετική ανάλυση και των υπόλοιπων γονιδίων. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ενισχύουν τη θεωρία ότι κάποια στελέχη που βρίσκονται σε κατάσταση «εξελικτικής στάσης» συνεχίζουν να κυκλοφορούν ανάμεσα στους πληθυσμούς των ιπποειδών. Επομένως η αναδιάταξη τέτοιων στελεχών με άλλα συν-κυκλοφορούντα είναι πολύ πιθανή και ίσως να αποτελεί νέα απειλή για τα ιπποειδή. Το γεγονός ότι στελέχη H3N8 της γρίπης των ιπποειδών έχουν απομονωθεί από χοίρους το 2005 και το 2006, αλλά και σκύλους την περίοδο 2003-2008 υποδηλώνει ότι τα ιπποειδή ίσως να μην αποτελούν πια τον τελικό ξενιστή αυτών των στελεχών.

Με την παρούσα έρευνα αναφέρεται για πρώτη φορά η απομόνωση του H3N8 ιού γρίπης των ιπποειδών στην Ελλάδα. Η απομόνωση του εν λόγω αναδιαταγμένου στελέχους και η μοριακή και η φυλογενετική ανάλυσή του αποτελούν χρήσιμο εργαλείο τόσο για την προσπάθεια παρακολούθησης των εξελικτικών οδών του ιού της γρίπης των ιπποειδών, όσο και για τον έλεγχο του νοσήματος.

Λέξεις κλειδιά: Γρίπη ιπποειδών, H3N8, χαρακτηρισμός, Ελλάδα,

B. ABSTRACT

Equine Influenza (EI) is an acute, highly contagious, respiratory disease of equine. The causative agent of EI infections is a type A influenza virus, classified into the family *Orthomyxoviridae*. Up to today two subtypes of EI are known, subtype 1 (H7N7) and subtype 2 (H3N8). Subtype 1 has not been isolated since 1977, and is presumed that has been replaced by the subtype 2, which is the causative agent of many recent outbreaks. Antigenic drift of H3N8 viruses resulted in the divergence of strains into two distinct evolutionary lineages, which co-circulate.

The high morbidity of equine influenza disease was demonstrated in all recent widespread outbreaks all over the world. On the other hand, the mortality rate of influenza disease in equids is generally low, unless secondary bacterial infections occurred. Devastating economic loss of the disease in breeding and race animals reinforced the importance of vaccination. Despite the extensive use of vaccines, outbreaks of equine influenza continue to occur. In 2003 there were widespread outbreaks of equine influenza among un-vaccinates and regularly vaccinated horses in Europe and later all over the world, even regions that rarely report equine influenza outbreaks.

The aim of the present study is isolation, molecular and phylogenetic analysis of the Greek strains, from outbreaks in 2003 and 2007. 30 nasal swabs from horses with fever and respiratory signs were used. Swabs were initially tested by a screening rapid test for Influenza A (Directigen) and then by diagnostic RT-PCR for the M gene, and the presence of influenza A virus was demonstrated. Isolation was succeeding in MDCK cell line, which was confirmed by both haemmagglutination with turkey RBCs and RT-PCR. RT-PCR with specific sets of primers for HAH3 and NAN8 was used for the characterization of the strains, as well. Five primer pairs were designed during this study in order to detect NP, PA, PB1, PB2 and NS genes of H3N8 viruses. Molecular analysis confirmed that the Greek isolates were members of H3N8 equine influenza viruses. HA sequences appeared to be more closely related to viruses isolated in Europe in early 1990s, but sequences of the other genes appeared to be more closely related to recent isolates of the last decade in Europe and Asia, suggesting that reassortment had occurred. Although, most studies up to date were limited to the HA characterization, our results

suggest that sequencing of other genes, in addition to that encoding HA, is now being increasingly interesting for investigating the origin or pathogenicity of equine influenza viruses. These findings reinforce the “frozen evolution” theory, which describes strains that show reduced amount of antigenic drift compared to the majority of circulating EIVs, and continue to circulate among equines. Thus, reassortment of co-circulation of genetically distinct strains may be threat to equine population. Further evidence that the horse may not be a dead-end host has arisen from the characterisation of two viruses isolated from pigs in 2005 and 2006 and dogs during 2003-2008.

For first time we report isolation of H3N8 equine influenza virus in Greece. In addition, isolation, molecular and phylogenetic analysis of the reassorted strain as presented in this study is a useful tool to investigate evolution pathways of H3N8 equine influenza virus in order to control the outbreaks.

Key Words: Equine influenza, H3N8, molecular characterisation, Greece.

**Γ. ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**

1. ΙΟΙ ΓΡΙΠΗΣ

1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι ιοί της γρίπης ανήκουν στην οικογένεια *Orthomyxoviridae*, η οποία περιλαμβάνει πέντε γένη ιών, τα: *Influenzavirus A*, *B* και *C*, *Thogotovirus* και *Isavirus* (Palese et al., 2007).

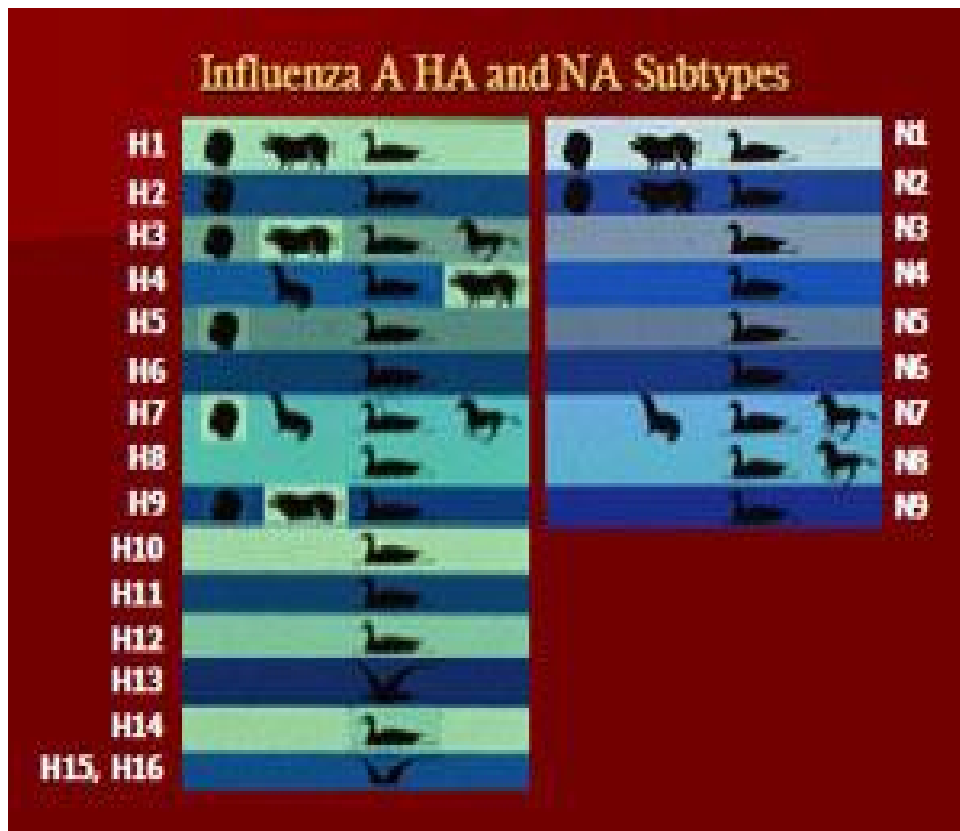
Οι ιοί των γενών *Influenzavirus A*, *B* και *C* διακρίνονται μεταξύ τους βάσει των αντιγονικών διαφορών των πρωτεϊνών του νουκλεοκαπιδίου (NP) και του περιβλήματος (M) (Palese et al., 2007). Επίσης, μπορούν να διαφοροποιηθούν ανάλογα με το είδος του ξενιστή που προσβάλλουν και τον αριθμό των RNA γενωμικών τμημάτων που φέρουν ως γενετικό υλικό. Οι ιοί τύπου A προσβάλλουν “φυσικά” τον άνθρωπο, τα πτηνά, το χοίρο, τα ιπποειδή και σπανιότερα κάποια άλλα θηλαστικά, όπως φώκιες και φάλαινες. Οι ιοί τύπου B προσβάλλουν τον άνθρωπο και τις φώκιες, ενώ αυτοί του τύπου C έχουν απομονωθεί από άνθρωπο, σκύλο και χοίρο μέχρι σήμερα (Yuanji and Desselberger 1984, Webster et al., 1992). Το γένωμα των ιών τύπου A και B αποτελείται από οκτώ τμήματα RNA (Ritchey et al., 1976, Palese et al., 2007), ενώ του τύπου C μόνο από επτά (Herrler and Klenk 1991).

Ο ιός της γρίπης των ιπποειδών (Equine influenza virus, EIV) ανήκει στο γένος *Influenzavirus A*, το οποίο ταξινομείται περαιτέρω σε υποτύπους ανάλογα με την αντιγονικότητα των μορίων γλυκοπρωτεΐνης του περιβλήματος, δηλαδή της αιμοσυγκολλητίνης (HA) και της νευραμινιδάσης (Neuraminidase, NA). Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί 16 υπότυποι HA (H1–H16) και 9 υπότυποι NA (N1-N9) (Fouchier et al., 2005) (Εικόνα 1). Κάθε ιός γρίπης A έχει ένα H και ένα N αντιγόνο. Το σύστημα της ταξινόμησης που επικράτησε για τους *Influenzavirus A* περιλαμβάνει τον τύπο του ιού, τον αρχικό ξενιστή του συγκεκριμένου τύπου, τη γεωγραφική τοποθεσία που απομονώθηκε, τον αριθμό του στελέχους και το έτος της απομόνωσης ακολουθούμενο από την αντιγονική περιγραφή των HA και NA (Wright, 2001). Για παράδειγμα, το A/swine/Iowa/15/30 (H1N1) περιγράφει το 15^ο στέλεχος της γρίπης A που απομονώθηκε στην Iowa το 1930 με υπότυπο H1N1.

Αντιγονικοί υπότυποι δεν έχουν αναγνωριστεί για τους ιούς της γρίπης B και C.

Γρίπη Ιπποειδών

Οι ιοί του γένους *Thogotovirus* (Thogoto και Dhori) φαίνεται ότι γενετικά, μορφολογικά και βιοχημικά μοιράζονται κοινές ιδιότητες τόσο με τους ιούς της γρίπης, όσο και με τον ιό της λοιμώδους αναιμίας του σολομού (*Infectious Salmon Anemia Virus*), που ανήκει στο γένος *Isavirus*, με αποτέλεσμα και τα 5 γένη να κατατάσσονται στην ίδια οικογένεια. Παρόλα αυτά τα είδη των ιών που ανήκουν στα διάφορα γένη διαφέρουν, μεταξύ τους, αντιγονικά (Wright, 2001, Lamb et al., 2007).



Εικόνα 1. Οι υπότυποι HA (H1–H16) και NA (N1–N9) των ιών της γρίπης A, που έχουν απομονωθεί από άνθρωπο, χοίρο, πτηνά και ιπποειδή.

1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ

Οι ιοί της γρίπης A έχουν πολυμορφική δομή και φέρουν περίβλημα. Το πλήρως σχηματισμένο ιικό σωματίδιο είναι κατά κανόνα σφαιρικό, με διάμετρο περίπου 100 nm

(Εικόνα 2). Παρόλα αυτά, αρκετά συχνά έχουν παρατηρηθεί με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και νηματοειδείς μορφές του σωματιδίου που μπορεί να φτάσουν και τα 300 nm. Το περίβλημα είναι λιποπρωτεϊνικής σύστασης. Αποτελείται, δηλαδή, από διπλή στιβάδα λιπιδίων, που προέρχεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του κύτταρου ξενιστή, και από ικές πρωτεΐνες. Στην επιφάνειά του υπάρχουν προεκβολές (πεπλομερίδια ή άκανθες), μήκους περίπου 10-14 nm, που αντιπροσωπεύουν τις ικές γλυκοπρωτεΐνες HA και NA, σε αναλογία 4:1. Κάθε ικό σωματίδιο φέρει περίπου 500 τέτοιες προεκβολές. Οι γλυκοπρωτεΐνες εμφανίζονται εξωτερικά κυλινδρικές, μήκους 13,5 nm και διαμέτρου 4 nm (Chu et al., 1949, Palese et al., 2007).

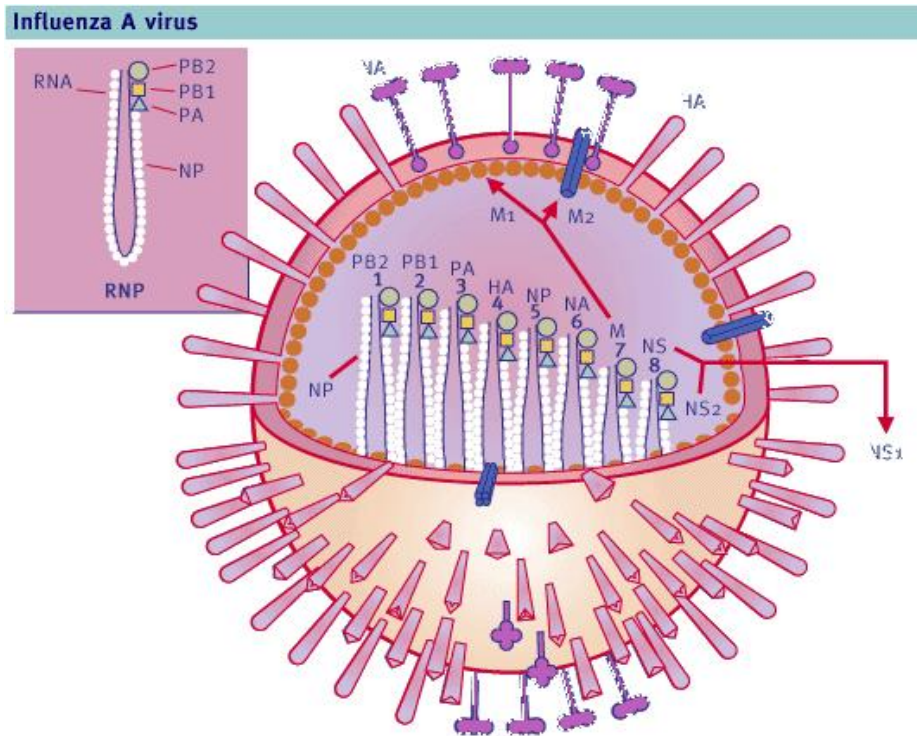
Εσωτερικά του περιβλήματος βρίσκεται η βασική μεμβράνη (matrix), που αποτελείται από δύο πρωτεΐνες (M1, M2), οι οποίες συμμετέχουν στη δομή του περιβλήματος. Η θεμέλια πρωτεΐνη M1, σχετίζεται με τη ριβονουκλεοπρωτεΐνη (RNP) (Nayak et al., 2004). Ο πυρήνας περιέχει το σύμπλεγμα της ριβονουκλεοπρωτεΐνης (RNP complex), που αποτελείται από το γενωμικό RNA, τις πολυμεράσες PB1, PB2 και PA και τη νουκλεοπρωτεΐνη NP (Compans et al., 1974, Palese et al., 2007). Επιπλέον στο εσωτερικό του ιού βρίσκεται και η πρωτεΐνη NEP/NS2 (nuclear export protein/non structural protein 2) (Richardson and Akkina 1991) (Εικόνα 2). Συνολικά τα ιικά σωματίδια αποτελούνται κατά 1% από RNA, 5-8% από υδατάνθρακες, 20% από λιπίδια και 70% από πρωτεΐνες.

Εξέχον χαρακτηριστικό των ιών της γρίπης είναι ότι το γένωμά τους αποτελείται από τμήματα μονόκλωνου γραμμικού RNA αρνητικής πολικότητας (Frommhagen, et al., 1959). Οι ιοί της γρίπης A και B έχουν οκτώ τμήματα RNA, ενώ εκείνοι της γρίπης C έχουν εφτά. Το μήκος της νουκλεοτιδικής αλυσίδας καθενός από τα οκτώ τμήματα των ιών της γρίπης A κυμαίνεται από 900 έως 2.350 νουκλεοτίδια, ενώ το συνολικό μοριακό βάρος του RNA ανέρχεται σε $4,5 \times 10^6$ Da. Τα τρία μεγαλύτερα τμήματα κωδικοποιούν για ισάριθμες πολυμεράσες, τα τρία ενδιάμεσα για τις γλυκοπρωτεΐνες επιφανείας HA και NA και την νουκλεοπρωτεΐνη NP και τα δύο μικρότερα για τις πρωτεΐνες του υποστρώματος (M1 και M2) και τις μη δομικές πρωτεΐνες (NS1 και NS2) (Noda et al., 2006, Hutchinson et al., 2010).

Οι ιοί της γρίπης B είναι πιο εύκολα διακριτοί στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε σχέση με εκείνους του τύπου A. Η κύρια διαφορά είναι ότι οι ιοί τύπου B έχουν τέσσερις

Γρίπη Ιπποειδών

πρωτεΐνες που προβάλλουν στο περίβλημα, τις HA, NA, NB και BM2. Οι ιοί της γρίπης C έχουν εξαγωνικό δικτυωτό σχήμα και σχηματίζουν ραβδωτές απολήξεις στην επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων. Επίσης, έχουν μία επιπλέον γλυκοπρωτεΐνη, την HEF (hemagglutinin-sterase-fusion), η οποία συνδυάζει την λειτουργία των HA και NA. Για το λόγο αυτό θεωρείται ότι ένα γενωμικό RNA τμήμα απουσιάζει (Wright, 2001).



Εικόνα 2. Το σωματίδιο του ιού της γρίπης τύπου A.

Οκτώ τμήματα μονόκλωνου RNA αρνητικής πολικότητας συνθέτουν το γένωμα των ιών της γρίπης τύπου A. Το RNA μαζί με το σύμπλεγμα των πολυμερασών και του νουκλεοκαπιδίου σχηματίζει το σύμπλεγμα RNP. Στο περίβλημα του σωματιδίου προβάλλουν τρεις πρωτεΐνες, οι HA, NA και M2. Η πρωτεΐνη M1, που βρίσκεται στο εσωτερικό της λιπιδικής μεμβράνης αλληλεπιδρά με το ελικοειδές σύμπλεγμα RNP. Οι πρωτεΐνες NS1 και NS2 είναι μη δομικές πρωτεΐνες και ο ρόλος τους δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. (http://www.pasteur.ac.ir/researchDepartment/flu/images/flu_structure.gif)

1.3 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ

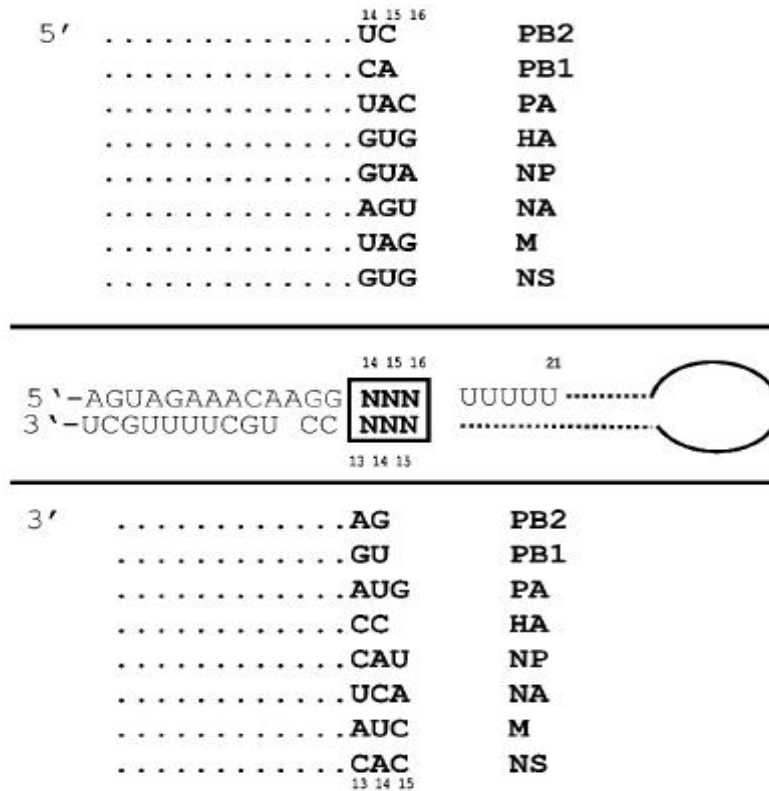
Οι ιοί της γρίπης είναι σχετικά ευαίσθητοι στο περιβάλλον. Παραμένουν όμως προστατευμένοι όταν βρίσκονται μέσα σε οργανική ουσία, όπως είναι οι ρινικές εκκρίσεις και τα κόπρανα, και έτσι αυξάνεται η αντίστασή τους στη φυσική και χημική αδρανοποίησή τους. Ειδικότερα συνθήκες ψύχους ή υγρασίας ευνοούν τη μακρόχρονη

επιβίωσή τους στο περιβάλλον. Για αυτό και οι ιοί της γρίπης επιβιώνουν στην υγρή κόπρη το χειμώνα για 105 ημέρες και στα κόπρανα για 30-35 ημέρες στους +4 °C ή για 7 ημέρες στους +20 °C. Σε συνθήκες *in vitro* όλοι οι ιοί της γρίπης είναι αρκετά ανθεκτικοί όταν διατηρούνται μέσα σε πρωτεϊνούχα διαλύματα, ενώ για τη μακροχρόνια διατήρησή τους οι μέθοδοι που συνιστώνται περιλαμβάνουν την κατάψυξή τους στους -80 °C ή τη λυοφιλοποίησή τους. Οι ιοί που έχουν απομονωθεί σε εμβρυοφόρα αβγά μπορούν να διατηρηθούν για αρκετές εβδομάδες στους +4 °C, χωρίς να μειώνεται η μολυσματικότητά τους. Η αιμοσυγκολλητική τους δραστηριότητα, καθώς και η δράση της νευραμινιδάσης μπορούν να παραμείνουν ενεργές ακόμη και όταν ο ιός πάψει να είναι μολυσματικός (Lamb et al., 2007).

1.4 ΤΟ ΓΕΝΩΜΑ ΤΩΝ ΙΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ

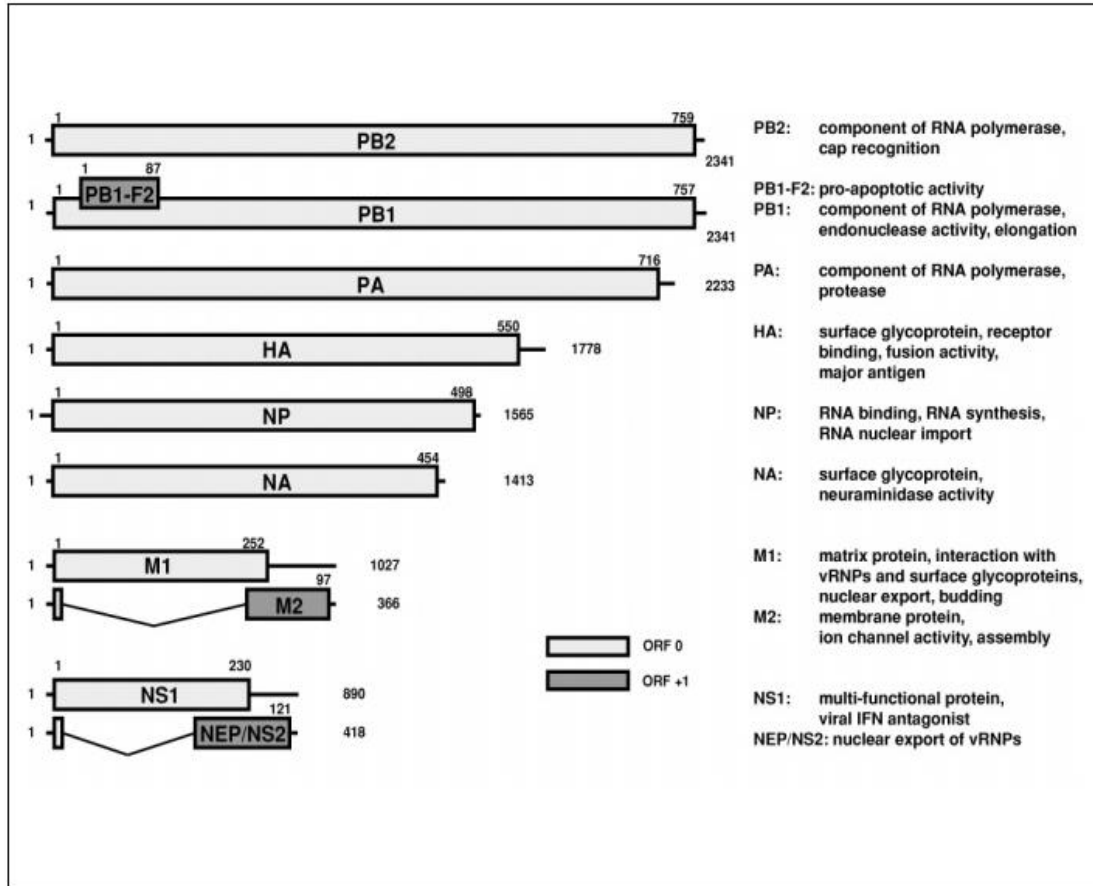
Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι ιοί της γρίπης τύπου A και B έχουν οκτώ τμήματα γενωμικού RNA, ενώ της γρίπης C μόνο επτά (McGeoch, et al., 1976, Palese and Schulman 1976, Ritchey et al., 1976). Κάθε τμήμα RNA τόσο στο 3', όσο και στο 5' άκρο έχει ακολουθίες που δεν κωδικοποιούν (non-coding regions, NCR) πολυπεπτίδια και συνορεύουν με τις περιοχές (Open Reading Frame, ORF) οι οποίες κωδικοποιούν μία συγκεκριμένη ιική πρωτεΐνη. Στο 3' και 5' άκρο κάθε περιοχής NCR υπάρχουν 12 και 13 νουκλεοτίδια, αντίστοιχα, που είναι συντηρημένα για όλους τους ιούς γρίπης τύπου A και συνοδεύουν ένα ειδικό για κάθε γονίδιο τμήμα (Robertson 1979, Desselberger et al., 1980) (Εικόνα 3). Οι NCR περιοχές των οκτώ γενωμικών τμημάτων εμφανίζουν μερική συμπληρωματικότητα μεταξύ τους με αποτέλεσμα να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές. Θεωρείται ότι οι δομές αυτές είναι αναγνωριστικά σημεία για τη ρύθμιση της μεταγραφής, αντιγραφής και μετάφρασης του ιικού RNA, καθώς και για την επιλογή των κατάλληλων τμημάτων RNA για το σχηματισμό των απόγονων ιικών σωματιδίων. Παρόλο που δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος ο ακριβής ρόλος τους, θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή του ιού (Pritlove et al., 1999, Leahy et al., 2001, Leahy, Pritlove et al., 2001).

Γρίπη Ιπποειδών



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση των συντηρημένων άκρων των οκτώ γονιδίων της γρίπης.
 Οι μη κωδικοποιές περιοχές των γονιδίων της γρίπης διαφέρουν μεταξύ τους, αλλά είναι χαρακτηριστικές για κάθε γονίδιο (Hoffmann et al., 2001).

Τα οκτώ τμήματα του γενωμικού RNA των ιών της γρίπης Α κωδικοποιούν 12 πρωτεΐνες, τις PB1, PB1-F2 (Chen et al., 2001), PB1 N40 (Wise et al., 2009), PB2 και PA, HA, NP, NA, M1 και M2, NS1 και NEP/NS2 (Wright, 2001). Πιο αναλυτικά, τα τρία μεγαλύτερα τμήματα RNAs κωδικοποιούν πολυμεράσες, το τέταρτο την HA, ενώ το πέμπτο και το έκτο τμήμα την NP και NA αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ιοί της γρίπης Α έχουν δύο μικρότερα σε μέγεθος RNAs – το έβδομο και όγδοο τμήμα, δηλαδή τα γονίδια M και NS αντίστοιχα – καθένα από τα οποία περιέχει δύο αλληλεπικαλυπτόμενα ORFs που με τη σειρά τους κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες M2/M1 και NEP/ NS2 αντίστοιχα (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Δομή του γενόματος του ιού της γρίπης Α και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες που αυτό κωδικοποιεί.

Οι γραμμές στην αρχή και στο τέλος αντιπροσωπεύουν τις NCR περιοχές, ενώ αναγράφεται το μέγεθος κάθε τμήματος τόσο σε νουκλεοτίδια (δίπλα σε κάθε τμήμα) όσο και σε αμινοξέα (επάνω σε κάθε τμήμα). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από κάθε τμήμα και ο ρόλος τους αναφέρονται δεξιά κάθε τμήματος (Wright, 2001).

Η πρωτεΐνη PB2 κωδικοποιείται από το πρώτο τμήμα του RNA και έχει καίριο ρόλο στην εκκίνηση της μεταγραφής του γενόματος σε mRNA. Συγκεκριμένα, αναγνωρίζει και συνδέεται με το 5'-μεθυλιωμένο άκρο των πρόδρομων mRNAs του κυττάρου ξενιστή, τα οποία χρησιμοποιεί ο ιός ως εκκινητές για τη σύνθεση του ιικού mRNA (Neumann et al., 2004). Επίσης, η εν λόγω πρωτεΐνη συμβάλλει και στον κύκλο αναπαραγωγής του ιού. Μελέτες έδειξαν ότι ακόμη και μία μετάλλαξη ενός αμινοξέως στο αμινοτελικό άκρο της μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή του κύκλου πολλαπλασιασμού του ιού, ενώ δεν επηρεάζει τη μεταγραφή (Gastaminza et al., 2003). Έχει διαπιστωθεί, επίσης, ότι το είδος του αμινοξέως στην θέση 627 της πρωτεΐνης PB2

μπορεί να καθορίσει την παθογόνο δράση του ιού (Hatta et al., 2001) και την ειδικότητα του ξενιστή (Subbarao et al., 1993).

Η πρωτεΐνη PB1 κωδικοποιείται από το δεύτερο τμήμα και έχει θέσεις σύνδεσης τόσο για την PB2 όσο και για την PA πρωτεΐνη και επομένως αποτελεί το συνδετικό κρίκο για το σχηματισμό του συμπλέγματος των πολυμερασών. Η PB1 είναι υπεύθυνη για την αρχική ανάπτυξη και την επιμήκυνση κατά τη σύνθεση των ιικών mRNA, cRNA (complementary RNA) και vRNA (viral RNA) (Gonzalez and Ortin, 1999). Επιπλέον έχει δράση RNA- ενδονουκλεάσης και έτσι είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του κατάλληλου εκκινήτη για τη σύνθεση του mRNA. Πρόσφατα, μία 11^η πρωτεΐνη, η PB1-F2, έχει βρεθεί ότι κωδικοποιείται από τους περισσότερους ιούς γρίπης τύπου A. Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι ένα ORF, διαφορετικό από εκείνο που κωδικοποιεί την PB1, το οποίο βρίσκεται κοντά στο 5' άκρο του γονιδίου PB1 κωδικοποιεί το πολυπεπτίδιο 87-aa-long-PB1-F2. Ο ρόλος της PB1-F2 σχετίζεται με τη διαδικασία της απόπτωσης. Αλληλεπιδρά, δηλαδή, με τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες ANT3 και VDAC 1, μεταβάλλοντας έτσι το δυναμικό της μεμβράνης του μιτοχονδρίου και τελικά προκαλεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και την απόπτωση (Chanturiya et al., 2004). Φαίνεται από τις μελέτες ότι η εν λόγω πρωτεΐνη είναι «πρόσθετη» καθώς αρκετά στελέχη των ιών της γρίπης τύπου A που απομονώθηκαν τόσο από ανθρώπους, όσο και από ζώα υπολείπονται της συγκεκριμένης περιοχής ORF που την κωδικοποιεί. Ίδια ή παρόμοια πρωτεΐνη δεν έχει βρεθεί στους ιούς τύπου B και C (Wright, 2001, Lamb et al., 2007). Πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι μία τρίτη πρωτεΐνη, η PB1-N40, κωδικοποιείται από το δεύτερο τμήμα του RNA (Wise et al., 2009). Παρόλο που ο ρόλος της δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με την PB2 πρωτεΐνη, καθώς και το σύμπλεγμα των πολυμερασών. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι τρεις πρωτεΐνες του δεύτερου τμήματος φαίνεται να είναι αλληλένδετες. Η αφαίρεση της PB1-F2 προκαλεί την απορύθμιση της παραγωγής της PB1-N40, ενώ η περικοπή της μετά το κωδικόνιο 8 σε συνδυασμός με μετάλλαξη της PB1 στη θέση 40 (M40I), παρεμποδίζουν την παραγωγή της PB1-N40. Ωστόσο, η απουσία της PB1-N40 δεν φαίνεται να επηρεάζει την βιωσιμότητα του ιού, αλλά είναι επιζήμια για τον πολλαπλασιασμό του (Wise et al., 2009).

Το τρίτο γενωμικό τμήμα του RNA, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PA, η οποία είναι το τρίτο τμήμα του RNA- εξαρτώμενου συμπλέγματος των πολυμερασών (PB1, PB2 και PA). Ο ρόλος της PA δεν έχει αποσαφηνιστεί, παρόλα αυτά μεταλλάξεις στην αλληλουχία της επηρεάζουν τόσο τη μεταγραφή όσο και τον πολλαπλασιασμό του ιού, υποδεικνύοντας ότι έχει κάποιο ρόλο και στις δύο αυτές διαδικασίες (Neumann et al., 2004). Επιπλέον, η PA θεωρείται ότι έχει και πρωτεολυτική δραστηριότητα (Sanz-Ezquerro et al., 1995).

Η γλυκοπρωτεΐνη αιμοσυγκολλητίνη (HA) κωδικοποιείται από το τέταρτο τμήμα του ιικού RNA και αποτελείται από τρία πανομοιότυπα μέρη, σχηματίζοντας έτσι ένα τριμερές μόριο. Το τελευταίο περιέχει δύο πολυπεπίδια (HA1 και HA2) που προκύπτουν μετά από πρωτεολυτική διάσπαση ενός πρόδρομου HA0 πολυπετιδίου. Η διάσπαση του HA0 επιτυγχάνεται με πρωτεολυτικά ένζυμα που παράγονται από το κυτταρο-ξενιστή και αποτελεί προϋπόθεση προκειμένου ο ιός να καταστεί λοιμογόνος. Το τριμερές μόριο της HA σχηματίζει μία σφαιρική κεφαλή στο ένα άκρο του και ένα μίσχο στο άλλο (Copeland et al., 1986). Η κεφαλή αποτελείται αποκλειστικά από το πολυπεπίδιο HA1 και περιέχει τόσο τις θέσεις σύνδεσης με τους υποδοχείς του κυττάρου ξενιστή όσο και τις αντιγονικές περιοχές. Ο μίσχος αποτελείται κυρίως από το πολυπεπίδιο HA2 και μερικώς από το HA1. Το HA2 πολυπεπίδιο περιέχει ένα τμήμα που παρουσιάζει μεγάλη συντηρητικότητα ανάμεσα στους ιούς της γρίπης τύπου A, το οποίο συμμετέχει ουσιαστικά στη διαδικασία σύντηξης της HA (Cross et al., 2001). Ο κύριος ρόλος της HA είναι η σύνδεση του ιικού σωματιδίου με τους υποδοχείς σιαλικού οξέως του κυττάρου-ξενιστή (McCaughey, 1983). Έχει βρεθεί ότι η θέση συγκεκριμένων αμινοξέων μπορεί να καθορίσει τόσο την ειδικότητα των υποδοχέων όσο και τη μετάδοση του ιού ανάμεσα σε διάφορα είδη ξενιστών (Matrosovich et al., 1999). Μετά τη σύνδεσή της με τους υποδοχείς του κυττάρου-ξενιστή, η HA ρυθμίζει τη συγχώνευση της κυτταρικής μεμβράνης με εκείνη του ιικού σωματιδίου, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του γενετικού υλικού στο κυτταρόπλασμα.

Η πρωτεΐνη NP κωδικοποιείται από το πέμπτο τμήμα του ιικού RNA. Είναι βασική δομική πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται με το νέο-παραγόμενο ιικό RNA (vRNA) προκειμένου να συντεθούν τα συμπλέγματα της ριβονουκλεοπρωτεΐνης (RNP) των νέων ιικών σωματιδίων. Η NP επειδή αλληλεπιδρά με την κυτταρική πρωτεΐνη-μεταφορέα

καρυοφερίνη α, παίζει σημαντικό ρόλο και στη μεταφορά των νέων αυτών RNP από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Melen et al., 2003). Όπως έχει ήδη αναφερθεί η πρωτεΐνη NP είναι άλλη μία πρωτεΐνη ειδική του τύπου του ιού της γρίπης και κύριος στόχος του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (Yewdell et al., 1985).

Η δεύτερη σημαντικότερη πρωτεΐνη του περιβλήματος του ιικού σωματιδίου είναι η γλυκοπρωτεΐνη νευραμινιδάση (NA), η οποία κωδικοποιείται από το έκτο τμήμα του ιικού RNA. Η αντιγονικότητα της NA είναι επίσης σημαντική, συμβάλλουσα στον καθορισμό των υποτύπων του ιού. Όπως και η γλυκοπρωτεΐνη HA, η NA φέρει στην αλληλουχία της περιοχές με έντονη παραλλακτικότητα, οι οποίες θεωρούνται αντιγονικές θέσεις-στόχοι του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (Gulati et al., 2002). Η άκανθα της NA, όπως προβάλλει στο περίβλημα του ιικού σωματιδίου, είναι ένα τετραμερές, που συντίθεται από τέσσερα ομοιόμορφα μονομερή. Εμφανίζει μανιταροειδή μορφή, αποτελούμενη από ένα βραχύ μίσχο στη βάση και μία κυβοειδή κεφαλή. Η κεφαλή κάθε μονομερούς έχει μία ενεργή θέση, η οποία αποτελείται από μία αλληλουχία συντηρημένων αμινοξέων και γύρω από αυτή εντοπίζονται οι αντιγονικές θέσεις της NA (Gamblin et al., 2010). Στο σύνολό της η άκανθα της NA διαθέτει τέσσερις ενεργές θέσεις (Wright, 2001). Η NA δρα στο τέλος του αναπαραγωγικού κύκλου του ιού, καθώς διευκολύνει την απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων από τα μολυσμένα κύτταρα κατά τη διαδικασία της εκβλάστησης. Παρεμποδίζει τόσο την αυτοσυγκόλληση των νέων ιικών σωματιδίων όσο και την επαναπροσρόφησή τους στο ήδη μολυσμένο κύτταρο, δρώντας στα σημεία σύνδεσης της ιικής αιμοσυγκολλητίνης (HA) με τους κυτταρικούς υποδοχείς, απομακρύνοντας τις ρίζες του σιαλικού οξέος (Palese et al., 1974, Palese and Compans 1976). Αντισώματα κατά της NA παρεμποδίζουν τη δράση της, οπότε δεν καταστρέφονται οι υποδοχείς του σιαλικού οξέως και έτσι περιορίζεται η λοίμωξη (Gamblin et al., 2010). Τελευταία, θεωρείται ότι η εν λόγω πρωτεΐνη έχει κάποιο ρόλο και στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, αφού διευκολύνει την είσοδο του ιού στο κύτταρο (Matrosovich et al., 2004) και καθυστερεί τη δράση των ενδοσωμάτων (Suzuki et al., 2005).

Το έβδομο τμήμα του ιικού RNA κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης, M1 και M2. Όπως έχει αναφερθεί, η πρωτεΐνη M1 βρίσκεται εσωτερικά της λιπιδικής στιβάδας του περιβλήματος του ιού και αλληλεπιδρά τόσο με τις ριβονουκλεοπρωτεΐνες

RNP όσο και με τη μη δομική πρωτεΐνη NEP/NS2, ρυθμίζοντας έτσι την έξοδο των νέων RNP από τον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή στο κυτταρόπλασμα (Ma et al., 2001). Επιπλέον, η M1 έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με τις HA, NA και RNP, παίζοντας έτσι βασικό ρόλο στη συγκρότηση και στην εκβλάστηση των νέων ιικών σωματιδίων (Gomez-Puertas et al., 2000, Latham and Galarza 2001). Η πρωτεΐνη M2 είναι η τρίτη πρωτεΐνη του περιβλήματος των ιών της γρίπης τύπου A, μαζί με τις HA και NA. Δρα ως διάυλος ανταλλαγής ιόντων, επιτρέποντας την εισροή πρωτονίων από τα ενδοσώματα στο εσωτερικό των ιικών σωματιδίων, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό του συμπλέγματος RNP και την ολοκλήρωση της διαδικασίας έκδυσης του ιού κατά το πρώτο στάδιο πολλαπλασιασμού του (Bron et al., 1993, Wharton et al., 1994, Schnell and Chou 2008). Δεδομένου ότι η αλληλουχία της πρωτεΐνης M2 είναι σχετικά συντηρημένη αποτελεί στόχο μελέτης τόσο για την παρασκευή εμβολίων, όσο και για την ανίχνευση του ιού (Fiers et al., 2004).

Τέλος, υπάρχουν και οι μη δομικές πρωτεΐνες NS1 και NS2/NEP, που κωδικοποιούνται από διαφορετικά ORFs του όγδοου τμήματος του γενωμικού RNA των ιών της γρίπης A. Η NS1 παράγεται σε μεγάλες ποσότητες στα προσβεβλημένα κύτταρα. Της προσδίδουν λειτουργία ανταγωνιστή ιντερφερόνης, η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του ιού και έχει ρόλο κλειδί στη δυνατότητα των ιών της γρίπης να ξεφεύγουν τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή (Garcia-Sastre, 2001). Επίσης, η πρωτεΐνη NS1 συμβάλλει με ποικίλες δραστηριότητες τόσο στον πολλαπλασιασμό όσο και στη μολυσματικότητα του ιού. Η πρωτεΐνη NEP/NS2, φαίνεται ότι εμπλέκεται, μαζί με την M1, στην έξοδο των νέων RNP από τον πυρήνα, παρόλο που ο ρόλος της δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος (O'Neill et al., 1998, Halet al., 2008).

Οι ιοί της γρίπης B έχουν γένωμα που αποτελείται και αυτό από οκτώ τμήματα RNAs και δομικά είναι παρόμοιο με εκείνο των ιών της γρίπης A. Παρατηρούνται, όμως, οι εξής διαφορές: α) το έβδομο τμήμα RNA των ιών της γρίπης B, δηλαδή το γονίδιο M, περιέχει μία τριπλέτα λήξης που είναι κοινή με την τριπλέτα έναρξης για την M2 πρωτεΐνη και β) οι περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες είναι μεγαλύτερες σε μήκος σε σχέση με τις αντίστοιχες του γενώματος των ιών της γρίπης A (Wright, 2001).

Στους ιούς της γρίπης C (επτά τμήματα RNA), τα τρία μεγαλύτερα τμήματα του RNA κωδικοποιούν πολυμεράσες, εκ των οποίων οι δύο πρώτες, PB1 και PB2, είναι ομόλογες

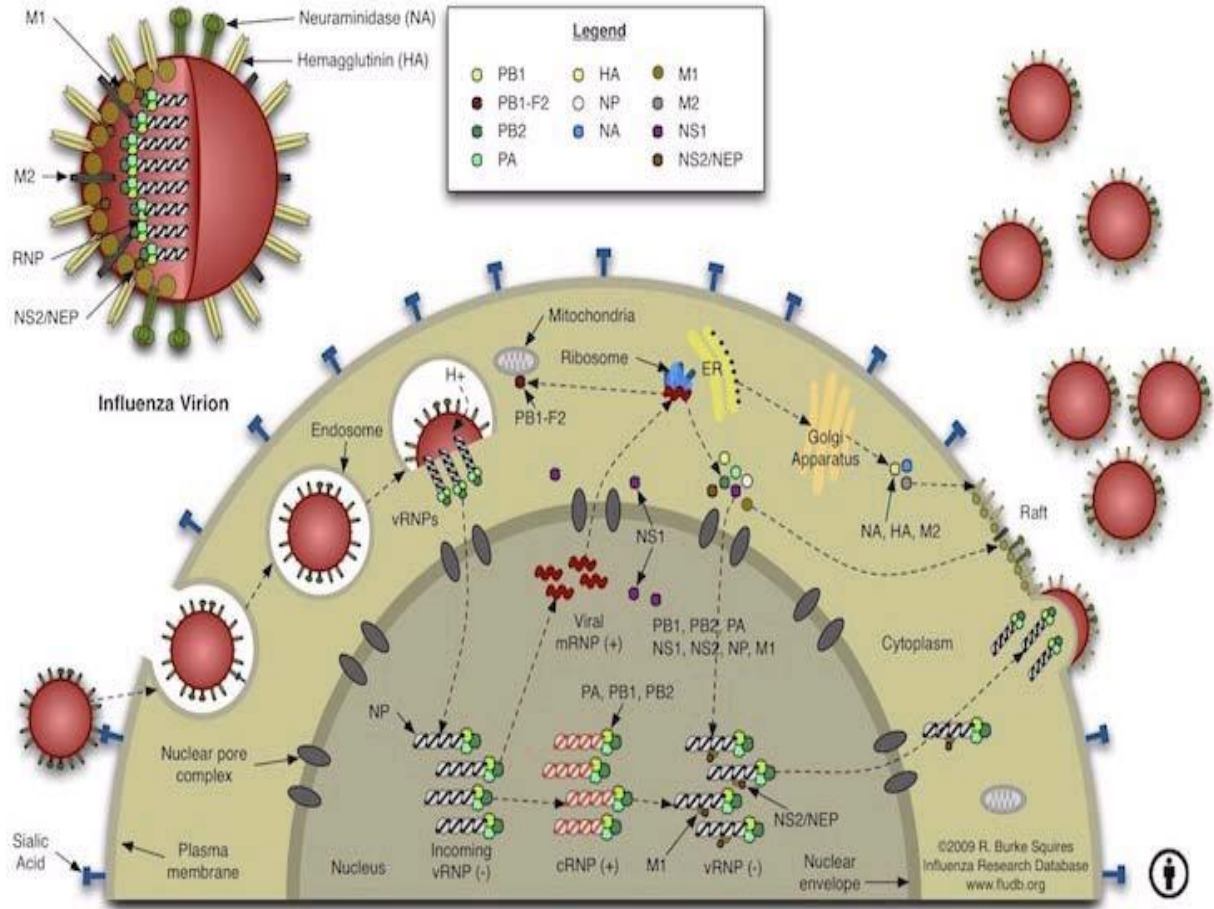
με τις αντίστοιχες των ιών της γρίπης Α και Β, ενώ η τρίτη πολυμεράση που κωδικοποιείται από το γονίδιο Ρ3, διαφέρει. Το τέταρτο γενωμικό τμήμα κωδικοποιεί την HEF πρωτεΐνη, η οποία συνδυάζει περισσότερους ρόλους από εκείνους που αναφέρθηκαν για την HA των ιών της γρίπης Α. Εκτός από το ρόλο που έχει κατά τη σύνδεση του ιού με τους υποδοχείς (Hemagglutination) και τη σύντηξη με την κυτταρική μεμβράνη (Fusion), διευκολύνει την έκδυσή του καθώς έχει δράση εστεράσης (Esterase). Η νουκλεοπρωτεΐνη κωδικοποιείται από το πέμπτο τμήμα του γενώματος, ενώ το έκτο τμήμα κωδικοποιεί την M πρωτεΐνη. Τέλος, το έβδομο τμήμα του γενωμικού RNA κωδικοποιεί την NS1 πρωτεΐνη, που μέσω ενός τμηματικού mRNA συνθέτει την NEP/NS2 (Wright, 2001).

Από άποψη εξέλιξης, οι ιοί όλων των τύπων γρίπης φαίνεται ότι έχουν κοινό πρόγονο. Φυλογενετικές αναλύσεις βασισμένες στο μόριο της αιμοσυγκολλητίνης, έδειξαν ότι οι ιοί της γρίπης Α και Β διαφοροποιήθηκαν μεταξύ τους πιο πρόσφατα σε σχέση με τους ιούς της γρίπης C. Οι ιοί της γρίπης Α φαίνεται ότι διαφοροποιήθηκαν πριν από 2.000 χρόνια, ενώ εκείνοι της γρίπης Β και C πριν από 4.000 και 8.000 χρόνια, αντίστοιχα (Wright, 2001).

1.5 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ- ΑΝΤΙΤΥΠΩΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ

Το πρώτο βήμα για τη μόλυνση και τον πολλαπλασιασμό του ιού, είναι η προσρόφησή του σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (σιαλικά οξέα) του κυττάρου ξενιστή (Skehel and Wiley, 2000). Η αιμοσυγκολλητίνη είναι η περιοχή διαμέσου της οποίας ο ιός συνδέεται με τους κυτταρικούς υποδοχείς, ενώ η νευραμινιδάση διασπά τον υποδοχέα και παίζει ρόλο στην απελευθέρωση του ιού από τα προσβληθέντα κύτταρα, αφού λάβει χώρα ο πολλαπλασιασμός αυτού. Ο κύκλος ζωής του ιού της γρίπης περιλαμβάνει τα εξής στάδια: α) την προσρόφηση του ιού στο κύτταρο-ξενιστή, β) την είσοδο του ιού στο κύτταρο και την έκδυσή του ιικού γενώματος, γ) τη μεταγραφή του ιικού γενώματος σε mRNA, δ) τη μετάφραση του mRNA, ε) την αντιτύπωση του ιικού RNA, στ) τη μορφογένεση και η) την έξοδο του ιού από το κύτταρο-ξενιστή (Wright 2007). Στην Εικόνα 5 απεικονίζεται ο τρόπος πολλαπλασιασμού του ιού της γρίπης όπως αυτός έχει καταγραφεί μετά από μελέτη του κυρίως σε κυτταροκαλλιέργειες.

Γρίπη Ιπποειδών



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του πολλαπλασιασμού του ιού της γρίπης.

Μετά τη σύνδεση του ιού σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο με το μηχανισμό της ενδοκύττωσης. Το χαμηλό pH στο εσωτερικό του κυττάρου ενεργοποιεί την έκδυση του ιού και την απελευθέρωση του RNA. Νέες πρωτεΐνες συνθέτονται από το mRNA του ιού. Το ιικό γένωμα (vRNA) πολλαπλασιάζεται μέσω ενός ενδιάμεσου cRNA, θετικής πολικότητας. Οι νέες αυτές ικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες απελευθερώνονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή και στη συνέχεια αφού σχηματίσουν περίβλημα αποσπώντας μέρος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή απελευθερώνονται ως νέα ιικά σωματίδια. (<http://www.reactome.org>)

Τα ιικά σωματίδια, αμέσως μετά την προσρόφηση, χρησιμοποιούν το μηχανισμό της ενδοκύττωσης προκειμένου να εισέλθουν στο κύτταρο ξενιστή, όπως συμβαίνει με σχεδόν όλους τους ιούς που φέρουν περίβλημα. Η ενδοκύττωση διεγείρεται κατά την προσρόφηση των ιικών μορίων HA στα κατάλληλα μόρια σιαλικού οξέος της κυτταρικής μεμβράνης, και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενδοσωματίου που περικλείει το ιικό

σωματίδιο και το μεταφέρει στο κυτταρόπλασμα. Τα μόρια HA του ιού παρουσιάζουν ειδικότητα ως προς τη σύνδεση με τους υποδοχείς του κυττάρου κάθε ξενιστή, δεδομένου ότι διαφορετικά μόρια HA αναγνωρίζουν διαφορετικά σιαλικά οξέα στην άκρη των υποδοχέων. Η ειδικότητα του υποδοχέα των ιών της γρίπης έχει πολύ σημαντικό ρόλο τόσο για τη μόλυνση και τον πολλαπλασιασμό, όσο και για την επιζωοτιολογία / επιδημιολογία των ιών της γρίπης και για αυτό το λόγο αναλύεται παρακάτω (Tasleem, 2009).

Το όξινο περιβάλλον που προσφέρει το ενδοσωμάτιο προκαλεί διαρθρωτικές αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης HA, η οποία διαχωρίζεται και επιδέχεται αλλαγές στο αμινοτελικό άκρο του μορίου HA2. Έτσι επιτυγχάνεται η σύντηξη της ιικής με την ενδοσωματική μεμβράνη (Stegmann, 2000). Στην όλη διαδικασία της έκδυσης συμβάλλει και η παρουσία της M2 πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί διάυλο ανταλλαγής ιόντων. Μέσω των καναλιών αυτών ιόντα H^+ εισέρχονται από τα ενδοσωμάτια στο εσωτερικό του ιικού καψιδίου, με αποτέλεσμα την αποσύνδεση της πρωτεΐνης M1 από το σύμπλεγμα του RNP και τελικά την απελευθέρωση του RNP του ιού στο κυτταρόπλασμα (Matlin et al., 1991). Πειράματα έδειξαν ότι η διαδικασία της έκδυσης μπορεί να παρεμποδιστεί είτε δεσμεύοντας τους διαύλους ιόντων, χρησιμοποιώντας ουσίες όπως η αμανταδίνη, είτε αλλάζοντας το όξινο pH του ενδοσωματίου. Στην πλειοψηφία τους οι ιοί της γρίπης φαίνεται ότι χρειάζονται 25 min για την είσοδό τους στο κύτταρο-ξενιστή και 10 min αργότερα τα συμπλέγματα-RNP εντοπίζονται στον πυρήνα αυτού. Επομένως, η όλη διαδικασία της εισόδου και της έκδυσης λαμβάνει χώρα σε περίπου 35 min. Η απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο κυτταρόπλασμα και η μεταφορά του στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή, σηματοδοτούν την έναρξη τη μεταγραφικής δραστηριότητας του ιού (Wright, 2001).

Χαρακτηριστικό του κύκλου της ζωής των ιών της γρίπης, που είναι ασυνήθιστο για τους RNA ιούς, είναι η εξάρτηση που αυτός δείχνει στις λειτουργίες του πυρήνα του κυττάρου ξενιστή. Ολόκληρη η διαδικασία της σύνθεσης του ιικού RNA λαμβάνει χώρα στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή, αλλά και η διαδικασία μεταφοράς ιικού γενώματος μέσα και έξω από τον πυρήνα συνδέεται στενά με τις λειτουργίες του πυρήνα. Και τα 8 τμήματα που αποτελούν το ιικό γένωμα ποτέ δεν απαντώνται ως «γυμνό» RNA, αλλά σχηματίζουν συμπλέγματα RNP. Η κύρια πρωτεΐνη του συμπλέγματος αυτού είναι η NP,

η οποία περιβάλλει το RNA. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες είναι οι τρεις πολυμεράσες PB1, PB2 και PA. Όλες οι πρωτεΐνες του συμπλέγματος RNP έχουν κάποιες ειδικές θέσεις, που αναφέρονται ως NLS (Nuclear Localization Signals) και παρεμβαίνουν στο μηχανισμό εισόδου στον πυρήνα (Herz et al., 1981, Wright, 2001).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι ιοί της γρίπης είναι RNA-ιοί με μονόκλωνη αλυσίδα αρνητικής πολικότητας, που περιέχουν τις περισσότερες αλλά όχι όλες τις απαιτούμενες πρωτεΐνες για τον πολλαπλασιασμό του ιού μέσα στο κύτταρο-ξενιστή. Το ιικό RNA (vRNA), που πλέον έχει εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή, χρησιμοποιείται ως εκμαγείο τόσο για την αντιγραφή σε θετικής πολικότητας RNA, δηλαδή cRNA (complementary RNA), όσο και για τη μεταγραφή του σε mRNA (messenger RNA) (Mikulasova et al., 2000). Η σύνθεση του mRNA απαιτεί τόσο την πολυμεράση II όσο και το RNA του κυττάρου ξενιστή, ως πηγή εκκινητών, οι οποίοι ενεργοποιούνται από τις ιικές ενδονουκλεάσες. Μία ενδονουκλεάση αρχίζει να τεμαχίζει τμήματα των 10-13 νουκλεοτιδίων από το 5'-μεθυλιωμένο άκρο του RNA του κυττάρου, κατά προτίμηση εκεί όπου υπάρχει πουρίνη, έτσι ώστε το ιικό RNA να μπορεί να προσαρμοστεί και να συνδεθεί με τις θέσεις των εκκινητών του κυτταρικού RNA. Το mRNA αρχίζει να συντίθεται μέχρι να φτάσει στην τερματική ακολουθία και ένα μόριο poly-A προστίθεται στο 3' άκρο της νέο-συντεθείσας αλυσίδας (Wright, 2001).

Από τις πρωτεΐνες του ιού, οι NP και NS1 είναι αυτές που παράγονται πρώτες μετά την απέκδυση του ιού και προάγουν τον πολλαπλασιασμό του (Hay et al., 1977). Η μετανάστευση των νέων αυτών πρωτεϊνών από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, πυροδοτεί το τέλος της σύνθεσης του mRNA και την έναρξη της σύνθεσης του cRNA. Η πρωτεΐνη NS1 παρεμβαίνοντας στο αμυντικό σύστημα του ξενιστή, δεσμεύει τις αντι-ιικές κυτταροκίνες και έτσι εξασφαλίζει τη συνέχιση του πολλαπλασιασμού του ιού (Hale et al., 2008).

Τα νέα ιικά RNAs περιβάλλονται από τις πρωτεΐνες NP, σχηματίζοντας έτσι συμπλέγματα RNP, και λειτουργούν ως εκμαγεία για τη μεταγραφή των ιικών mRNAs και τη μετάφρασή των υπόλοιπων ιικών πρωτεϊνών (O'Neill et al., 1998, Whittaker and Helenius 1998). Η σύνδεση της πρωτεΐνης M1 με τα συμπλέγματα RNPs και η αλληλεπίδραση με τις νέες ιικές πρωτεΐνες HA, NA και M2 σηματοδοτεί το τέλος της διαδικασίας της μετάφρασης και μεταγραφής, ενώ παράλληλα οδηγεί στη συγκέντρωση

και μεταφορά των ικών προϊόντων από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Martin & Helenius, 1991, Compans et al., 1974).

Η εκβλάστηση των νέων ικών σωματιδίων λαμβάνει χώρα δια μέσου του τμήματος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης όπου έχουν ενσωματωθεί οι πρωτεΐνες HA, NA και M2, αποκτώντας έτσι και το λιπιδικό τμήμα του περιβλήματός τους (Nayak et al., 2004).

1.6 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ

Οι ιοί της γρίπης αρχικά καλλιεργήθηκαν σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας. Η μέθοδος αυτή συνεχίζει ακόμα και σήμερα να είναι η μέθοδος επιλογής σε αρκετές περιπτώσεις, όπως όταν απαιτείται παραγωγή μεγάλης ποσότητας ιού για την παρασκευή εμβολίων. Για την απομόνωση των ιών της γρίπης Α των πτηνών και των ιπποειδών ενοφθαλμίζονται εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας, ηλικίας 10 έως 11 ημερών, στην αλλαντοϊκή κοιλότητα, και επωάζονται στους 33-37 °C για δύο έως τρεις ημέρες. Ιοί της γρίπης του ανθρώπου έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα μετά από ενοφθαλμισμό στην αλλαντοϊκή ή αμνιακή κοιλότητα εμβρυοφόρων αυγών όρνιθας και επώαση στους 33-34 °C. Οι ιοί της γρίπης C έχουν απομονωθεί μετά από πενταήμερη επώαση εμβρυοφόρων αυγών, ηλικίας 7 έως 8 ημερών, που ενοφθαλμίστηκαν στην αμνιακή – και όχι στην αλλαντοϊκή- κοιλότητα.

Για δεκαετίες οι φαρμακοβιομηχανίες στήριζαν την παραγωγή των εμβολίων στην καλλιέργεια των στελεχών της γρίπης σε εμβρυοφόρα αυγά (Gerdil, 2003). Η ανάπτυξη των κυτταροκαλλιεργειών για την καλλιέργεια των ιών της γρίπης ήταν επιτακτική ανάγκη για τους εξής λόγους : α) της δυσκολίας στην άμεση διάθεση μεγάλης ποσότητας εμβρυοφόρων αυγών για την παραγωγή εμβολίων σε μία πανδημία, β) της αποφυγής προβλημάτων που προκύπτουν από τα εμβόλια που έχουν παραχθεί από στελέχη καλλιεργημένα σε εμβρυοφόρα αυγά, όπως για παράδειγμα, αλλεργικές αντιδράσεις λόγω αλβουμίνης, και γ) διότι παρατηρήθηκε ότι μετά από πολλές διόδους του ιού σε εμβρυοφόρα αυγά υπήρξαν μεταλλάξεις στο μόριο της HA, με αποτέλεσμα ο ιός που είχε απομονωθεί μετά από τις διόδους να είναι αντιγονικά διαφορετικός σε σχέση με εκείνον που υπήρχε στο κλινικό δείγμα (Alymova et al, 1998, Kistner 1999, Tree et al., 2001).

Η κυτταρική σειρά MDCK (Madin- Darby canine kidney) έχει αποδειχτεί ότι είναι η καταλληλότερη συνεχής κυτταρική σειρά (η πλέον ευαίσθητη) για την απομόνωση των

ιών γρίπης A και B, καθώς αυτοί μπορούν να αναπτυχθούν πιο γρήγορα (2 ημέρες νωρίτερα) σε σχέση με την κυτταρική σειρά Vero (African green monkey kidney) (Youli et al., 2004, Correia et al., 1999). Οι κυτταρικές σειρές έχουν πλέον χρησιμοποιηθεί και για την παραγωγή εμβολίων (Alymova, et al., 1998, Kistner et al., 1998, Tree et al., 2001).

Ο ιός δεν προκαλεί ιδιαίτερες κυτταροπαθολογικές αλλοιώσεις και το μόνο που μπορεί να χαρακτηριστεί ως τέτοιο είναι η απόπτωση. Ο χρόνος εμφάνισης του κυτταροπαθογόνου αποτελέσματος εξαρτάται από τη λοιμογόνο δύναμη του ιού και ποικίλει από 3 έως 7 ημέρες. Πιθανόν να μην είναι εμφανές το κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα από τον πρώτο ενοφθαλμισμό του ιού στα κύτταρα, για αυτό το λόγο πρέπει να ακολουθήσει 2^η και 3^η «τυφλή» δίοδος.

1.7 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΥΠΟΔΟΧΕΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αιμοσυγκολλητίνη του ιού της γρίπης είναι μία γλυκοπρωτεΐνη του περιβλήματος, η οποία ευθύνεται για την αναγνώριση των ειδικών υποδοχέων (Receptor Binding Domain, RBD) στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή και την προσκόλληση του ιικού σωματιδίου στο κύτταρο, ενώ παράλληλα σχετίζεται άμεσα με την ποικιλομορφία των στελεχών της γρίπης.

Παρόλο που όλοι οι ιοί της γρίπης αναγνωρίζουν στις RBD θέσεις ολιγοσακχαρίτες, που έχουν στο τελικό τους άκρο σιαλικό οξύ (SA), η ειδικότητα του μορίου της HA σε σχέση με αυτούς διαφέρει. Για παράδειγμα, στα ιπποειδή και στα πτηνά το μόριο HA αναγνωρίζει το σιαλικό οξύ-α2,3-γαλακτικό (SA-α2,3-Gal) δεσμό ως θέση σύνδεσης με τους υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων της τραχείας της αναπνευστικής οδού, ενώ οι ιοί της γρίπης του ανθρώπου δείχνουν προτίμηση στο SA-α2,6-Gal δεσμό (Suzuki et al., 2000, Mikhail et al., 2006). Τόσο η ποσότητα όσο και το είδος των σιαλικών οξέων [N-ακετυλονευραμινικό οξύ (NeuAc) και N-γλυκοζαμινικό οξύ, (NeuGc)], που υπάρχουν στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή, ποικίλει στα διάφορα είδη ζώων και παίζει σημαντικό ρόλο στο φραγμό του είδους των ιών της γρίπης. Για παράδειγμα, ένας ιός γρίπης με HA που αναγνωρίζει υποδοχέα με σιαλικό οξύ NeuAc-α2,6Gal και όχι NeuAc-α2,3Gal ή NeuGc-α2,3Gal δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί στους ίππους. Αντίθετα, αν το HA μόριο αναγνωρίζει το σιαλικό οξύ NeuGc-α2,3Gal τότε μπορεί να

εισέλθει και να πολλαπλασιαστεί στα επιθηλιακά κύτταρα της τραχείας του ίππου, καθώς το εν λόγω σιαλικό οξύ είναι κυρίαρχο στο ζωικό αυτό είδος (περίπου 97% του συνόλου των σιαλικών οξέων) (Suzuki et al., 2000, Suzuki et al., 1985), ενώ αποτελεί λιγότερο και από το 0,1% στους ανθρώπινους ιστούς (Rogers et al., 1983). Για το λόγο αυτό δεν έχουν αναφερθεί μέχρι και σήμερα περιστατικά μετάδοσης ιού γρίπης από ιπποειδή σε άνθρωπο.

Τα επιθηλιακά κύτταρα της τραχείας των χοίρων φέρουν και τους δύο τύπους σιαλικών οξέων και για αυτό οι χοίροι θεωρούνται ως δεξαμενή γενετικών ανασυνδυασμών των ιών της γρίπης (Ito et al., 1998). Για τον ίδιο λόγο οι χοίροι έχουν μολυνθεί από ιούς της γρίπης των πτηνών, οι οποίοι αναγνωρίζουν τόσο το SA α 2,3Gal όσο και το SA α 2,6Gal (Kida et al., 1994). Αυτή η μελέτη, έδωσε έμφαση στο ρόλο που παίζει στη μετάδοση του ιού της γρίπης στα διάφορα είδη ζώων το είδος και το ποσοστό των κατάλληλων υποδοχέων στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή.

Εντούτοις, γεννάται το ερώτημα γιατί υπήρξε μετάδοση του ιού της γρίπης H5N1 από τα πτηνά στους ανθρώπους για πρώτη φορά στο Hong Kong το 1997, εφόσον οι υποδοχείς στα επιθηλιακά κύτταρα των πτηνών και των ανθρώπων είναι διαφορετικοί (Claas et al., 1998, Matrosovich et al., 1999). Φαίνεται λοιπόν ότι η ειδικότητα του μορίου HA του ιού ως προς τους υποδοχείς εξαρτάται από τον συνδυασμό των υποδοχέων και του συγκεκριμένου στελέχους του ιού. Στους ίππους για παράδειγμα, η ικανότητα του ιού να αναγνωρίζει τους ειδικούς υποδοχείς σύνδεσης στο κύτταρο είναι ζωτικής σημασίας για τον πολλαπλασιασμό του ιού, ενώ αντίθετα στους ανθρώπους φαίνεται ότι η αναγνώριση των κατάλληλων υποδοχέων δεν σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό του ιού (Suzuki et al., 2000). Επιπλέον, φαίνεται ότι οι ιοί έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται στο ξενιστή με σημειακές μεταλλάξεις στα σημεία σύνδεσης υποδοχέα - HA ιού. Σε μία μελέτη που έγινε στο στέλεχος που προκάλεσε την πανδημία της γρίπης το 1918, υποστηρίζεται ότι υπήρξε μια σημειακή μετάλλαξη (Asp190Glu) στο σημείο σύνδεσης με τους υποδοχείς, η οποία μείωσε την ικανότητα σύνδεσης του ιού στο SA- α 2,6 δεσμό, ενώ μία δεύτερη σημειακή μετάλλαξη (Asp225Gly) αύξησε την ικανότητα σύνδεσής του με τον α 2,3-SA υποδοχέα. Έτσι, οι δύο αυτές σημειακές μεταλλάξεις επηρέασαν την ικανότητα του ιού να συνδέεται με

τους υποδοχείς του ξενιστή και επομένως επηρέασαν την εξέλιξη του ιού (Gamblin et al., 2004).

1.8 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΙΩΝ

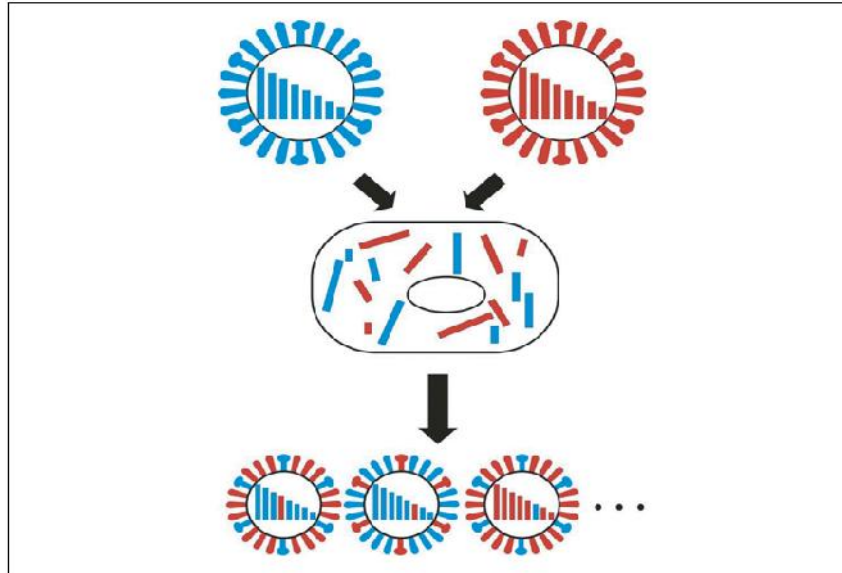
Παρόλο που οι ιοί της γρίπης έχουν μικρού μεγέθους γένωμα, το οποίο μάλιστα αποτελείται από μικρό σύνολο γονιδίων, παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία. Το γεγονός αυτό γίνεται αντιληπτό από τις μεγάλες αντιγονικές τους διαφορές, τις διαφορές στη λοιμογόνο τους δύναμη, καθώς και από τις γενετικές τους διαφορές. Αυτή η γενετική ποικιλομορφία είναι δυνατό να προκύψει μέσα από διάφορους μηχανισμούς, όπως η ανταλλακτική ανακατάταξη, η αντιγονική παρέκλιση (antigenic drift) και η αντιγονική μετάπτωση (antigenic shift) (Webster et al., 1992).

1) Ανταλλακτική Ανακατάταξη: Ο μηχανισμός της ανταλλακτικής ανακατάταξης οδηγεί στην πρόκληση μεταλλάξεων που μπορεί να έχουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση νέων ιικών σωματιδίων, ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες επιλογής. Στους ιούς της γρίπης Α, η ανταλλακτική ανακατάταξη μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού του ιού αν η RNA πολυμεράση χρησιμοποιήσει ως εκμαγείο αντιγραφής του ιικού RNA τμήμα RNA ενός άλλου ιού γρίπης Α, που έχει μολύνει το ίδιο κύτταρο, ή κατά την επανένωση των κατατμημένων τμημάτων των νουκλεϊκών οξέων των δύο ιών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού του μηχανισμού είναι η μετάλλαξη δύο χαμηλής λοιμογόνου δύναμης ιών γρίπης των πτηνών, σε υψηλής λοιμογόνου δύναμης ιούς, μετά την προσθήκη 21 νουκλεοτιδίων του Μ γονιδίου (Bowes et al., 2004, Hirst et al., 2004, Pasick et al., 2005) ή 30 νουκλεοτιδίων του ΝΡ γονιδίου (Suarez et al., 2004) στο ΗΑ γονίδιο. Η ανταλλακτική ανακατάταξη γονιδίων μεταξύ δύο διαφορετικών ιών γρίπης τύπου Α, αν και δεν είναι συχνό φαινόμενο έχει αναφερθεί (Rohde and Scholtissek 1980).

2) Αντιγονική παρέκλιση: Η συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων, δηλαδή απαλοιφών και προσθηκών στο γένωμα, αποτελούν τον κύριο μηχανισμό γενετικής ποικιλομορφίας των ιών της γρίπης (Wright, 2001). Εξαιτίας της υψηλής συχνότητας σφαλμάτων - 1 ανά 10 βάσεις- των RNA πολυμερασών και της έλλειψης του διορθωτικού μηχανισμού σε κάθε κύκλο αντιγραφής (Holland et al., 1982, Steinhauer and Holland 1987) προκύπτουν μεταλλαγμένα ιικά σωματίδια που κάποια μπορεί να μην είναι

βιώσιμα και κάποια να περιέχουν μεταλλάξεις χρήσιμες για την περαιτέρω εξέλιξη του ιού (Webster et al., 1992). Αυτές οι σημειακές μεταλλάξεις συχνά οδηγούν σε αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων, αλλά και αμινοξέων με αποτέλεσμα την αλλαγή στην αντιγονικότητα των πρωτεϊνών HA και NA των στελεχών του ιού (Wright, 2001). Έτσι, με την αλλαγή της αντιγονικότητας των πρωτεϊνών HA και NA, τα αντισώματα του ξενιστή που προέρχονται από εμβολιασμό ή παλαιότερη λοίμωξη, δεν είναι πλέον ειδικά κατά του ιού (Webster et al., 1992). Συνήθως κάθε στέλεχος του ιού της γρίπης Α κυριαρχεί 2 έως 5 έτη πριν αντικατασταθεί από κάποιο άλλο.

3) Αντιγονική μετάπτωση: Ο μηχανισμός της αντιγονικής μετάπτωσης περιλαμβάνει την ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ δύο διαφορετικών ιών γρίπης που έχουν μολύνει το κύτταρο ξενιστή (Εικόνα 6). Η αντιγονική μετάπτωση έχει αναφερθεί για όλους του τύπους της γρίπης, αλλά δεν έχει παρατηρηθεί μεταξύ ιών που ανήκουν σε δύο διαφορετικούς τύπους γρίπης (Wright, 2001). Τα στελέχη που προκύπτουν μετά την αντιγονική μετάπτωση είναι ανοσολογικά διαφορετικά από τα πατρογονικά στελέχη, καθώς περιέχουν διαφορετικές, ως προς την αντιγονικότητά τους, πρωτεΐνες. Επομένως είναι δυνατόν στελέχη που έχουν προκύψει από αντιγονική μετάπτωση να παρουσιάζουν έντονη λοιμογόνο δύναμη και να προκαλούν πανδημίες, επηρεάζοντας κυρίως «παρθέτους» ανοσολογικά οργανισμούς (Wright, 2001). Χαρακτηριστικό παράδειγμα του μηχανισμού της αντιγονικής μετάπτωσης, είναι το στέλεχος H1N1, που προκάλεσε την τελευταία πανδημία γρίπης το 2009, το οποίο προέκυψε από αντιγονική μετάπτωση των στελεχών H3N2 (Αμερικανικό στέλεχος χοίρου) και H1N2 (Ευρωπαϊκό στέλεχος χοίρου). Συγκεκριμένα, το γένωμα του νέου στελέχους αποτελούνταν από τα γονίδια PB2 και PA του Αμερικανικού στελέχους του ιού της γρίπης των πτηνών, το γονίδιο PB1 του ιού H3N2 που προσβάλλει τον άνθρωπο, τα γονίδια HA, NP, NS του στελέχους της γρίπης του χοίρου και τα γονίδια NA και M του ιού της γρίπης του χοίρου του Ευρωπαϊκού κλάδου (Neumann et al., 2009). Παρόμοιο παράδειγμα αντιγονικής μετάπτωσης αποτελεί και το Ευρωπαϊκής προέλευσης NS γονίδιο του στελέχους A/eq/Lincolnshire/1/06, το οποίο χαρακτηρίζεται ως Αμερικανικό, βάση της φυλογενετικής ανάλυσης της HA πρωτεΐνης του (Bryant et al., 2009).

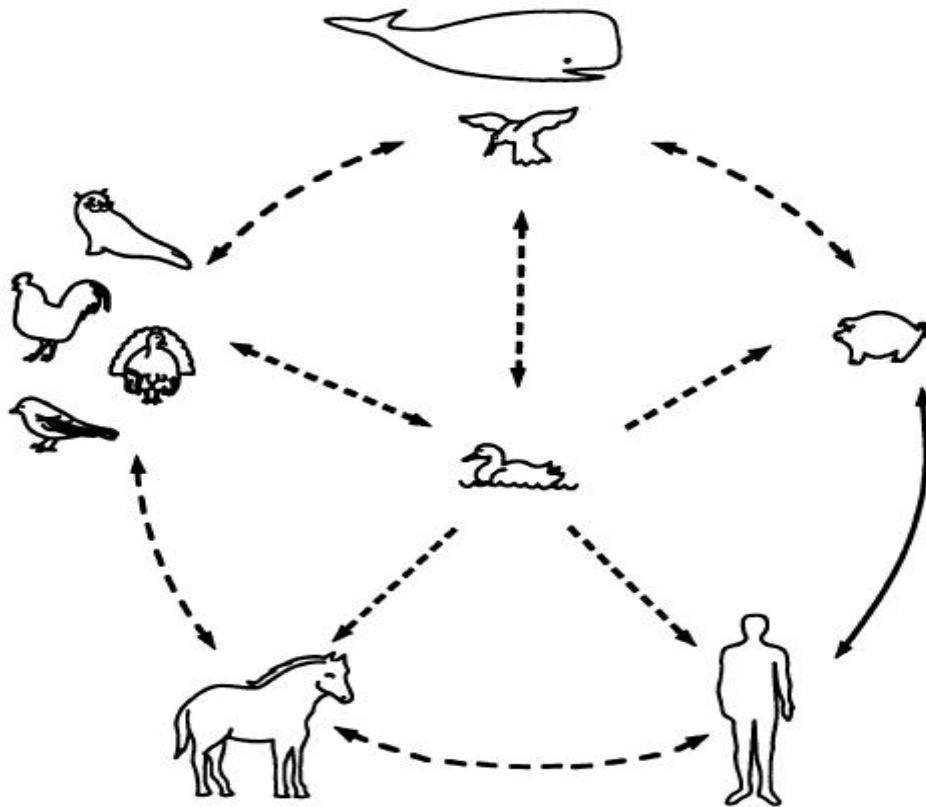


Εικόνα 6. Αντιγονική μετάπτωση. Ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ δύο ή περισσότερων συγγενών ιών
(Wright, 2001)

Η γενετική ποικιλομορφία των ιών της γρίπης συμβάλει στην πρόκληση ενζωσιών ή/και πανδημιών, δεδομένου ότι μπορούν να διαφεύγουν την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή. Οι αντιγονικές διαφοροποιήσεις καθιστούν τη διάγνωση δυσκολότερη και την ανάπτυξη εμβολίων προβληματική. Τα εμβόλια που εφαρμόζονται ετησίως στον ανθρώπινο πληθυσμό περιέχουν τα στελέχη της γρίπης που απομονώθηκαν από άτομα που νόσησαν το προηγούμενο έτος, ενώ στα ζώα τα εμβόλια συνήθως περιέχουν τον κύριο υπότυπο που μολύνει το αντίστοιχο είδος ζώου, με αποτέλεσμα πολλές φορές ο εμβολιασμός να μην προσφέρει προστασία έναντι των στελεχών που μολύνουν τους αντίστοιχους πληθυσμούς τη δεδομένη στιγμή. Η ταυτόχρονη κυκλοφορία διαφορετικών στελεχών ανάμεσα στους πληθυσμούς έχει ως αποτέλεσμα τη συχνή αποτυχία των εμβολιακών σχημάτων (Webster et al., 1992, Wright, 2001).

Οι φυλογενετικές αναλύσεις, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι όλοι οι γνωστοί υπότυποι HA και NA των ιών της γρίπης A έχουν απομονωθεί από πτηνά, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι όλοι οι τύποι ιών γρίπης A που έχουν προκαλέσει λοίμωξη σε θηλαστικά προήλθαν από τα πτηνά (Webster et al., 1992, Wright, 2001) (Εικόνα 7). Τόσο σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, όσο και σε επίπεδο αμινοξέων οι ιοί της γρίπης A στον πληθυσμό των άγριων πτηνών φαίνεται ότι δεν έχουν έντονο εξελικτικό ρυθμό (Gorman,

Bean et al., 1990). Αυτό συνηγορεί στο γεγονός ότι ο ιός έχει προσαρμοστεί πλήρως στον ξενιστή του και τα άγρια πτηνά (κυρίως υδρόβια), τα οποία αποτελούν τη φυσική αποθήκη των ιών της γρίπης Α στη φύση. Οι ιοί της γρίπης Α του ανθρώπου δεν παρουσιάζουν τον ίδιο εξελικτικό ρυθμό σε όλα τα τμήματα του RNA τους. Για παράδειγμα, το γονίδιο HA μεταλλάσσεται με γρηγορότερο ρυθμό από ότι τα γονίδια PB1, PB2, PA, NP και M. Επίσης, η αναλογία των σιωπηλών προς τις ολικές μεταλλάξεις, η οποία λαμβάνει χώρα στα διάφορα τμήματα του RNA, διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στα γονίδια. Για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις που γίνονται στο γονίδιο HA επιτρέπουν στον ιό να «ξεγελά» το αμυντικό σύστημα του ξενιστή. Το γονίδιο PB2 δεν σχετίζεται τόσο με την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή, με αποτέλεσμα οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε αυτό να χαρακτηρίζονται ως επί το πλείστον σιωπηλές. Το H3 HA γονίδιο, που έχει απομονωθεί από τον άνθρωπο, έχει διαπιστωθεί ότι παρουσιάζει μεταλλάξεις με ρυθμό 4×10^{-3} αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων ανά έτος και 5×10^{-3} αλλαγές αμινοξέων ανά έτος. Δεδομένου ότι αυτές οι μεταλλάξεις λαμβάνουν χώρα στις αντιγονικές θέσεις της επιφάνειας της πρωτεΐνης HA, τα εμβόλια που κυκλοφορούν θα πρέπει να ανανεώνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα (Webster et al., 1992, Wright 2007). Φυλογενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι οι τυπικοί ιοί της γρίπης του ανθρώπου και των χοίρων έχουν κοινό πρόγονο (Gorman et al., 1991), ενώ οι ιοί της γρίπης των πτηνών διαχωρίζονται σε δύο βασικούς κλάδους, έναν Αμερικανικό και έναν Ευρωπαϊκό (Donis et al., 1989). Αυτό συνεπάγεται ότι τα είδη που αποτελούν τους ξενιστές των στελεχών που ανήκουν στους δύο κλάδους παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των γονιδίων των ιών της γρίπης.



Εικόνα 7. Η αποθήκη των ιών της γρίπης A.

Θεωρείται ότι τα άγρια πτηνά αποτελούν τη δεξαμενή του ιού γρίπης A στη φύση. Ο ιός έχει μεταδοθεί από τις άγριες πάπιες τόσο σε άλλα είδη πτηνών όσο και σε θηλαστικά (Webster, et al., 1992)

Ανάμεσα στους ιούς της γρίπης A, B και C υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον ρυθμό εξέλιξης. Οι ιοί της γρίπης B τυπικά μολύνουν τον άνθρωπο, αλλά έχουν απομονωθεί και από φώκιες. Οι ιοί της γρίπης C έχουν απομονωθεί από ανθρώπους, χοίρους και σκύλους. Και οι δύο όμως τύποι εξελίσσονται βραδύτερα σε σχέση με τον τύπο A. Οι ιοί της γρίπης A του ανθρώπου παρουσιάζουν γραμμική εξέλιξη, δηλαδή ένα στέλεχος προσβάλλει κάθε φορά τον ανθρώπινο πληθυσμό και δεν παρατηρείται συχνά πανδημία λόγω ταυτόχρονης προσβολής από διαφορετικά στελέχη. Αντίθετα, η εξέλιξη τόσο των ιών της γρίπης B όσο και C χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη συνύπαρξη διαφορετικών αντιγονικά και γενετικά στελεχών στον ανθρώπινο πληθυσμό και για εκτεταμένο χρονικό διάστημα (Wright 2007).

2. ΓΡΙΠΗ ΙΠΠΟΕΙΔΩΝ (Equine Influenza, EI)

Η γρίπη των ιπποειδών οφείλεται σε ιό της γρίπης τύπου Α. Τα ιπποειδή αποτελούν έναν από τους τρεις κύριους ξενιστές των ιών της γρίπης Α στα θηλαστικά, ενώ οι άλλοι δύο είναι οι χοίροι και ο άνθρωπος (Mumford, 1998). Ο πυρετός, ο βήχας, η κατάπτωση και το ρινικό έκκριμα είναι τα πιο συχνά συμπτώματα της νόσου, θάνατοι όμως αναφέρονται σπάνια, εκτός των περιπτώσεων δευτερογενούς επιπλοκής.

Αναγνωρίστηκε ως ασθένεια για πρώτη φορά το 1956, όταν είχε ξεσπάσει ενζωοτία στον πληθυσμό των ίππων στην Ανατολική Ευρώπη (Sovínova, 1958). Από τότε μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί 2 αντιγονικοί τύποι. Ο πρώτος, ο A/Equine1, με αντιγονικό τύπο H7N7 απομονώθηκε στην Τσεχοσλοβακία το 1956 και ταυτοποιήθηκε ως A/Equine/1/1Prague/1956 (Sovínova, 1958) και ο δεύτερος, ο A/Equine2, απομονώθηκε στις ΗΠΑ, έχει αντιγονικό τύπο H3N8 και ταυτοποιήθηκε ως A/Equine/2/ Miami/1963 (Waddell et al., 1963). Αν και η τελευταία επίσημα επιβεβαιωμένη ενζωοτία γρίπης ιπποειδών από τον υπότυπο 1 αναφέρθηκε το 1979, συνεχίζονται οι αναφορές, όπου σε μη εμβολιασμένους ίππους ανιχνεύονται αντισώματα κατά του H7. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως ο εν λόγω υπότυπος συνεχίζει να κυκλοφορεί στους πληθυσμούς σε υποκλινική μορφή για αυτό και δεν έχει προκαλέσει κάποια ενζωοτία τα τελευταία χρόνια (Webster, 1993). Ο υπότυπος 2 προκάλεσε μεγάλες ενζωοτίες στις ΗΠΑ. Το πρωτότυπο στέλεχος του ιού του υπότυπου 2, A/Equine/2/ Miami/1963, θεωρείται ότι προήλθε από μολυσμένους ίππους που είχαν εισαχθεί στη Φλόριντα από την Αργεντινή (Scholtens, 1964). Δεν παρατηρείται καμία διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ των δύο υπότυπων και επομένως στην περίπτωση φυσικής μόλυνσης ή εμβολιασμού δεν υπάρχει «διασταυρούμενη» ανοσία.

Λόγω των σημαντικών οικονομικών επιπτώσεων που έχει η γρίπη των ιπποειδών στην διοργάνωση αγώνων και διαγωνισμών, η μεταφορά των ζώων διέπεται από κανόνες εμβολιασμού και καραντίνας. Παρόλα αυτά συνεχώς νέα στελέχη του ιού - και πιο συγκεκριμένα τα τελευταία χρόνια του υπότυπου 2- φαίνεται ότι προκαλούν ενζωοτίες σε όλο τον κόσμο, σε εμβολιασμένους και μη πληθυσμούς ίππων (Daly et al., 1996, Newton et al., 2006).

2.1 Παθογένεια

Από την νόσο προσβάλλονται ζώα όλων των ηλικιών. Ιδιαίτερα ευπαθή είναι τα νεαρά ιπποειδή (μέχρι 2 ετών), τα εξασθενημένα, τα καταπονημένα (stress) και τα υπερήλικα. Τα ευαίσθητα ζώα μολύνονται με την εισπνοή μολυσμένων μικροσταγονιδίων. Ο χρόνος επώασης είναι σχετικά βραχύς (1-3 ημέρες).

Ο ιός, με τα μικροσταγονιδία, εισέρχεται στην αναπνευστική οδό και εγκαθίσταται στο βλεννογόνο της πρόσθιας και οπίσθιας αναπνευστικής οδού. Αν ο ιός εισέλθει σε μεγάλη δόση είναι ικανός να διαπεράσει το βλεννογόνο και να προσβάλλει τα κροσσωτά κυλινδρικά επιθηλιακά κύτταρα. Πολλαπλασιάζεται στα προσβεβλημένα κύτταρα σε διάστημα 4-6 ημερών, μετά από το οποίο απελευθερώνεται από αυτά και προσβάλλει τα παρακείμενα κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό, η μόλυνση μεταδίδεται από τις αρχικά λίγες εστίες σε μεγάλο αριθμό κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος προκαλώντας υπεραιμία, οίδημα, νέκρωση, εστιακή διάβρωση του βλεννογόνου και διήθηση της περιοχής από ουδετερόφιλα και πτώση των κροσσών σε μεγάλη έκταση του αναπνευστικού επιθηλίου. Λιγότερο συχνά ο ιός προσβάλλει και άλλα κύτταρα της αναπνευστικής οδού, όπως τα κυψελιδικά κύτταρα, τα κύτταρα των βλεννογονίων αδένων και τα μακροφάγα (Wright, 2001).

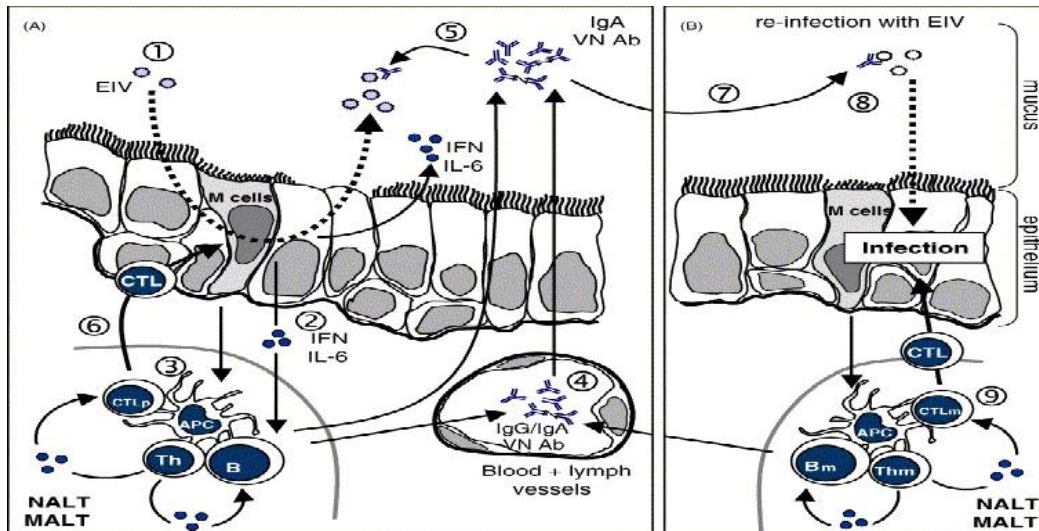
Επομένως, η αναπνευστική οδός καθίσταται ευάλωτη στην είσοδο βακτηρίων ή άλλων μολυσματικών παραγόντων. Οι κυριότερες δευτερογενείς λοιμώξεις, που έχουν καταγραφεί αφορούν τα γένη *Streptococcus* spp, *Pasteurella* spp και *Actinobacillus* spp (Timoney, 1996).

Δεδομένου ότι η ιαιμία δεν είναι συχνό φαινόμενο, σπάνια ο ιός της γρίπης έχει ανιχνευτεί σε εξωπνευμονικές θέσεις. Δυνητικά αν ο ιός μπει στην κυκλοφορία μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη στο μυοσκελετικό ή στο καρδιαγγειακό σύστημα, ακόμα και εγκεφαλίτιδα. Υπάρχει μία αναφορά πρόκλησης εγκεφαλίτιδας από ιό της γρίπης σε δύο ίππους στην Αγγλία κατά την ενζωοτία του 2003 (Daly et al., 2006). Ο παθογενετικός μηχανισμός σύνδεσης του ιού της γρίπης με την εγκεφαλίτιδα δεν είναι γνωστός, αλλά από αντίστοιχες μελέτες που έγιναν σε περιστατικά στον άνθρωπο θεωρείται ότι τα υψηλά ποσοστά κυτταροκινών, ιντερλευκίνης IL-6 και του παράγοντα TNF (Tumor Necrosis Factor) που παράγονται κατά την λοίμωξη στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό επηρεάζουν τον ξενιστή (Togashi et al., 2004, Hidaka et al., 2006).

Σε πειραματική μόλυνση, η περίοδος επώασης της νόσου κυμαίνεται από 18-72 ώρες (Quinlivan et al., 2004, Toulemonde et al., 2005, Bryant et al., 2010). Η σοβαρότητα της νόσου σχετίζεται με την ποσότητα του ιού που έχει αποβληθεί με τις εκκρίσεις, επομένως η ικανότητα του ιού να αναδιπλασιάζεται ενδέχεται να αποτελεί σημαντικό μηχανισμό παθογένειας της νόσου. Επιπλέον, οι ίδιες πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν το 1993 προκαλούν πιο ήπια συμπτωματολογία από εκείνα της επιζωοτίας του 2003, παρόλο που ανήκουν στον ίδιο υπότυπο H3N8 (Newton et al., 2006). Οι ιοί του υπότυπου 2 του Ευρωασιατικού κλάδου προκαλούν πιο βαριά κλινική εικόνα και παρουσιάζουν και τροπισμό στους πνεύμονες. Οι μελέτες απέδειξαν ότι η παθογόνος δράση του ιού, καθώς και η κλινική εικόνα της λοίμωξης σχετίζονται με την παραγωγή και απελευθέρωση κυτταροκινών, ιδιαίτερα των TNF α , INF α και IL-6, στις αναπνευστικές εκκρίσεις και την κυκλοφορία (Wattrang et al., 2003).

2.2 Ανοσολογική Απάντηση

Η ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή στην προσβολή από τον ιό της γρίπης περιλαμβάνει τη σύνθετη αλληλεπίδραση χυμικής ανοσίας, παραγωγής τοπικών αντισωμάτων, κυτταρικής ανοσίας, ιντερφερονών και άλλων παραγόντων άμυνας του ξενιστή (Slater et al., 2000). Στην Εικόνα 8 απεικονίζονται οι μηχανισμοί χυμικής και κυτταρικής ανοσίας στην περίπτωση προσβολής ιπποειδούς από τον ιό της γρίπης.



Εικόνα 8. Ανοσολογική απάντηση του ξενιστή μετά την είσοδο του ιού της γρίπης των ιπποειδών στο ρινικό βλεννογόνο για πρώτη φορά (A) και σε περίπτωση επαναμόλυνσης (B).

Η προσβολή των επιθηλιακών κυττάρων ① προκαλεί την παραγωγή των κυτταροκινών IFN και IL-6 ②. Τα αντιγόνοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen presenting cells, APC) ③ αλληλεπιδρούν με τα B-και T-λεμφοκύτταρα με σκοπό τη διέγερση των B-κυττάρων προς παραγωγή ειδικών κατά του ιού αντισωμάτων (IgA, IgG) ④, τόσο τοπικά στο βλεννογόνο, όσο και στον ορό ⑤, και των T-κυττάρων προς παραγωγή κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων (CTL) ⑥ που αναγνωρίζουν τα μολυσμένα με τον ιό κύτταρα και τα καταστρέφουν. Στην περίπτωση της επαναμόλυνσης με τον ιό (B) τα κυκλοφορούντα ειδικά αντισώματα τον εξουδετερώνουν. Αν ο τίτλος αυτών των αντισωμάτων είναι χαμηλός και δεν επαρκεί για την εξουδετέρωση του ιού τότε η παραγωγή τους επιταχύνεται είτε μέσω των κυττάρων μνήμης (M cells) είτε μέσω του ίδιου μηχανισμού που περιγράφεται παραπάνω (Paillot et al., 2006).

Η μόλυνση των επιθηλιακών κυττάρων με τον ιό της γρίπης προκαλεί την τοπική σύνθεση των κυτταροκινών IL-6 και IFN τύπου I (IFN α/β) (Wattrang et al., 2003). Η IL-6 συμβάλει στην παραγωγή των IgA και συμμετέχει στη δράση των B- και T-λεμφοκυττάρων κατά τη λοίμωξη (Ramsay et al., 1994). Η IFN α/β συμβάλλει στη δράση των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων (natural killer, NK) του ανοσοποιητικού (Hannant and Mumford, 1989). Έχει αναφερθεί ότι η παραγωγή των κυτταροκινών IFN- γ , IL-4 και IL-2 αυξάνεται τη 14^η ημέρα μετά την πειραματική μόλυνση και θεωρείται ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην κυτταρική ανοσία, αλλά αυτός δεν είναι διευκρινισμένος (Soboll et al., 2003).

Μελέτη έδειξε ότι ίπποι φυσικά μολυσμένοι με τον ιό της γρίπης, παρουσίαζαν καλύτερη ανοσία σε σχέση με εμβολιασμένα ζώα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ο τίτλος των αντισωμάτων κατά της HA ήταν ανεξάρτητος της παρεχόμενης ανοσίας στην

περίπτωση της φυσικής λοίμωξης, αλλά ήταν άμεσα συνδεδεμένος με την προστασία στην περίπτωση του εμβολιασμού (Hannant et al., 1988, Slatre and Hannant, 2000). Τα αντισώματα που κατευθύνονται κατά της αιμοσυγκολλητίνης, φαίνεται ότι είναι οι σημαντικότεροι μεσολαβητές της χυμικής ανοσίας, ενώ τα αντισώματα κατά του αντιγόνου NA περιορίζουν την μετάδοση του ιού και συντελούν στη μείωση της διασποράς της λοίμωξης.

Πειραματική μόλυνση ίππων έδειξε ότι ο ιός προκαλεί την παραγωγή υψηλού τίτλου ειδικών IgA, IgGa και IgGb αντισωμάτων, τόσο στον ορό όσο και τοπικά στο βλεννογόνο, καθώς και IgM αντισωμάτων (Nelson et al., 1998). Ο τίτλος των τελευταίων όμως «πέφτει» μετά από 50 ημέρες (Hannant et al., 1987). Ο τίτλος των IgA και IgGa /b αντισωμάτων φαίνεται ότι φτάνει στο μέγιστο 7 έως 14 ημέρες μετά τη μόλυνση. Όμως, δύο μήνες μετά τη μόλυνση μόνο το 20% των IgA ανιχνεύεται, ενώ ο τίτλος των IgGa /b πέφτει δραματικά μετά από 15 μήνες.

Παρόλο, που στον άνθρωπο είναι γνωστοί οι μηχανισμοί της κυτταρικής ανοσίας που παρεμποδίζουν τη λοίμωξη από τον ιό της γρίπης, στα ιπποειδή δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι. Βασικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση του ίππου φαίνεται ότι παίζουν τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I και τα CD+8 κυτταροτοξικά T- λεμφοκύτταρα (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL), τα οποία προκαλούν λύση των προσβεβλημένων από τον ιό κυττάρων. Η έναρξη της δραστηριότητας αυτών των κυττάρων έχει ανιχνευτεί 14 ημέρες μετά τη μόλυνση, ενώ συνεχίζει η ανίχνευσή τους ακόμα και 6 μήνες μετά (Hannant et al., 1987, Hannant and Mumford 1989). Έχει αποδειχτεί ότι σε περίπτωση δεύτερης λοίμωξης με τον ιό της γρίπης αυξάνεται η δραστηριότητα αυτών των κυττάρων (Hannant et al., 1994). Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση ότι η ανοσοπροστασία έναντι του ιού σε περίπτωση φυσικής μόλυνσης συνοδεύεται από την παρουσία των CTL κυττάρων, όταν δεν ανιχνεύονται αντισώματα, αν και η εν λόγω υπόθεση δεν έχει επιβεβαιωθεί σε ίππους (Paillot et al., 2006).

Επίσης σημαντικό ρόλο στην ανοσία παίζει και η ετερογένεια των κυκλοφορούντων στελεχών του ιού, αλλά και το γεγονός ότι τα μόρια HA και NA του ιού υπόκεινται σε συχνές μεταλλάξεις (antigenic drift), με αποτέλεσμα το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή να καθυστερεί στην παραγωγή των ειδικών αντισωμάτων (Daly et al., 2003). Δεν

υπάρχει διασταυρούμενη ανοσία μεταξύ των δύο υποτύπων, H7N7 και H3N8, του ιού της γρίπης των ιπποειδών (Wilson, 1993), αλλά και μεταξύ μερικών ετερόλογων στελεχών του υποτύπου H3N8 (Daly et al., 2004). Μετά από πειραματική μόλυνση εμβολιασμένων πόνυ με στελέχη ομόλογα των εμβολιακών, η ανοσία διάρκεσε 32 εβδομάδες, ενώ φαίνεται ότι τα ζώα ήταν μερικώς προστατευμένα έναντι του ιού για περίπου ένα χρόνο (Hannant et al., 1987).

2.3 Κλινική Εικόνα- Παθολογοανατομικές Αλλοιώσεις

Όλες οι ενζωτίες των τελευταίων ετών σε εμβολιασμένα ή μη ζώα έχουν προκληθεί από τον υπότυπο A/Equi2 (H3N8). Ο ιός της γρίπης διασπείρεται πάρα πολύ γρήγορα σε όλους τους ίππους που σταβλίζονται στον ίδιο χώρο, και επιπλέον είναι δυνατή η μετάδοσή του ακόμα και σε ίππους που βρίσκονται σε άλλους στάβλους της ίδιας ή άλλης περιοχής. Η γρήγορη εξάπλωση της νόσου αποτελεί πρόβλημα για την εκτροφή, εντούτοις είναι ενδεικτική για τη διαφορική διάγνωση σε σχέση με τα υπόλοιπα νοσήματα του αναπνευστικού των ιπποειδών.

Μετά από βραχεία επώαση του ιού για 1-2 ημέρες, εμφανίζεται πυρετός έως 41 °C που συνοδεύεται από ξηρό βήχα, κατάπτωση και ρινικό έκκριμα. Ο ξηρός επίμονος βήχας είναι χαρακτηριστικό σύμπτωμα της νόσου, προκαλείται λόγω της ρινοφαρυγγικής συμφόρησης και μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 3 εβδομάδες. Άλλα συχνά συμπτώματα, που συνθέτουν την κλινική εικόνα της νόσου, είναι η επιπεφυκίτιδα, το οίδημα των άκρων, η μυϊκή δυσκαμψία, η δύσπνοια και η ταχυκαρδία.

Η σοβαρότητα της κλινικής εικόνας που παρουσιάζει κάθε ζώο εξαρτάται από την τυχόν βακτηριακή επιπλοκή, την ηλικία του ζώου, το ιστορικό του, το περιβάλλον στο οποίο ζει καθώς και το εμβολιακό πρόγραμμα που ακολουθείται.

Το νόσημα είναι αυτοπεριοριζόμενο και η πλήρης ανάρρωση επέρχεται συνήθως σε 2-3 εβδομάδες. Η θνησιμότητα είναι μηδαμινή, αλλά σε περιπτώσεις εγκύων φοράδων ο παρατεταμένος πυρετός μπορεί να οδηγήσει σε αποβολές. Αν συμβεί βακτηριακή επιμόλυνση η ανάρρωση μπορεί να διαρκέσει πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και να απαιτείται συστηματική θεραπευτική αγωγή, διότι στις περιπτώσεις αυτές προσβάλλονται ακόμα και οι πνεύμονες, με αποτέλεσμα η βρογχοπνευμονίτιδα και η πλευρίτιδα να είναι η κύρια κλινική εικόνα που παρουσιάζουν τέτοια ζώα.

Γρίπη Ιπποειδών

Τα συμπτώματα της νόσου χωρίς επιπλοκές μοιάζουν με εκείνα της ρινοπνευμονίτιδας, της αρτηρίτιδας και των λοιμώξεων από αδενοϊούς ή ρινοϊούς.

Παρόλο που ο ιός της γρίπης παραδοσιακά προκαλεί αναπνευστικά συμπτώματα, κατά την επιζωοτία του 2003 αναφέρονται για πρώτη φορά νευρολογικά συμπτώματα σε δύο ανεμβολίαστους ίππους προσβεβλημένους από τον ιό (Daly et al., 2006). Κατά τη νεκροψία του ενός περιστατικού διαπιστώθηκαν αλλοιώσεις ιογενούς, μη πυώδους εγκεφαλίτιδας. Η παρουσία του ιού της γρίπης επιβεβαιώθηκε εργαστηριακά και στα δύο περιστατικά, ενώ δεν ανιχνεύτηκε ερπητοϊός, συνηγορώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι ο ιός της γρίπης ενδέχεται να προκαλεί προσβολή του νευρικού συστήματος (Daly et al., 2006). Αντίστοιχος συσχετισμός του ιού της γρίπης με εγκεφαλίτιδα / εγκεφαλοπάθεια έχει περιγραφεί σε επιδημίες γρίπης στον άνθρωπο (Toomey, 2008, Hjalmarsson et al., 2009).

Θάνατοι και συνεπώς παθολογοανατομικές αλλοιώσεις παρατηρούνται σε σπάνιες περιπτώσεις βαριάς λοίμωξης ή/και σε αυτές που υπάρχουν δευτερογενείς επιπλοκές.

Οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις που μπορεί να παρατηρηθούν είναι λαρυγγίτιδα, τραχειίτιδα, εστιακές διαβρώσεις στο πρόσθιο αναπνευστικό σύστημα, βρογχίτιδα, βρογχιολίτιδα, διάμεση πνευμονία συνοδευόμενη από υπεραιμία και οίδημα των κυψελίδων. Τα μεσοπνευμόνια ή/και τραχειοβρογχικά λεμφογάγγλια εμφανίζονται διογκωμένα. Όταν υπάρχει επιμόλυνση είναι δυνατό να παρατηρηθούν επιπεφυκίτιδα, φαρυγγίτιδα, πυώδης βρογχοπνευμονία και χρόνια αναπνευστική νόσος.

Οι μικροσκοπικές αλλοιώσεις συνίστανται σε συγκέντρωση μονοπύρηνων και εωσινόφιλων κυττάρων γύρω από βρόγχια και βρογχιόλια, καθώς και συγκέντρωση μακροφάγων στους αεραγωγούς. Αυτό οδηγεί σε διάχυτη πάχυνση των κυψελιδικών διαφραγμάτων και των μικρών βρόγχων. Μερικές φορές παρατηρείται κυψελιδικό οίδημα. Καθώς οι ιστολογικές αλλοιώσεις δεν είναι παθολογικές, η εικόνα συγχέεται με άλλες παθολογικές καταστάσεις των πνευμόνων ιογενούς (ερπητοϊός), βακτηριακής (παστεριδίαση) ή παρασιτικής αιτιολογίας.

2.4 Επιζωοτιολογία

2.4.1 Μετάδοση του ιού

Η μετάδοση συμβαίνει κυρίως μέσω της αναπνευστικής οδού. Το νόσημα είναι άκρως μεταδοτικό και μπορεί να μεταδοθεί άμεσα ανάμεσα στις διάφορες ομάδες ζώων. Αυτό σχετίζεται με το γεγονός ότι στα σταγονίδια του «αεροζόλ», που διασπείρονται με τον έντονο βήχα ή/και τον πταρμό των ήδη μολυσμένων ζώων, περιέχεται μεγάλη ποσότητα ιικών σωματιδίων. Επομένως, τα ζώα μπορούν να μολυνθούν είτε με την εισπνοή ελεύθερων ιικών σωματιδίων είτε μολυσμένων με ιό κυττάρων που προέρχονται από τις αναπνευστικές εκκρίσεις μολυσμένων ζώων. Ο ιός μπορεί να μεταφερθεί και να παραμείνει μολυσματικός ακόμα και σε αποστάσεις περίπου 32 μέτρων. Σημαντικό ρόλο παίζει, επίσης, η έμμεση μετάδοση του ιού, καθώς οι σταυλίτες και οι προπονητές μπορούν εύκολα να μεταφέρουν τον ιό μέσα στην ίδια μονάδα ή και σε άλλες. Τα μολυσμένα δοχεία που χρησιμοποιούνται για την περιποίηση των ζώων και το σταβλισμό τους, καθώς και η έλλειψη υγιεινής από το προσωπικό συμβάλλουν στη διασπορά του ιού (Timoney, 1996).

Η απέκκριση του ιού αρχίζει 24 ώρες μετά τη μόλυνση και μπορεί να συνεχιστεί για 7 έως και 10 ημέρες, κυρίως σε ίππους που μολύνονται για πρώτη φορά (Myers and Wilson, 2006).

Σημαντικό ρόλο στη μετάδοση έχουν και τα ζώα με υποκλινική λοίμωξη. Μελέτες έχουν δείξει ότι εμβολιασμένα ζώα –κυρίως όταν έχουν εμβολιαστεί με εμβόλια που περιέχουν στελέχη μη ομόλογα με εκείνα της παρούσας λοίμωξης - μπορεί να προσβληθούν από τον ιό και να τον μεταδώσουν, χωρίς όμως να εκδηλώνουν έντονα συμπτώματα (Newton et al., 2006, Park et al., 2004, Martella et al., 2007). Η παρουσία ζώων με υποκλινική λοίμωξη αποτελεί τον κύριο παράγοντα κινδύνου για την έναρξη έξαρσης της νόσου (Barquero et al., 2007).

Μεταφορά του ιού σε μεγάλες αποστάσεις γίνεται με ζώα που λαμβάνουν μέρος σε αγώνες ή μεταφέρονται για λόγους αναπαραγωγής ή εμπορικούς, όταν βέβαια νοσούν ή είναι σε φάση επώασης του ιού. Ταυτόχρονη λοίμωξη των ζώων με άλλους ιούς ή βακτήρια, μπορεί να συμβάλλει στη γρηγορότερη μετάδοση της μόλυνσης, μέσω της αύξησης των πνευμονικών εκκρίσεων, μέσα στις οποίες βρίσκονται τα ιικά σωματίδια.

Η νόσος μπορεί να προσβάλλει όλες τις ηλικιακές ομάδες, ανεξαρτήτου φυλής και φύλου, αν και συχνότερα προσβάλλει εξασθενημένους οργανισμούς, ζώα σε κατάσταση στρες και νεαρά ή ηλικιωμένα ζώα. Επίσης, η έξαρση της νόσου είναι συχνότερη τους χειμερινούς μήνες, λόγω του παρατεταμένου σταβλισμού των ζώων (Barquero et al., 2007).

Η νοσηρότητα μπορεί να φτάσει το 100%, ενώ η θνησιμότητα είναι πολύ χαμηλή και εξαρτάται από την γενικότερη κατάσταση του ζώου και τις τυχόν επιπλοκές από δευτερογενείς λοιμογόνους παράγοντες (Myers and Wilson, 2006).

2.4.2 Γεωγραφική εξάπλωση

Η νόσος παρουσιάζει ευρεία γεωγραφική εξάπλωση. Εκτός από τη Νέα Ζηλανδία, σε όλο τον υπόλοιπο κόσμο έχουν περιγραφεί εξάρσεις της.

Η γρίπη των ιπποειδών αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1956, όταν ένας ιός της οικογένειας *Orthomixoviridae* είχε προκαλέσει ευρεία πανζωτία, με αναπνευστικά συμπτώματα στους ίππους της Ανατολικής Ευρώπης (Sovinova et al., 1958). Ο ιός που απομονώθηκε χαρακτηρίστηκε ως τύπου 1 (A/equine/1/Prague/56 και για συντομία A/equine1) και φέρει τον αντιγονικό τύπο H7N7. Το 1963 ξέσπασε μία μεγάλη επιζωτία στο Μαϊάμι των ΗΠΑ, που οφειλόταν στον υπότυπο H3N8 (Wadell et al., 1963). Ο εν λόγω ιός είναι το πρότυπο στέλεχος της τύπου 2 γρίπης του ίππου (A/equine/2/Miami/63 ή A/equine2). Οι επιδημιολόγοι θεωρούν ότι ο υπότυπος αυτός εισήχθη στον πληθυσμό των ίππων της Φλόριντα μέσω της Αργεντινής, με την εμπορία ίππων. Στη συνέχεια, η νόσος εξαπλώθηκε από τις ΗΠΑ στην Ευρώπη, όπου προκλήθηκε μεγάλη πανζωτία κατά τη διάρκεια των ετών 1964-1965. Δεδομένου ότι οι δύο τύποι κυκλοφορούσαν ταυτόχρονα και μόλυναν τα ιπποειδή, στις αρχές (το πρώτο μισό) της δεκαετίας του 1960 κυκλοφόρησε εμβόλιο στις ΗΠΑ που περιείχε συνδυασμό των δύο τύπων της γρίπης. Πριν από την τελευταία απομόνωση του τύπου 1 ιού της γρίπης των ιπποειδών, το 1979, δεν υπάρχουν αναφορές για απομόνωση ιών τύπου 1 σε ίππους που είχαν εμβολιαστεί με εμβόλια που περιείχαν συνδυασμό των ιών και των δύο τύπων. Αντίθετα, ο τύπος A/Equine2 παραμένει σημαντικό πρόβλημα στις εκτροφές και στους στάβλους των ίππων ακόμα και σήμερα, παρά την εκτεταμένη χρήση εμβολίων που περιέχουν στελέχη του τύπου 2. Μεταξύ των ετών 1978 και 1981, ο υπότυπος H3N8 προκάλεσε πανζωτίες

τόσο στην Ευρώπη όσο και στη Βόρεια Αμερική, προσβάλλοντας εμβολιασμένα και μη ζώα (Daly et al., 1996, Daly et al., 2004). Στη Μ. Βρετανία το 1979, ο υπότυπος H3N8 εξαπλώθηκε αρχικά σε μη εμβολιασμένους ίππους, αλλά κατά το δεύτερο εξάμηνο της χρονιάς εκείνης εξαπλώθηκε ακόμα και σε εμβολιασμένα ζώα, παρέχοντας έτσι τρανή απόδειξη ότι τόσο τα εμβόλια όσο και τα εμβολιακά προγράμματα, που εφαρμόζονταν μέχρι εκείνη την περίοδο, δεν παρείχαν ανοσολογική κάλυψη στα ζώα έναντι της νόσου (Burrows et al., 1982). Η εν λόγω επιζωοτία επηρέασε ακόμα και τις ιπποδρομίες, με αποτέλεσμα το 1981 να καθιερωθεί ο υποχρεωτικός εμβολιασμός των ίππων για τον ιό της γρίπης τόσο στη Μ. Βρετανία όσο και στην Ιρλανδία (Daly et al., 2004). Το 1989 αναφέρεται πάλι μία μεγάλη επιζωοτία στην Ευρώπη από τον τύπο H3N8 τόσο σε μη όσο και σε εμβολιασμένους ίππους (Livesay et al., 1993). Αυτή η επιζωοτία είναι η πρώτη μεγάλη επιζωοτία στη Μ. Βρετανία μετά από αυτή του 1979. Από το 1989 και μετά αναφέρονται σποραδικά, εξάρσεις της νόσου αναφέρονται στην Ευρώπη και στην Αμερική, σε εμβολιασμένα και μη ιπποειδή (Daly et al., 2004).

Το 1986 και 1987, η νόσος εξαπλώθηκε στη Νότια Αφρική (Kawaoka and Webster, 1989) και στην Ινδία (Gupta et al., 1993), προκαλώντας μεγάλες επιζωοτίες. Πιστεύεται ότι η νόσος εισήλθε στη Νότια Αφρική μετά από μεταφορά εμβολιασμένων ζώων από τη Β. Αμερική και συγκεκριμένα από περιοχές όπου υπήρχε ενζωοτία. Παρόλο που τα εισαγόμενα ζώα δεν παρουσίαζαν κλινική εικόνα γρίπης και ήταν εμβολιασμένα, η ανεπαρκής περίοδος παραμονής σε καραντίνα αποτέλεσε την αιτία της διασποράς του ιού στους πληθυσμούς. Επιπλέον, τα μολυσμένα μέσα μεταφοράς των ζώων συνέβαλλαν στη γρήγορη και ευρεία εξάπλωση (Kawaoka and Webster, 1989). Στους ίδιους λόγους οφειλόταν και η πανζωοτία στην Ινδία, που προκλήθηκε μετά από μεταφορά ζώων από την Ευρώπη. Για πρώτη φορά αναφέρθηκε και υψηλό ποσοστό θνησιμότητας σε ιπποειδή εργασίας, λόγω δευτερογενών βακτηριακών επιμολύνσεων. Μελέτες που ακολούθησαν της λοίμωξης έδειξαν ότι ο ιός παρέμενε ανθεκτικός σε ακάθαρτα νερά για 2 εβδομάδες. Η φυλογενετική ανάλυση των HA γονιδίων από τις πανζωοτίες στη Νότια Αφρική και στην Ινδία επιβεβαίωσε ότι οι ιοί παρουσίαζαν αντιγονική ομοιότητα με εκείνους που είχαν προκαλέσει τις πανζωοτίες σε ΗΠΑ και Ευρώπη (Kawaoka and Webster, 1989, Gupta et al., 1993).

Μία μεγάλη πανζωτία γρίπης σε ίππους προκλήθηκε το 1989 στην Κίνα, όπου προκάλεσε 80% νοσηρότητα και 20% θνησιμότητα (Guo et al., 1992). Βέβαια σε όλες τις περιπτώσεις που τα ζώα κατέληξαν, υπεύθυνες ήταν οι δευτερογενείς βακτηριακές επιπλοκές. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες πανζωτίες που καταγράφηκαν στη Νότια Αφρική και στην Ινδία, η εν λόγω έξαρση της νόσου δεν μπορούσε να συσχετιστεί με εισαγωγή ζώων από άλλες περιοχές. Παράλληλα, μελέτες έδειξαν ότι παρόλο που το υπεύθυνο για την πανζωτία στέλεχος A/Equine/Jilin/1/89 (H3N8) ήταν τύπου A/ equine 2, αντιγονικά παρουσίαζε χαρακτηριστικές διαφορές με τους ιούς του ίδιου τύπου που είχαν απομονωθεί μέχρι εκείνη τη στιγμή (Webster et al., 1992). Με βάση τις πληροφορίες της αλληλούχισης, θεωρήθηκε ότι το στέλεχος αυτό προήλθε από πτηνά, καθώς έξι από τα οκτώ γονίδιά του προσομοίαζαν με εκείνα που απομονώθηκαν από τα πτηνά (Webster et al., 1992, Liu et al., 2009, Guo et al., 1992), σηματοδοτώντας για πρώτη φορά τη μετάδοση της νόσου από πτηνά σε ίππους, δηλαδή σε διαφορετικά είδη ζώων. Παρόλο που το στέλεχος του ιού των πτηνών “έσπασε” με επιτυχία το φραγμό του είδους και κατάφερε να μολύνει ίππους, το εν λόγω στέλεχος έχασε τη λοιμογόνο ικανότητά του και δεν μολυνε τις πάπιες, ενώ και μετά το 1990 δεν παρατηρήθηκαν άλλα κρούσματα γρίπης από το συγκεκριμένο στέλεχος στον πληθυσμό των ιπποειδών. Αναφέρονται και άλλες πανζωτίες γρίπης στην Κίνα που πιστεύεται ότι προκλήθηκαν από μολυσμένα ζώα που πέρασαν τα σύνορα από τη Μογγολία και τη Ρωσία. Υπεύθυνος ιός βρέθηκε ότι ήταν στέλεχος του υπότυπου 2 (H3N8) που προσομοίαζε αντιγονικά με εκείνο που είχε απομονωθεί στην Ευρώπη.

Άλλες εξάρσεις της νόσου που ακολούθησαν το 1992 στο Χονγκ Κονγκ (Powell et al., 1977), το 1993 στην Αγγλία, το 1995 στο Ντουμπάϊ (Wernery et al, 1998) και το 1997 στις Φιλιππίνες, καθώς και σε άλλες χώρες τη δεκαετία του 1990, αποτελούν απόδειξη της εύκολης μετάδοσης της νόσου (Daly et al., 2004). Σε αντίθεση με τους ανθρώπους, η γρίπη των ιπποειδών, δεν θεωρείται εποχιακή νόσος. Κρούσματα μπορεί να παρατηρηθούν σε οποιαδήποτε εποχή και σχεδόν πάντα εκδηλώνονται μετά από εισαγωγές ή μετακινήσεις ιπποειδών είτε για λόγους αναπαραγωγής είτε αγωνιστικούς, καθώς και κατά το συγχρωτισμό των ζώων.

Παρά την ευρεία εφαρμογή εμβολιασμών στους ίππους τον 21^ο αιώνα, οι επιζωοτίες συνέχισαν. Το 2003 αναφέρεται μεγάλη εστία επιζωοτίας σε εμβολιασμένους ίππους

στην Αγγλία, στην περιοχή Newmarket (Newton et al., 2006, Barquero et al., 2007). Η ορολογική και ιολογική ανάλυση των στελεχών αυτών επιβεβαίωσε την πολυπλοκότητα των παραγόντων που επηρεάζουν την ανοσία έναντι του ιού στους πληθυσμούς των ιπποειδών (Barquero et al., 2007). Από το 2003 και μετά, εξάρσεις της νόσου έχουν αναφερθεί τόσο στο Ηνωμένο Βασίλειο και την υπόλοιπη Ευρώπη, όσο και στις ΗΠΑ (Damiani et al., 2008, Barbic et al., 2009, Bryant et al., 2009), ενώ πολλές χώρες που δεν είχαν στο παρελθόν αναφέρει τη νόσο επηρεάστηκαν. Από το Δεκέμβριο του 2003 έως και τον Ιανουάριο του 2004 η Νότια Αφρική αναφέρει τη δεύτερη μεγάλη επιζωοτία γρίπης ιπποειδών στην ιστορία της (Guthrie, 2006). Το 2008, η Ινδία επίσης αναφέρει επιζωοτία γρίπης ιπποειδών μετά από 20 χρόνια (Virmani et al., 2010, Virmani et al., 2008). Το 2007 αναφέρεται για πρώτη φορά η νόσος σε ιπποειδή στην Αυστραλία. Επιδημιολογική έρευνα που ακολούθησε κατέδειξε ως υπεύθυνη της εισόδου του ιού στην Αυστραλία, τη μη τήρηση μέτρων καραντίνας σε νεοεισερχόμενους ίππους από την Ιαπωνία (Anon, 2008, Callinan, 2008), παρά το γεγονός ότι στην Ιαπωνία δεν είχε παρατηρηθεί η νόσος τα τελευταία 35 χρόνια πριν το 2007 (Bryant et al., 2009, Yamanaka et al., 2008). Στην περίπτωση της Αυστραλίας αποφασίστηκε ο υποχρεωτικός εμβολιασμός των ιπποειδών με το εμβόλιο ProteqFlu της Merial. Δεδομένου ότι το εν λόγω εμβόλιο προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων μόνο κατά της ιικής γλυκοπρωτεΐνης HA, μπορεί εύκολα να γίνει διαχωρισμός των εμβολιασμένων από τα φυσικά μολυσμένα ιπποειδή, με τη χρήση διαγνωστικής ELISA που ανιχνεύει αντισώματα κατά της νουκλεοπρωτεΐνης NP (Sergeant et al., 2009).

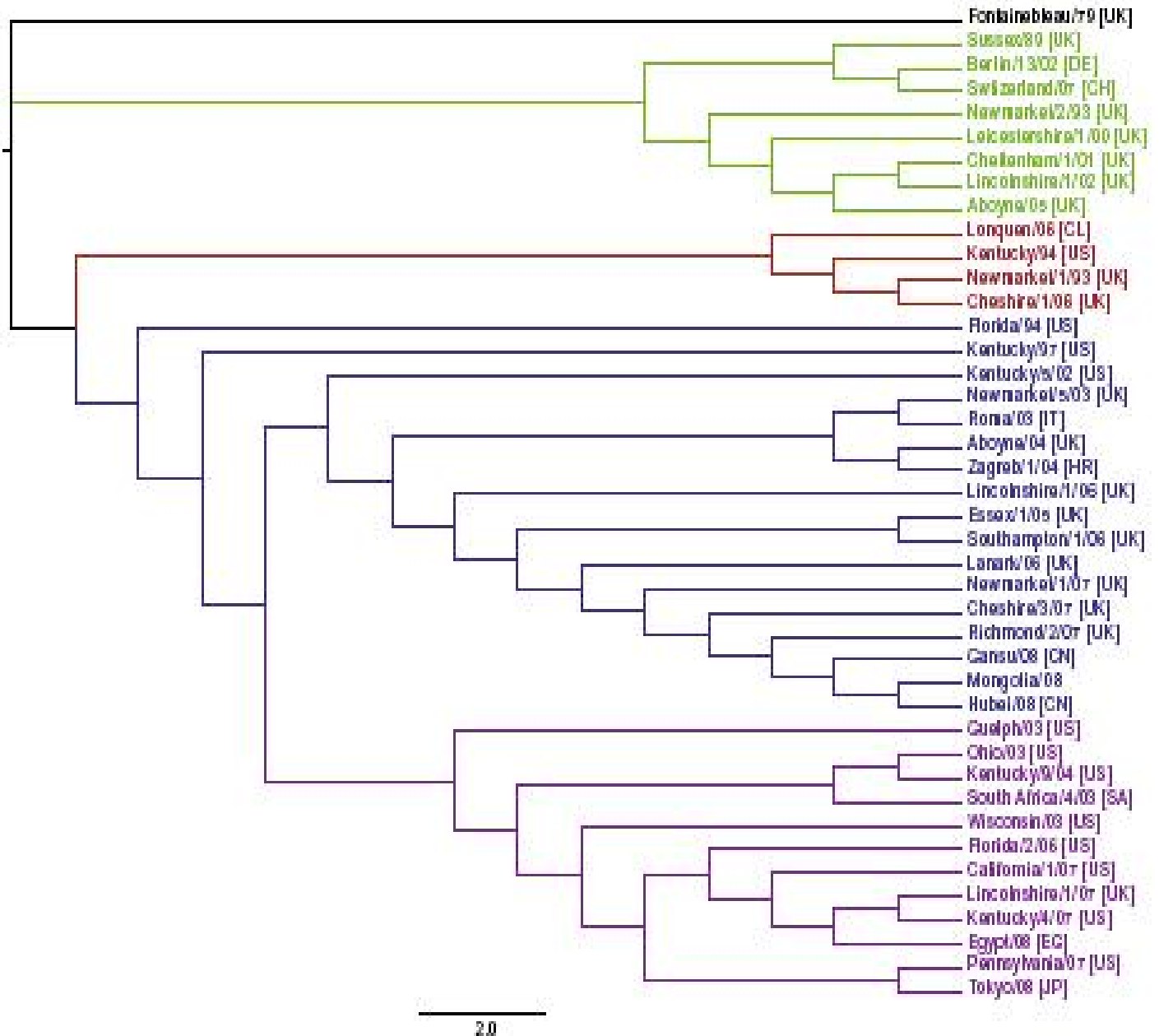
2.5 Εξέλιξη των στελεχών του ιού της γρίπης των ιπποειδών

Μετά από φυλογενετική ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου HA διαπιστώθηκε ότι, ενώ ο υπότυπος 1 (H7N7) δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη εξέλιξη, ο υπότυπος 2 (H3N8) παρουσίαζε γραμμική εξέλιξη για περίπου δύο δεκαετίες (Kawaoka et al., 1989) και στα μέσα της δεκαετίας του 1980 διαχωρίστηκε σε δύο κλάδους, οι οποίοι εξελίσσονταν παράλληλα (Daly et al., 1996). Αρχικά, τα στελέχη του ενός κλάδου ήταν κυρίαρχα στην Αμερική (Αμερικανικά στελέχη), ενώ εκείνα του άλλου κλάδου είχαν απομονωθεί μόνο στην Ευρώπη και στην Ασία (Ευρωασιατικά). Το φυλογενετικό δέντρο που έχει διαμορφωθεί σήμερα, μετά τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών H3N8 του ιού, είναι

πολύ πιο περίπλοκο (Εικόνα 9). Ο κλάδος των Ευρωασιατικών στελεχών (πράσινο χρώμα στην Εικόνα. 9) αντιπροσωπεύεται από το στέλεχος Newmarket/2/93 και παρόλο που τα στελέχη του συνεχίζουν να αποτελούν μία αυτοτελή ομάδα, σπάνια απομονώνονται τα τελευταία χρόνια (Bryant et al., 2009). Τα Αμερικανικά στελέχη φαίνεται ότι τα τελευταία χρόνια κυριαρχούν και προκαλούν ενζωτίες σε πληθυσμούς ιπποειδών όχι μόνο στην Αμερικανική ήπειρο, αλλά παγκοσμίως. Αντιπροσωπευτικά στελέχη αυτού του κλάδου είναι τα Newmarket/1/93 και Kentucky/1994 (κόκκινο χρώμα στην Εικόνα 9). Σε αυτόν τον κλάδο ανήκουν και τα στελέχη που απομονώθηκαν από ενζωτίες στο Ηνωμένο Βασίλειο (Bryant et al., 2009) και στη Χιλή (Muller et al., 2009) το 2006. Ο Αμερικανικός κλάδος περικλείει τρεις μικρότερους κλάδους, δηλαδή τις υποομάδες α) Kentucky-like, που περιλαμβάνει στελέχη που προσομοιάζουν σε εκείνα που απομονώθηκαν στο Kentucky, β) Argentina-like, που περιλαμβάνει στελέχη που προσομοιάζουν σε εκείνα που απομονώθηκαν στην Αργεντινή, και γ) Florida-like που περιλαμβάνει στελέχη που προσομοιάζουν σε εκείνα που απομονώθηκαν στη Florida. Τα στελέχη που προκάλεσαν την ενζωτία του 2003 στην περιοχή Newmarket του Ηνωμένου Βασιλείου, καθώς και η πλειονότητα των στελεχών που απομονώθηκαν στην Ευρώπη την ίδια χρονική περίοδο, ανήκουν στην υποομάδα Florida-like (Damiani et al., 2008, Bryant et al., 2009, Rozek et al., 2009). Σε αυτή την υποομάδα ταξινομούνται στελέχη που έχουν διαχωριστεί σε δύο κλάδους. Ο κλάδος I (Florida Clade I) περιλαμβάνει στελέχη που απομονώθηκαν στη Β. Αμερική μέχρι το 2003, όπως για παράδειγμα το στέλεχος Ohio/2003, και διαφέρουν από εκείνα του κλάδου II (Florida clade II) που προκάλεσαν ενζωτίες στην Ευρώπη, όπως για παράδειγμα το στέλεχος Newmarket/5/03. Τα στελέχη του κλάδου I ήταν υπεύθυνα για τις εξάρσεις της νόσου τόσο στη Νότια Αφρική το 2003 όσο και για αυτές στην Ιαπωνία και στην Αυστραλία το 2007 (Bryant et al., 2009). Αντιθέτως οι εξάρσεις της νόσου από το 2007 έως και το 2009 σε Μογγολία, Ινδία και Κίνα οφείλονταν σε στελέχη του κλάδου II (Qi et al., 2010, Virmani et al., 2010). Τα αποτελέσματα των φυλογενετικών αναλύσεων έδειξαν ότι την περίοδο 1993-2003 έγινε «εισαγωγή» στελεχών του ιού από την Β. Αμερική στην Ευρώπη και οι δύο κλάδοι προέκυψαν με τη βοήθεια των μηχανισμών εξέλιξης και ανασυνδυασμού. Αξιοσημείωτο για τον ιό της γρίπης των ιπποειδών είναι το γεγονός ότι τα νέα στελέχη που απομονώνονται κατά περιόδους δεν αντικαθιστούν τα παλαιότερα,

Γρίπη Ιπποειδών

αλλά συνεχίζουν να κυκλοφορούν παλιά και νέα στελέχη στους πληθυσμούς των ιπποειδών (Oxburgh et al., 1999, Lai et al., 2004).



Εικόνα 9: Φυλογενετική ανάλυση των νουκλεοτιδίων του γονιδίου HA 40 στελεχών H3N8 που απομονώθηκαν από ενζωοτίες του 21^{ου} αιώνα, καθώς και πρότυπων στελεχών αντιπροσωπευτικών των διαφορετικών εξελικτικών κλάδων.

Με μαύρο χρώμα έχουν σημειωθεί τα προ-διαφοροποίησης στελέχη. Τα Ευρωασιατικά στελέχη παρουσιάζονται με πράσινο, ενώ με κόκκινο χρώμα φαίνονται τα Αμερικανικά. Τα στελέχη του κλάδου Florida I είναι με μπλε και του κλάδου Florida II με μωβ χρώμα. Σε κάθε στέλεχος έχει σημειωθεί εντός παρένθεσης η χώρα προέλευσής του (Daly et al., 2010).

2.6 Μετάδοση του ιού της γρίπης των ιπποειδών σε άλλα είδη ξενιστών

Παρόλο που υπάρχουν ιστορικές αναφορές ότι η γρίπη των ιπποειδών μπορεί να μεταδοθεί σε σκύλους και ανθρώπους (Law, 1874), δεν έχουν στηριχθεί επιστημονικά δεδομένου ότι ήταν πριν την αναγνώριση του αιτιολογικού παράγοντα της νόσου. Μέχρι πρόσφατα, τα ιπποειδή χαρακτηρίζονταν ως τελικός ξενιστής των ιών της γρίπης Α, καθώς πιστεύεται ότι ο ιός H3N8 προήλθε από τα πτηνά, αλλά δεν υπήρχε καμία αναφορά μετάδοσής του σε άλλα είδη ζώων (Webster et al., 1992). Αρχικά υπήρξαν φόβοι ότι ο υπότυπος H3 των ιπποειδών μπορεί να είχε αντιγονική σχέση με τον υπότυπο H3 της γρίπης του ανθρώπου, καθώς έχουν κοινό πρόγονο. Αυτοί οι φόβοι ενισχύθηκαν από τα αποτελέσματα μελέτης που έδειξε ότι, μετά από πειραματική μόλυνση, ο άνθρωπος δυνητικά μπορεί να νοσήσει από τον ιό της γρίπης των ιπποειδών H3N8 (Kasel et al., 1965, Kasel and Couch, 1969). Όμως η αλληλούχιση και η φυλογενετική ανάλυση, έδειξαν ότι πρόκειται για διαφορετικούς υποτύπους H3 του γονιδίου HA.

Στις αρχές του 2004 αναφέρονται στη Φλόριντα μαζικά κρούσματα γρίπης σε σκύλους κυνοδρομιών, ράτσας greyhound, τα οποία κατέληξαν σε θανάτους από αιμορραγική πνευμονία. Υπεύθυνος παράγοντας αναγνωρίστηκε ο ιός της γρίπης των ιπποειδών H3N8, και συγκεκριμένα το στελέχος A/eq/Florida/242/03, μετά την απομόνωσή του από ένα περιστατικό και την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων στις άλλες περιπτώσεις (Crawford et al., 2005). Την ίδια χρονική περίοδο υπήρξαν αναφορές για μετάδοση του ιού της γρίπης των ιπποειδών στους σκύλους, σε 6 πολιτείες το 2004 και σε 11 το 2005 στις Η.Π.Α. (Crawford et al., 2005, Yoon et al., 2005). Από τις δύο επιζωοτίες απομονώθηκαν δύο στελέχη, το A/ca/Florida/43/2004 και το A/ca/Iowa/13628/2005, αντίστοιχα. Η ορολογική διερεύνηση των επιζωοτιών έδειξε ότι ο ιός κυκλοφορούσε και πριν το 2004, αλλά όχι νωρίτερα από το 1998 (Crawford et al., 2005). Η μοριακή και η αντιγονική ανάλυση των δύο προαναφερθέντων στελεχών που απομονώθηκαν από τους σκύλους έδειξαν ότι τα στελέχη αυτά παρουσίαζαν μεγάλη ομοιότητα με εκείνα της γρίπης των ίπων. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια HA και NA των στελεχών από τους σκύλους παρουσίαζαν 96-98% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων με τα γονίδια HA και NA στελεχών H3N8 των ιπποειδών. Αλληλούχιση και των 8 γονιδίων των ιών που απομονώθηκαν από τους σκύλους έδειξε ότι όλα τα γονίδια προσομοίαζαν με τα αντίστοιχα στελεχών H3N8 που έχουν απομονωθεί από τις τελευταίες επιζωοτίες σε

ιπποειδή, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι υπήρξε μετάδοση του ιού από τα ιπποειδή στο σκύλο. Η φυλογενετική ανάλυση όλων των γονιδίων τα κατέταξε σε ένα φυλογενετικό κλάδο, συμπεραίνοντας έτσι ότι ο ιός προσαρμόστηκε μετά από σημειακές μεταλλάξεις του γενώματός του στο νέο είδος ξενιστή και δεν υπήρξε ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ διαφορετικών στελεχών (Crawford et al., 2005).

Ακολούθησαν και άλλες μελέτες που συμφωνούν ότι ο ιός H3N8 των ιπποειδών έχει μεταδοθεί στο σκύλο (Daly et al., 2008, Newton et al., 2007, Kirkland et al., 2010). Πιο αναλυτικά, ο ιός της γρίπης των ιπποειδών θεωρήθηκε ως ο αιτιολογικός παράγοντας των έντονων αναπνευστικών συμπτωμάτων μιας ομάδας σκύλων Foxhound στο Ηνωμένο Βασίλειο, το 2002. Ορολογικά διαπιστώθηκε ότι και μία άλλη ομάδα σκύλων της ίδια ράτσας είχε προσβληθεί από το ίδιο στέλεχος (Daly et al., 2008, Newton et al., 2007). Μετά την πρόσφατη ενζωτία γρίπης ιπποειδών στην Αυστραλία, το 2007, αναφέρεται επίσης ότι υπήρξε μετάδοση του ιού και στους σκύλους (Kirkland et al., 2010).

Ο ιός H3N8 της γρίπης των ιπποειδών ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά σε χοίρους με αναπνευστικά συμπτώματα, κατά τη διάρκεια εφαρμογής προγράμματος επιτήρησης της γρίπης των χοίρων, το διάστημα 2004-2006 στην Κίνα. Απομονώθηκαν δύο στελέχη, τα A/swine/Chibi/01/2005 (H3N8) και A/swine/Anhui/01/2006 (H3N8), που προσομοιάζουν με εκείνα των ιπποειδών. Η φυλογενετική ανάλυση και των οκτώ γονιδίων κάθε στελέχους έδειξε ότι πρόκειται για ιό της γρίπης των ιπποειδών H3N8, ο οποίος μετά από σημειακές μεταλλάξεις προσαρμόστηκε στους χοίρους (Tu et al., 2009). Σε αντίθεση όμως με το στέλεχος H3N8 που απομονώθηκε από τους σκύλους, αυτά τα στελέχη δεν φαίνεται να προκάλεσαν άλλες επιζωotίες και κατατάσσονται φυλογενετικά στον Ευρωπαϊκό κλάδο, ο οποίος περιλαμβάνει στελέχη που απομονώθηκαν τη δεκαετία του 1990 (Tu et al., 2009). Δεδομένου ότι το Μάιο του 1993 είχε απομονωθεί το στέλεχος A/Eq/Gansu/2/94 από επιζωotία γρίπης σε ίππους στην Κίνα, το οποίο φυλογενετικά προσομοιάζε στα στελέχη του Ευρωπαϊκού κλάδου (Guo et al., 1995), ενισχύεται η υπόθεση ότι ο ιός που απομονώθηκε στους χοίρους προήλθε από τα ιπποειδή.

2.7 Διάγνωση

2.7.1 Κλινική Διάγνωση

Η κλινική διάγνωση του νοσήματος βασίζεται κατά κύριο λόγο στη διαπίστωση συμπτωμάτων από το αναπνευστικό. Το ζώο είναι δυνατόν να εμφανίζει πυρετό, πταρμό, ρινικό έκκριμα, βήχα, ανορεξία, κατάπτωση και αφυδάτωση, χωρίς ωστόσο τα συμπτώματα να είναι τόσο χαρακτηριστικά της νόσου. Η κλινική εκδήλωση της νόσου μπορεί να συγχέεται με άλλα νοσήματα του αναπνευστικού ποικίλης αιτιολογίας, όπως είναι η ρινοπνευμονίτιδα (λοίμωξη από ερπητοϊούς), η ιογενής αρτηρίτιδα (λοίμωξη από αδενοϊούς) ή ακόμα και βακτηριακής προέλευσης πνευμονίες. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η εργαστηριακή διάγνωση για την επιβεβαίωση της νόσου.

2.7.2 Εργαστηριακή Διάγνωση

Η εργαστηριακή διάγνωση βασίζεται είτε στην απομόνωση του ιού και την ανίχνευση του γενετικού υλικού ή των ικών πρωτεϊνών, είτε στην ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων κατά του ιού. Οι διαπιστευμένες μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εργαστηριακή διάγνωση της γρίπης των ιπποειδών περιγράφονται αναλυτικά στο σχετικό εγχειρίδιο του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (ΟΙΕ, 2010).

2.7.2.1 Ανίχνευση αντισωμάτων

Για πολλά χρόνια η εργαστηριακή διάγνωση στηριζόταν στην ανίχνευση αντισωμάτων κατά της γλυκοπρωτεΐνης HA του ιού, σε ζεύγη ορών. Το πρώτο δείγμα λαμβάνεται κατά την οξεία φάση της νόσου και το δεύτερο κατά την αποδρομή της (14-21 ημέρες αργότερα), με σκοπό τον προσδιορισμό της μεταβολής (ανόδου) του τίτλου των αντισωμάτων. Με αυτή τη διαγνωστική προσέγγιση το δεύτερο δείγμα απαιτείται προκειμένου να διακριθεί αν ο τίτλος αντισωμάτων κατά της HA προέρχεται από στέλεχος εμβολιακό ή φυσικής λοίμωξης. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση αντι-HA αντισωμάτων είναι η δοκιμασία της αναστολής της αιμοσυγκόλλησης. Ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η αδυναμία διάκρισης των εμβολιακών αντισωμάτων από εκείνα που παράγονται κατά τη φυσική λοίμωξη, εκτός αν χρησιμοποιηθεί ζεύγος ορών.

Προκειμένου να ξεπεραστεί το εμπόδιο του διαχωρισμού των εμβολιακών από τα φυσικά αντισώματα σε ένα δείγμα ορού αναπτύχθηκε ELISA που ανιχνεύει αντισώματα

κατά της πρωτεΐνης NS1 (Ozaki et al., 2001, Birch-Machin et al., 1997) ή και του αντιγόνου NP του ιού (Cook et al., 1988). Τέτοια αντισώματα παράγονται μόνο κατά τη φυσική λοίμωξη, αφού το αντιγόνο NP δεν έχει ενσωματωθεί στα αδρανοποιημένα ή τα ανασυνδυασμένα εμβόλια. Τα ανασυνδυασμένα εμβόλια προκαλούν την παραγωγή αντισωμάτων μόνο κατά της HA πρωτεΐνης και επομένως επιτρέπεται η διαφοροποίηση των αντισωμάτων που προέρχονται από φυσική λοίμωξη ή από εμβολιασμό. Βέβαια, η χρησιμότητα αυτής της ELISA εξαλείφεται όταν χρησιμοποιούνται ζωντανά εμβόλια, που περιέχουν όλες τις πρωτεΐνες του ιού, καθώς κινητοποιείται η παραγωγή αντισωμάτων για όλες τις πρωτεΐνες. Με την ευρεία χρήση των νέων, γενετικά ανασυνδυασμένων εμβολίων μπορεί να γίνει καθορισμός της προέλευσης των αντισωμάτων βασιζόμενοι σε αυτή τη μέθοδο.

2.7.2.2 Απομόνωση του ιού

Ο ιός μπορεί να απομονωθεί από το ρινικό ή/και το ρινοφαρυγγικό έκκριμα, τα οποία λαμβάνονται με τη βοήθεια βαμβακοφόρου στυλεού που εισάγεται από τους ρόθωνες ή με φαρυγγικές εκπλύσεις. Ο στυλεός εμβαπτίζεται άμεσα σε αποστειρωμένο σωλήνα που περιέχει υπόστρωμα κατάλληλο για μεταφορά ιών (διάλυμα 40% γλυκερόλης σε PBS), αντιβιοτικά [2% διάλυμα πενικιλίνης (10.000 units) και στρεπτομυκίνης (100 µg/ml)] και αντιμυκητιακά [2% fungizone (250 mg/ml stock)] (OIE, 2010). Αν πρόκειται να εξεταστεί τις επόμενες 48 ώρες διατηρείται στους + 4 °C, ειδάλλως στους -80 °C (OIE, 2010). Ομογενοποιημένα τμήματα ιστών από την τραχεία ή και τους πνεύμονες μπορούν επίσης να χρησιμεύσουν για την απομόνωση του ιού, αν και λόγω χαμηλού ποσοστού θνησιμότητας που παρουσιάζει η νόσος, είναι σπάνιο να υπάρξουν. Η απομόνωση γίνεται με ενδοαλλαντοϊκό ενοφθαλμισμό εμβρυοφόρων αυγών όρνιθας ηλικίας 10-11 ημερών ή σε κυτταροκαλλιέργειες. Ως καταλληλότερη κυτταρική σειρά για την καλλιέργεια του ιού της γρίπης των ιπποειδών έχει χαρακτηριστεί η συνεχής σειρά MDCK (Youli et al, 2004). Η απομόνωση του ιού πρέπει να επιβεβαιωθεί με μία ακόμα μέθοδο, καθώς οι κυτταροπαθολογικές αλλοιώσεις δεν είναι ιδιαίτερα εμφανείς. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται παραδοσιακά η μέθοδος της αιμοσυγκόλλησης, η οποία όμως για να δώσει θετικά αποτελέσματα απαιτείται μεγάλη συγκέντρωση ιού (van Maanen et al., 2002). Για την υποτυποποίηση της HA και NA του στελέχους εφαρμόζεται η αναστολή της αιμοσυγκόλλησης και η αναστολή της νευραμινιδάσης,

αντίστοιχα. Για την απομόνωση του ιού από τις εκκρίσεις του ζώου απαιτούνται τουλάχιστον 2-3 ημέρες, ενώ αν χρειαστούν και περαιτέρω τυφλές δίοδοι του ιού, τότε η διάγνωση αργεί περισσότερο. Για το λόγο αυτό και δεδομένου ότι η καλλιέργεια του ιού κυρίως σε κυτταροκαλλιέργειες είναι δύσκολη και χρονοβόρα, κρίθηκε αναγκαία η ανάπτυξη και άλλων μεθόδων ταχείας διάγνωσης του.

2.7.2.3 Ταχείες μέθοδοι

Στο εμπόριο διατίθενται πολλές δοκιμασίες (Kit) ταχείας διάγνωσης της γρίπης του ανθρώπου, που βασίζονται στην ανοσο-ϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης NP του ιού. Δεδομένου ότι η εν λόγω πρωτεΐνη είναι συντηρημένη σε όλους του υποτύπους της γρίπης A, αποδείχτηκε ότι το kit Directigen Flu-A, βρίσκει εφαρμογή και στη γρίπη των ιπποειδών, με ευαισθησία που κυμαίνεται από 40-100% (Chambers et al., 1994, Quinlivan et al., 2004, Gavine et al., 2003). Με τη δοκιμασία αυτή μπορεί κανείς να κάνει διάγνωση της νόσου σε 20 min χρησιμοποιώντας ως παθολογικό υλικό το ρινικό έκκριμα. Λόγω του άμεσου αποτελέσματος που παρέχεται, το Directigen Flu-A χρησιμοποιείται ως μέσο ελέγχου και επιτήρησης της γρίπης των ιπποειδών (Daly et al., 2004), αλλά και ως επικουρικό εργαλείο στην απομόνωση του ιού από δείγματα που είναι επιβεβαιωμένα θετικά. Η παράλληλη χρήση του με την απομόνωση του ιού, στην επιζωοτία της γρίπης ιπποειδών το 1989 στην Αγγλία, βελτίωσε κατά 44% την επιτυχή απομόνωση του ιού (Livesay et al., 1993).

2.7.2.4 Μοριακές τεχνικές

Τα τελευταία χρόνια, η καθιέρωση μοριακών διαγνωστικών τεχνικών έχει συνεισφέρει σημαντικά στη διάγνωση. Οι μέθοδοι ανάστροφης τρανσκριπτάσης - αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (reverse transcriptase – polymerase chain reaction, RT – PCR) θεωρείται ότι διαθέτουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, παρέχοντας έτσι πιο ακριβή αποτελέσματα, ενώ παράλληλα επιτρέπουν την εξέταση πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί διάφορες τέτοιες μέθοδοι για τη διάγνωση της νόσου (Oxburgh and Hagstrom, 1999, Fouchier et al., 2000, Donofrio et al., 1994) και για την υποτυποποίηση της HA και NA κάθε στελέχους (Hoffman et al., 2001, Newton et al., 2006, Ito et al., 2008).

Πέρα από τις προαναφερθείσες μοριακές δοκιμές, πρόσφατα αναπτύχθηκαν και δοκιμασίες RT-PCR πραγματικού χρόνου (real-time RT-PCR) για την ανίχνευση του ιού.

Η ανάπτυξη μιας τέτοιας δοκιμασίας, με χρήση ειδικού ανιχνευτή υβριδισμού τεχνολογίας TaqMan, προσφέρει διάγνωση σε συντομότερο χρόνο, με απλούστερο τρόπο και με μεγαλύτερη ευαισθησία, σε σύγκριση με τις PCR που αναφέρθηκαν παραπάνω, ενώ παράλληλα είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA του ιού στο δείγμα (Quinlivan et al., 2005). Σήμερα, υπάρχουν ακόμη και μέθοδοι real-time RT-PCR ειδικές του γονοτύπου, επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων γονιδίων (Lu et al., 2009). Σε όλες τις περιπτώσεις η απομόνωση του ιού παραμένει σημαντική διότι επιτρέπει τον περεταίρω χαρακτηρισμό του στελέχους και κυρίως για την παρασκευή των εμβολίων.

2.8 Θεραπεία

Αιτιολογική θεραπεία για τη νόσο δεν υπάρχει. Για την αντιμετώπισή της ακολουθείται συμπτωματική αγωγή για την ανακούφιση του ζώου. Ζώα που έχουν προσβληθεί από τον ιό πρέπει να μεταφέρονται σε ήσυχο και ήρεμο περιβάλλον, να εξασφαλίζονται υγιεινές συνθήκες διαβίωσης, καλή διατροφή και ξεκούραση για να αναρρώσουν ταχύτερα και να μην υπάρχει κίνδυνος μετάδοσης του ιού σε υγιή ζώα. Η χορήγηση αντιβιοτικών, για πρόληψη ενδεχόμενων βακτηριακών επιπλοκών, πρέπει να αποφεύγεται ή να γίνεται με φειδώ. Γι' αυτό η πρόληψη είναι το καλύτερο μέσο για την αποφυγή της νόσου (Timoney, 1996, Myers and Wilson, 2006).

2.9 Πρόληψη και Έλεγχος

Ο καλύτερος τρόπος πρόληψης είναι η αποφυγή επαφής των υγιών με μολυσμένα ζώα. Η διαχείριση των ζώων (management), καθώς και η τήρηση του χρόνου απομόνωσης των νεοεισερχόμενων ζώων, παίζει σπουδαίο ρόλο στην αποφυγή της μετάδοσης της νόσου.

Η συνδυασμένη εφαρμογή των μέτρων αυτών και των εμβολιασμών αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για να γίνει η πρόληψη της γρίπης πιο αποτελεσματική, αλλά και για τον έλεγχο της νόσου.

2.9.1 Αποτελεσματικότητα εμβολιασμών

Τόσο η γενετική ποικιλομορφία των στελεχών του ιού της γρίπης των ιπποειδών, όσο και η ύπαρξη των μητρικών αντισωμάτων στα νεαρά ζώα ή/και ο εμβολιασμός με

στελέχη ετερόλογα από εκείνα της εκάστοτε λοίμωξης, αποτελούν τους κύριους παράγοντες της αποτυχίας του προστατευτικού εμβολιασμού των πληθυσμών. Η μη έγκαιρη επικαιροποίηση των εμβολίων οφείλεται στο γεγονός ότι δεν υπάρχει οργανωμένο παγκόσμιο σύστημα παρακολούθησης της νόσου και στο ότι κυκλοφορούν πολλά στελέχη ταυτόχρονα στους πληθυσμούς των ιπποειδών. Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα να ποικίλουν τα αποτελέσματα των εμβολιασμών και έτσι αυτά να μην παρέχουν πάντα προστασία.

Επιπλέον, το γεγονός ότι ακόμα και εμβολιασμένα ζώα μπορεί να συμβάλλουν στη μετάδοση της νόσου, χωρίς τα ίδια να παρουσιάζουν έντονα συμπτώματα, αποτελεί κρίσιμο σημείο στην προσπάθεια ελέγχου της νόσου (Daly et al., 2004).

Στην αγορά υπάρχουν ποικίλης τεχνολογίας εμβόλια που μπορεί να είναι νεκρά ή ζωντανά και να περιέχουν «ολόκληρα» ιικά σωματίδια ή τμήματα του ιού, από αντιπροσωπευτικά στελέχη των δύο μεγάλων κλάδων (Ευρωπαϊκού & Αμερικανικού) του ιού της γρίπης των ιπποειδών. Η επιλογή των κατάλληλων εμβολιακών στελεχών είναι μια συνεχής αναζήτηση που βασίζεται στο πρόγραμμα παρακολούθησης και ελέγχου της νόσου από τον ΟΙΕ.

Τα εμβόλια προκαλούν την παραγωγή αντισωμάτων IgG στον ορό και στους πνεύμονες, τα οποία μειώνουν την εμφάνιση και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων, καθώς και τον πολλαπλασιασμό και την απέκκριση του ιού, αλλά δεν παρέχουν πλήρη προστασία.

2.9.2 Βελτιστοποίηση εμβολιακών σχημάτων

Επιζωοτιολογικές μελέτες, τόσο μετά από πειραματική μόλυνση όσο και μετά από φυσική μόλυνση (επιζωοτίες), έχουν δείξει ότι ο εμβολιασμός μειώνει την έκταση της επιζωοτίας (Glass et al., 2002). Για το λόγο αυτό ιπποειδή αγώνων εμβολιάζονται υποχρεωτικά προκειμένου να συμμετέχουν σε διοργανώσεις, ώστε να μην υπάρχουν φόβοι επιζωοτίας της νόσου και ακύρωσης των αγώνων. Οι απαιτούμενες προϋποθέσεις, που τίθενται για τα ζώα αγώνων είναι να έχουν εμβολιαστεί αρχικά με δύο δόσεις, σε διάστημα 4-6 εβδομάδων, και στη συνέχεια να γίνεται αναμνηστικός εμβολιασμός κάθε 6 μήνες. Παρόλα αυτά θεωρείται ότι τα αδρανοποιημένα εμβόλια παρέχουν μικρής διάρκειας ανοσία, αφήνοντας «απροστάτευτα» ανοσολογικά τα ζώα για αρκετούς μήνες μέχρι τον επόμενο εμβολιασμό (Cullinane et al., 2001, Newton et al., 2000). Ο Newton

και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι το επίπεδο ανοσίας εξαρτάται άμεσα από το χρόνο του τελευταίου εμβολιασμού, αλλά και από το συνολικό αριθμό των αναμνηστικών δόσεων που έχουν χορηγηθεί (Newton et al., 2000). Ο Park και οι συνεργάτες του προτείνουν την αύξηση της συχνότητας των εμβολιασμών σε ίππους ηλικίας 2 ετών και άνω, διότι ο τρόπος αυτός θα προσφέρει αύξηση της προστασίας έναντι της νόσου (Park et al., 2003). Όμως, δεν είναι γνωστό τι επιπτώσεις μπορεί να προκαλέσουν στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιπποειδών οι πολύ συχνοί εμβολιασμοί, διότι υπάρχει φόβος «ανοσολογικής παράλυσης» (Daly et al., 2004). Δεδομένου ότι τα μητρικά αντισώματα παρεμποδίζουν την παραγωγή αντισωμάτων κατά τον εμβολιασμό στα πολύ νεαρά ζώα, θεωρείται ότι το καλύτερο εμβολιακό σχήμα σε αυτή την περίπτωση είναι ο εμβολιασμός των εγκύων φοράδων, 6-4 εβδομάδες πριν τον τοκετό, και στη συνέχεια τα πουλάρια να εμβολιάζονται μετά την ηλικία των 6 μηνών, οπότε η μητρική ανοσία έχει εξασθενήσει (Cullinane et al., 2001).

2.10 Η Νόσος στην Ελλάδα

Η παρουσία της γρίπης των ιπποειδών στη χώρα μας διαπιστώθηκε πρώτη φορά το 1969 στην περιοχή της Ροδόπης, μετά από ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του εν λόγω ιού, σε μη εμβολιασμένα ζώα (Πασχαλέρη και συν., 1970). Το 1970 αναφέρεται η παρουσία του ιού και σε εμβολιασμένους ίππους του ιπποδρόμου της Αθήνας (Μενασέ και συν., 1970). Ο υπότυπος 2 (H3N8) ήταν ο υπεύθυνος παράγοντας και των δύο αυτών επιζωοτιών. Στο τέλος της δεκαετίας του 1990, έγινε προσδιορισμός αντισωμάτων με αναστολή της αιμοσυγκόλλησης σε ορούς ιπποειδών, από διάφορες περιοχές της χώρας. Στα ανεμβολίαστα ζώα, βρέθηκαν αντισώματα έναντι του στελέχους Prague σε ποσοστό 14% και έναντι του στελέχους Miami σε ποσοστό 10,4%, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ιοί της γρίπης κυκλοφορούσαν στον πληθυσμό των ιπποειδών, των υπό εξέταση περιοχών (Σπύρου και συν., 1999). Κατά τα έτη 2003-2004 και 2007 υπήρξε επιζωοτία σε άλογα των ιπποφορβείων στην περιοχή της Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας. Η διάγνωση βασίστηκε στον προσδιορισμό του αντιγόνου σε ρινικές εκκρίσεις με την ταχεία μέθοδο Directigen (Ε. Ξυλούρη, αδημοσίευτα δεδομένα).

Στην Ελλάδα, χρησιμοποιείται το ανασυνδυασμένο εμβόλιο PROTEQ Flu Te, το οποίο φέρει μόνο το γονίδιο HA του ιού της γρίπης Α και περιλαμβάνει τα στελέχη

Γρίπη Ιπποειδών

A/Equi-2/Ohio/2003 (αντιπροσωπευτικό του Αμερικανικού κλάδου) και A/Equi-2/Newmarket/2/93 (αντιπροσωπευτικό του Ευρωπαϊκού κλάδου), καθώς και την ανατοξίνη του τετάνου.

Δ. ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της παρουσίας του ιού της γρίπης των ιπποειδών στην Ελλάδα, σε ζώα που εκδήλωσαν αναπνευστικά συμπτώματα κατά τον Ιούνιο του 2003 και το Μάιο του 2007.

Παρόλο που στην Ελλάδα είχε διαπιστωθεί η ύπαρξη αντισωμάτων έναντι του οροτύπου A/equi 2 σε εμβολιασμένα και ανεμβολίαστα ιπποειδή, χωρίς ωστόσο να γίνει διαχωρισμός των εμβολιακών ή μη αντισωμάτων (Σπύρου και συν., 1999), δεν υπάρχει καμία αναφορά μοριακού χαρακτηρισμού του ιού στη χώρα μας. Έτσι, πρωταρχικός στόχος της μελέτης ήταν η απομόνωση του ιού σε κύτταρα με σκοπό την περαιτέρω μελέτη του. Δεδομένου ότι υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι η απομόνωση σε εμβρυοφόρα αυγά ενδέχεται να καταλήγει σε σημειακές μεταλλάξεις του γονιδιώματος του ιού, και πιο συγκεκριμένα του γονιδίου της αιμοσυγκολλητίνης (Pob1 et al., 1994), αποφασίστηκε η καλλιέργεια και απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες.

Στη συνέχεια, αφού ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας των Ζώων, για την τυποποίηση και υποτυποποίηση του ιού, προχωρήσαμε στην ανάλυση τμημάτων όλων των γονιδίων του. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση των ικών πρωτεϊνών προκειμένου να εξαγάγουμε πληροφορίες για την επιζωοτιολογία των απομονωθέντων στελεχών του ιού.

1. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Ζώα & Δειγματοληψία

Κατά τη συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκε παθολογικό υλικό από 30 ίππους, που σταβλίζονταν ομαδικά στην περιοχή του Νομού Αττικής. Η δειγματοληψία έλαβε χώρα τον Ιούνιο του 2003 και τον Μάιο του 2007 και αφορούσε διαφορετικά ζώα κατά τις δύο αυτές χρονικές περιόδους. Οι ίπποι, ηλικίας από 6 μηνών έως 2 ετών, εμφάνιζαν αναπνευστική λοίμωξη και η εξέταση των παθολογικών υλικών με το τεστ BD Directigen™ Flu A έδωσε θετικό αποτέλεσμα. Σύμφωνα με το ιστορικό, τα ζώα δεν είχαν εμβολιαστεί για τον ιό της γρίπης, ούτε είχαν εκδηλώσει οποιαδήποτε νόσο πριν την εν λόγω επιζωοτία.

Από τα ζώα που εμφάνιζαν συμπτώματα γρίπης συλλέγονταν ρινικό έκκριμα, με τη βοήθεια βαμβακοφόρων στυλεών, μιας χρήσεως, που είχαν προετοιμαστεί στο εργαστήριό μας. Οι εν λόγω στυλεοί αποτελούνταν από συρμάτινο στέλεχος, μήκους περίπου 25-30 cm, για να μπορούν να εισέρχονται στους ρόθωνες των ιπποειδών για τη συλλογή του ρινικού εκκρίματος, και περιτύλιγμα από γάζα. Πριν τη χρήση τους αποστειρώνονταν στους 121 °C για 30 min. Αμέσως μετά τη δειγματοληψία οι στυλεοί εμβαπτιζόνταν σε υλικό μεταφοράς και μεταφέρονταν στο εργαστήριό μας εντός μίας ώρας από τη στιγμή της δειγματοληψίας. Τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80 °C μέχρι την εξέτάσή τους, αλλά και μετά το πέρας αυτής.

1.2 Απομόνωση Ελληνικών στελεχών ιού γρίπης των ιπποειδών σε κυτταροκαλλιέργειες

Για την απομόνωση των Ελληνικών στελεχών του ιού της γρίπης των ιπποειδών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MDCK, η οποία προέρχεται από επιθηλιακά κύτταρα νεφρού σκύλου. Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονταν σε στείρες πλαστικές φιάλες των 25cm² και των 75cm² (Greiner bio one, Germany), σε θερμοκρασία 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ (Jouan Ltd., Derbyshire, UK). Για την ανάπτυξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), στο οποίο προσθέτονταν, σε αναλογία 1%, 1.000 IU/ml πενικιλίνης G, 100 μg/ml στρεπτομυκίνης, 0,25 mg/ml αμφοτερικίνης B και L-γλουταμίνη, καθώς και 10% (v/v) ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Calf Serum). Όλα τα συστατικά του μέσου καλλιέργειας ήταν της εταιρίας Lonza (Belgium), εκτός από την αμφοτερικίνη B που ήταν της εταιρείας Serva electrophoresis GmbH (Germany).

Όταν τα πλήρως ανεπτυγμένα κύτταρα επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν για απομόνωση του ιού, το θρεπτικό υπόστρωμα (υπόστρωμα μόλυνσης, infectious medium) περιείχε, τα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος ανάπτυξης πλην του ορού εμβρύου μόσχου (FBS) και επιπλέον 2μg/ml TPCK-trypsin (Sigma Chemical Co., Poole, UK). Για τις διόδους των κυττάρων χρησιμοποιούταν διάλυμα θρυψίνης (Trypsin/EDTA, Invitrogen UK).

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων τα κύτταρα διατηρούνταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Για να επιτευχθεί αυτό γίνονταν διόδοι των καλλιιεργειών κάθε 3-4 ημέρες. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν υποστεί 15-40 διόδους, διότι μετά την 40^η διόδο παρατηρήθηκε ότι αναπτύσσονταν με βραδύ ρυθμό. Επιπλέον, αν χρησιμοποιούνταν κύτταρα διόδου μικρότερης της 10^η τότε απαιτούταν σημαντικός χρόνος προσαρμογής τους στις συνθήκες ανάπτυξης, μετά τη φύλαξη σε υγρό άζωτο και την απόψυξή τους.

Η συγκέντρωση των κυττάρων που διανεμόταν στις φιάλες των 25 cm² για την απομόνωση του ιού και των 75 cm² για την δημιουργία «stock» ιού («αποθέματος» ιού) ήταν 5x10⁴ κύτταρα/ml. Ο αριθμός των κυττάρων προσδιοριζόταν με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου (Neubauer haemocytometer).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί (κεφ. 1.1), ως παθολογικό υλικό για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε το ρινικό έκκριμα. Το υλικό αυτό, αρχικά αραιωνόταν με D-MEM, σε αναλογία 1/10, φυγοκεντρούταν στα 3000 rpm (EBA 20S, Hettich Lab Technology GmbH & Co. KG, Germany) για 10 min. Εν συνεχεία σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, λαμβανόταν το υπερκείμενο υγρό και, αφού διηθούνταν (αποστειρωμένα φίλτρα των 0,45μm), τοποθετούταν σε αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο universal (Greiner Bio-One, Germany).

Ο ενοφθαλμισμός γινόταν σε κυτταροκαλλιέργειες με πλήρες ταπήτιο. Αρχικά, απομακρυνόταν το θρεπτικό υπόστρωμα και ακολουθούσαν τρεις πλύσεις με PBS, ώστε να απομακρυνθεί ο ορός εμβρύου μόσχου που εμποδίζει την προσρόφηση του ιού στα κύτταρα. Η ποσότητα του ενοφθαλμίσματος ήταν 100 μl. Μισή ώρα μετά την επώαση των ενοφθαλμισμένων κυτταροκαλλιιεργειών στους 37 °C, προσθέτονταν θρεπτικό υπόστρωμα μόλυνσης. Για τις επόμενες 3-4 ημέρες οι ενοφθαλμισμένες κυτταροκαλλιιεργειες ελέγχονταν καθημερινά με ανεστραμμένο μικροσκόπιο για την ανίχνευση κυτταρικής απόπτωσης ως αποτέλεσμα της κυτταροπαθογόνου επίδρασης του ιού (cytopathic effect, CPE).

Όλες οι ενοφθαλμισμένες κυτταροκαλλιέργειες είτε παρουσίαζαν CPE είτε όχι στην 1^η δίοδο υπόκεινταν σε τυφλές διόδους μέχρι και την 3^η δίοδο. Οι κυτταροκαλλιέργειες που παρουσίαζαν CPE κατά την 3^η δίοδο υπόκεινταν σε επιπλέον διόδους (έως 6 δίοδοι), ώστε να αυξηθεί ο τίτλος του ιού με σκοπό την αύξηση του πληθυσμού του. Μετά από κάθε δίοδο το υπερκείμενο των κυτταροκαλλιεργειών που παρουσίαζαν 100% απόπτωση των κυττάρων, μεταφερόταν σε φιαλίδια τύπου universal (Greiner Bio-One, Germany) και φυγοκεντρούταν στα 1.000 rpm για 7 min. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέα φιαλίδια (Greiner Bio-One, Germany) και φυλασσόταν στους -80 °C, για περεταίρω ταυτοποίηση και νουκλεοτιδική αλληλούχιση του απομονωθέντος στελέχους. Ένα δείγμα παθολογικού υλικού χαρακτηριζόταν ως αρνητικό όταν δεν παρατηρούταν CPE ύστερα από τρεις διαδοχικές διόδους.

Για αποφυγή επιμολύνσεων, κάθε δείγμα ενοφθαλμιζόταν σε διαφορετική χρονική περίοδο και μετά από απολύμανση του επωαστήρα, ώστε κάθε φορά να υφίσταται χειρισμούς ένα μόνο δείγμα. Κάθε δείγμα ενοφθαλμιζόταν εις τριπλούν, ενώ παράλληλα ως μάρτυρας χρησιμοποιούταν μη-ενοφθαλμισμένη κυτταροκαλλιέργεια. Όσον αφορά στο θετικό μάρτυρα του ιού, χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος A/equine/Newmarket/1/93 H3N8 (ευγενική χορηγία της Dr. Janet Daly, New Market, UK), το οποίο καλλιεργήθηκε μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης του ιού από τα παθολογικά δείγματα, αφού προηγουμένως είχε διατηρηθεί «υγειονομικό κενό».

1.3 Έλεγχος ζωτικότητας κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan blue

Για να εκτιμηθεί το ποσοστό ζωτικότητας, τόσο στις ενοφθαλμισμένες όσο και στις μη ενοφθαλμισμένες με παθολογικό υλικό κυτταροκαλλιέργειες, έγινε χρήση της χρωστικής Trypan blue (Lonza, Belgium). Η εν λόγω χρωστική έχει την ιδιότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη μόνο των νεκρών κυττάρων, διαφοροποιώντας τα από τα ζώντα κύτταρα.

Η διαδικασία της χρώσης είχε ως εξής: σε 50 μl Trypan blue προσθέτονταν 50 μl εναιωρήματος κυττάρων. Από το μίγμα αυτό λαμβάνονταν 10 μl και τοποθετούνταν στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Στη συνέχεια, γινόταν καταμέτρηση ζωντανών και νεκρών κυττάρων σε τέσσερις περιοχές. Η ζωτικότητα των κυττάρων των κυτταροκαλλιεργειών εκφραζόταν σε ποσοστό ζωντανών επί του συνόλου προς την

κυτταροκαλλιέργεια μάρτυρα που συντηρούταν ανά δείγμα (% ζωντανών κυττάρων στη μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια / % ζωντανών κυττάρων στην κυτταροκαλλιέργεια μάρτυρα).

1.4 Τιτλοποίηση απομονωθέντων στελεχών του ιού

Για την τιτλοποίηση των στελεχών χρησιμοποιήθηκε η συνεχής κυτταρική σειρά και τα αντιδραστήρια που αναφέρονται και στην απομόνωση των στελεχών (κεφ. 1.2). Παράλληλα, έγινε χρήση πλακών 96 βοθρίων, με επίπεδο πυθμένα, κατάλληλων για την καλλιέργεια κυττάρων (Greiner bio one, Germany). Στο περιεχόμενο της φιάλης που αφορούσε στην τρίτη δίοδο του ιού, λάμβαναν χώρα διαδοχικές υποδεκαπλάσιες (10^{-0} έως 10^{-6}) αραιώσεις, σε μία σειρά περιεκτών, χρησιμοποιώντας ως αραιωτικό το θρεπτικό υπόστρωμα Dulbecco's MEM.

Στη συνέχεια, από κάθε αραιώση ενοφθαλμιζόνταν 4 βοθρία (50 μl/βοθρίο) και ακολουθούσε επώαση σε συνθήκες ανάλογες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στην απομόνωση των στελεχών. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, σε όλα τα βοθρία προσθέτονταν 150 μl Dulbecco's MEM και η πλάκα με τα κύτταρα τοποθετούταν ξανά στον επωαστήρα. Στο σύστημα περιλαμβάνονταν, επίσης, δύο ειδών αρνητικοί μάρτυρες από 4 βοθρία έκαστος- ο ένας ήταν αρνητικός μάρτυρας της μεθόδου και ο άλλος ως δείκτης ανάπτυξης των κυττάρων, καθένα από τα οποία ενοφθαλμιζόταν με 50μl Dulbecco's-MEM χωρίς ιό. Τα κύτταρα ελέγχονταν καθημερινά για την ύπαρξη κυτταροπαθογόνου δράσης του ιού και ο προσδιορισμός του τίτλου του ιού γινόταν την 3^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό, χρησιμοποιώντας τον τύπο του Karber. Ο τίτλος εκφράστηκε ως η μέση λοιμογόνος δόση του ιού για την κυτταροκαλλιέργεια ανά ml ενοφθαλμίσματος (Tissue Culture Infectious Dose 50%, TCID₅₀/ml).

1.5 Ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών του ιού

Για την ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών αρχικά χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit BD Directigen™ Flu A προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τα απομονωθέντα στελέχη ανήκαν στον τύπο A της γρίπης. Πρόκειται για ένα εμπορικό kit *in vitro* ανοσοπροσδιορισμού σε μεμβράνη για την άμεση, ταχεία και ποιοτική ανίχνευση του αντιγόνου του ιού της γρίπης A, με το οποίο εξετάστηκε το υπερκείμενο υγρό των κυτταροκαλλιεργειών, σύμφωνα με τις οδηγίες του

κατασκευαστή (Becton Dickinson and Co., Maryland, USA). Πιο συγκεκριμένα, μετά την τοποθέτηση μίας σταγόνας υπερκείμενου υγρού ενοφθαλμισμένων κυτταροκαλλιιεργειών, στην ειδική συσκευή του kit, γινόταν προσρόφηση ενός ειδικού κατά της νουκλεοπρωτεΐνης του ιού της γρίπης Α μονοκλωνικού αντισώματος. Σε κάθε συσκευή εξετάζεται ένα μόνο δείγμα. Για την επιβεβαίωση της ορθότητας του τεστ κάθε συσκευή περιέχει ένα αντιγόνο του ιού H1N1 στο κέντρο της μεμβράνης, το οποίο κατά την ανάγνωση των αποτελεσμάτων αναπτύσσει μία μωβ κηλίδα. Το θετικό αποτέλεσμα αξιολογείται με την παρουσία ενός τριγώνου, μωβ χρώματος, περιμετρικά της προαναφερθείσας κηλίδας, ενώ η ένταση του χρώματος αποτυπώνει την θετικότητα του δείγματος.

1.5.1 Δοκιμασία αιμοσυγκόλλησης και δοκιμασία αναστολής της αιμοσυγκόλλησης

Για την τυποποίηση του ορότυπου στον οποίο ανήκαν τα απομονωθέντα στελέχη, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία της αναστολής της αιμοσυγκόλλησης, αφού προηγήθηκε η ανεύρεση του τίτλου του ιού με την δοκιμασία της αιμοσυγκόλλησης. Οι τεχνικές αυτές εφαρμόστηκαν όπως περιγράφονται στο εγχειρίδιο του ΟΙΕ (ΟΙΕ, 2010). Για την αναστολή της αιμοσυγκόλλησης οι πρότυποι αντιοροί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι A/equine/Newmarket/77 (H7N7), A/equine/Newmarket/2/93 (H3N8) και A/equine/Newmarket/1/93 (H3N8), ενώ και για τις δύο τεχνικές χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) ινδόρνιας 0,5%, σε PBS (pH 7,2), και πλάκες των 96-βοθρίων με πυθμένα σχήματος «V». Η λήψη των ερυθρών αιμοσφαιρίων έγινε σε διάλυμα Alsever (Invitrogen) σε αναλογία 1:1.

1.5.1.1 Δοκιμασία αιμοσυγκόλλησης

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ειδική πρόσδεση των μορίων της αιμοσυγκολλητίνης του ιού με τα σιαλικά οξέα των υποδοχέων των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs), διαφόρων ειδών ζώων.

Η διαδικασία εξέτασης είχε ως εξής: σε κάθε βοθρίο, όλων των οριζοντίων (1-12) και κάθετων (A-H) σειρών της πλάκας, τοποθετούνταν αρχικά 25 μl PBS. Στη συνέχεια, μόνο στο πρώτο βοθρίο (No 1) κάθε κάθετης σειράς (A-H) προσθέτονταν 25 μl αντιγόνου (υπερκείμενο υγρό ενοφθαλμισμένων κυτταροκαλλιιεργειών) (A-H)

και ακολουθούσε η διεξαγωγή διαδοχικών υποδιπλάσιων αραιώσεων (1:2 έως 1:1024). Μετά, σε όλα τα βοθρία προσθέτονταν επιπλέον 25 µl PBS (τελικός όγκος σε κάθε βοθρίο 50 µl) και εν συνεχεία 50 µl RBC. Η πλάκα επωαζόταν σε θερμοκρασία δωματίου ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) για 30 min, σε σκοτεινό χώρο. Σε κάθε πλάκα ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μία σειρά βοθρίων με υπερκείμενο υγρό μη ενοφθαλμισμένης κυτταροκαλλιέργειας (11A-11H) και μία σειρά με PBS αντί του αντιγόνου (12A-12H).

Παρουσία του ιού τα ερυθρά αιμοσφαίρια συγκολλούνται με τα αντιγόνα HA αυτού και στο βοθρίο σχηματίζεται ένα διάχυτο ερυθρό ίζημα, ενώ απουσία του ιού τα ερυθρά αιμοσφαίρια καθιζάνουν και στον πυθμένα του βοθρίου σχηματίζεται ένα συμπαγές ερυθρό ίζημα, το οποίο χαρακτηρίζεται ως «κουμπί». Για να προσδιοριστεί ο τίτλος του ιού ανευρίσκεται η υψηλότερη αραιώση (μικρότερη συγκέντρωση ιού) στην οποία παρατηρείται συγκόλληση του 50% των αιμοσφαιρίων που προστέθηκαν. Θεωρείται ότι στη συγκεκριμένη αραιώση ανά μονάδα χρησιμοποιηθέντος όγκου εναιωρήματος ιού, υπάρχει ένα ικό σωματίδιο ικανό να συγκολλά ερυθρά αιμοσφαίρια. Το σωματίδιο αυτό ονομάζεται αιμοσυγκολλητική μονάδα (Haemagglutination Unit, HAU) και ο τίτλος αιμοσυγκόλλησης εκφράζεται σε μονάδες αιμοσυγκόλλησης.

1.5.1.2 Δοκιμασία αναστολής της αιμοσυγκόλλησης

Μετά την ανεύρεση του τίτλου αιμοσυγκόλλησης, το αρχικό εναιώρημα, στο οποίο υπήρχε ο ιός, αραιωνόταν κατάλληλα με PBS (διαίρεση τίτλου με το 4), ώστε να περιέχει 4 μονάδες αιμοσυγκόλλησης (HAU) ανά μονάδα όγκου εναιωρήματος (4 HAU/ 25 µl).

Για την πιστοποίηση της ορθής αραιώσης του αντιγόνου (4 HAU/25µl) ακολουθούσαν η εξής διαδικασία: στα βοθρία 2-6, εκ των οριζοντίων σειρών, τοποθετούνταν 25 µl PBS. Στη συνέχεια, στο πρώτο βοθρίο κάθε σειράς προσθέτονταν 50 µl «τιτλοποιημένου» αντιγόνου και με τη λήψη 25 µl από αυτό το βοθρίο ακολουθούσε η διεξαγωγή διαδοχικών υποδιπλάσιων αραιώσεων. Μετά, σε κάθε βοθρίο συμπληρώνονταν άλλα 25 µl PBS, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 50 µl, και ακολουθούσε η προσθήκη 50 µl RBC. Η επώαση γινόταν στις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 1.5.1.

Αν το αντιγόνο είχε αραιωθεί ορθά ώστε να περιλαμβάνει 4 HAU, τότε τα τρία πρώτα βοθρία παρουσίαζαν πλήρη αιμοσυγκόλληση (1^ο βοθρίο περιέχει 4 HAU, 2^ο βοθρίο 2 HAU, 3^ο βοθρίο 1 HAU) κατά την ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Σε αντίθετη περίπτωση γινόταν εξ' αρχής η αρραίωση του αντιγόνου.

Πριν την εκτέλεση της δοκιμασίας της αναστολής της αιμοσυγκόλλησης, ήταν απαραίτητη η κατεργασία των αντιορών (κεφ.1.5.1) που χρησιμοποιήθηκαν, δεδομένου ότι οι αντιοροί ενδέχεται να περιέχουν μη ειδικές ουσίες οι οποίες αναστέλλουν ή προκαλούν την αιμοσυγκόλληση. Για το σκοπό αυτό παρασκευαζόταν διάλυμα 1:4 v/v αντιορού και ενζύμου RDE (receptor destroying enzyme) (ευγενική χορηγία της Dr. Daly). Το διάλυμα αυτό, αφού επωαζόταν σε υδατόλουτρο στους 37 °C όλο το βράδυ, θερμαινόταν στους 56 °C για 30 min προκειμένου να αδρανοποιηθούν τα υπολείμματα του RDE. Τέλος, όταν η θερμοκρασία του έφτανε στα ίδια επίπεδα με τη θερμοκρασία δωματίου, προσθέτονταν φυσιολογικός ορός (1.800 μl, 85% NaCl), ώστε η τελική αρραίωση του αντιορού να είναι 1:10.

Κατόπιν, ακολουθούσε η δοκιμασία της αναστολής της αιμοσυγκόλλησης για κάθε δείγμα με τους τρεις γνωστούς αντιορούς, που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 1.5.1. Η διαδικασία εφαρμογής της δοκιμασίας είχε ως εξής: στα οριζόντια βοθρία 2-12 κάθε σειράς της πλάκας των 96-βοθρίων τοποθετούνταν 25 μl PBS, ενώ στο 1^ο βοθρίο τοποθετούνταν 50 μl αντιορού. Ακολουθούσαν διαδοχικές υποδιπλάσιες αραιώσεις του αντιορού. Μετά, προσθέτονταν σε κάθε βοθρίο 25 μl ιού που περιείχε 4 HAU. Το μίγμα αντιορού-ιού επωαζόταν για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στο διάστημα αυτό τα αντισώματα, εφόσον ήταν ομόλογα του απομονωθέντος στελέχους του ιού, ενώνονταν με τις αιμοσυγκολλητίνες του. Στην συνέχεια, προσθέτονταν σε όλα τα βοθρία 50 μl εναιωρήματος 0,5% ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ακολουθούσε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min και μετά γινόταν η ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

Σε κάθε δοκιμασία υπήρχαν τρία είδη αρνητικών μαρτύρων: αρνητικός μάρτυρας των ερυθρών αιμοσφαιρίων (50 μl PBS και 50 μl RBC), αρνητικός μάρτυρας των αντιορών [25 μl κάθε αντιορού, 25 μl PBS (αντί αντιγόνου) και 50 μl RBC] και αρνητικός μάρτυρας ιού (50μl υπερκείμενου υγρού μη ενοφθαλμισμένης κυτταροκαλλιέργειας, 50μl RBC).

Λόγω των διαδοχικών αραιώσεων του αντιορού η συγκέντρωση των αντισωμάτων συνεχώς υποδιπλασιάζεται και από κάποια αρραίωση και μετά ο ιός δεν δεσμεύεται

από τα αντισώματα, παραμένει ελεύθερος, και επομένως συγκολλά τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Έτσι, στις αρχικές αραιώσεις αν υπάρχουν ομόλογα αντισώματα εμποδίζουν τον ιό να δράσει και τα ερυθρά αιμοσφαίρια καθιζάνουν σχηματίζοντας το «κουμπί», ενώ στις υψηλότερες αραιώσεις του αντιορού δημιουργείται διάχυτο ερυθρό ίζημα, λόγω συγκόλλησης ερυθρών αιμοσφαιρίων και ιού. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση που ο αντιορός περιέχει μη ειδικά αντισώματα. Επομένως η μεγαλύτερη αραιώση του κάθε αντιορού που εμποδίζει την εμφάνιση της αιμοσυγκόλλησης είτε πλήρως είτε τουλάχιστον κατά 50% αποτελεί τον τίτλο αναστολής της αιμοσυγκόλλησης.

1.6 Υλικά για την εκχύλιση του ιικού RNA

Η εκχύλιση του ιικού RNA, τόσο από το υπερκείμενο των κυτταροκαλλιιεργειών όσο και από τα πρωτογενή δείγματα (βαμβακοφόροι στυλεοί), έγινε με τη χρήση του QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, UK) στο οποίο περιλαμβάνονται τρία ρυθμιστικά διαλύματα, τα AVL, AW1 και AW2. Σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή ετοιμαζόταν μίγμα που αποτελούνταν από 140 μl υπερκείμενου των ρινικών εκκρίσεων (από το βαμβακοφόρο στυλεό) ή των ενοφθαλμισμένων με παθολογικό υλικό κυτταροκαλλιιεργειών, 560 μl ρυθμιστικού διαλύματος AVL και 5,6 μl RNA carrier. Στη συνέχεια, το μίγμα επωαζόταν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Μετά την επώαση, προσθέτονταν στο μίγμα 560 μl αιθανόλης και αυτό τοποθετούταν σε στήλη περιστροφής (spin column), η οποία υποβαλλόταν σε φυγοκέντρηση στα 6.000 rpm για 1 min. Κατόπιν, η στήλη υποβαλλόταν σε δύο διαδοχικά ξεπλύματα προκειμένου να απομακρυνθούν αναστολείς της PCR. Το πρώτο ξέπλυμα γινόταν με 500 μl διαλύματος AW1 και φυγοκέντρηση στα 6.000 rpm για 1 min και το δεύτερο με 500 μl διαλύματος AW2 και φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 3 min. Η έκλυση του τελικού RNA γινόταν σε 60 μl διαλύματος AVE.

1.7 Εκκινητές

Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για τα γονίδια M (M1 και M2 πρωτεΐνες), HA και NA σχεδιάστηκαν με βάση τα δεδομένα από προηγούμενες δημοσιευμένες εργασίες (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον μοριακό χαρακτηρισμό του ιού H3N8 της γρίπης των ιπποειδών

Γονίδιο (μήκος)	Ανοδικός εκκινητής 5'-3' (Θέση)	Καθοδικός εκκινητής 5'-3' (Θέση)	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
HA 1.765	HA1/RT AGCAAAAGCAGGGGATATTTCTG 1-23	HA1/3 GCTATTGCTCCAAAGATTC 1063-1081	1.080
	HA1/2 TGAGGTGACAAATGCTACTG 176-195	HA1/4 TGATTTGCTTTTCTGGTACA 1040-1059	880 (Newton et al., 2006)
NA 1.460	NAF AGCAAAAGCAGGAGT TTA 25-43	NAR AGTCTCCTTTAATGCAGGTGCGTG 679-703	678 (Ito et al., 2008)
M 1.002	M52C CTTCTAACCGAGGTCGAAACG 7-28	M253R AGGGCATTTTGGACAAAG/TCGT CTA 227-251	244 (Fouchier et al., 2000)

Για το μοριακό χαρακτηρισμό των υπόλοιπων πέντε γονιδίων (NS, NP, PA, PB1 και PB2) του ιού της γρίπης, σχεδιάστηκαν πέντε ζεύγη εκκινητών με βάση τις γενετικά συντηρημένες περιοχές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων δημοσιευμένων αλληλουχιών των προαναφερθέντων γονιδίων (Πίνακας 2). Για το σκοπό αυτό, εντοπίστηκαν και στοιχίστηκαν 15 δημοσιευμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εν λόγω γονιδίων του ιού της γρίπης H3N8 του ίππου, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Gene Runner Έκδοση 3.01 (Hastings Software, Inc). Παράλληλα έγινε έλεγχος ειδικότητας, με τη χρήση του λογισμικού BLAST στο NCBI (www.ncbi.nih.gov/GenBank), για τυχόν παρουσία τους και σε γένωμα άλλων οργανισμών μη-στόχων. Η σύνθεση των εκκινητών έλαβε χώρα στη Eurofins MWG, Germany. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με στόχο την ενίσχυση του μεγαλύτερου τμήματος έκαστου γονιδίου.

Πίνακας 2. Ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν για τον μοριακό χαρακτηρισμό του ιού H3N8 της γρίπης των ιπποειδών

Γονίδιο (μήκος bp)	Ανοδικός εκκινητής 5'-3' (Θέση)	Καθοδικός εκκινητής 5'-3' (Θέση)	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
NS 864	NSF ACTGTGTCAAGCTTTCAGGT 13-32	NSR TGTCGCACTTCTTCAATCAA 707-726	713
NP 1.520	NPF GGGAACGCCAGAATGCAACT 72-91	NPR CATGTCAAAGGAAGGCACGA 1449-1468	1.396
PA 2.151	PAF AGAGATCGAACAATGGCATG 244-263	PAR ACAGGATGCATTGAGTAGAG 1403-1422	1.178
PB1 2.341	PB1F CAGATTGTGTATTGGAAGCA 254-273	PB1R AGTAGACCAGTCTTTGATCG 1750-1769	1.515
PB2 2.341	PB2F AAAACGAACGATGCTGGC 238-255	PB2R AGAGTTGATGCATGGGGTTC 1284-1303	1.065

Ο έλεγχος της ειδικότητας των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και των δοκιμών RT-PCR που αναπτύχθηκαν με τους εν λόγω εκκινητές, γινόταν βάσει της αξιολόγησης των αποτελεσμάτων της θετικής αντίδρασης των θετικών μαρτύρων και του προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας όλων των προϊόντων ενίσχυσης που είχαν ήδη αξιολογηθεί ως θετικά με την δοκιμασία RT-PCR για το γονίδιο M. Ο έλεγχος της ειδικότητας αξιολογήθηκε και με το αρνητικό αποτέλεσμα που προέκυψε από την εξέταση μη ενοφθαλμισμένων κυτταροκαλλιιεργειών και από πιστοποιημένα αρνητικό ίππο (Ευγενική χορηγία της Dr. Janet Dally, Newmarket, UK). Δεδομένου ότι τα εν λόγω γονίδια θεωρούνται συντηρημένα, οι εκκινητές δεν ήταν ειδικοί μόνο για τον ιό της γρίπης του ίππου, αλλά και για τα αντίστοιχα γονίδια άλλων ιών γρίπης τύπου A.

1.8 Αντίστροφη μεταγραφή - Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Για όλες τις PCR που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το πρότυπο στέλεχος A/equine/Newmarket/1/1993 H3N8, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν υπερκείμενο υγρό μη ενοφθαλμισμένης κυτταροκαλλιέργειας και νερό απαλλαγμένο από RNAάση και DNAάση. Βελτιστοποίηση των αντιδράσεων έγινε ως προς τη συγκέντρωση του $MgCl_2$ και των εκκινητών, ενώ το βέλτιστο θερμο-πρωτόκολλο για κάθε ζεύγος εκκινητών προσαρμόστηκε πειραματικά. Όλες οι μοριακές τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης της παρούσας μελέτης διενεργήθηκαν τρεις φορές, προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, όλα τα μίγματα για τις PCR πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, με διαφορετικές πιπέτες και διαφορετικά ρύγχυι πιπετών με φίλτρο και κάτω από συνθήκες που ελαχιστοποιούσαν τον κίνδυνο επιμόλυνσης με εξωγενές RNA.

1.8.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου (M) των πρωτεϊνών της βασικής μεμβράνης (M1 και M2)

Η ενίσχυση του γονιδίου M, στα πρωτογενή δείγματα και στο υπερκείμενο υγρό των κυτταροκαλλιεργειών, αφορούσε 244 νουκλεοτίδια. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι M52C και M253R (Πίνακας 1). Η μετουσίωση του εκχυλισμένου RNA κάθε δείγματος έγινε με χρήση του εμπορικού kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen S.R.L.) από το οποίο παρασκευαζόταν μίγμα τελικού όγκου 50 μ l, που περιείχε 10 μ l εκχυλισμένου RNA, 1x Reaction mix ρυθμιστικού μίγματος, 0,2 mM από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,2 mM $MgSO_4$, 1 μ l RT/Platinum Taq mix και τους δύο εκκινητές (50 μ M) σε τελική συγκέντρωση 0,2 μ M. Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες θερμοκρασιακές συνθήκες: αντίστροφη μεταγραφή στους 42 °C για 30 min και αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 94 °C για 2 min και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 15 sec, 45 °C για 30 sec, 72 °C για 1 min. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10 min.

1.8.2 Χαρακτηρισμός του τύπου του ιού βάσει της αιμοσυγκολλητίνης - Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της αιμοσυγκολλητίνης (HA).

Για το χαρακτηρισμό του τύπου του ιού βάσει της αιμοσυγκολλητίνης, στα δείγματα που ανιχνεύθηκε γρίπη τύπου Α, εφαρμόστηκε ένθετη RT-PCR (nested RT-PCR). Χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών, το ζεύγος HA1/RT και HA1/2, που ενίσχυε τμήμα μήκους 1.080 νουκλεοτιδίων, και το ζεύγος HA1/3 και HA1/4 που ενίσχυε τμήμα μήκους 880 νουκλεοτιδίων (Πίνακας 1). Και τα δύο ζεύγη ενίσχυαν τμήματα του 3'-άκρου του γονιδίου HA.

Για την RT-PCR έγινε χρήση του εμπορικού kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen S.R.L.) με τελικό όγκο μίγματος 50 μ l, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.8.1, και του ακόλουθου θερμο-πρωτοκόλλου: αντίστροφη μεταγραφή στους 50 °C για 50 min και αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 94 °C για 2 min και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 30 sec, 50 °C για 30 sec, 72°C για 1 min και 30 sec. Η τελική επέκταση έγινε στους 70 °C για 10 min.

Στη συνέχεια, για την εφαρμογή της ένθετης PCR ακολουθήθηκε πρωτόκολλο που περιγράφεται σε προηγούμενη δημοσιευμένη εργασία (Borchers et al., 2005), ενώ έγινε και βελτιστοποίηση. Παράλληλα αναπτύξαμε μία άλλη ένθετη PCR κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε 1 μ l από το προϊόν της 1^{ης} RT-PCR και το εμπορικό kit Taq DNA Polymerase (Qiagen). Ο τελικός όγκος του μίγματος ήταν 50 μ l και περιείχε 1X ρυθμιστικό διάλυμα, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM κάθε δεοξυνουκλεοτιδίου (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,3 μ l Taq DNA Polymerase και τους εκκινητές HA1/3 και HA1/4 (Πίνακας 1) σε τελική συγκέντρωση 0,5 μ M. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στον κυκλοποιητή ήταν οι εξής: 94 °C για 3 min και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 40 sec, 50 °C για 30 sec, 72 °C για 1 min. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10 min.

1.8.3 Χαρακτηρισμός του τύπου του ιού βάσει της νευραμινιδάσης - Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της νευραμινιδάσης (NA).

Εφόσον τα στελέχη που απομονώθηκαν χαρακτηρίστηκαν μοριακά ότι ανήκουν στον τύπο II του ιού της γρίπης του ίππου (H3N8), χρησιμοποιήθηκε μία δεύτερη RT-PCR (Πίνακας 1) που ενίσχυε το 5'- άκρο του γονιδίου της NA του υπότυπου N8 του τύπου II. Η συγκεκριμένη RT-PCR χρησιμοποιήθηκε με σκοπό τόσο την

επιβεβαίωση ότι τα απομονωθέντα στελέχη ανήκουν στον υπότυπο H3N8 όσο και για την περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της νευραμινιδάσης.

Για τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen SRL) από το οποίο παρασκευαζόταν μίγμα 50 μl τελικού όγκου, που περιείχε 10 μl εκχυλισμένου RNA, 1x Reaction mix ρυθμιστικού μίγματος, 0,2 mM από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,2 mM MgSO₄, 1 μl RT/Platinum Taq mix και τους δύο εκκινητές (50 μM) σε τελική συγκέντρωση 0,2 μM. Το θερμο-πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: αντίστροφη μεταγραφή στους 50 °C για 50 min και αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 94 °C για 2 min και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 1 min, 55 °C για 1 min, 72 °C για 1 min. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10 min. Το προϊόν είχε μήκος 678 ζεύγη βάσεων.

1.8.4 Ενίσχυση των γονιδίων των πολυμερασών (PB1, PB2, PA)

Για την ενίσχυση των τριών γονιδίων των πολυμερασών (PB1, PB2, PA), σχεδιάστηκε αντίστοιχος αριθμός ζευγών εκκινητών (Πίνακας 2), με στόχο τη φυλογενετική ανάλυση των απομονωθέντων στελεχών. Κάθε γονίδιο ενισχύθηκε με RT-PCR σε δύο βήματα.

Το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής και των τριών RT-PCR έγινε με τον ίδιο τρόπο, με χρήση του εμπορικού kit Superscript First strand synthesis system for RT-PCR. Συγκεκριμένα, 8 μl RNA μεταγράφονταν αντίστροφα σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl που περιείχε 2 μl PCR buffer 1x (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3), 4 μl 25 mM MgCl₂, 1μl dNTPs [(1 mM από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP)], 2 μl DTT (0,1 M), 1 μl Rnase OUT Inhibitor, 1 μl SuperScript II reverse transcriptase και 1 μl random hexamers. Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) γινόταν στους 42 °C για 50 min και η αποδιάταξη στους 70 °C για 15 min.

Για τις PCR που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκε το ίδιο εμπορικό kit Taq DNA Polymerase (Qiagen), αλλά διαφορετικό πρωτόκολλο για κάθε μία. Πιο αναλυτικά:

Για την ενίσχυση του γονιδίου PA χρησιμοποιήθηκε PCR που ενίσχυε τμήμα 1.178 ζεύγη νουκλεοτιδίων. Κάθε φιαλίδιο περιείχε 5 μl cDNA, 0,5 μl (50 pmol/μl) των εκκινητών PAF και PAR (Πίνακας 2), 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM κάθε δεοξυνουκλεοτιδίου (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,3 μl Taq DNA

Polymerase και νερό απαλλαγμένο από RNAάση και DNAάση, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να ανέρχεται στα 50 μ l. Το θερμο-πρωτόκολλο περιλάμβανε αρχική μετουσίωση του cDNA με θέρμανση στους 95 °C για 3 min και στη συνέχεια 40 κύκλους των 94 °C για 40 sec, 55 °C για 30 sec, 72 °C για 2 min. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10 min.

Για την ενίσχυση του γονιδίου PB1 χρησιμοποιήθηκε PCR που ενίσχυε τμήμα 1.515 ζεύγη νουκλεοτιδίων. Κάθε φιαλίδιο περιείχε 5 μ l cDNA, 0,5 μ l (50 pmol / μ l) των εκκινητών PB1F και PB1R (Πίνακας 2), 5 μ l ρυθμιστικού διαλύματος, 6 μ l MgCl₂, ώστε το διάλυμα να έχει τελική συγκέντρωση 3 mM, 0,2 mM από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,3 μ l Taq DNA Polymerase και νερό απαλλαγμένο από RNAάση και DNAάση, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να ανέρχεται στα 50 μ l. Το θερμο-πρωτόκολλο περιλάμβανε αρχική μετουσίωση του cDNA με θέρμανση στους 95 °C για 5 min και στη συνέχεια 40 κύκλους των 94 °C για 30 sec, 55 °C για 1 sec, 72 °C για 2 min. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10 min.

Για την ενίσχυση του γονιδίου PB2 χρησιμοποιήθηκε PCR που ενίσχυε τμήμα 1.065 νουκλεοτιδίων. Κάθε φιαλίδιο περιείχε 5 μ l cDNA, 0,5 μ l (50 pmol/ μ l) των εκκινητών PB2F και PB2R (Πίνακας 2), 5 μ l ρυθμιστικού διαλύματος, 2 μ l MgCl₂, ώστε το διάλυμα να έχει τελική συγκέντρωση 2 mM, 0,2 mM από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,3 μ l Taq DNA Polymerase και νερό απαλλαγμένο από RNAάση και DNAάση, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να ανέρχεται στα 50 μ l. Το θερμο-πρωτόκολλο περιλάμβανε αρχική μετουσίωση του cDNA με θέρμανση στους 95 °C για 3 min και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 40 sec, 55 °C για 30 sec, 72 °C για 2 min. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10 min.

1.8.5 Ενίσχυση του γονιδίου της νουκλεοπρωτεΐνης (NP)

Για την ενίσχυση του γονιδίου της πρωτεΐνης NP, η οποία είναι ειδική του τύπου του ιού της γρίπης, χρησιμοποιήθηκε RT-PCR με εκκινητές τους NPF και NPR (Πίνακας 2). Η συγκεκριμένη PCR ενίσχυε τμήμα 1.396 ζεύγη νουκλεοτιδίων. Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen S.R.L.) από το οποίο παρασκευαζόταν μίγμα 50 μ l τελικού όγκου που περιείχε 10 μ l εκχυλισμένου RNA, 1x Reaction mix ρυθμιστικού μίγματος, 0,2 mM

κάθε δεοξυνουκλεοτιδίου (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,2 mM MgSO₄, 1 μl RT/Platinum Taq mix, τους δύο εκκινητές (50 μM) σε τελική συγκέντρωση 0,2 μM και νερό απαλλαγμένο από RNAάση και DNAάση. Στον κυκλοποιητή ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο: αντίστροφη μεταγραφή στους 50 °C για 50 min, 94 °C για 2 min και στη συνέχεια 40 κύκλοι των 94 °C για 1 min, 55 °C για 1 min, 72 °C για 2 min. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10 min.

1.8.6 Ενίσχυση του γονιδίου NS που κωδικοποιεί τις μη δομικές πρωτεΐνες NS1 και NS2.

Η ενίσχυση του γονιδίου NS αφορούσε ένα τμήμα μήκους 713 ζεύγη νουκλεοτιδίων, από το οποίο κωδικοποιούνται οι πρωτεΐνες NS1 και NS2. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε RT-PCR, με εκκινητές τους NSF και NSR (Πίνακας 2). Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen SRL). Κάθε φιαλίδιο περιείχε 10 μl RNA, 1x Reaction mix ρυθμιστικού μίγματος, 0,2 mM από κάθε δεοξυνουκλεοτιδίου (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,2 mM MgSO₄, 1 μl RT/Platinum Taq mix, τους δύο εκκινητές (50μM) σε τελική συγκέντρωση 0,2 μM και νερό απαλλαγμένο από RNAάση και DNAάση. Ο τελικός όγκος του διαλύματος ήταν 50 μl. Το μίγμα μεταγραφόταν αντίστροφα στους 50 °C για 30 min, και στην συνέχεια ακολουθούσαν 1 κύκλος των 94 °C για 2 min και 35 κύκλοι των 94 °C για 2 min, 54 °C για 1 min, 72 °C για 1 min. Η τελική επέκταση έγινε στους 72 °C για 10 min.

1.9 Υλικά για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Για την ανίχνευση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης υψηλής καθαρότητας (Applichem GmbH, Germany), διαλυμένης σε διάλυμα 1xTAE (40 mM Tris, 20 mM Acetic acid και 1 mM EDTA, pH 8,3) σε συγκέντρωση 1,5%. Για την απεικόνιση των προϊόντων της PCR, στις πηκτές αгарόζης ενσωματώθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml.

Ποσότητα 5 μl προϊόντος PCR αναμιγνυόταν με 1 μl διαλύματος φόρτωσης (6X Loading Dye Solution, Fermentas, Spain) και τοποθετούταν στα βοθρία της πηκτής. Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε τάση 90 Volt για 50 min, μέσα σε διάλυμα 1X TAE και θερμοκρασία δωματίου. Τα προϊόντα της PCR γίνονταν ορατά σε συσκευή

υπεριώδους ακτινοβολίας (UV transilluminator). Το μέγεθος των προϊόντων προσδιορίζονταν βάσει του δείκτη γνωστών μοριακών βαρών (GeneRuler 100bp DNA Ladder, ready-to-use ή/και Mass Ruler DNA Ladder, Fermentas, Spain).

1.10 Απομόνωση των προϊόντων των RT-PCR

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της RT-PCR, έλαβε χώρα εφαρμογή της τυποποιημένης διαδικασίας QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Germany) στα προϊόντα της RT-PCR, μετά το πέρας της μεθόδου.

Για την εκχύλιση του DNA από την πηκτή αγαρόζης, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και κάτω από υπεριώδεις ακτίνες απομακρυνόταν το τεμάχιο της πηκτής που έφερε το προϊόν της RT-PCR, με αποστειρωμένη λεπίδα νυστεριού μίας χρήσης. Στη συνέχεια, εκχυλιζόταν το DNA από το τεμάχιο της αγαρόζης χρησιμοποιώντας το εμπορικό σκεύασμα QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Germany).

1.11 Αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων των προϊόντων ενίσχυσης των RT-PCRs

Τα προϊόντα των RT-PCRs, μετά τον καθαρισμό ή την εκχύλισή τους από την πηκτή αγαρόζης στάλθηκαν για αλληλούχιση νουκλεοτιδίων. Η αλληλούχιση έλαβε χώρα με τεχνολογία DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing σε αλληλουχοποιητή AB3710xl (Applied Biosystems, USA) (Beckman Coulter Genomics, United Kingdom). Στη συνέχεια, ακολούθησε σύγκριση των αλληλουχιών με δημοσιευμένες αλληλουχίες γονιδιωμάτων, μέσω της βάσης δεδομένων GenBank database (www.ncbi.nih.gov/GenBank).

1.12 Λογισμικά πολλαπλής στοίχισης και επεξεργασίας αλληλουχιών για φυλογενετική ανάλυση και ανάλυση των πρωτεϊνών

Τα λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πολλαπλή στοίχιση και την επεξεργασία των αλληλουχιών των Ελληνικών στελεχών με στελέχη από τη διεθνή βιβλιογραφία, οι αλληλουχίες των οποίων έχουν κατατεθεί στο GenBank του National Center of Biotechnology Information (NCBI), ήταν το BioEdit (Hall, 1999) και το MEGA έκδοση 4.0 (Tamura et al., 2007). Το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε, επίσης, και για την φυλογενετική ανάλυση. Όλα τα φυλογενετικά δέντρα υπολογίστηκαν βάσει των αλληλουχιών των εκάστοτε πρωτεϊνών με τη μέθοδο «Ένωσης Γειτόνων» (Neighbour Joint). Όλα τα δενδρογράμματα παρουσιάζονται υπό

κλίμακα, η οποία αντιπροσωπεύει τον αριθμό των αντικαταστάσεων των αμινοξέων. Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1.000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps», οι οποίες αναφέρονται σε ποσοστά επί τις %, ενώ αναγράφονται όσες είναι πάνω από 80. Το στέλεχος A/equine/Miami/63 χρησιμοποιήθηκε ως παραομάδα, για την κατασκευή των δέντρων και για την εκτίμηση της εξελικτικής απόστασης των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στα δέντρα. Η εξελικτική απόσταση παρουσιάζεται σε γραφήματα για κάθε πρωτεΐνη χωριστά σε αναλογία με τα έτη των επιζωοτιών.

1.13 Συντήρηση παθολογικών υλικών και αντιδραστηρίων

Τα παθολογικά υλικά ήταν αποθηκευμένα στους -80 °C και η επεξεργασία και εξέτασή τους άρχισε στο εργαστήριό μας κατά την περίοδο 2007- 2008. Όλα τα δείγματα κατά την επεξεργασία τους στην παρούσα μελέτη υποβλήθηκαν σε έναν έως δύο κύκλους ψύξης-απόψυξης. Επίσης, όλα τα εκχυλίσματα ιικού RNA, καθώς και τα υπερκείμενα των ενοφθαλμισμένων κυτταροκαλλιιεργειών συντηρούνταν στους -80 °C.

Τα εμπορικά kit QIAamp Viral RNA mini kit και QIAquick PCR Purification Kit, που αφορούσαν στην εκχύλιση του ιικού RNA και τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR συντηρούνταν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα εμπορικά kit για τις RT-PCR συντηρούνταν στους -20 °C.

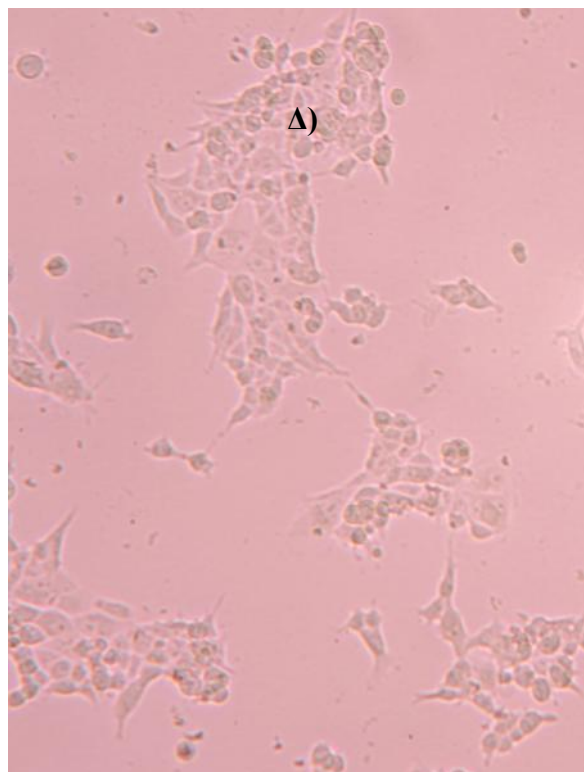
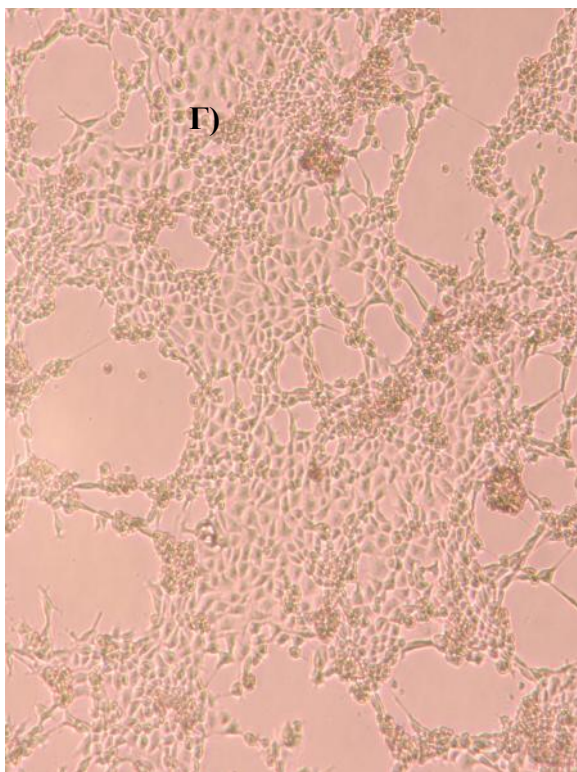
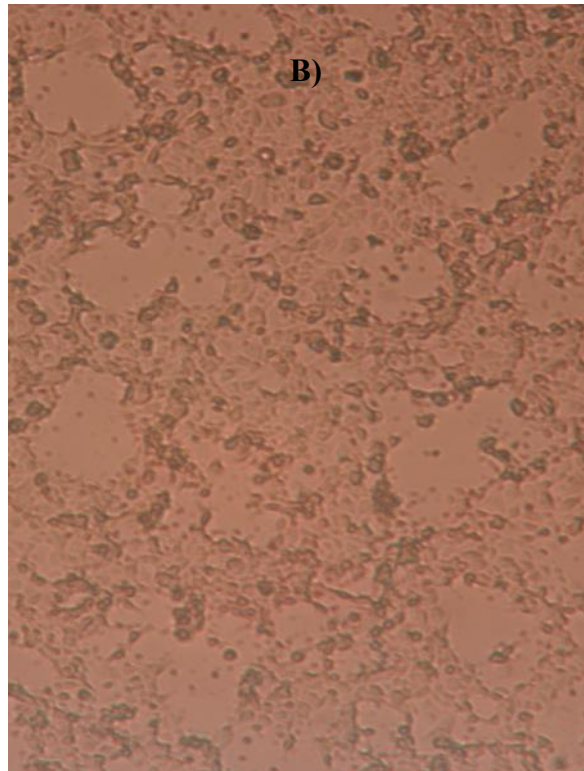
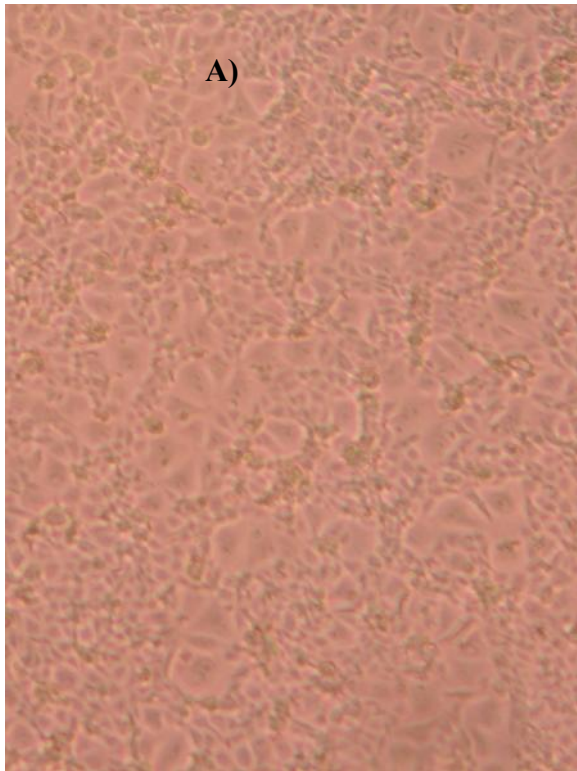
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν, συνολικά 30 DFA (Directigen™ Flu A+B) θετικά δείγματα παθολογικού υλικού, που προέρχονταν από ρινικό έκκριμα ισάριθμων ίππων, οι οποίοι εκδήλωσαν τυπικά συμπτώματα γρίπης, το 2003 και το 2007.

2.1 Απομόνωση Ελληνικών στελεχών του ιού σε κυτταροκαλλιιεργειες, έλεγχος απόπτωσης κυττάρων και τιτλοποίηση του ιού

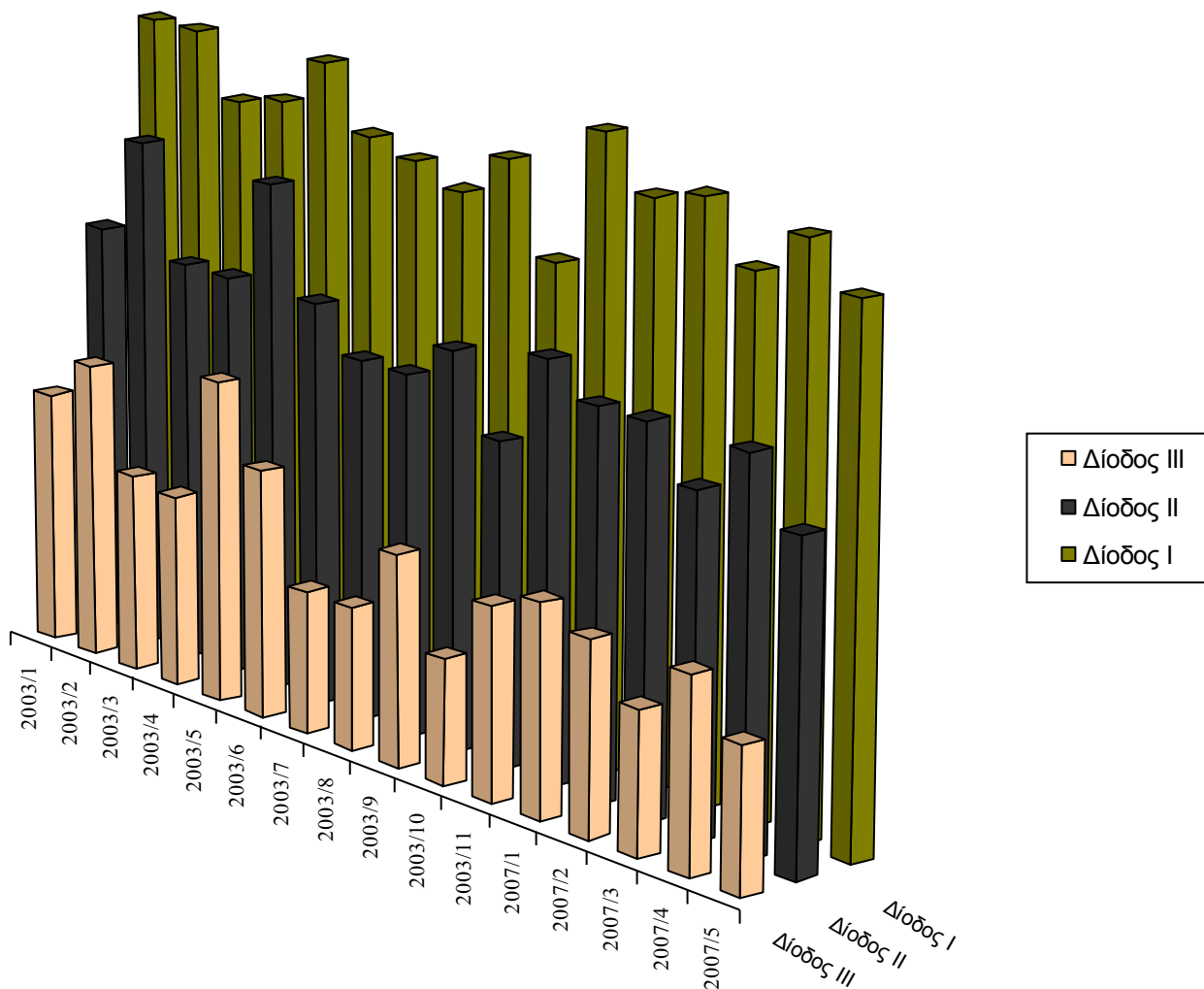
Με τη χρήση της συνεχούς κυτταρικής σειράς MDCK επιτεύχθηκε η απομόνωση του ιού στα 16 από τα 30 δείγματα ρινικού εκκρίματος και πιο συγκεκριμένα σε έντεκα δείγματα από την επιζωοτία του 2003 και σε πέντε δείγματα από εκείνη του 2007. Παρόλο που τα κύτταρα δεν έδειξαν συγκεκριμένο κυτταροπαθογόνο

αποτέλεσμα (Εικόνα 10), εμφάνισαν έντονη απόπτωση, σε σχέση με τους μάρτυρες, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και με τη δοκιμασία Trypan blue, όπως φαίνεται στο γράφημα 1. Τα περισσότερα δείγματα προκάλεσαν απόπτωση κυττάρων από τη δεύτερη δόση και μετά τις πρώτες 48 ώρες από τον ενοφθαλμισμό.



Εικόνα 10. Απομόνωση Ελληνικών στελεχών σε κύτταρα MDCK

Κυτταρική σειρά MDCK 24 (B), 48 (Γ) και 72 (Δ) ώρες μετά τον ενοφθαλισμό θετικών δειγμάτων για τον ιό της γρίπης κατά την τρίτη δίοδο. (A) Μη ενοφθαλισμένη κυτταροκαλλιέργεια (μάρτυρας) 24 ώρες μετά την αφαίρεση του ορού εμβρύου μόσχου (Μεγέθυνση X10).



Γράφημα 1. Απεικόνιση της ζωτικότητας ενοφθαλισμένων κυτταροκαλλιεργειών ανά δείγμα και ανά δίοδο μετά από χρώση με Trypan blue.

Η ζωτικότητα κάθε ενοφθαλισμένης κυτταροκαλλιέργειας εκφράζεται σε ποσοστό επί τοις % με αναγωγή στην κυτταροκαλλιέργεια μάρτυρα ανά δείγμα. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε 72 ώρες μετά τον ενοφθαλισμό.

Από την τιτλοποίηση των απομονωθέντων στελεχών προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Οι τίτλοι των απομονωθέντων στελεχών (3^η δίοδος) από την επιζωοτία του 2003 κυμάνθηκαν από 10^{0,5} έως 10^{2,75}, ενώ της αντίστοιχης του 2007 κυμάνθηκαν από 10^{1,5} έως 10^{2,5} TCID₅₀/ml. Τα δείγματα τα οποία, κατά την τιτλοποίηση που έγινε στην τρίτη δίοδο, παρουσίασαν τίτλο ίσο ή μεγαλύτερο του 10^{1,25} TCID₅₀/ml ήταν θετικά (απόπτωση) από την πρώτη δίοδο, εκτός από τα δείγματα 2003/1 και 2003/11 τα οποία ήταν θετικά στη δεύτερη και τρίτη δίοδο, αντίστοιχα. Ειδικότερα, όλα τα δείγματα του 2007 έδωσαν θετικό αποτέλεσμα από την πρώτη δίοδο, ενώ από τα έντεκα δείγματα του 2003 επτά ήταν θετικά στην πρώτη δίοδο και οκτώ στη δεύτερη. Αξιοσημείωτο είναι ότι ενώ τρία δείγματα του 2003 (2003/3, 2003/4 και 2003/11) έδειξαν τον ίδιο τίτλο (10^{1,75} TCID₅₀/ml) στο ένα από αυτά η απομόνωση του ιού έγινε στην τρίτη δίοδο και στα άλλα δύο από την πρώτη.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα απομόνωσης ιού σε κυτταροκαλλιέργειες MDCK ανά δίοδο και ανά δείγμα, καθώς και της τιτλοποίησής τους στην 3^η δίοδο.

A/A απομονωθέντος δείγματος	Απομόνωση ιού δίοδος I	Απομόνωση ιού δίοδος II	Απομόνωση ιού δίοδος III*	Τίτλος (TCID ₅₀ /ml)
2003/1	-	+	+	10 ^{1,25}
2003/2	-	-	+	10 ^{0,75}
2003/3	+	+	+	10 ^{1,75}
2003/4	+	+	+	10 ^{1,75}
2003/5	-	-	+	10 ^{0,5}
2003/6	+	+	+	10 ^{1,25}
2003/7	+	+	+	10 ^{2,25}
2003/8	+	+	+	10 ^{2,25}
2003/9	+	+	+	10 ^{1,5}
2003/10	+	+	+	10 ^{2,75}
2003/11	-	-	+	10 ^{1,75}
2007/1	+	+	+	10 ^{1,5}
2007/2	+	+	+	10 ²
2007/3	+	+	+	10 ^{2,25}
2007/4	+	+	+	10 ^{1,75}
2007/5	+	+	+	10 ^{2,5}

Η απομόνωση κρίθηκε επιτυχής με την εμφάνιση απόπτωσης και επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο RT-PCR για το γονίδιο M στην 3^η δίοδο

2.2 Αποτελέσματα αιμοσυγκόλλησης, αναστολής της αιμοσυγκόλλησης και ταυτοποίησης στελεχών με το εμπορικό kit Directigen Flu A+B.

Με τη δοκιμασία της αιμοσυγκόλλησης επιβεβαιώθηκε η παρουσία του ιού στα 15 από τα 16 δείγματα, που ήταν θετικά κατά την απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες. Το στέλεχος 2003/9 ήταν αρνητικό στη δοκιμασία της αιμοσυγκόλλησης. Παρόλο που οι 16 κυτταροκαλλιέργειες παρουσίασαν εικόνα προσαρμογής και καλής ανάπτυξης του ιού, οι τίτλοι αιμοσυγκόλλησης στα 15 θετικά δείγματα ήταν χαμηλοί. Όλα τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν αύξηση του τίτλου αιμοσυγκόλλησης στην τρίτη δίοδο, εκτός από το δείγμα 2003/1, το οποίο στη δεύτερη και τρίτη δίοδο παρουσίασε τον ίδιο τίτλο αιμοσυγκόλλησης.

Κατά την επιβεβαίωση της απομόνωσης στελεχών της γρίπης τύπου Α με το Directigen Flu A+B (DFA), στην τρίτη δίοδο του ιού στις κυτταροκαλλιέργειες, 15 στελέχη έδωσαν θετική αντίδραση, ενώ το 2003/11 αρνητική.

Η αναστολή της αιμοσυγκόλλησης εφαρμόστηκε μόνο σε τέσσερα δείγματα (2003/10, 2007/3, 2007/4, 2007/5), δεδομένου ότι στα υπόλοιπα έντεκα ο τίτλος αιμοσυγκόλλησης ήταν πολύ χαμηλός, οπότε δεν ήταν δυνατόν να αραιωθεί κατάλληλα το αντιγόνο ώστε να περιέχει 4 HAU, για να διεξαχθεί η δοκιμασία της αναστολής της αιμοσυγκόλλησης. Τα εν λόγω δείγματα έδειξαν αναστολή της αιμοσυγκόλλησης μόνο με τον αντιορό A/equine/Newmarket/2/93.

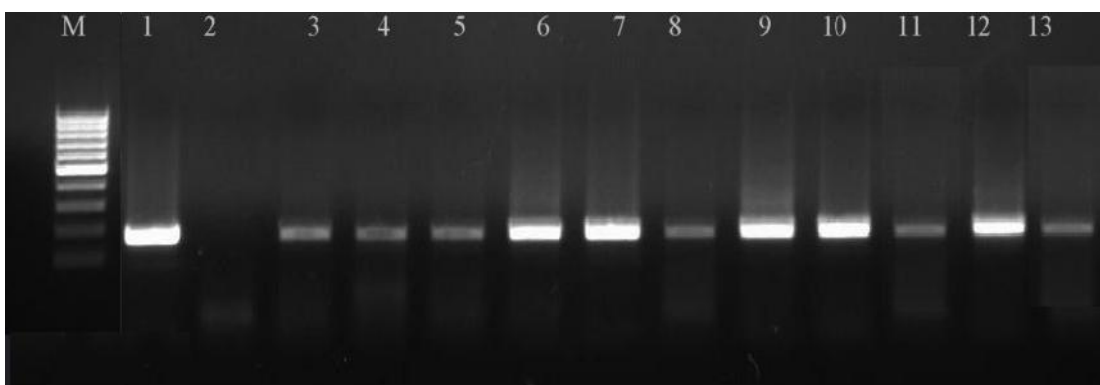
Ο τίτλος αιμοσυγκόλλησης και αναστολής της αιμοσυγκόλλησης, καθώς και τα αποτελέσματα της DFA, ανά δείγμα, παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Παρουσίαση αποτελεσμάτων ανίχνευσης του ιού της γρίπης των ιπποειδών.

Τα αποτελέσματα αφορούν τις ακόλουθες δοκιμές: απομόνωση και τιτλοποίηση του ιού (TCID_{50/ml}), δοκιμασία αιμοσυγκόλλησης (HAU/25μl), δοκιμασία αναστολής της αιμοσυγκόλλησης, ανίχνευση αντιγόνου του ιού με DFA και ανίχνευση των γονιδίων M, HA και NA με RT-PCR, τόσο από τα πρωτογενή δείγματα (βαμβακοφόροι στύλεοι) όσο και από κυτταροκαλλιέργειες.

2.3 Αποτελέσματα RT-PCR για ιούς γρίπης τύπου A (βάσει του γονιδίου M)

Με την RT-PCR, που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου M, ο ιός της γρίπης τύπου A ανιχνεύθηκε σε 18 από τους 30 ίππους, που εμφάνισαν συμπτώματα γρίπης το 2003 και το 2007 (Εικόνα 11). Πιο αναλυτικά, όσον αφορά στην επιζωοτία του 2003, ο εν λόγω ιός ανιχνεύτηκε σε 11 από τα 20 δείγματα ρινικού εκκρίματος, καθώς και σε 11 κυτταροκαλλιέργειες, που είχαν ενοφθαλμιστεί με το υλικό αυτό. Σχετικά με την επιζωοτία του 2007, ενώ ο ιός ανιχνεύτηκε σε 7 από τα 10 δείγματα ρινικού εκκρίματος, στις ενοφθαλμισμένες κυτταροκαλλιέργειες ανιχνεύτηκε μόνο σε 5 από τα 7 δείγματα. Με την εν λόγω RT-PCR επιβεβαιώθηκε η απομόνωση του ιού στις συνολικά 16 θετικές κυτταροκαλλιέργειες και από τις δύο επιζωοτίες.



Εικόνα 11. Διαγνωστική RT-PCR για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου M.

Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους (100ζβ έως 1.000ζβ), Διαδρομή 1 : θετικός μάρτυρας (244bp), Διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας, Διαδρομές 3-13: δείγματα και από τις 2 ενζωοτίες θετικά στον ιό. Το προϊόν έχει μήκος 224 ζεύγη βάσεων.

4.4 Συγκριτική μελέτη των μεθόδων διάγνωσης του ιού της γρίπης των ιπποειδών

Στα πλαίσια της ερευνάς μας έγινε προσπάθεια να συγκριθεί η ευαισθησία των τεσσάρων μεθόδων ανίχνευσης του ιού της γρίπης A των ιπποειδών, που χρησιμοποιήθηκαν.

Με τη μέθοδο RT-PCR ο ιός ανιχνεύτηκε σε 18 από τους 30 βαμβακοφόρους στυλεούς, με τους οποίους λήφθηκε το ρινικό έκκριμα από τους ίππους με τα συμπτώματα γρίπης. Κατά την απομόνωση του ιού με ενοφθαλμισμό κυττάρων MDCK, με τα προαναφερθέντα ρινικά εκκρίματα, θετικό αποτέλεσμα διαπιστώθηκε

σε 16 κυτταροκαλλιέργειες (16/18, 89% επί των θετικών δειγμάτων), γεγονός που επιβεβαιώθηκε και με την RT-PCR, ενώ η δοκιμασία της αιμοσυγκόλλησης ήταν θετική (υπερκείμενο υγρό) σε 15 από τις 16 κυτταροκαλλιέργειες. Στο τεστ DFA θετική αντίδραση έδωσαν 15 δείγματα υπερκείμενου κυτταροκαλλιεργειών (15/18, 83% επί των θετικών δειγμάτων και 15/16, 94% επί των απομονωθέντων στελεχών). Αντίθετα, μετά από ένα κύκλο ψύξης-απόψυξης των δειγμάτων, μόνο 12 από τα 18 δείγματα που λήφθηκαν με στυλεούς έδωσαν θετική αντίδραση στο τεστ DFA (12/18, 67% επί των θετικών δειγμάτων). Ένα απομονωθέν στέλεχος (2003/9) που ήταν θετικό ως προς το τεστ DFA δεν παρουσίασε καθόλου αιμοσυγκολλητική ικανότητα, ενώ ένα άλλο (2003/11) αρνητικό ως προς το DFA έδειξε αιμοσυγκόλληση (Πίνακας 4). Τα εν λόγω δύο απομονωθέντα στελέχη εμφάνισαν απόπτωση και ήταν θετικά με τη μέθοδο RT-PCR για το γονίδιο M₂, που διενεργήθηκε σε υπερκείμενο υγρό ενοφθαλμισμένων κυτταροκαλλιεργειών 3^{ης} διόδου.

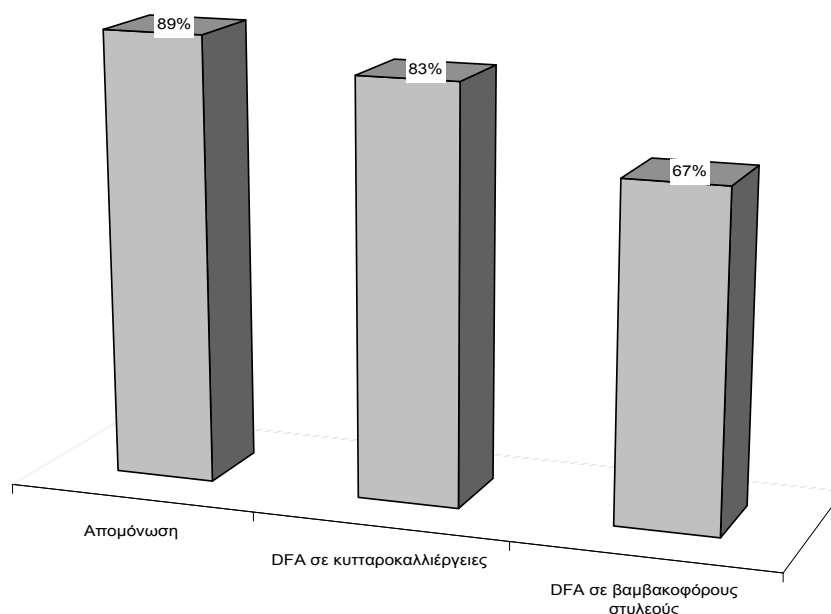
Η τιτλοποίηση των απομονωθέντων στις κυτταροκαλλιέργειες στελεχών φαίνεται ότι δεν είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα του DFA, ενώ η αιμοσυγκόλληση έδειξε χαμηλούς τίτλους (Πίνακας 4).

Από τη σύγκριση των τεσσάρων μεθόδων ανίχνευσης του ιού της γρίπης Α των ιπποειδών, φάνηκε ότι η μέθοδος RT-PCR ήταν αυτή που ανέδειξε τα περισσότερα θετικά αποτελέσματα, αλλά και η χρήση των κυτταροκαλλιεργειών έδωσε υψηλά ποσοστά απομόνωσης του ιού. Το τεστ DFA και η μέθοδος της αιμοσυγκόλλησης παρόλο που ανέδειξαν το ίδιο ποσοστό θετικών δειγμάτων, η τελευταία έδωσε πολύ χαμηλούς τίτλους με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή σε όλες τις περιπτώσεις η αναστολή της αιμοσυγκόλλησης.

Στον Πίνακα 5 φαίνονται τα ποσοστά των θετικών δειγμάτων ανά μέθοδο επί του συνόλου των δειγμάτων, ενώ στο Γράφημα 2 παρουσιάζεται το ποσοστό απομόνωσης του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες, καθώς και το ποσοστό ανίχνευσης αυτού, τόσο στις ενοφθαλμισμένες κυτταροκαλλιέργειες όσο και στους βαμβακοφόρους στυλεούς, με το τεστ ανοσοπροσδιορισμού DFA.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα ανίχνευσης του ιού της γρίπης των ιπποειδών με RT-PCR, ενοφθαλμισμό κυτταροκαλλιιεργειών και DFA

	Σύνολο πασχόντων ίππων	RT-PCR	Απομόνωση ιού	DFA στους βαμβακοφόρους στυλεούς	DFA σε υπερκείμενο κυτταροκαλλιιεργειών
	30				
Αριθμός θετικών δειγμάτων		18	16	12	15
Ποσοστά % θετικών επί του συνόλου		60%	53%	40%	50%



Γράφημα 2. Ποσοστά ανίχνευσης του ιού H3N8 των ιπποειδών με τις μεθόδους απομόνωση σε κυτταροκαλλιιεργειες και DFA, στο σύνολο των θετικών δειγμάτων.

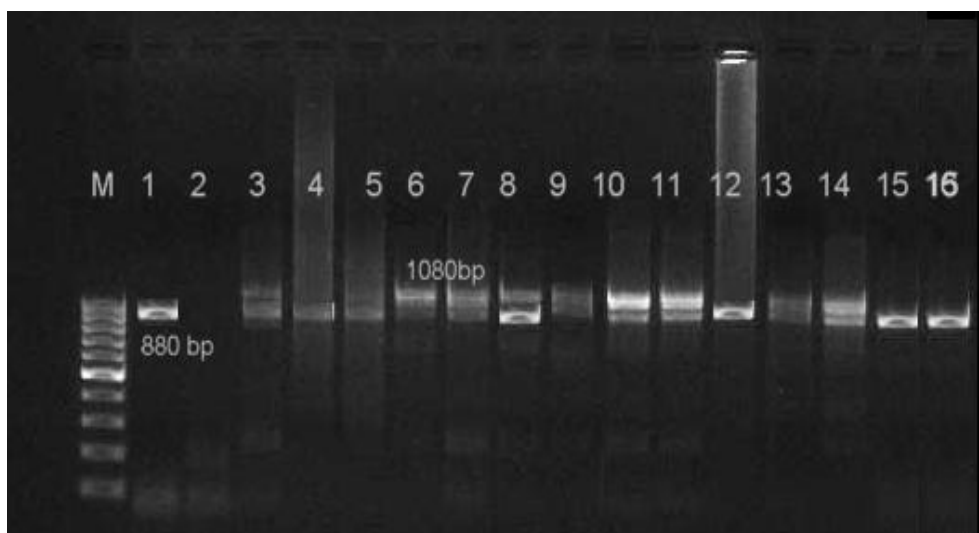
2.5 Αποτελέσματα ένθετης RT-PCR για το χαρακτηρισμό του υποτύπου των Ελληνικών στελεχών (βάσει των γονιδίων HA και NA)

Με την ένθετη RT-PCR, που αναπτύχθηκε κατά την παρούσα μελέτη για τον προσδιορισμό του υποτύπου του ιού ως προς την HA πρωτεΐνη, θετική αντίδραση έδωσαν τα αναφερθέντα στο κεφάλαιο 2.3 δεκαοκτώ δείγματα και χαρακτηρίστηκαν ως υπότυπος H3. Τα 16 στελέχη που απομονώθηκαν μετά από ενοφθαλμισμό κυτταροκαλλιιεργειών (κεφ.2.3) παρουσίασαν επίσης θετική αντίδραση.

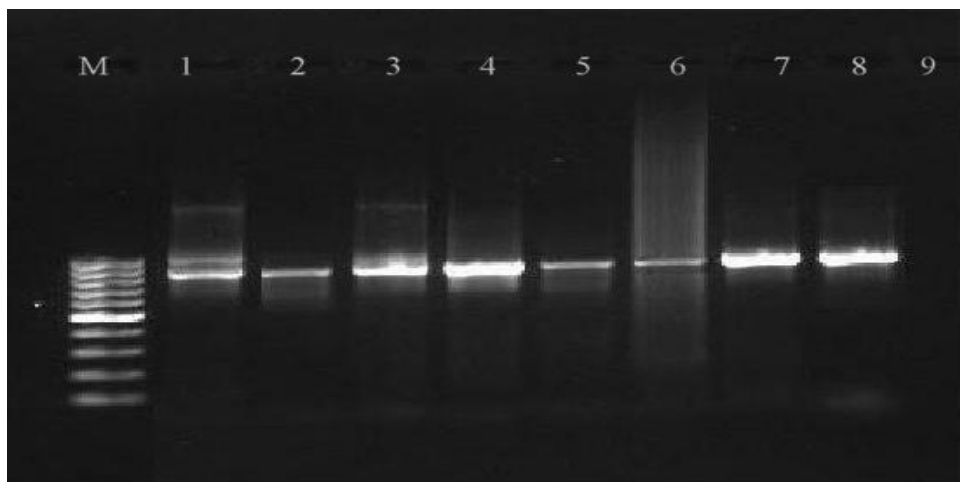
Αξιοσημείωτο είναι ότι βάσει του δημοσιευμένου πρωτοκόλλου για την ένθετη PCR (Brocher et al., 2005) δεν παρατηρήθηκε καμία θετική αντίδραση, ούτε καν του θετικού μάρτυρα και παρά τις προσπάθειες βελτιστοποίησης.

Στην εικόνα 12Α παρουσιάζονται αποτελέσματα της ένθετης RT-PCR από θετικά δείγματα που προήλθαν από βαμβακοφόρους στυλεούς (διαδρομές 3-9), καθώς και από τις κυτταροκαλλιέργειες που ενοφθαλμίστηκαν με αυτά (3^η δίοδος) (διαδρομές 10-16), ενώ στην εικόνα 12Β παρουσιάζονται αποτελέσματα από θετικές κυτταροκαλλιέργειες μετά από βελτιστοποίηση της μεθόδου. Πριν τη βελτιστοποίηση της μεθόδου πολλά δείγματα παρουσίαζαν, μετά την ένθετη PCR, θετική αντίδραση τόσο στα 1.080 ζβ (θετική αντίδραση της RT-PCR) όσο και στα 880 ζβ (PCR).

A)



B)



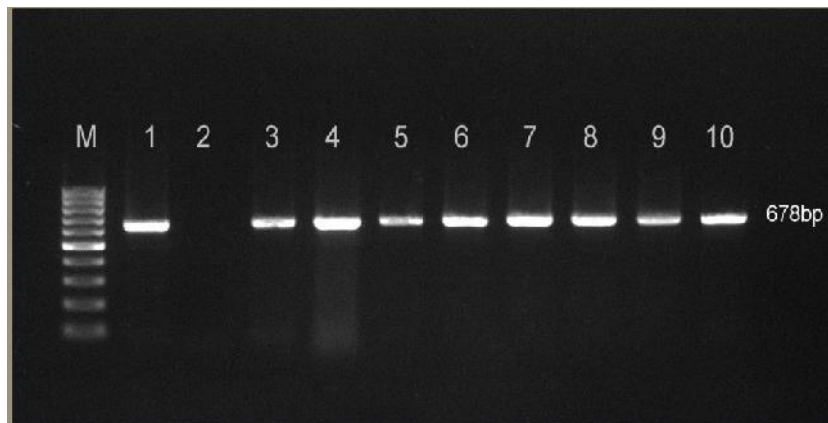
Εικόνα 12. Ένθετη RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου HA του υπότυπου N (H3N8) των Ελληνικών στελεχών.

A) Ένθετη RT-PCR. Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους (100ζβ έως 1.000ζβ). Διαδρομή 1 : θετικός μάρτυρας, Διαδρομή 2 : αρνητικός μάρτυρας, Διαδρομές 3-9 : θετικά δείγματα από βαμβακοφόρους στυλεούς, Διαδρομές 10-16 : θετικά δείγματα από τα αντίστοιχα στελέχη, που απομονώθηκαν σε κύτταρα MDCK. Το προϊόν έχει μήκος 1.080 ζεύγη βάσεων.

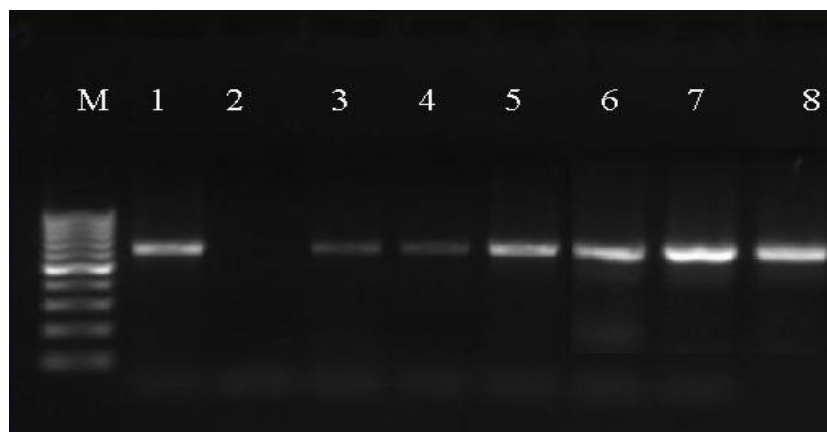
B) Ένθετη RT-PCR μετά από βελτιστοποίηση. Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους (100ζβ έως 1.000ζβ). Διαδρομή 1: θετικός μάρτυρας, Διαδρομή 9: αρνητικός μάρτυρας, Διαδρομές 2-8: δείγματα θετικά στον ιό (απομονωθέντα σε κυτταροκαλλιέργειες στελέχη, μετά από τρεις διόδους). Το προϊόν έχει μήκος 880 ζεύγη βάσεων.

Τα αποτελέσματα της RT-PCR για την τυποποίηση του γονιδίου (678ζβ) της NA πρωτεΐνης, συμφωνούσαν με εκείνα που προέκυψαν από το χαρακτηρισμό της αιμοσυγκολλητίνης του ιού. Πιο αναλυτικά, 18 κλινικά δείγματα και τα 16 απομονωθέντα στελέχη αντέδρασαν θετικά στην RT-PCR και χαρακτηρίστηκαν ως υπότυπος N8 (Εικόνα 13B & A).

A)



B)



Εικόνα 13. RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου NA του υπότυπου II (H3N8) των Ελληνικών στελεχών.

A) Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους (100ζβ έως 1.000ζβ). Διαδρομή 1 : θετικός μάρτυρας, Διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας, Διαδρομές 3-10: : θετικά δείγματα από κυτταροκαλλιέργειες.

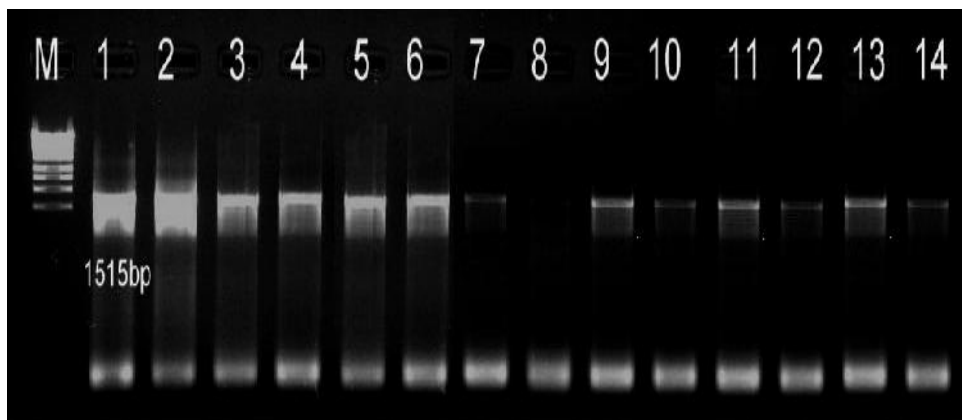
B) Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους (100ζβ έως 1.000ζβ). Διαδρομή 1 : θετικός μάρτυρας, Διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας, Διαδρομές 3-5: θετικά δείγματα από βαμβακοφόρους στυλεούς, Διαδρομές 6-8: θετικά δείγματα από κυτταροκαλλιέργειες.

Το προϊόν έχει μήκος 678 ζεύγη βάσεων.

Τα αποτελέσματα της RT-PCR για την ανίχνευση του γονιδίου M ήταν σε πλήρη συμφωνία με εκείνα που προέκυψαν από την ένθετη RT-PCR για το γονίδιο HA και την RT-PCR για το γονίδιο NA.

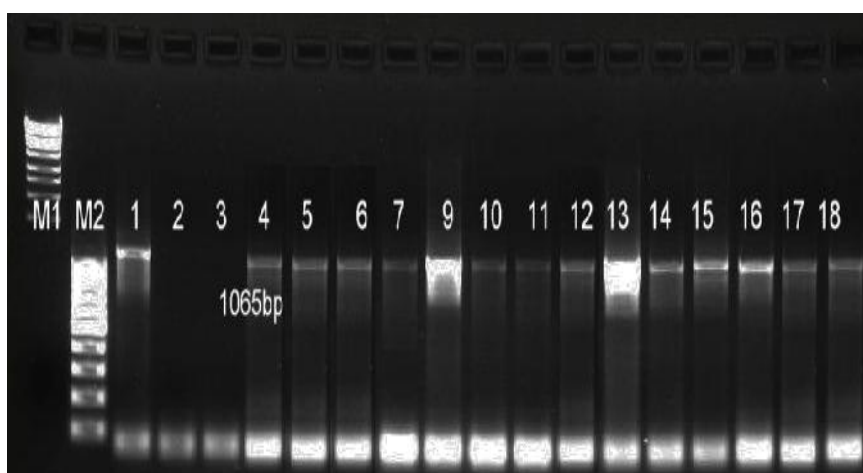
2.6 Αποτελέσματα RT-PCRs για την ενίσχυση των εσωτερικών γονιδίων (NP, NS, PB1, PB2, PA) των Ελληνικών στελεχών

Τα αποτελέσματα των RT-PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων NP, NS, PB1, PB2 και PA συμφωνούσαν με εκείνα που προέκυψαν από το χαρακτηρισμό του ιού. Θετική αντίδραση έδωσαν τα 18 κλινικά δείγματα και τα 16 απομονωθέντα σε κυτταροκαλλιέργειες Ελληνικά στελέχη (κεφ. 2.3) (Εικόνες 14-18).



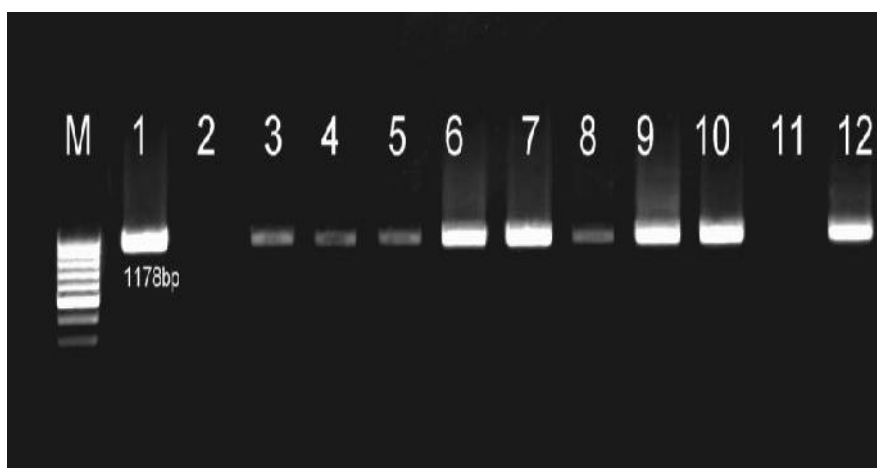
Εικόνα 14. RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου PB1 των Ελληνικών στελεχών.

Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους (1.500ζβ έως 10.000ζβ), Διαδρομή 1: θετικός μάρτυρας, Διαδρομή 8: αρνητικός μάρτυρας, Διαδρομές 2-7: δείγματα θετικά από εκχύλισμα θετικών κυτταροκαλλιιεργειών, Διαδρομή 9-14 : δείγματα θετικά από τους αντίστοιχους βαμβακοφόρους στυλεούς. Το προϊόν έχει μήκος 1.515 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 15. RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου PB2 των ελληνικών στελεχών.

Διαδρομές M1 και M2: δείκτες μοριακού βάρους 100ζβ έως 1.000ζβ και 1.500ζβ έως 10.000ζβ αντίστοιχα. Διαδρομή 1: θετικός μάρτυρας, Διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας, Διαδρομή 3: μη ενοφθαλμισμένη κυτταροκαλλιέργεια, Διαδρομές 4-18: δείγματα θετικά. Το προϊόν έχει μήκος 1.065 ζεύγη βάσεων.



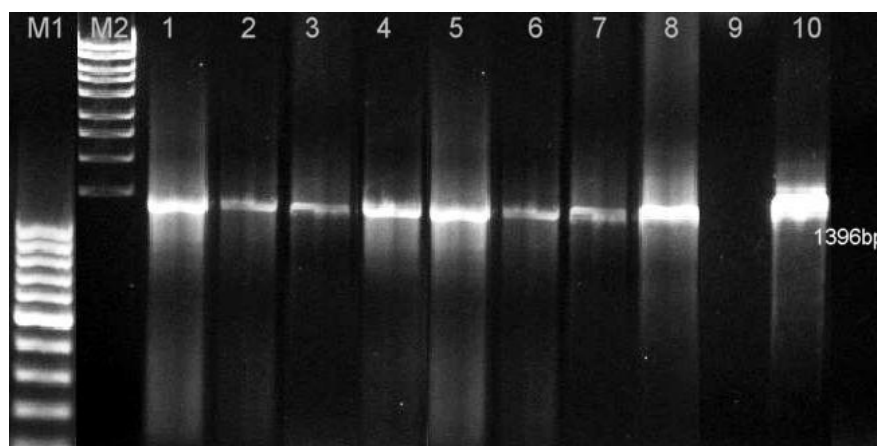
Εικόνα 16. RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου PA των ελληνικών στελεχών.

Διαδρομή M: δείκτης μοριακού βάρους (100ζβ έως 1.000ζβ). Διαδρομή 1: θετικός μάρτυρας, Διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας, Διαδρομές 3-10: δείγματα θετικά, Διαδρομή 11: υπερκείμενο υγρό αρνητικής κυτταροκαλλιέργειας (control), Διαδρομή 12: υπερκείμενο υγρό κυτταροκαλλιέργειας ενοφθαλμισμένης με το στέλεχος A/equine/ Newmarket/1/93 (θετικός μάρτυρας). Το προϊόν έχει μήκος 1.178 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 17. RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου NS των ελληνικών στελεχών.

Διαδρομές M1 και M2: δείκτες μοριακού βάρους 100ζβ έως 1.000ζβ και 1.500ζβ έως 10.000ζβ αντίστοιχα. Διαδρομή 1: θετικός μάρτυρας, Διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας, Διαδρομές 3-17: δείγματα θετικά. Το προϊόν έχει μήκος 713 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 18. RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου NP των ελληνικών στελεχών.

Διαδρομές M1 και M2: δείκτες μοριακού βάρους 100ζβ έως 1.000ζβ και 1.500ζβ έως 10.000ζβ αντίστοιχα. Διαδρομές 1-8: δείγματα θετικά, Διαδρομή 9: αρνητικός μάρτυρας, Διαδρομή 10: θετικός μάρτυρας. Το προϊόν έχει μήκος 1.396 ζεύγη βάσεων.

2.7 Αποτελέσματα προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των απομονωθέντων στελεχών

Μετά την αλληλούχιση των 8 γονιδιακών τμημάτων των απομονωθέντων στελεχών, που ενισχύθηκαν με RT-PCR, και την εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST χαρακτηρίστηκαν ως αντίστοιχα γονιδιακά τμήματα ιών γρίπης των ιπποειδών, υποτύπου H3N8.

Κατόπιν πολλαπλής στοίχισης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και υπολογισμό των ομοιοτήτων σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, διαπιστώθηκε ότι τα Ελληνικά στελέχη εμφάνιζαν μεταξύ τους ομοιότητα 100%, καθώς και πλήρη ομοιότητα μεταξύ απομονωθέντος σε κυτταροκαλλιέργειες και πρωτογενούς δείγματος. Για το λόγο αυτό τα Ελληνικά στελέχη κωδικοποιήθηκαν ως A/Equine/Athens/2003 και A/Equine/Athens/2007 για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2003 και του 2007, αντίστοιχα. Αναλυτικά αναφέρονται:

- *Γονίδιο HA*

Μετά από πολλαπλή στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου HA και υπολογισμό των ομοιοτήτων σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, διαπιστώθηκε ότι τα Ελληνικά στελέχη παρουσίασαν υψηλά ποσοστά ομοιότητας (97-100%) με στελέχη ιπποειδών που κυκλοφορούσαν παλαιότερα στην Ευρώπη, καθώς και με δύο στελέχη που απομονώθηκαν από χοίρους το 2005 και 2006 στην Κίνα και όχι με στελέχη που επικρατούσαν κατά την περίοδο των επιζωοτιών στην Ιταλία (A/equine/Bari/2005) και στην Αγγλία (A/equine/Newmarket/5/2003) (Πίνακας 6). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα Ελληνικά στελέχη παρουσιάζαν 100% ομοιότητα με το στέλεχος A/equine/Newmarket/2/1993 ως προς το γονίδιο HA.

Οι αλληλουχίες των Ελληνικών στελεχών κατατέθηκαν στο GenBank, με αριθμούς εισαγωγής HM164058, HM164059, FJ605181, FJ605182.

Πίνακας 6. Ποσοστό ομοιότητας του γονιδίου HA Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη

Διεθνή στελέχη (γονίδιο HA)	% ομοιότητα με τα Ελληνικά στελέχη
A/equine/Newmarket/2/1993	100%
A/equine/Italy/1199/1992	99,60%
A/equine/Berlin/1/1991	99,50%
A/equine/Roma/5/1991	99,50%
A/equine/Hong Kong/1/1992	99,40%
A/equi 2/Avesta/1993	99,30%
A/equine/Lambourn/22778/1992	99,10%
A/eq/Sussex/1989	98,90%
A/equine/Grobois/1/1998	98,90%
A/equine/Rook/93753/1989	98,80%
A/equine/Berlin/1/1989	98,80%
A/equine/Berlin/13/2002	98,60%
A/swine/Chibi/01/2005	98,40%
A/equine/Cheltenham/1/2001	98,30%
A/equine/Switzerland/173/1993	98,10%
A/equine/Leicestershire/1/2000	98,10%
A/equine/Lincolnshire/1/2002	98%
A/equine/Kentucky/1/1990	97,80%
A/equine/Kentucky/1/1992	97,50%
A/equine/Aboyne/1/2005	97,50%
A/equine/Switzerland/P112/2007	97,30%
A/equine/Cheshire/1/2006	96,80%
A/equine/Argentina/1/1996	95,90%
A/equine/Kentucky/5/2002	95,80%
A/eq/Ella/1989/	95,80%
A/equine/Wisconsin/1/2003	95,60%
A/equine/Newmarket/1/1993	95,60%
A/equine/Newmarket/5/2003	95,60%
A/equine/Berlin/2/1991	95,60%
A/equine/Bari/2005	95,20%
A/equine/Gansu/7/2008	95%
A/equine/Yorkshire/3/2009	95%
A/equine/Romania/1980	94,50%
A/equine/California/191/2003	94,40%
A/equine/Fontainebleau/1976	93,50%
A/equine/Miami/1/1963	91,40%
A/equine/Uruguay/1/1963	91,30%

Αναλύοντας τις αντικαταστάσεις σε επίπεδο αμινοξέων, οι οποίες διαφοροποιούν τα στελέχη του Αμερικανικού κλάδου (226Arg→Lys και 241Thr→Ile) από εκείνα του Ευρωπαϊκού κλάδου (43Val→Asp, 128Thr→Ile, 154Gln→Lys, 172Lys→Glu, 178Ile→Val και 238Pro→Leu) (Daly et al., 1996, Manuguerra et al., 2000) τα Ελληνικά στελέχη κατατάσσονται στον Ευρωπαϊκό κλάδο.

Τα Ελληνικά στελέχη διαφέρουν κατά 6 αμινοξέα (43Asp-Val, 100Gly-Arg, 123Gly-Glu, 209Met-Thr, 238Leu-Pro, 265Ile-Val) από το στέλεχος που απομονώθηκε στην Ελβετία το 2007, καθώς και από εκείνα που απομονώθηκαν στο Βερολίνο το 2002 (43Asp-Val, 100Gly-Arg, 121Lys-Glu, 209Met-Thr, 238Leu-Pro, 265Ile-Val). Με το στέλεχος A/equine/Lincolnshire/1/2002 διαφέρουν κατά 7 αμινοξέα στις θέσεις 48Asn-Ser, 100Gly-Arg, 122Ser-Phe, 207Ile-Val, 245Glu-Lys, 265Ile-Val και 269 Lys-Arg και μόνο κατά 4 αμινοξέα με το στέλεχος A/equine/Cheltenham/1/2001 (θέσεις 48Asn-Ser, 100Gly-Arg, 207Ile-Val, 269Lys-Arg).

- *Γονίδιο NA*

Μετά από πολλαπλή στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου NA και υπολογισμό των ομοιοτήτων σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, διαπιστώθηκε ότι τα Ελληνικά στελέχη παρουσίασαν υψηλά ποσοστά ομοιότητας (97-99,7%) με στελέχη που επικρατούσαν την περίοδο των επιζωοτιών (Πίνακας 6). Τα υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας τα εμφάνισαν με στελέχη που απομονώθηκαν στην Ασία την περίοδο 2007-2008 (Πίνακας 7).

Οι αλληλουχίες των Ελληνικών στελεχών κατατέθηκαν στο GenBank, με αριθμούς εισαγωγής HM164056, HM164057, HM164055, HM164054

Πίνακας 7. Ποσοστό ομοιότητας του γονιδίου NA των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη

Διεθνή στελέχη (γονίδιο NA)	% ομοιότητας με τα Ελληνικά στελέχη
A/equine/Gansu/7/2008(H3N8)	99,70%
A/equine/Inner Mongolia/8/2008(H3N8)	99,50%
A/equine/Xinjiang//2007(H3N8)	99,50%
A/equine/Huabei/1/2007(H3N8)	99,50%
A/equine/Liaoning/9/2008(H3N8)	99,20%

A/equine/Heilongjiang/10/2008(H3N8)	99%
A/equine/Kentucky/5/2002(H3N8)	98,70%
A/equine/Newmarket/5/2003(H3N8)	98,70%
A/equine/California/8560/2002(H3N8)	98,70%
A/equine/Mysore/1/2008	98,50%
A/equine/Ohio/1/2003(H3N8)	97,50%
A/equine/Wisconsin/1/2003(H3N8)	97,40%
A/equine/Newmarket/1/1993(H3N8)	97,20%
A/equine/New York/452/2003	97,20%
A/canine/New York/100528-6/2006	97,10%
A/equine/New York/452/2003(H3N8)	97%
A/equine/Kentucky/1/1992(H3N8)	97%
A/equine/Newmarket/2/1993	96,20%
A/equine/Sussex/1/1989	96,20%
A/equine/Roma/5/1991	95,90%
A/swine/Chibi/01/2005	95,30%
A/swine/Anhui/01/2006	95,30%
A/equine/Kentucky/1/1981	94,30%
A/equine/Fontainbleu/1/1979	93,30%
A/equine/Romania/1/1980	92,90%
A/Equine/Miami/1/1963	90,70%
A/equine/Uruguay/1/1963	90,60%

Μετά από πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών των αμινοξέων της πρωτεΐνης NA του ελληνικού στελέχους A/equine/Athens/2003 και A/equine/Athens/2007 με το A/equine/Gansu/2008 φαίνεται ότι στις θέσεις 209 και 229 υπήρξε μετάλλαξη (209Val-Ile, 229Arg-Cys). Τα στελέχη A/equine/Newmarket/5/03 και A/equine/Ohio/1/2003 – πρότυπα στελέχη των κλάδων II και I της Florida αντιστοίχως- φαίνεται ότι μοιράζονται τις ίδιες μεταλλάξεις στις θέσεις 9Thr- Ala, 12Ser-Phe, 40Glu-Gly, 66His-Tyr, 119Ile-Val και 229Arg-Cys, ενώ το στέλεχος A/equine/Ohio/1/2003 παρουσιάζει τρεις επιπλέον μεταλλάξεις στις θέσεις 42Gly-Asp, 70Ala-Thr και 78Pro-Ser. Ο κύριος εκπρόσωπος του Ευρωασιατικού κλάδου, δηλαδή το στέλεχος A/equine/Newmarket/2/93, παρουσιάζει 13 μεταλλάξεις (θέσεις 9, 17, 20, 40, 46, 61, 66, 70, 72, 78, 191, 219, 229) στην αλληλουχία της πρωτεΐνης NA σε σύγκριση με τα Ελληνικά στελέχη, εννέα από τις οποίες απαντώνται και στο στέλεχος A/equine/Newmarket/1/1993 (9, 40, 61, 66, 70, 72, 78, 191, 229).

- *Γονίδιο M*

Μετά τον προσδιορισμό των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των προϊόντων της RT-PCR για το γονίδιο M από το υπερκείμενο υγρό των κυτταροκαλλιιεργειών και από τους στυλεούς, και την εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST, αυτές παρουσίασαν ομοιότητα με άλλα διεθνή στελέχη ιπποειδών. Το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και σε επίπεδο αμινοξέων, το εμφάνισαν με το στέλεχος A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8). Από την αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων του γονιδίου M των Ελληνικών στελεχών με άλλα στελέχη γρίπης A κατατεθειμένα στο GenBank, προέκυψε ότι τα Ελληνικά στελέχη προσομοιάζουν με τα διεθνή στελέχη του υπότυπου 2 (A/equine/H3N8) (Πίνακας 8), και με τα περισσότερα από αυτά διαφέρουν μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο και ένα αμινοξύ. Συγκεκριμένα, τα Ελληνικά στελέχη διαφέρουν κατά ένα αμινοξύ με το στέλεχος A/equine/Gansu/2008 στην θέση 3Asn-Asp. Δεδομένου ότι η εν λόγω περιοχή του γονιδίου M είναι συντηρημένη, τα στελέχη που έχουν απομονωθεί κατά περιόδους δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές.

Οι αλληλουχίες των Ελληνικών στελεχών κατατέθηκαν στο GenBank, με αριθμούς εισαγωγής EU647883 και EU647883.2.

Πίνακας 8. Ποσοστό ομοιότητας του γονιδίου M των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη

Διεθνή στελέχη (γονίδιο M)	% ομοιότητα με τα Ελληνικά στελέχη
A/equine/Liaoning/9/2008	99,50%
A/equine/Kentucky/3/1981	99,50%
A/equine/Kentucky/2/1980	99,50%
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	99,50%
A/equine/Gansu/7/2008	99,50%
A/donkey/Xinjiang/5/2007	99,50%
A/equine/Wisconsin/1/2003	99%
A/canine/Philadelphia/2008	98%
A/equine/Ohio/1/2003	99%
A/equine/Hubei/6/2008	99%
A/equine/Huabei/1/2007	99%
A/equine/Fontainbleu/1/1979	99%
A/eq/LaPlata/1993	99%
A/equine/Switzerland/173/1993	98,60%
A/equine/Roma/5/1991	98,60%
A/equine/New York/146066/2007	98,60%
A/equine/Hong Kong/J/1992	98,60%

A/equine/Newmarket/5/2003	98,10%
A/equine/Kentucky/5/2002	98,10%
A/eq/Miami/1963	98,10%
A/eq/Kentucky/199292(H3N8)	98,10%
A/eq/Lambourn/22778/1992	98%
A/equine/Newmarket/2/1993	97,60%
A/equine/Newmarket/1/1993	97,20%

- *Γονίδιο PB1*

Στο γονίδιο PB1, τα υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας (99%), σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, τα εμφάνιζαν τα Ελληνικά στελέχη με εκείνα που κατατάσσονται στον κλαδο Florida II. Πιο συγκεκριμένα, παρουσίαζαν 99,3% ομοιότητα με τα στελέχη A/equine/Newmarket/5/2003 και A/equine/California/8560/2002 (Πίνακα 9).

Οι αλληλουχίες των Ελληνικών στελεχών κατατέθηκαν στο GenBank, με αριθμούς εισαγωγής HQ696123 και HQ696122.

Πίνακας 9. Ποσοστό ομοιότητας του γονιδίου PB1 των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη

Διεθνή στελέχη (γονίδιο PB1)	% ομοιότητα με τα Ελληνικά στελέχη
A/equine/Newmarket/5/2003	99,30%
A/equine/California/8560/2002	99,30%
A/equine/Kentucky/5/2002	99,20%
A/equine/Hubei/6/2008	98,90%
A/equine/Huabei/1/2007	98,70%
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	98,60%
A/equine/Gansu/7/2008	98,60%
A/equine/Ohio/1/2003	98,40%
A/equine/Wisconsin/1/2003	98,20%
A/donkey/Xinjiang/5/2007	98,00%
A/equine/Newmarket/1/1993	97,20%
5A/equine/Kentucky/1/1992	96,70%
A/equine/Sussex/1/1989	96,50%
A/equine/Berlin/1/1989	96,50%
A/equine/Roma/5/1991	96,50%
A/equine/Newmarket/2/1993	96,30%
/equine/Austria/421/1992	96,30%
A/equine/Switzerland/173/1993	96,20%

A/equine/Miami/1/1963	92,80%
A/equine/Uruguay/1/1963	92,40%

Τα Ελληνικά στελέχη, σε σχέση με τα δύο προαναφερθέντα διεθνή στελέχη, διαφέρουν κατά δύο αμινοξέα, στις θέσεις 119 και 387. Από την πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών των αμινοξέων στελεχών με τα Ελληνικά φαίνεται ότι τα Ελληνικά στελέχη, τόσο του 2003 όσο και του 2007, μοιράζονται τις ίδιες αντικαταστάσεις σε κάποιες θέσεις με τα στελέχη που απομονώθηκαν στην Ασία τα έτη 2007 και 2008. Για παράδειγμα, στις θέσεις 13 και 296 των ελληνικών στελεχών, ενώ υπάρχει αντικατάσταση αμινοξέων σε σχέση με τα στελέχη A/equine/Newmarket/5/2003 και A/equine/California/8560/2002, παρατηρείται ταύτιση με τα στελέχη που απομονώθηκαν στην Ασία το 2007 και το 2008, δηλώνοντας ίσως ότι τα Ελληνικά στελέχη είναι πρόδρομοι των Ασιατικών στελεχών. Αξιοσημείωτο είναι ότι στη θέση 455 εμφανίζεται κωδικόνιο λήξης σε όλα τα στελέχη που ανήκουν στον Αμερικανικό κλάδο (συμπεριλαμβανομένου των Ελληνικών), το οποίο δεν υπάρχει στα στελέχη του Ευρωασιατικού κλάδου.

- *Γονίδιο PB2*

Στο γονίδιο PB2, τα Ελληνικά στελέχη εμφάνισαν τα υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας (πάνω από 99%) σε επίπεδο νουκλεοτιδίων με στελέχη που απομονώθηκαν από επιζωοτίες στην Ασία τα έτη 2007-2008, αλλά και με τα στελέχη A/equine/Newmarket/5/2003 και A/equine/California/8560/2002, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 10.

Οι αλληλουχίες των Ελληνικών στελεχών κατατέθηκαν στο GenBank, με αριθμούς εισαγωγής HQ696124 και HQ696125.

Πίνακας 10. Ποσοστό ομοιότητας γονιδίου PB2 των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη

Διεθνή στελέχη (γονίδιο PB2)	% ομοιότητα με τα Ελληνικά στελέχη
A/equine/Xinjiang/1/2007	99,30%
A/equine/Gansu/7/2008	99,30%
A/equine/Liaoning/9/2008	99,30%

A/equine/Hubei/6/2008	99,30%
A/equine/Xinjiang/2/2007	99,10%
A/equine/California/8560/2002	99,10%
A/equine/Newmarket/5/2003	99,10%
A/equine/Kentucky/5/2002	99,10%
A/equine/Xinjiang/4/2007	98,80%
A/equine/Massachussetts/213/2003	98,60%
A/equine/Wisconsin/120/03	98,50%
A/equine/New York/452/2003	98,50%
A/equine/California/191/2003	98,50%
A/equine/Ohio/1/2003	98,20%
A/equine/New York/146066/2007	97,60%
A/equine/Newmarket/1/1993	97,60%
A/equine/Newmarket/2/1993	97,30%
A/equine/Sussex/1/1989	96,50%
A/equine/Austria/421/1992	96,20%
A/equine/Switzerland/173/1993	96,10%
A/equine/Fontainbleu/1/1979	95,60%
A/equine/Miami/1/1963	93,30%
A/equine/Uruguay/1/1963	93,20%

Σε επίπεδο νουκλεοτιδίων του γονιδίου PB2, φαίνεται ότι ενώ τα Ελληνικά στελέχη διαφέρουν κατά 6 νουκλεοτίδια με το στέλεχος A/equine/Gansu/2008, σε επίπεδο αμινοξέων έχουν 100% ομοιότητα. Η πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών της PB2 πρωτεΐνης έδειξε ότι η εν λόγω πρωτεΐνη είναι αρκετά συντηρημένη, αφού τα Ελληνικά στελέχη παρουσιάζουν 99,10% ποσοστό ομοιότητας με το στέλεχος A/equine/Newmarket/5/03 και εμφανίζουν διαφορά σε ένα μόνο αμινοξύ, στη θέση 147Lys-Arg. Η ίδια αντικατάσταση αμινοξέος παρατηρείται και στο στέλεχος A/equine/Newmarket/2/93, το οποίο παρουσιάζει 100% ομοιότητα με το A/equine/Newmarket/5/03.

- *Γονίδιο PA*

Μετά από πολλαπλή στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου PA και υπολογισμό των ομοιοτήτων σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, διαπιστώθηκε ότι τα Ελληνικά στελέχη παρουσίασαν υψηλά ποσοστά ομοιότητας (97,9-99,7%) με στελέχη που επικρατούσαν την περίοδο των επιζωοτιών διεθνώς

(Πίνακα 11). Τα υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας τα εμφάνιζαν με στελέχη που απομονώθηκαν στην Ασία την περίοδο 2007-2008 (Πίνακας 11).

Οι αλληλουχίες των Ελληνικών στελεχών κατατέθηκαν στο GenBank, με αριθμούς εισαγωγής HQ696120 και HQ696121.

Σε επίπεδο αμινοξέων παρουσίαζαν 100% ομοιότητα με το στέλεχος A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) PA.

Πίνακας 11. Ποσοστό ομοιότητας γονιδίου PA των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη

Διεθνή στελέχη (γονίδιο PA)	% ομοιότητα με τα Ελληνικά στελέχη
A/equine/Gansu/7/2008 PA	99,70%
A/equine/Huabei/1/2007 PA	99,70%
A/equine/Xinjiang/4/2007 PA	99,70%
A/equine/Xinjiang/2/2007 PA	99,70%
A/equine/Xinjiang/1/2007 PA	99,70%
A/equine/Hubei/6/2008 PA	99,70%
A/equine/Liaoning/9/2008 PA	99,70%
A/equine/Heilongjiang/10/2008 PA	99,60%
A/equine/Inner Mongolia/8/2008 PA	99,60%
A/equine/Xinjiang/3/2007 PA	99,50%
A/equine/Newmarket/5/2003 PA	99,30%
A/equine/California/8560/2002 PA	99,20%
A/equine/Kentucky/5/2002 PA	99,20%
A/equine/Ohio/1/2003 PA	99%
A/equine/Newmarket/1/1993 PA	98,10%
A/equine/Wisconsin/1/2003 PA	97,90%
A/equine/Roma/5/1991 PA	96,30%
A/equine/Sussex/1/1989 PA	96,20%
A/equine/Switzerland/173/1993 PA	96%
A/equine/Newmarket/2/1993 PA	96%
A/equine/Fontainbleu/1/1979 PA	94,40%
/equine/Miami/1/1963 PA	92,50%
A/equine/Uruguay/1/1963 PA	92,40%

- *Γονίδιο NP*

Μετά από πολλαπλή στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου NP και υπολογισμό των ομοιοτήτων σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, διαπιστώθηκε ότι τα Ελληνικά στελέχη παρουσίασαν υψηλά ποσοστά ομοιότητας (98,9-99,6%) με στελέχη που επικρατούσαν την περίοδο των επιζωοτιών (Πίνακας 12).

Το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας (99,6%) το εμφάνιζαν με στελέχη που απομονώθηκαν στην Ασία το 2007 και το 2008, αλλά και με τα στελέχη A/equine/California/8560/2002, A/equine/Kentucky/5/2002 και A/equine/Newmarket/5/2003. Τα ποσοστά ομοιότητας των Ελληνικών στελεχών με άλλα διεθνή στελέχη συνοψίζονται στον πίνακα 12.

Οι αλληλουχίες των Ελληνικών στελεχών κατατέθηκαν στο GenBank, με αριθμούς εισαγωγής HQ696116 και HQ696117.

Πίνακας 12. Ποσοστό ομοιότητας γονιδίου NP των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη

Διεθνή στελέχη (γονίδιο NP)	% ομοιότητα με τα Ελληνικά στελέχη
A/equine/California/8560/2002(H3N8)	99,60%
A/equine/Gansu/7/2008(H3N8)	99,60%
A/equine/Hubei/6/2008(H3N8)	99,60%
A/equine/Huabei/1/2007(H3N8)	99,60%
A/equine/Kentucky/5/02(H3N8)	99,60%
A/equine/Xinjiang/2007(H3N8)	99,60%
A/equine/Newmarket/5/2003(H3N8)	99,50%
A/equine/Heilongjiang/10/2008(H3N8)	99,40%
A/equine/Inner Mongolia/8/2008(H3N8)	99,40%
A/equine/Liaoning/9/2008(H3N8)	99,40%
A/equine/Wisconsin/1/2003(H3N8)	99%
A/equine/Ohio/1/2003(H3N8)	98,90%
A/equine/Newmarket/1/1993(H3N8)	98,60%
A/equine/Sussex/1/1989(H3N8)	97,30%
A/equine/Berlin/1/1989(H3N8)) NP	97,10%
A/equine/Roma/5/1991(H3N8)	97,10%
A/equine/Switzerland/173/1993(H3N8)	96,90%
A/equine/Newmarket/2/1993(H3N8)	96,80%

A/equine/Fontainbleu/1/1979(H3N8)	95,10%
A/equine/Miami/1/1963(H3N8)	93,70%
A/equine/Uruguay/1/1963(H3N8)	93,50%

Η πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών των αμινοξέων των Ελληνικών στελεχών με διεθνή έδειξε ότι παρουσιάζουν μετάλλαξη μόνο σε ένα αμινοξύ (θέση 226 Pe-Thr) σε σχέση με το στέλεχος A/equine/Gansu/08 και σε δύο αμινοξέα (θέσεις 105 Pe-Met, 328Ala-Thr) σε σχέση με τα στελέχη A/equine/Newmarket/5/03 και A/equine/Kentucky/ 5/2002. Με το στέλεχος A/equine/Ohio/1/2003 – στέλεχος του κλάδου II της Florida- μοιράζονται τις ίδιες μεταλλάξεις (θέσεις 105 και 328) καθώς και μία επιπλέον στη θέση 419Ser-Asn. Αξιοσημείωτο είναι ότι το στέλεχος A/equine/Newmarket/1/93, μέλος του Αμερικανικού κλάδου, παρουσιάζει δύο μεταλλάξεις αμινοξέων σε σύγκριση με τα Ελληνικά στελέχη, εκ των οποίων η μία παρατηρείται σε στελέχη του κλάδου II της Florida (θέση 105 Pe-Met) και η άλλη σε στελέχη του κλάδου I της Florida (θέση 419 Ser-Asn). Το στέλεχος A/equine/Newmarket/2/1993, κύριος εκπρόσωπος του Ευρωασιατικού κλάδου, παρουσιάζει 5 μεταλλάξεις συγκριτικά με τα Ελληνικά στελέχη στις θέσεις 74 Met-Pe, 88Pe-Val, 105Pe-Met, 159Val-Pe και 353Lys-Arg.

- *Γονίδιο NS*

Μετά από πολλαπλή στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου NS και υπολογισμό των ομοιοτήτων σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, διαπιστώθηκε ότι τα Ελληνικά στελέχη παρουσίασαν υψηλά ποσοστά ομοιότητας (98-99,5%) με στελέχη που επικρατούσαν την περίοδο των επιζωοτιών (Πίνακας 13). Τα υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας (πάνω από 99%) σε επίπεδο νουκλεοτιδίων το εμφάνιζαν με στελέχη που απομονώθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο τα έτη 2003, 2005 και 2007 και πιο συγκεκριμένα με το στέλεχος A/equine/Essex/1/2005, με το οποίο το ποσοστό ομοιότητας ανέρχεται στο 99,5%. Το αντιπροσωπευτικό στέλεχος του κλάδου Florida II, A/equine/Newmarket/5/2003, παρουσιάζει 99,2% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων με τα Ελληνικά στελέχη, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 13.

Οι αλληλουχίες των Ελληνικών στελεχών κατατέθηκαν στο GenBank, με αριθμούς εισαγωγής HQ696118 και HQ696119.

Πίνακας 13. Ποσοστό ομοιότητας του γονιδίου NS των Ελληνικών στελεχών με διεθνή δημοσιευμένα στελέχη

Διεθνή στελέχη (γονίδιο NS)	% ομοιότητα με τα Ελληνικά στελέχη
A/equine/Essex/1/2005 NS	99,50%
A/equine/Lanark/1/2006 NS	99,50%
A/equine/Hubei/6/2008(H3N8)	99,30%
A/equine/Inner Mongolia/8/2008(H3N8)	99,30%
A/equine/Maidstone/2/2007 NS	99,30%
A/equine/Newmarket/5/2003(H3N8)	99,20%
A/equine/Cheshire/3/2007 NS	99,20%
A/equine/California/8560/2002 NS	99,20%
5A/equine/Horsham/1/2007 NS	99,20%
A/equine/Kentucky/5/2002 NS	99,20%
A/equine/Ohio/1/2003(H3N8)	99%
/equine/Cheshire/1/2007 NS	99%
A/equine/Huabei/1/2007 NS	99%
A/equine/Kentucky/9/2004 NS	99%
A/equine/Gansu/7/2008(H3N8)	98,90%
A/equine/Cheshire/2/2007	98,90%
A/equine/Kentucky/7/2007NS	98,90%
A/equine/Florida/2/2006 NS	98,60%
A /equine/Kentucky/4/2007	98,60%
/equine/California/2/2007 NS	98,60%
A/equine/Kentucky/4/2007 NS	98,60%
A/equine/California/1/2007	98,40%
A/equine/Wisconsin/1/2003(H3N8)	98%
A/equine/Kentucky/1/1992 NS	97,80%
A/equine/Ahmedabad/1/2009 NS	97,70%
A/equine/Newmarket/1/1993 NS	97,30%
A/equine/Berlin/1/1989 NS	97,30%
A/equine/Roma/5/1991	97,20%
A/equine/Cheshire/1/2006 NS	97,20%
A/equine/Switzerland/173/1993 NS	97%
A/equine/Switzerland/P112/2007 NS	97%
A/equine/Austria/421/1992 NS	96,40%
A/equine/Avesta/1/1993 NS	96,40%

A/equine/Newmarket/2/1993	96,40%
A/eq/Hong Kong/1/92 NS	96,30%
A/equine/New Market/1979 NS	95,80%
A/equine/Miami/1/1963 NS	95,50%
A/equine/Grobois/1/98 NS	95,40%
A/equine/Lincolnshire/1/2002 NS	95,20%
A/eq/Lambourn/22778/92 NS	94,90%
A/equine/Fontainebleau/1979 NS	94,70%
A/equine/Aboyne/1/2005 NS	94,30%
A/equine/Lincolnshire/1/2006 NS	93,70%

Η πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών των αμινοξέων των Ελληνικών στελεχών με διεθνή έδειξε ότι υπάρχει μετάλλαξη ενός μόνο αμινοξέος, στη θέση 216 Ile-Thr, συγκριτικά με το στέλεχος A/equine/Essex/1/2005. Σε σύγκριση με το στέλεχος A/equine/Gansu/2008 το ποσοστό ομοιότητας των Ελληνικών στελεχών, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, είναι 98,9%, όμως σε επίπεδο αμινοξέων υπάρχει αντικατάσταση μόνο σε δύο θέσεις, τις 45Ala και 47Ile-Thr. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στη θέση 220 υπάρχει ένα κωδικόνιο λήξης που παρατηρείται μόνο στα στελέχη που απομονώθηκαν από το 2003 και μετά, ενώ τα παλαιότερα στελέχη εμφανίζουν αμινοξύ στη θέση αυτή και η πρωτεΐνη σταματά στην θέση 231.

Τα Ελληνικά στελέχη, κατά τη σύγκριση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών NA, NP, PB2, PB1 και PA, μοιράζονται τις ίδιες αντικαταστάσεις αμινοξέων με τα στελέχη που απομονώθηκαν στην Ασία (Ινδία- Κίνα) τα έτη 2007-2008 και ανήκουν στον κλάδο Florida II. Αυτές οι αντικαταστάσεις φαίνεται να είναι μοναδικές, καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί σε άλλα προγενέστερα στελέχη. Δεν μοιράζονται όμως αντίστοιχες μοναδικές αντικαταστάσεις και για τις πρωτεΐνες M1 και NS1. Οι αντικαταστάσεις συνοψίζονται στον πίνακα 14.

Πίνακας 14. Επαναλαμβανόμενες πρότυπες αντικαταστάσεις αμινοξέων στα Ελληνικά στελέχη

Πρωτεΐνη	NA (N8)				NP	PB1	PB2	PA			
	9	40	66	191				136	119	251	158
Θέση	9	40	66	191	136	119	251	158	237	321	337
Ελληνικά στελέχη	T	E	H	I	I	M	K	R	K	N	T
Ασιατικά στελέχη (Ινδία- Κίνα) 2007-2008	T	E	H	I	I	M	K	R	K	N	T
Στελέχη H3N8 (1993-2003)	A	G	Y	V	M	V	R	K	E	S	A

2.8. Φυλογενετική ανάλυση των Ελληνικών στελεχών

Το αποτέλεσμα της φυλογενετικής ανάλυσης των Ελληνικών στελεχών με τη μέθοδο «Ένωσης Γειτόνων», υποστηρίζει αυτό της αλληλούχισης των πρωτεϊνών του ιού, δηλαδή όλα τα Ελληνικά στελέχη είναι όμοια καθώς σχηματίζουν αυτοτελή κλάδο ή κατατάσσονται στον ίδιο φυλογενετικό κλάδο.

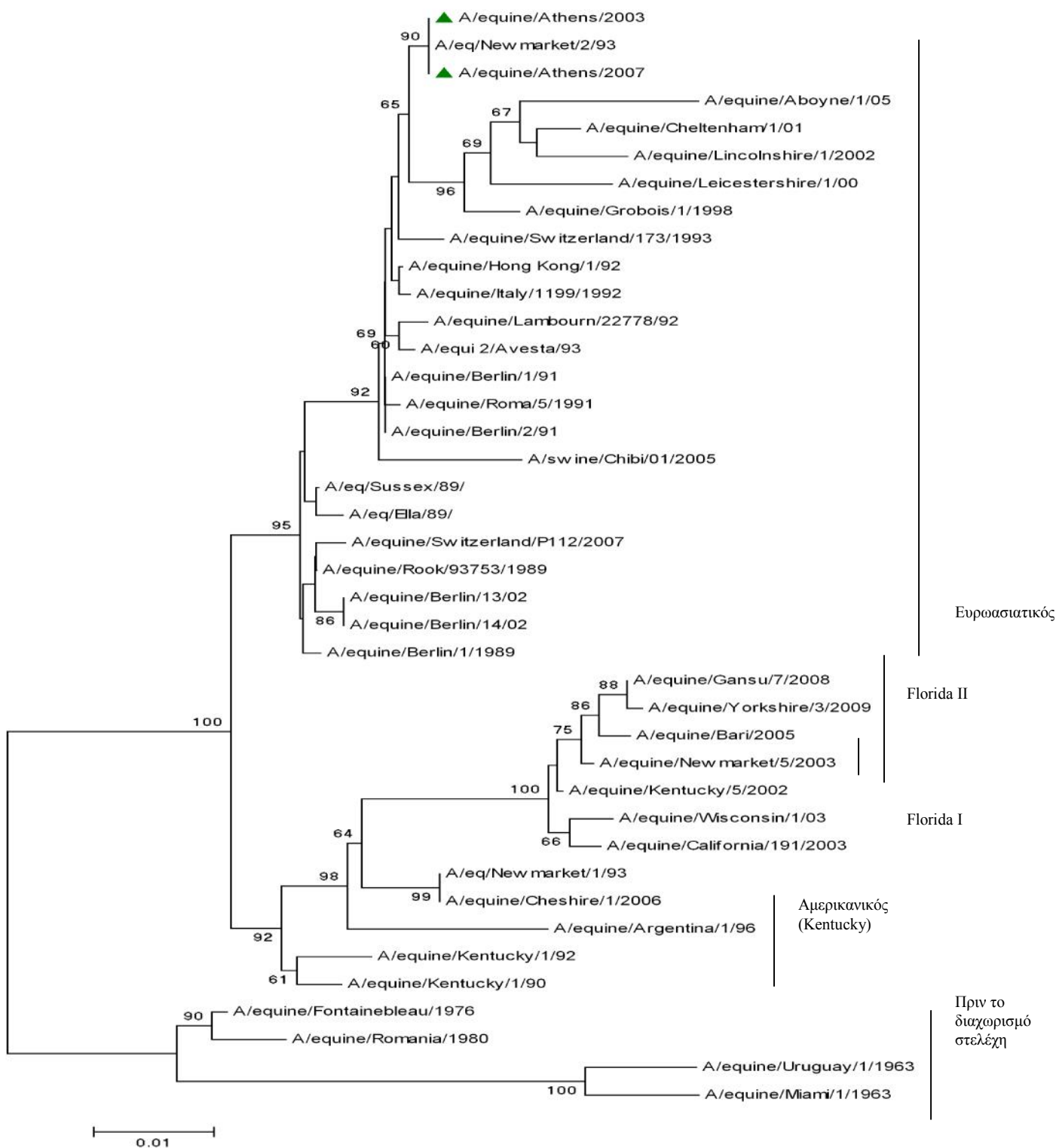
Ο υπολογισμός των τοπολογιών του φυλογενετικού δέντρου για τις πρωτεΐνες HA, NA, NS1, NP και PB1 παρουσιάζει τέσσερεις κύριους κλάδους: τον προ-διαφοροποίησης των στελεχών κλάδο, τον Ευρωασιατικό, τον Αμερικανικό και τον κλάδο της Florida. Στον τελευταίο κλάδο υπήρξε περαιτέρω διαφοροποίηση σε δύο υποκλάδους, τον Florida clade I και Florida clade II, η οποία στηρίζεται με τιμή αυτοδυναμίας 100% για τις πρωτεΐνες HA, NA, NS1 και NP και 99% για την PB1 πρωτεΐνη στα αντίστοιχα φυλογενετικά δέντρα (Εικόνες 19-23).

Το σύνολο των Ελληνικών στελεχών, βάσει της πρωτεΐνης HA, ανήκουν στον Ευρωασιατικό κλάδο των ιών της γρίπης των ιπποειδών. Ταξινομούνται μαζί με το στέλεχος A/equine/Newmarket/2/1993 και ομαδοποιούνται με στελέχη που απομονώθηκαν στην Ευρώπη τη δεκαετία του 1990, αλλά και με πιο πρόσφατα στελέχη που απομονώθηκαν από το 2000 και μετά (Εικόνα 18). Αντιθέτως, βάσει των πρωτεϊνών NA, NS1, NP και PB1 τα Ελληνικά στελέχη, και από τις δύο επιζωοτίες, σχηματίζουν αυτοτελή κλάδο ανάμεσα σε στελέχη που ανήκουν στον «Αμερικανικό» κλάδο και πιο συγκεκριμένα στον Florida II (Εικόνες 19-22).

Ο υπολογισμός των τοπολογιών του φυλογενετικού δέντρου για την πρωτεΐνη PA δεν παρουσιάζει το διαχωρισμό των στελεχών σε τέσσερεις κλάδους, αλλά στους τρεις βασικούς κλάδους, δηλαδή τον προ-διαφοροποίησης των στελεχών κλάδο, τον Ευρωασιατικό και τον Αμερικανικό (Εικόνα 24). Στο φυλογενετικό δέντρο φαίνεται ότι το στέλεχος A/equine/ Newmarket/5/2003 είναι κοινός πρόγονος για τα Ελληνικά στελέχη, αλλά και για τα στελέχη που απομονώθηκαν στην Ασία το 2007 και το 2008.

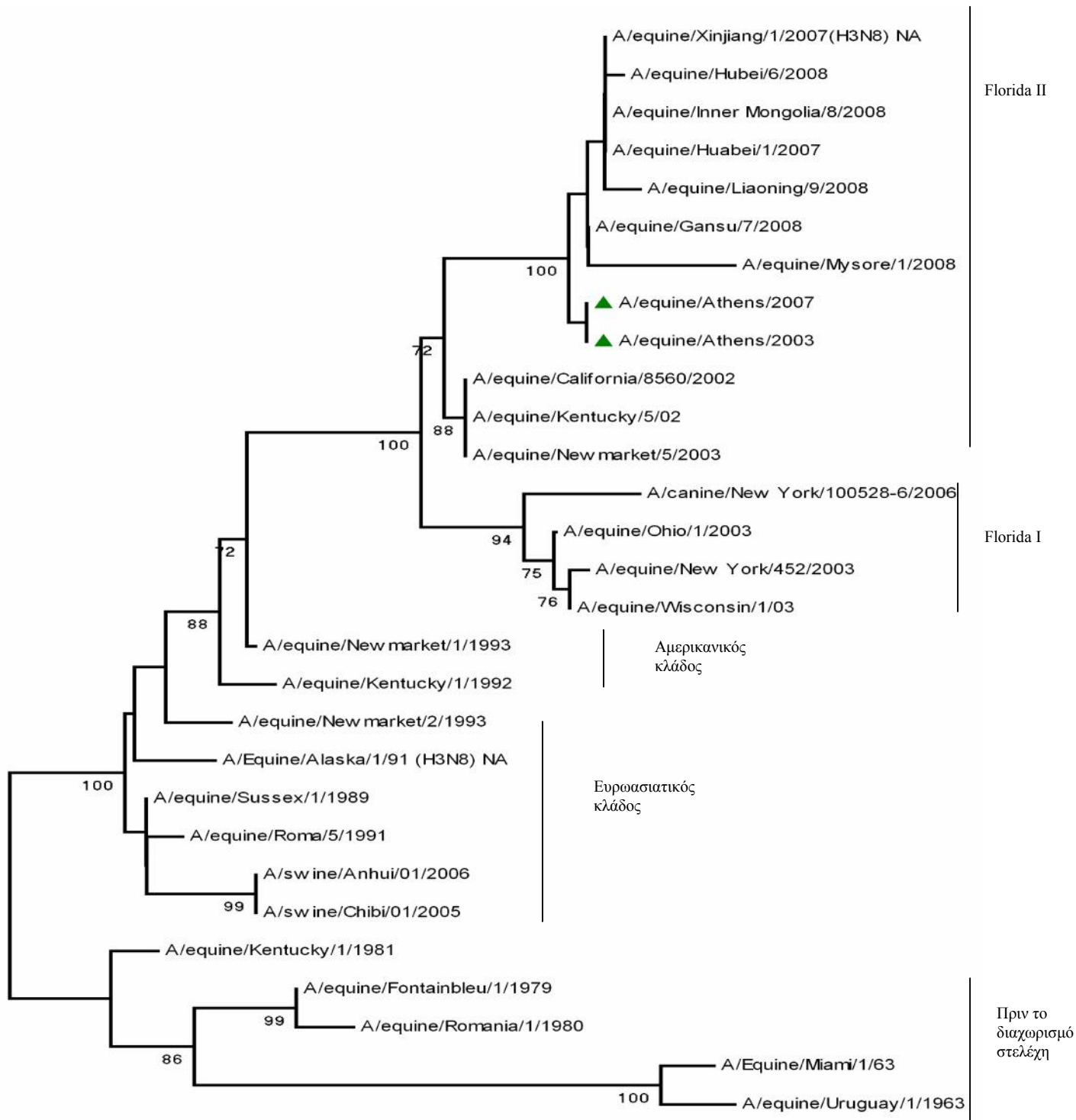
Αντιθέτως, ο υπολογισμός των τοπολογιών του φυλογενετικού δέντρου για τις πρωτεΐνες M1 και PB2 δείχνει ότι πολλά στελέχη που απομονώθηκαν την τελευταία δεκαετία κατατάσσονται στους ίδιους κλάδους με τα προγενέστερης δεκαετίας στελέχη, χωρίς να μπορεί να γίνει κάποιος διαχωρισμός. Αυτό υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες M1 και PB2 είναι αρκετά συντηρημένες και δεν παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα με την πάροδο του χρόνου. Ως προς τις εν λόγω πρωτεΐνες το σύνολο των Ελληνικών στελεχών σχημάτισαν έναν αυτοτελή κλάδο, ο οποίος

συμπεριλαμβάνεται σε ένα μεγαλύτερο, με στελέχη που απομονώθηκαν στην Ασία το 2007 και το 2008 (Εικόνες 25 & 26).



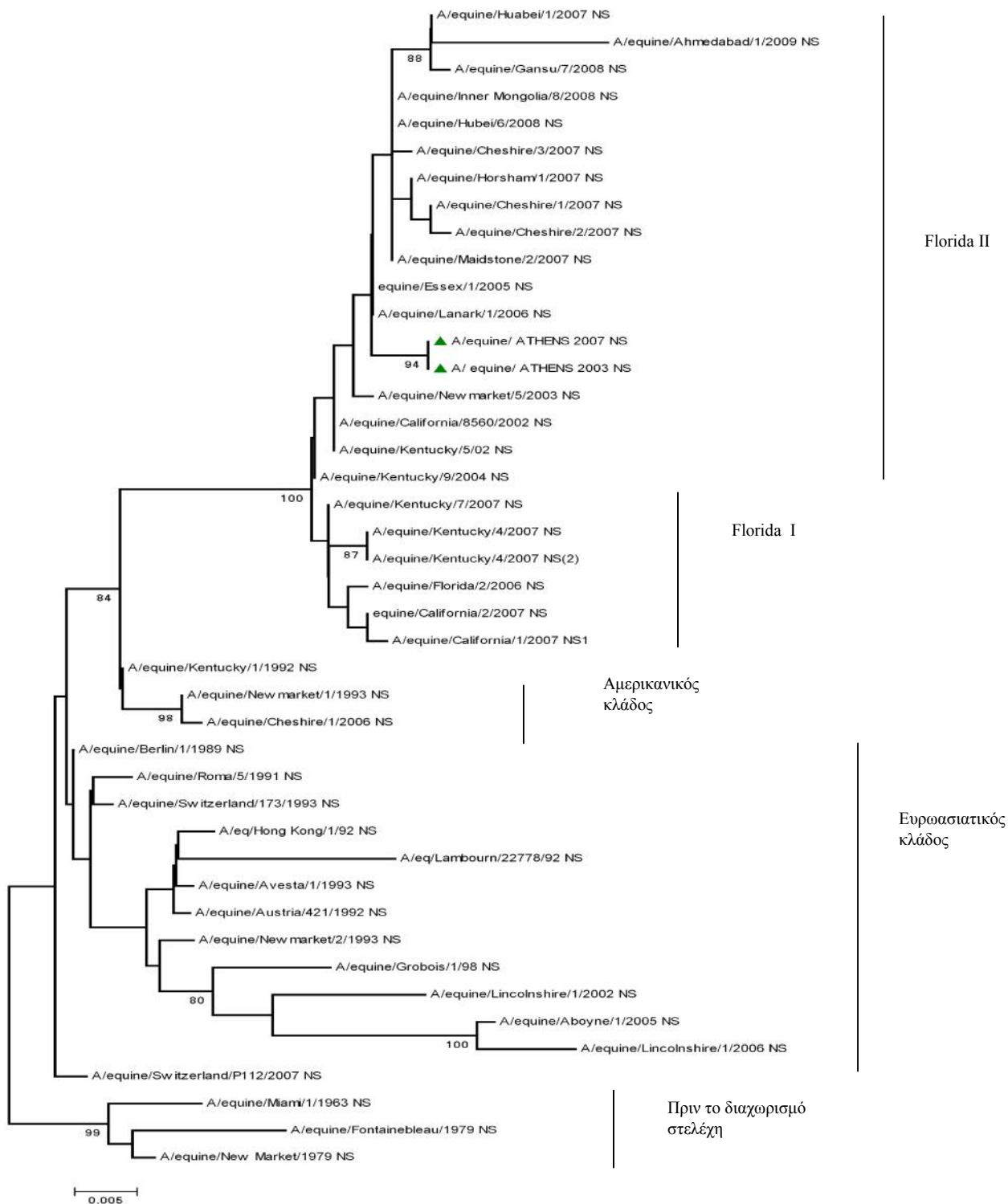
Εικόνα 19. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην πρωτεΐνη HA με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.

Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps». Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Τα Ελληνικά στελέχη δεδομένου ότι παρουσιάζουν ομοιότητα 100% κωδικοποιήθηκαν ως εξής: A/Equine/Athens/2003, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2003, και A/Equine/Athens/2007, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2007.



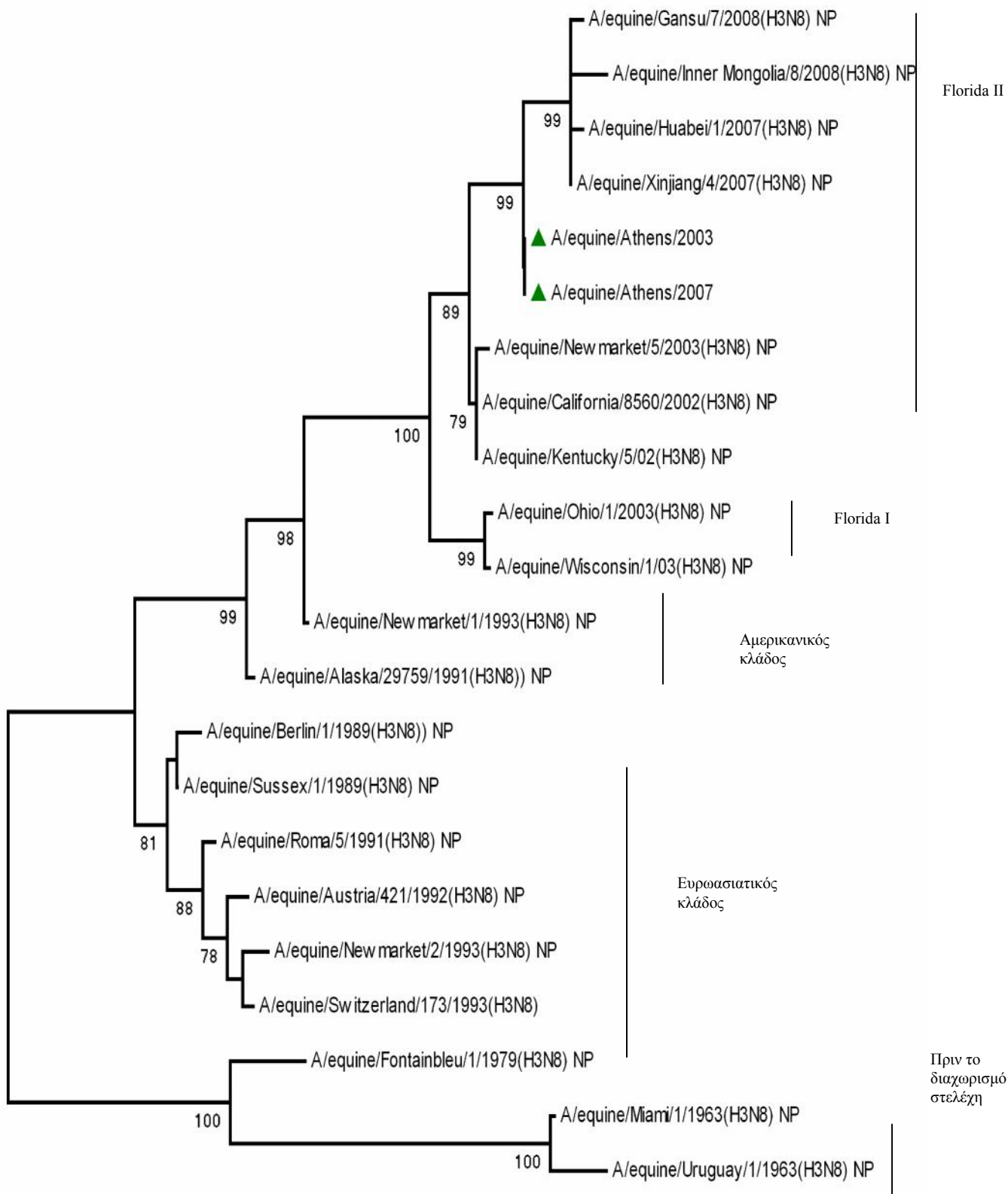
Εικόνα 20. Υπολογισμός δέντρου «Ενώσης Γειτόνων» που αφορά στην πρωτεΐνη NA με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.

Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps». Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Τα Ελληνικά στελέχη δεδομένου ότι παρουσιάζουν ομοιότητα 100% κωδικοποιήθηκαν ως εξής: A/Equine/Athens/2003, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2003, και A/Equine/Athens/2007, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2007.



Εικόνα 21. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην πρωτεΐνη NS1 με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.

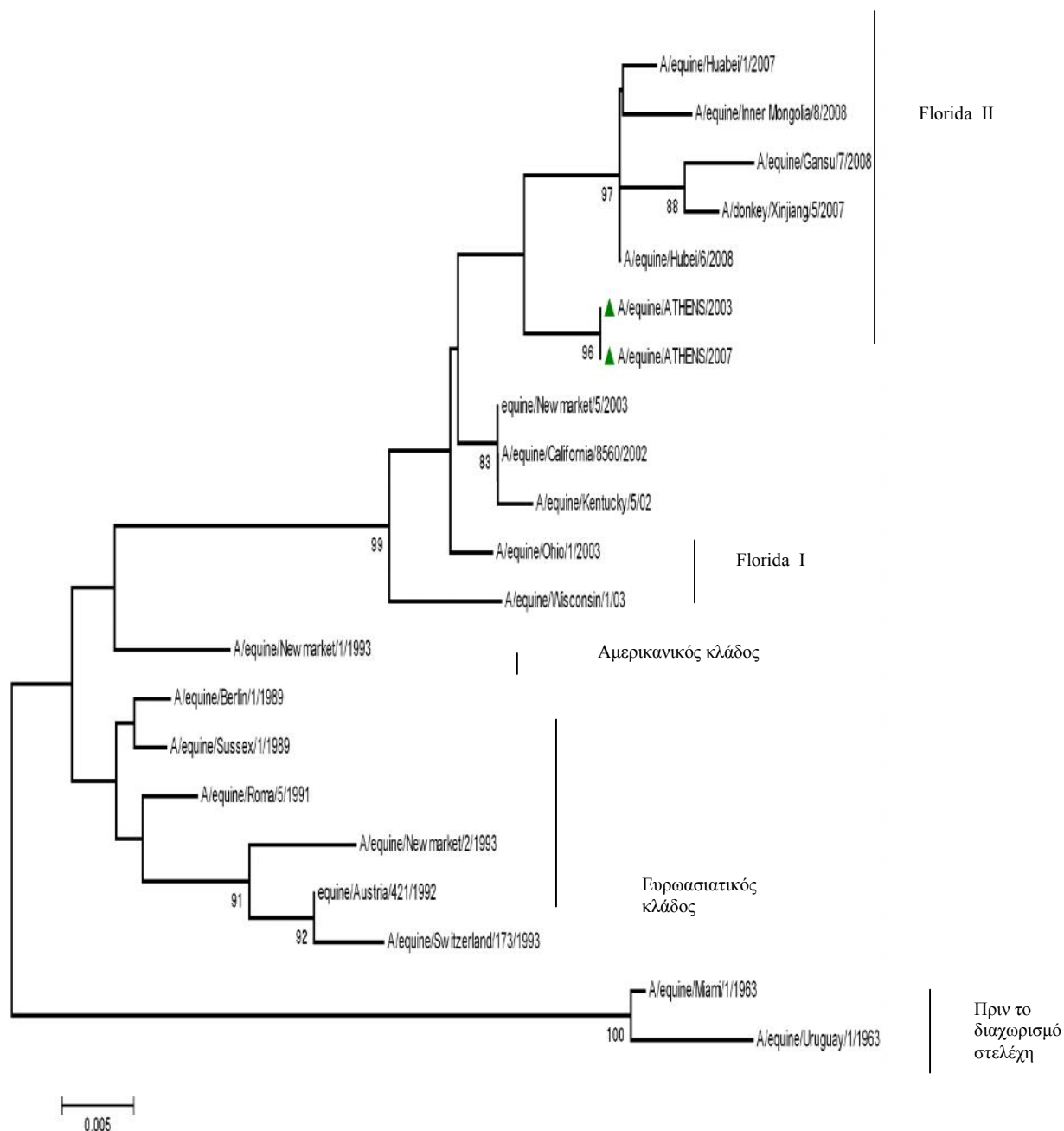
Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps». Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Τα Ελληνικά στελέχη δεδομένου ότι παρουσιάζουν ομοιότητα 100% κωδικοποιήθηκαν ως εξής: : A/Equine/Athens/2003, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2003, και A/Equine/Athens/2007, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2007.



Εικόνα 22. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην πρωτεΐνη NP με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.

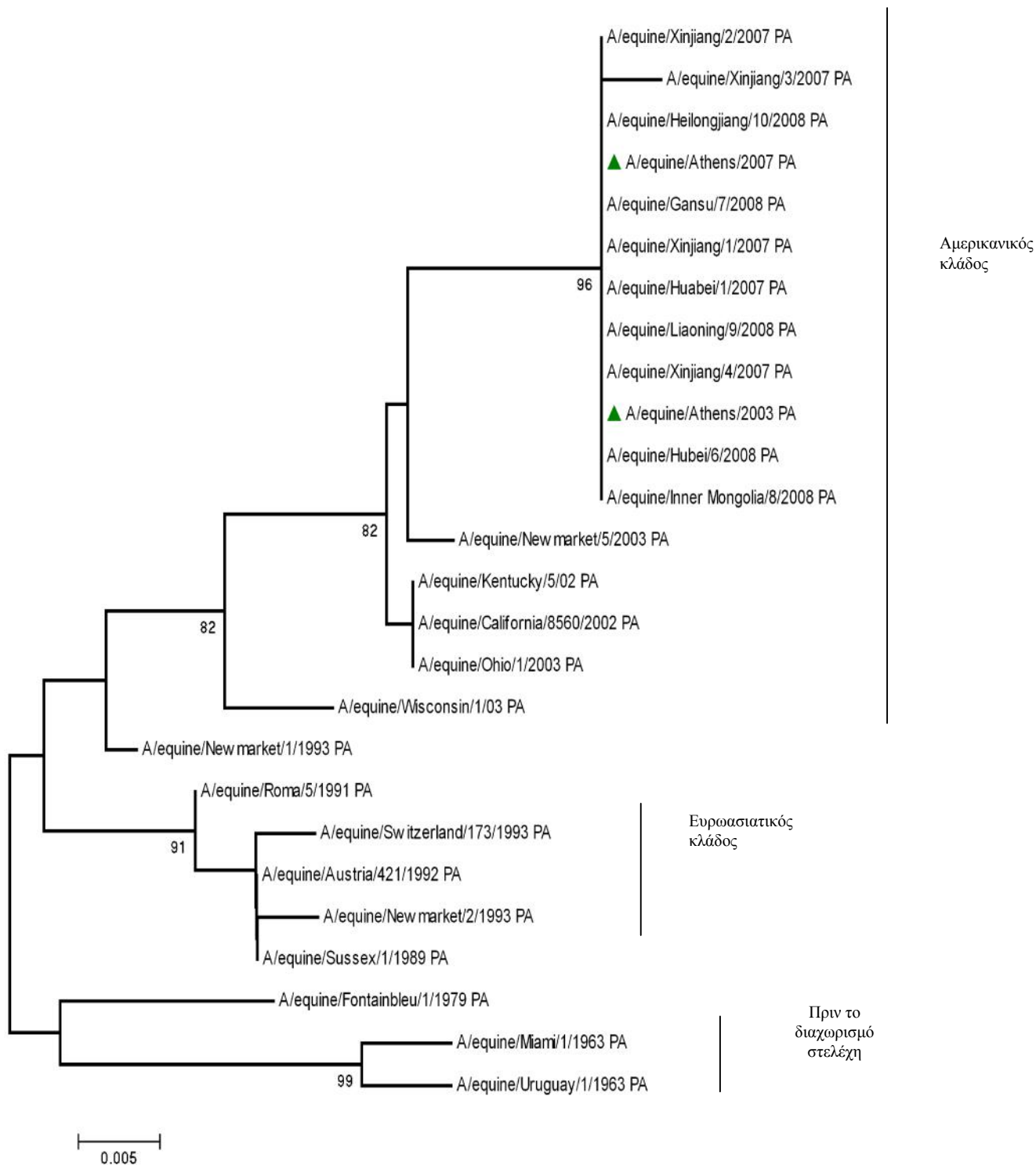
Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps». Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Τα Ελληνικά στελέχη δεδομένου ότι παρουσιάζουν ομοιότητα 100% κωδικοποιήθηκαν ως εξής: A/Equine/Athens/2003, για

τα στελέχη από την επιζωοτία του 2003, και A/Equine/Athens/2007, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2007.



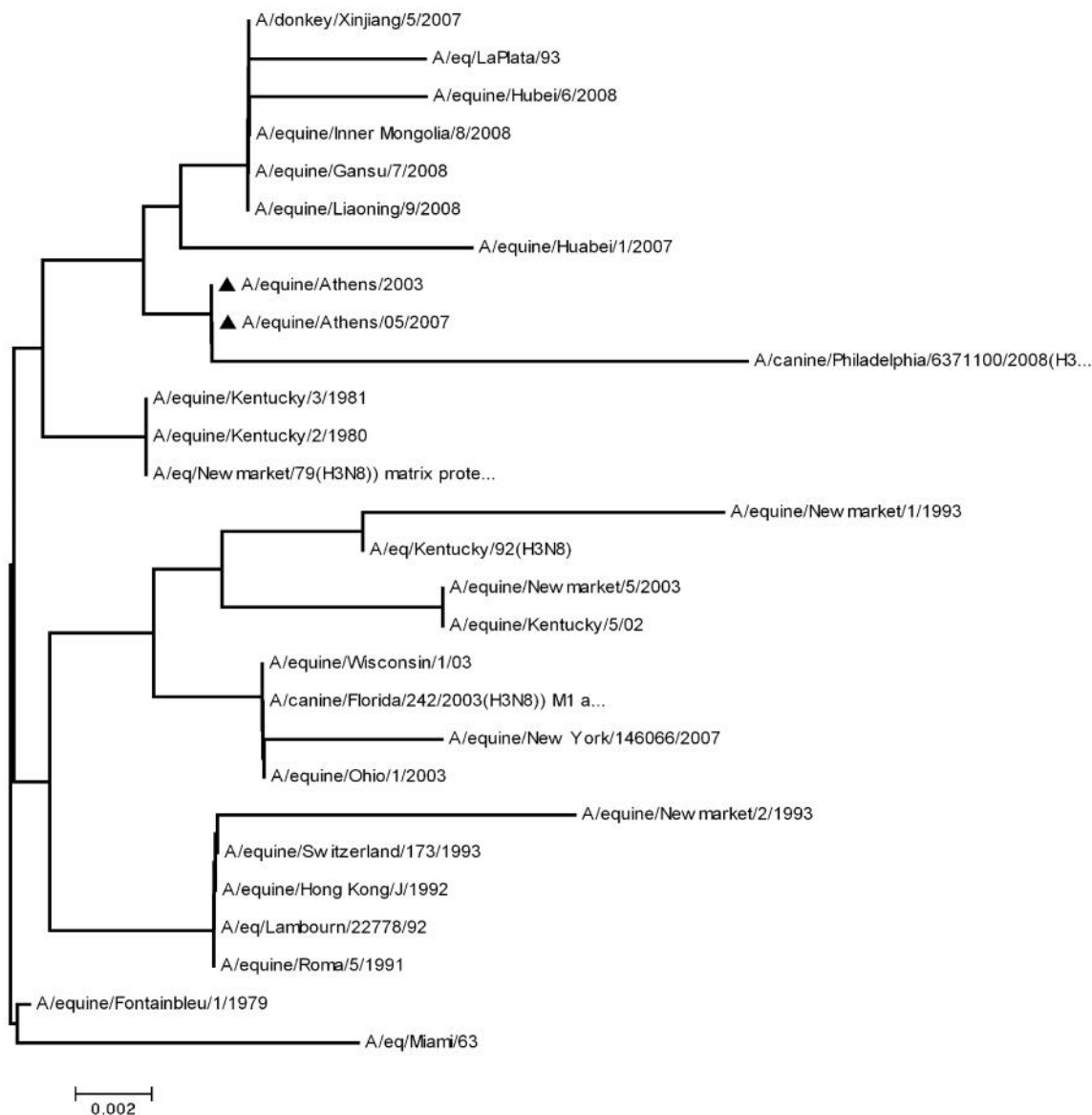
Εικόνα 23. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην πρωτεΐνη και PB1 με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.

Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps». Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Τα Ελληνικά στελέχη δεδομένου ότι παρουσιάζουν ομοιότητα 100% κωδικοποιήθηκαν ως εξής: A/Equine/Athens/2003, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2003, και A/Equine/Athens/2007, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2007.

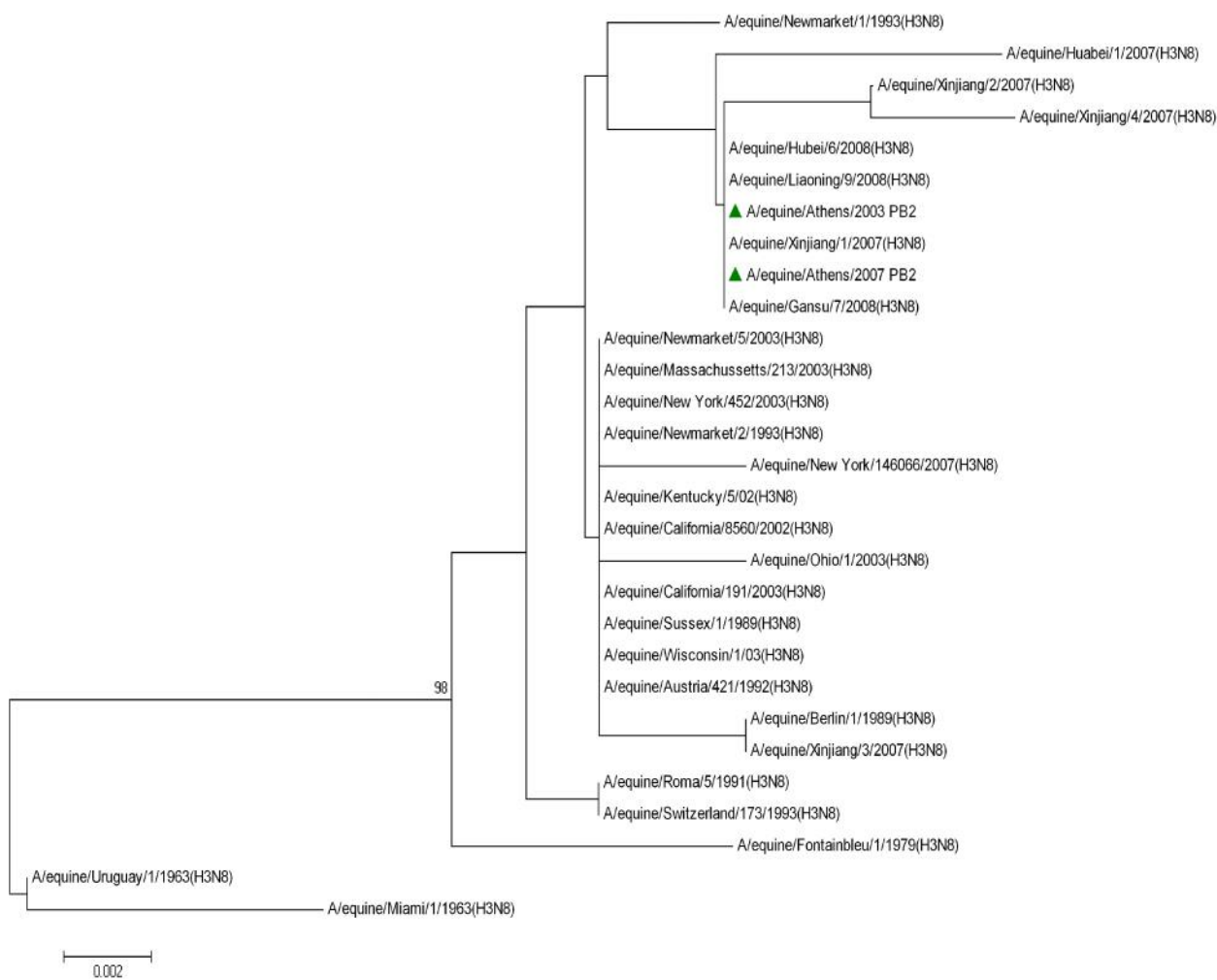


Εικόνα 24. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην πρωτεΐνη PA με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.

Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps». Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Τα Ελληνικά στελέχη δεδομένου ότι παρουσιάζουν ομοιότητα 100% κωδικοποιήθηκαν ως εξής: : A/Equine/Athens/2003, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2003, και A/Equine/Athens/2007, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2007.



Εικόνα 25. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην πρωτεΐνη M1 με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.
 Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps». Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Τα Ελληνικά στελέχη δεδομένου ότι παρουσιάζουν ομοιότητα 100% κωδικοποιήθηκαν ως εξής: : A/Equine/Athens/2003, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2003, και A/Equine/Athens/2007, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2007.



Εικόνα 26. Υπολογισμός δέντρου «Ένωσης Γειτόνων» που αφορά στην πρωτεΐνη και PB2 με το λογισμικό MEGA έκδοση 4.0.

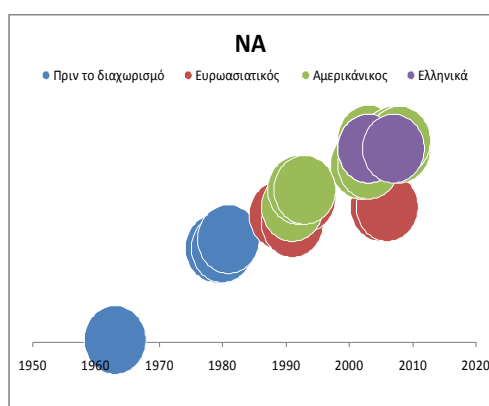
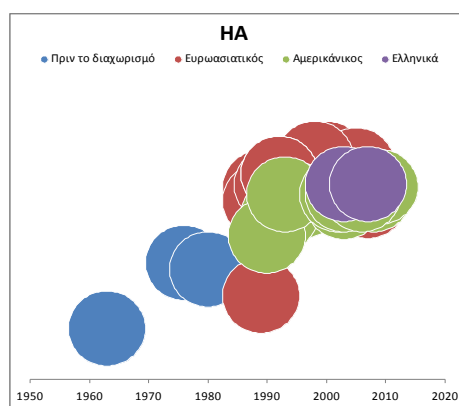
Η στατιστική αξιοπιστία των τοπολογιών αξιολογήθηκε με 1000 τιμές αυτοδυναμίας «bootstraps». Η κλίμακα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αντικατάστασης αμινοξέων ανά θέση. Τα Ελληνικά στελέχη δεδομένου ότι παρουσιάζουν ομοιότητα 100% κωδικοποιήθηκαν ως εξής: : A/Equine/Athens/2003, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2003, και A/Equine/Athens/2007, για τα στελέχη από την επιζωοτία του 2007.

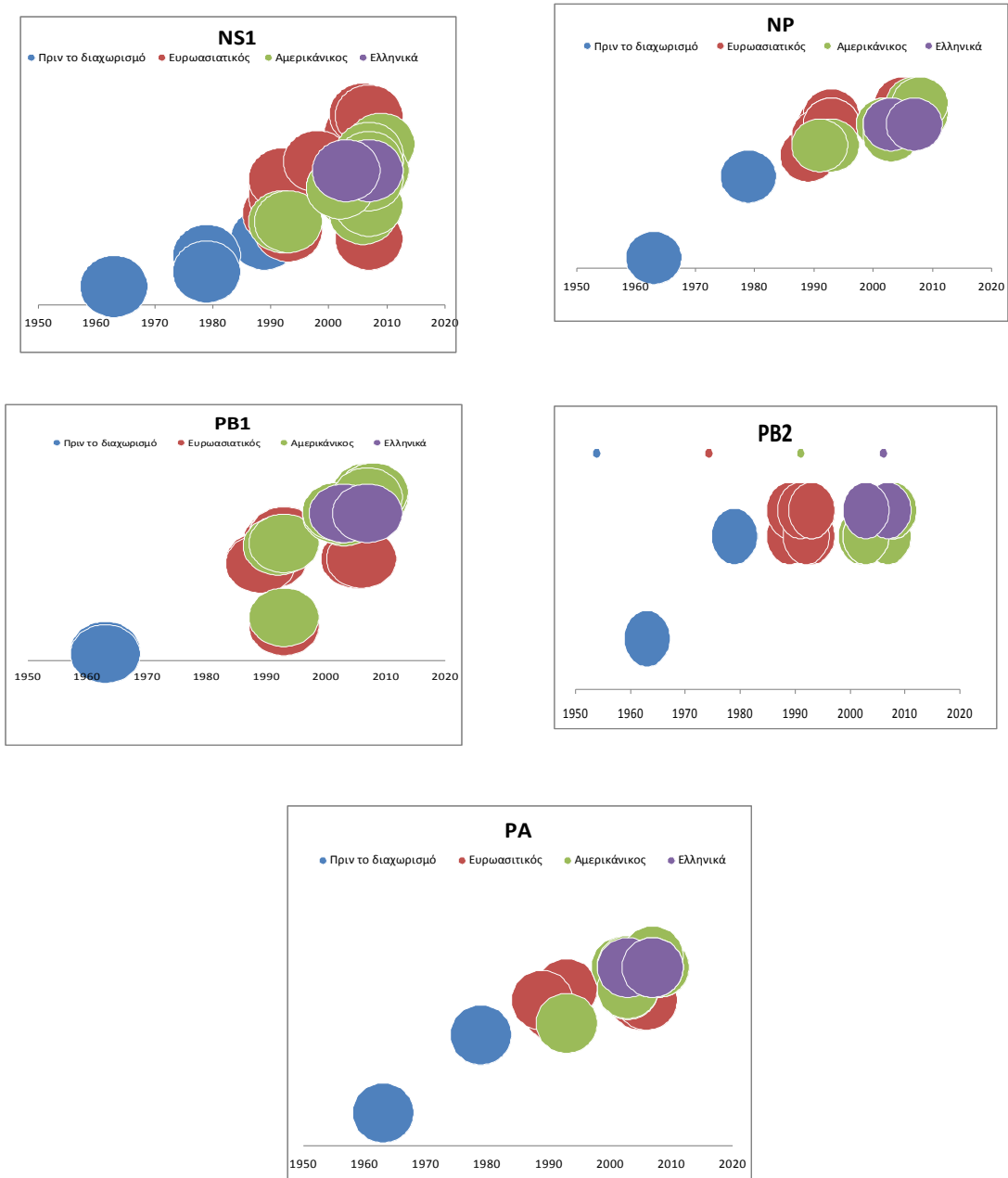
2.9 Υπολογισμός εξελικτικής απόστασης των πρωτεϊνών HA, NA, NS ,NP, PB1, PB2 και PA όπως αυτή προκύπτει από τα φυλογενετικά δέντρα

Η εξελικτική απόσταση των στελεχών, όπως παρουσιάζονται σε κάθε φυλογενετικό δέντρο ανά πρωτεΐνη, εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της αντικατάστασης των αμινοξέων κάθε στελέχους σε σχέση με το πρότυπο στέλεχος A/equine/ Miami/1963 και δίνεται σε συνάρτηση με τα έτη των επιζωοτιών (Εικόνα 27). Στα γραφήματα της εικόνας 27 παρουσιάζονται με διαφορετική ένδειξη τα στελέχη των τριών βασικών κλάδων (Κλάδος πριν το διαχωρισμό, Ευρωασιατικός κλάδος και Αμερικανικός κλάδος) καθώς και τα Ελληνικά στελέχη του 2003 και 2007.

Δεδομένου ότι το τμήμα της πρωτεΐνης M1 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αφορά κυρίως στη διάγνωση και επομένως είναι συντηρημένο, δεν προσφέρεται για μία τέτοια ανάλυση.

Για όλες τις πρωτεΐνες, εκτός από την PB2, φαίνεται από τα γραφήματα ότι ο Αμερικανικός και ο Ευρωασιατικός κλάδος παρουσιάζουν σχεδόν παράλληλη εξέλιξη, ενώ στελέχη και των δύο κλάδων συνεχίζουν να «συνυπάρχουν» ακόμα και την τελευταία δεκαετία. Αυτό επιβεβαιώνει το διαχωρισμό που παρατηρείται στα φυλογενετικά δέντρα, ενώ επιπλέον φαίνεται ότι τα στελέχη της γρίπης των ιπποειδών, των διαφορετικών εξελικτικών κλάδων, συνκυκλοφορούν. Αυτή η διαπίστωση απεικονίζεται πιο έντονα για τις πρωτεΐνες HA και NS1, καθώς για αυτές υπάρχουν περισσότερες κατατεθειμένες αλληλουχίες στη διεθνή βάση του GenBank.





Εικόνα 27. Υπολογισμός εξελικτικής απόστασης των πρωτεϊνών HA, NA, NS1, NP, PB1, PB2 και PA όπως αυτή προκύπτει από τα φυλογενετικά δέντρα. Ως παραομάδα έχει χρησιμοποιηθεί το στέλεχος A/equine/Miami/1963. Η συνολική απόσταση κάθε στελέχους από την παραομάδα, έχει υπολογιστεί βάσει της αντικατάστασης των αμινοξέων και δίνεται σε συνάρτηση με τα έτη των επιζωοτιών.

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο ιός της γρίπης των ιπποειδών αποτελεί έναν από τους κύριους παθογόνους παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνιση οξείας αναπνευστικής λοίμωξης στα ιπποειδή. Ανήκει στους ιούς της γρίπης τύπου Α. Όλοι οι ιοί της γρίπης Α αποτελούνται από οκτώ τμήματα γενωμικού RNA, τα οποία κωδικοποιούν 11 ή 12 πρωτεΐνες, εκ των οποίων οι δύο, PB1-F2 (Chen et al., 2001) και PB1N40 (Wise et al., 2009), έχουν ανακαλυφθεί την τελευταία δεκαετία. Επομένως υπάρχουν ακόμα άγνωστες πτυχές του ιού προς διερεύνηση.

Στα ιπποειδή απαντώνται δύο αντιγονικοί υπότυποι του ιού, ο H7N7 και ο H3N8, τα τελευταία χρόνια, όμως, έχουν αναφερθεί επιζωοτίες μόνο από τον υπότυπο H3N8. Παρά την εκτεταμένη χρήση εμβολίων στους πληθυσμούς των ιπποειδών, συνεχίζουν να αναφέρονται εξάρσεις της νόσου. Από το 2003 και τα επόμενα χρόνια υπήρξε εκτεταμένη μετάδοση της νόσου σε πολλές χώρες της Ευρώπης (Damiani et al., 2008, Barbic et al., 2009, Bryant et al., 2009), και όχι μόνο, διότι και σε χώρες όπως η Νότιος Αφρική (Guthrie, 2006), η Ινδία (Virmani et al., 2008) και η Ιαπωνία (Ito et al., 2009) αναφέρθηκαν αντίστοιχες επιζωοτίες. Η Αυστραλία δήλωσε για πρώτη φορά επιζωοτία από τον ιό της γρίπης των ιπποειδών το 2007 (Anon, 2008).

Τα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν συνολικά 30 και προέρχονταν από ανεμβολίαστους ίππους, που διαβιούσαν ομαδικά, και παρουσίασαν συμπτώματα γρίπης τον Ιούνιο του 2003 και τον Μάιο του 2007. Τα δείγματα ήταν ρινικές εκκρίσεις των ζώων, που είχαν συλλεχθεί με βαμβακοφόρους στυλεούς τις πρώτες 2-3 ημέρες από την έναρξη των συμπτωμάτων στο αναπνευστικό σύστημα. Όλες οι δοκιμές που εφαρμόστηκαν οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο υπεύθυνος παράγοντας των εξάρσεων της νόσου ήταν στελέχη υποτύπου H3N8 του ιού της γρίπης των ιπποειδών, που χαρακτηρίστηκαν ως A/equine/Athens/2003 και A/equine/Athens/2007, σε αντιστοιχία με το έτος της επιζωοτίας κατά το οποίο απομονώθηκαν.

Η απομόνωση του ιού της γρίπης Α «παραδοσιακά» επιτυγχάνεται με τον ενοφθαλμισμό εμβρυοφόρων αυγών, καθώς θεωρούνται το καταλληλότερο υπόστρωμα για την απομόνωση των ιών της γρίπης. Εντούτοις, απαιτούνται αφενός κατάλληλος εξοπλισμός (επωαστήρας, ειδικός χώρος) και κατάλληλα εμβρυοφόρα αυγά (λευκό κέλυφος, SPF) και αφετέρου μεγάλη εμπειρία για τον επιτυχή ενοφθαλμισμό τους. Επιπλέον, υπάρχουν προβλήματα που συνδέονται με τη χρήση

των αυγών για καλλιέργεια του ιού σε μεγάλη ποσότητα, με σκοπό την παραγωγή εμβολίων, συμπεριλαμβανομένης της μεταβλητότητας στην ευαισθησία τους κατά τη μόλυνση με τον ιό της γρίπης (Monto et al., 1981). Οι κυτταροκαλλιέργειες, ωστόσο, είναι πολύ πιο δεκτικές σε μεγάλης κλίμακας παραγωγή του ιού και αποτελούν εναλλακτική λύση αντί για τα αυγά (Gonorkova et al., 1999, 1996, Kistner et al., 1999, Merten et al., 1996).

Δεδομένων όλων των παραπάνω, καθώς και του ότι η συνεχής κυτταρική σειρά MDCK έχει αποδειχτεί ότι είναι η καταλληλότερη για την απομόνωση των ιών της γρίπης Α (Youli et al., 2004), αποφασίστηκε η επιλογή της για την απομόνωση του ιού. Το ποσοστό απομόνωσης του ιού στις κυτταροκαλλιέργειες, επί των θετικών δειγμάτων, ήταν πολύ υψηλό (89%), ιδιαίτερα αν το συγκρίνουμε με το 7% που αναφέρουν οι Morley και συνεργάτες (1995).

Παρά την επιτυχή απομόνωση του ιού στις κυτταροκαλλιέργειες, ο τίτλος αιμοσυγκόλλησης παρέμεινε χαμηλός, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η διεξαγωγή της αναστολής της αιμοσυγκόλλησης για τα περισσότερα δείγματα. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι σε ένα εμβρυοφόρο αυγό περιέχονται πολύ περισσότερα κύτταρα και πρωτεολυτικά ένζυμα, σε σύγκριση με τις κυτταροκαλλιέργειες. Οι Lazarowitz και συνεργάτες (1973), διαπίστωσαν στην έρευνά τους ότι το αλλαντοϊκό υγρό περιέχει πρωτεολυτικά ένζυμα που βοηθούν στη διάσπαση του μορίου της ΗΑ, με αποτέλεσμα το ιικό σωματίδιο να καθίσταται λοιμογόνο. Επιπλέον, φαίνεται ότι ο τίτλος αιμοσυγκόλλησης απομονωθέντων σε κυτταροκαλλιέργειες στελεχών, παρουσία τρυψίνης, παρόλο που είναι παραπλήσιος με τον αντίστοιχο τίτλο απομονωθέντων σε εμβρυοφόρα αυγά στελεχών, είναι χαμηλότερος (Tobita et al., 1975). Βάσει των αποτελεσμάτων μας οι τίτλοι αιμοσυγκόλλησης δεν σχετίζονται με τον αντίστοιχο τίτλο του ιού στην κυτταροκαλλιέργεια.

Σχετικά με τη δοκιμασία του *in vitro* ανοσοπροσδιορισμού με το εμπορικό τεστ Directigen (DFA), τα αποτελέσματα της παρούσα έρευνας έδειξαν ότι γενικά παρουσιάζει υψηλά ποσοστά θετικών αποτελεσμάτων (83% επί του συνόλου των θετικών δειγμάτων) και σχεδόν την ίδια με εκείνα της απομόνωσης του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια (89%). Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων μελετών (Chambers et al., 1994, Quinlivan et al., 2004, van Maanen et al., 2003), που υποδηλώνουν ότι η συγκεκριμένη δοκιμασία είναι αρκετά ευαίσθητη ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική της απομόνωσης του ιού ή ως δοκιμασία διαλογής (screening test). Το υψηλό ποσοστό ευαισθησίας της δικαιολογείται από το

γεγονός ότι η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε την 2^η -3^η ημέρα από την έναρξη των συμπτωμάτων, δηλαδή στην κορύφωση της λοίμωξης, όπως άλλωστε έχουν δείξει και προηγούμενες έρευνες (Quinlivan et al., 2004).

Μελέτες έδειξαν ότι το γονίδιο της αιμοσυγκολλητίνης των ιών γρίπης που πολλαπλασιάζονται σε κυτταρικές σειρές, συγκρινόμενο με εκείνο στο κλινικό δείγμα, δεν παρουσιάζει μεταλλάξεις (Katz et al., 1990, Robertson et al., 1990), ενώ συμβαίνει το αντίθετο στους ιούς που προκύπτουν μετά από πολλαπλασιασμό σε εμβρυοφόρα αυγά (Schild et al., 1983). Πιο πρόσφατη μελέτη, όμως, καταδεικνύει ότι για την απομόνωση του ιού της γρίπης των ιπποειδών το υπόστρωμα εκλογής πρέπει να είναι τα εμβρυοφόρα αυγά. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας στηρίχθηκαν σε συγκριτική μελέτη της αλληλουχίας του γονιδίου HA στελεχών καλλιιεργημένων σε αυγά και κυτταροκαλλιέργειες MDCK, χωρίς όμως να γίνει σύγκριση και με τα αντίστοιχα πρωτογενή δείγματα (Pobi et al., 1994). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με τις αρχικές μελέτες, καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία μετάλλαξη στην αλληλουχία του γονιδίου HA, μεταξύ των πρωτογενών στελεχών και εκείνων που απομονώθηκαν κατά την τρίτη δίοδο σε κυτταροκαλλιέργειες.

Η απομόνωση του ιού, παρόλο που είναι χρονοβόρα και τεχνικά δύσκολη εργαστηριακή μέθοδος, αποτελεί το «χρυσό κανόνα» στην Ιολογία, αφού είναι η μέθοδος ανίχνευσης ζωντανού λοιμογόνου ιού και επομένως ανάδειξης ενεργού λοίμωξης. Παράλληλα προσφέρει υλικό για την περαιτέρω μελέτη των απομονωθέντων στελεχών, και για την παρασκευή εμβολίων.

Η RT-PCR για το γονίδιο M χρησιμοποιήθηκε τόσο για τη διάγνωση της νόσου από τα πρωτογενή δείγματα, όσο και για την επιβεβαίωση της απομόνωσης του ιού στις κυτταροκαλλιέργειες. Η δοκιμασία αυτή περιγράφεται από τους Fouchier και συνεργάτες (2000) και βασίζεται στην ανίχνευση τμήματος του έβδομου γονιδίου του ιού της γρίπης τύπου A, το οποίο είναι συντηρημένο σε όλους τους ιούς γρίπης του τύπου αυτού. Οι προαναφερθέντες ερευνητές, διαπίστωσαν την εξειδίκευση αυτής της δοκιμασίας στην ταυτοποίηση των ιών της γρίπης A σε πολλούς ξενιστές, περιλαμβανομένων και των ιπποειδών (Fouchier et al., 2000). Αν και η RT-PCR απαιτεί περισσότερο χρόνο, συγκριτικά με τη δοκιμασία του ανοσοπροσδιορισμού Directigen, είναι σαφώς ταχύτερη από την απομόνωση του ιού. Στην παρούσα μελέτη, καταδείχθηκε ως η πιο ευαίσθητη μέθοδος, καθώς βρέθηκαν δύο επιπλέον θετικά δείγματα, τα οποία εμφανίζονταν ως αρνητικά, σε όλες τις άλλες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν. Το συμπέρασμα αυτό είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα

αποτελέσματα των Quinlivan και συνεργατών (2004), οι οποίοι, στη συγκριτική μελέτη διαφόρων μεθόδων για τη διάγνωση του ιού της γρίπης των ιπποειδών, δηλώνουν ότι η RT-PCR αποτελεί την πιο ευαίσθητη μέθοδο και μπορεί να αποτελέσει μέθοδο διαλογής σε διαγνωστικό εργαστήριο.

Η αλληλούχιση του εν λόγω τμήματος του γονιδίου M επιβεβαίωσε ότι ο αιτιολογικός παράγοντας της λοίμωξης και στις δύο εξάρσεις της νόσου, το 2003 και το 2007, ήταν ιός γρίπης τύπου A.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα του μοριακού χαρακτηρισμού των δύο βασικών γονιδίων, δηλαδή της αιμοσυγκολλητίνης (HA) και της νευραμινιδάσης (NA), των απομονωθέντων στελεχών έδειξαν ότι ο εν λόγω αιτιολογικός παράγοντας ήταν ένα αναδιαταγμένο στέλεχος του υποτύπου II (H3N8) της γρίπης των ιπποειδών. Συγκεκριμένα, τα Ελληνικά στελέχη ταξινομούνται στον Ευρωασιατικό κλάδο βάσει της αιμοσυγκολλητίνης (HA), ενώ βάσει της νευραμινιδάσης (NA) κατατάσσονται ως μέλη του Αμερικανικού κλάδου και συγκεκριμένα του κλάδου Florida II.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ενώ βάσει του δημοσιευμένου πρωτοκόλλου της ένθετης PCR για την ανίχνευση του γονιδίου HA χρησιμοποιείται το εμπορικό kit Gene Amp (Applied Biosystems), κατά τη διάρκεια των δικών μας πειραμάτων καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το kit αυτό μπορεί να είναι ασύμβατο με το εμπορικό kit που χρησιμοποιείται για την 1^η PCR, καθώς η δοκιμασία δεν έδωσε καμία αντίδραση ακόμα και μετά από βελτιστοποίηση. Αντιθέτως, η ένθετη RT-PCR που περιγράφεται στην παρούσα μελέτη με τους ίδιους εκκινητές δίνει καλά αποτελέσματα.

Το φυλογενετικό δέντρο της HA πρωτεΐνης, όπως αυτό διαμορφώθηκε κατά την παρούσα μελέτη με τη μέθοδο της «Ένωσης Γειτόνων», παρουσιάζει ίδιες τοπολογίες, με εκείνες που έχουν αναφερθεί παλαιότερα (Daly et al., 1996, Lai et al., 2001). Το φυλογενετικό δέντρο της HA του ιού H3N8 παρουσίαζε γραμμική εξέλιξη για δύο δεκαετίες περίπου (Kawaoka et al., 1989), αλλά στα μέσα της δεκαετίας του 1980 διαχωρίστηκε σε δύο κλάδους, οι οποίοι εξελίσσονταν παράλληλα (Daly et al., 1996). Αρχικά, τα στελέχη του ενός κλάδου ήταν κυρίαρχα στην Αμερική (Αμερικανικά στελέχη), ενώ εκείνα του δεύτερου είχαν απομονωθεί μόνο στην Ευρώπη και στην Ασία (Ευρωασιατικά). Αν και ο δεύτερος αυτός κλάδος περιλαμβάνει κυρίως στελέχη που απομονώθηκαν κατά τη δεκαετία του 1990, τα μετέπειτα χρόνια, και κατά περιόδους, απομονώνονται ακόμα στελέχη που ανήκουν σε αυτόν, όπως για παράδειγμα τα στελέχη που απομονώθηκαν στο Βερολίνο το

2002, στην Ελβετία το 2007 και στο Ηνωμένο Βασίλειο τα έτη 2000 και 2002. Σε αυτόν τον κλάδο ανήκουν και τα Ελληνικά στελέχη βάσει της πρωτεΐνης HA. Τα Αμερικανικά στελέχη φαίνεται ότι τα τελευταία χρόνια κυριαρχούν και προκαλούν ενζωτιές σε πληθυσμούς ιπποειδών όχι μόνο στην Αμερικάνικη ήπειρο, αλλά παγκοσμίως. Ο Αμερικάνικος κλάδος συμπεριλαμβάνει τρεις άλλους κλάδους, δηλαδή τον κλάδο που περιλαμβάνει στελέχη που προσομοιάζουν σε εκείνα που απομονώθηκαν στο Kentucky (Kentucky-like), τον κλάδο που περιλαμβάνει στελέχη που προσομοιάζουν σε εκείνα που απομονώθηκαν στην Αργεντινή (Argentina-like) και τον κλάδο που περιλαμβάνει στελέχη που προσομοιάζουν σε εκείνα που απομονώθηκαν στη Florida (Florida-like). Τα στελέχη που προκάλεσαν την ενζωτία του 2003 στην περιοχή Newmarket του Ηνωμένου Βασιλείου, καθώς και η πλειονότητα των στελεχών που απομονώθηκαν στην Ευρώπη την ίδια χρονική περίοδο, ανήκουν στον κλάδο Florida (Damiani et al., 2008, Bryant et al., 2009, Rozek et al., 2009). Ο κλάδος Florida διαχωρίζεται σε δύο υποκλάδους. Ο υποκλάδος I (Florida Clade I) περιλαμβάνει στελέχη που απομονώθηκαν στη Β. Αμερική μέχρι το 2003, όπως για παράδειγμα το στέλεχος Ohio/2003, τα οποία διαφέρουν από εκείνα του υποκλάδου II (Florida clade II) που προκάλεσαν ενζωτιές στην Ευρώπη, όπως για παράδειγμα το στέλεχος Newmarket/5/2003. Τα στελέχη του υποκλάδου I ήταν υπεύθυνα για τις εξάρσεις της νόσου τόσο στη Νότια Αφρική το 2003, όσο και στην Ιαπωνία και στην Αυστραλία το 2007 (Bryant et al., 2009). Αντιθέτως, οι εξάρσεις της νόσου από το 2007 έως και το 2009 σε Μογγολία, Ινδία και Κίνα οφείλονταν σε στελέχη του υποκλάδου II (Qi et al., 2010, Virmani et al., 2010). Οι φυλογενετικές αναλύσεις κατέδειξαν ότι την περίοδο 1993-2003 έγινε «εισαγωγή» στελεχών του ιού από τη Β. Αμερική στην Ευρώπη και με τη βοήθεια των μηχανισμών εξέλιξης και ανασυνδυασμού προέκυψαν οι δύο κλάδοι.

Το φυλογενετικό δέντρο της πρωτεΐνης NA των Ελληνικών στελεχών, που προέκυψε με την εφαρμογή της μεθόδου «Ένωση Γειτόνων», φαίνεται ότι ακολουθεί το διαχωρισμό στους κλάδους που αναφέρθηκαν για την πρωτεΐνη HA. Αυτό σημαίνει, ότι οι δύο γλυκοπρωτεΐνες επιφάνειας (HA & NA) των ιών γρίπης υποτύπου II των ιπποειδών εξελίσσονται παράλληλα και υποβάλλονται σε παρόμοια επίπεδα επιλεκτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Βάσει αυτού τα Ελληνικά στελέχη κατατάσσονται στον κλάδο II της Florida.

Αξιοσημείωτο, για τον ιό της γρίπης των ιπποειδών H3N8, είναι το γεγονός ότι τα νέα στελέχη που απομονώνονται κατά περιόδους δεν αντικαθιστούν τα παλαιότερα,

αλλά συνεχίζουν να συνκυκλοφορούν (Oxburgh et al., 1999, Lai et al., 2001), γεγονός που επιβεβαιώνεται και με την παρούσα μελέτη. Η εξελικτική πορεία των παλαιών και νέων στελεχών του υποτύπου H των ιπποειδών σε παράλληλους κλάδους είναι μοναδική ανάμεσα στους ιούς της γρίπης τύπου A, καθώς οι υπόλοιποι ιοί γρίπης A, που προσβάλλουν άλλα είδη σπονδυλωτών, εξελίσσονται με γραμμική πορεία και τα νέα στελέχη αντικαθιστούν τα παλαιά (Webster et al., 1992). Οι ιοί της γρίπης τύπου B και C του ανθρώπου παρουσιάζουν παρόμοια εξελικτική πορεία με τους ιούς της γρίπης A των ιπποειδών, δηλαδή σε παράλληλους κλάδους οι οποίοι περιλαμβάνουν και στελέχη που δεν παρουσιάζουν μεταλλάξεις για αρκετά χρόνια (Lai et al., 2001, Buonagurio et al., 1985, 1986).

Με βάση τα προαναφερθέντα, φαίνεται ότι τα Ελληνικά στελέχη, και των δύο επιζωοτίων, προέκυψαν από ανασυνδυασμό στελεχών που ήταν μέλη του Ευρωασιατικού κλάδου και του υποκλάδου Florida H. Το φαινόμενο του ανασυνδυασμού μεταξύ στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικούς φυλογενετικούς κλάδους δεν είναι νέο. Συγκεκριμένα, οι Bryant και συνεργάτες αναφέρουν ότι το στέλεχος A/equine/Lincolnshire/1/06 (H3N8) παρουσίαζε ένα Ευρωασιατικού μέλους NS γονίδιο και ένα Florida κλάδου H-HA γονίδιο (Bryant et al., 2009). Επίσης, οι Lindstrom και συνεργάτες (1998) θεωρούν ότι ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των M και NS γονιδίων του στελέχους A/equine/LaPlata/1/1988 οφείλεται σε γενετικό ανασυνδυασμό μεταξύ του στελέχους A/equine/Miami/1963 και άλλων μεταγενέστερων H3N8 στελεχών. Επιπλέον, στην ίδια έρευνα, οι προαναφερθέντες ερευνητές επιβεβαίωσαν την H7N7 και H3N8 προέλευση των γονιδίων M και NS αντιστοίχως του στελέχους A/equine/Newmarket/1977, που είχε διαπιστώσει σε προηγούμενη μελέτη (Adeyefa et al., 1994). Ειδικότερα, στο στέλεχος A/equine/Newmarket/1977 το γονίδιο M προσομοιάζει με το αντίστοιχο γονίδιο του στελέχους A/equine/Prague/1956, ενώ το γονίδιο NS προσομοιάζει με εκείνο του στελέχους A/EQ/Newmarket/1979 (Lindstrom et al., 1998).

Μία πιθανή εξήγηση της Ευρωασιατικής προέλευσης του γονιδίου HA των Ελληνικών στελεχών είναι ότι το γονίδιο αυτό παρέμεινε σε κατάσταση «εξελικτικής στάσης» ('frozen evolution'). Το φαινόμενο αυτό περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Endo και συνεργάτες (1992) και αφορά στελέχη ιών που εξελίσσονται με πολύ αργό ρυθμό και προσομοιάζουν με πολύ προγενέστερα στελέχη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εξελικτικής στάσης αποτελεί και ένα στέλεχος που απομονώθηκε το 1993 στη Γαλλία και γενετικά προσομοιάζει σε ένα Σουηδικό στέλεχος, που είχε

απομονωθεί εννέα χρόνια πριν (Manuguerra et al., 2000). Αν και τα περισσότερα στελέχη που παρουσιάζουν εξελικτική στάση ανήκουν στον Ευρωασιατικό κλάδο, οι Lindstrom και συνεργάτες (1998) αναφέρουν ότι το γονίδιο M του αμερικανικού στελέχους A/equine/LaPlata/1/93 είναι ακριβώς όμοιο με το αντίστοιχο γονίδιο του στελέχους A/equine/Miami/63, που ανήκει στον κλάδο που υπήρχε πριν αυτά διαφοροποιηθούν, ενώ οι Bryant και συνεργάτες (2009) αναφέρουν 100% ομοιότητα του HA γονιδίου του στελέχους A/equine/Chechire/2006 με εκείνο του στελέχους A/equine/Newmarket/1/93, το οποίο ανήκει στον Αμερικάνικο κλάδο. Παρόλο που στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές για τέτοια στελέχη-παραδείγματα του φαινομένου αυτού (Borchers et al., 2005, Gupta et al., 1993, Lindstrom et al., 1998, Manuguerra et al., 2000, Bryant et al., 2009), υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να θεωρηθούν ως αποτέλεσμα εργαστηριακής επιμόλυνσης. Κατά την παρούσα έρευνα δεν υπήρξε κίνδυνος επιμόλυνσης, διότι κανένα από τα στελέχη με τα οποία προσομοιάζαν τα Ελληνικά δεν προϋπήρχε στο εργαστήριό μας. Επιπλέον, τα δείγματα από κάθε περιστατικό ελέγχθηκαν σε διαφορετικό χρόνο, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 2.1. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στελέχη που παρουσιάζουν το φαινόμενο της εξελικτικής στάσης ανευρίσκονται κυρίως σε ανεμβολίαστους πληθυσμούς, όπως ήταν και το στέλεχος που απομονώθηκε στην Ινδία το 1987 που προσομοιάζε στο A/equine/Miami/63 (Gupta et al., 1993). Τα αποτελέσματα που αναφέρονται στην παρούσα μελέτη, προέκυψαν από την εξέταση ανεμβολίαστων ίππων, γεγονός που συμφωνεί με την υπόθεση ότι τέτοια στελέχη απομονώνονται σε ανεμβολίαστα ζώα (Borchers et al., 2005).

Η έλλειψη μεγάλου αριθμού στελεχών που παρουσιάζουν εξελικτική στάση ή που ανήκουν ακόμα στον Ευρωασιατικό κλάδο ίσως οφείλεται στο σχετικά μικρό αριθμό δειγμάτων από ανεμβολίαστα ιπποειδή ή στο ότι ο Ευρωασιατικός κλάδος έχει αρχίσει να εξαφανίζεται. Τα στελέχη A/equine/Switzerland/2007 και A/equine/Aboyne/2005 είναι τα τελευταία αυτού του κλάδου που απομονώθηκαν από επιζωοτίες σε ιπποειδή. Όμως, οι Tu και συνεργάτες (2009), αναφέρουν την απομόνωση δύο στελεχών του ιού H3N8 των ιπποειδών, μέλη του Ευρωασιατικού κλάδου, από χοίρους στην Κίνα το 2005 και το 2006. Η αλληλούχηση και των οκτώ γονιδίων των στελεχών αυτών έδειξε ότι προσομοιάζουν με στελέχη H3N8 των ιπποειδών, που απομονώθηκαν στην Ευρώπη τη δεκαετία του 1990. Η φυλογενετική ανάλυση κατέταξε τα στελέχη από τους χοίρους στον Ευρωασιατικό κλάδο. Αυτό

αποτελεί απόδειξη ότι τα στελέχη αυτού του κλάδου συνεχίζουν να κυκλοφορούν και να προκαλούν εξάρσεις της νόσου (Tu et al., 2009).

Η πρωτεΐνη HA του ιού της γρίπης, εκτός του ότι είναι υπεύθυνη για την είσοδο του ιού στον κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή, αποτελεί τον κύριο στόχο των εξουδετερωτικών αντισωμάτων που παράγει ο ξενιστής έναντι του ιού. Επομένως η επιδημιολογία του εξαρτάται από τις αντιγονικές αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης αυτής. Η πρωτεΐνη NA, μέχρι πρότινος θεωρούταν ότι δρα στο τέλος του αναπαραγωγικού κύκλου του ιού, καθώς διευκολύνει την απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων από τα μολυσμένα κύτταρα κατά τη διαδικασία της εκβλάστησης. Τελευταία, όμως, θεωρείται ότι έχει και αυτή κάποιο ρόλο στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, αφού διευκολύνει την είσοδο του ιού στο κύτταρο (Matrosovich et al., 2004) και καθυστερεί την δράση των ενδοσωμάτων (Suzuki et al., 2005). Δεδομένων όλων των παραπάνω, μπορεί να υποθεθεί ότι στελέχη του κλάδου της Florida προσαρτούν γονίδια από κυκλοφορούντα στελέχη του Ευρωασιατικού κλάδου, καταλήγοντας έτσι σε δημιουργία νέων στελεχών με διαφορετική αντιγονικότητα και παθογόνο δράση. Διαφορετική παθογόνος δράση, μεταξύ στελεχών που ανήκουν στον Ευρωασιατικό και στον Αμερικανικό κλάδο, έχει παρατηρηθεί μετά από πειραματική μόλυνση ιπποειδών (Yates and Mumford, 2000, Paillot et al., 2006). Είναι πιθανό με αυτό τον τρόπο να δημιουργούνται νέα στελέχη έναντι των οποίων ο οργανισμός δεν διαθέτει μηχανισμούς ανίχνευσης ή άμυνας ή ακόμα τα νέα αυτά στελέχη να ακολουθούν διαφορετικά εξελικτικά μονοπάτια. Αυτό ίσως μπορεί να αιτιολογήσει και τον ανασυνδυασμό των Ελληνικών στελεχών που απομονώθηκαν κατά την παρούσα μελέτη.

Δεδομένου ότι η παθογόνος δράση του ιού της γρίπης είναι πολυγονιδιακό γνώρισμα και προκειμένου να μελετηθεί η φυλογενετική προέλευση των Ελληνικών ανασυνδυασμένων στελεχών, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση τμημάτων και των υπόλοιπων έξι γονιδίων τους. Η μοριακή ανάλυση των γονιδίων M, NS, NP, PB1, PB2 και PA έδειξε 100% ομοιότητα μεταξύ των στελεχών για κάθε γονίδιο και τα κατέταξε ανάμεσα σε άλλα H3N8 στελέχη της γρίπης των ιπποειδών. Επίσης, τα Ελληνικά στελέχη ως προς τις πρωτεΐνες NS1, NP, PB1 και PA παρουσιάζουν ίδια φυλογενετική προέλευση με εκείνη της πρωτεΐνης NA. Ανήκουν, δηλαδή, στον κλάδο Florida II και είναι απόγονοι στελεχών που απομονώθηκαν από ιπποειδή σε επιζωοτίες του 2003 και μετά στην Ευρώπη, ενώ παράλληλα αποτελούν προγόνους στελεχών που απομονώθηκαν σε επιζωοτίες στην Ασία το 2007 και το 2008. Επίσης,

η τοπολογία της μέγιστης πιθανοφάνειας των φυλογενετικών δέντρων για τις πρωτεΐνες NS, NP, PB1, PA (εκτός των πρωτεϊνών M και PB2) παρουσιάζει τον ίδιο διαχωρισμό σε κλάδους με εκείνον που παρατηρήθηκε τόσο για την πρωτεΐνη HA, όσο και την NA. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι εν λόγω πρωτεΐνες, αν και θεωρούνται πιο συντηρημένες ανάμεσα σε όλους τους ιούς της γρίπης A, φαίνεται ότι εξελίσσονται ακολουθώντας ένα μοτίβο που προσομοιάζει με εκείνο της πρωτεΐνης HA.

Τα γονίδια M και NS κωδικοποιούν βασικές ιικές πρωτεΐνες από διαφορετικά αλλά επικαλυπτόμενα πλαίσια ανάγνωσης, μειώνοντας έτσι σημαντικά την πιθανότητα να συμβούν μεταλλάξεις και ως εκ τούτου είναι συντηρημένα (Ito et al., 1991, Kawaoka et al., 1998). Το τμήμα της πρωτεΐνης M1 που χρησιμοποιήθηκε στη φυλογενετική ανάλυση είναι αρκετά συντηρημένο ανάμεσα στους ιούς της γρίπης τύπου A των θηλαστικών, με αργό ρυθμό εξέλιξης, και για αυτό θεωρείται ότι η ανίχνευση αυτού του τμήματος εξυπηρετεί αποκλειστικά διαγνωστικούς σκοπούς της νόσου. Από τα αποτελέσματα της μοριακής μελέτης μας φαίνεται ότι αυτό επιβεβαιώνεται. Οι Lindstrom και συνεργάτες (1998), συμπέραναν ότι ο χαμηλός εξελικτικός ρυθμός του γονιδίου M των H3N8 ιών της γρίπης των ιπποειδών-ο οποίος ήταν πιο αργός και από εκείνον του ιού της γρίπης του ανθρώπου- οφείλεται σε μείωση των ποσοστών λανθασμένης ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του RNA από το σύμπλεγμα πολυμερασών αυτών των ιών.

Η φυλογενετική ανάλυση της εν λόγω πρωτεΐνης μόνο για στελέχη H3N8 του ιού της γρίπης των ιπποειδών που πραγματοποιήσαμε με τη μέθοδο της «Ένωσης Γειτόνων» έδειξε ότι υπάρχουν δύο βασικοί κλάδοι εξέλιξης μετά το 1963. Και οι δύο αυτοί κλάδοι περιλαμβάνουν τόσο παλαιότερα στελέχη όσο και στελέχη που απομονώνονται πρόσφατα. Από το φυλογενετικό δέντρο της πρωτεΐνης M1 φαίνεται ότι στελέχη που απομονώθηκαν στις ΗΠΑ τη δεκαετία του 1980 είναι προγονικά των Ελληνικών στελεχών, ενώ τα τελευταία φαίνεται να αποτελούν τους προγόνους τόσο των στελεχών H3N8 των ιπποειδών που απομονώθηκαν τα έτη 2007 και 2008 στην Ασία, όσο και του στελέχους H3N8 που απομονώθηκε από σκύλους στις ΗΠΑ το 2008. Οι Daly και συνεργάτες (1996), διατύπωσαν την άποψη ότι τα εξελικτικά μονοπάτια των γονιδίων M και NS, των πρόσφατων απομονωθέντων στελεχών του ιού της γρίπης των ιπποειδών, δείχνουν ότι τα γονίδια αυτά έχουν εξελιχθεί σε μια ουσιαστικά παράλληλη πορεία με το γονίδιο HA αυτών των στελεχών. Υπάρχουν ενδείξεις ότι μεταλλάξεις στα γονίδια M και NS έχουν προηγηθεί της απόκλισης του

γονιδίου HA. Για παράδειγμα, ενώ το γονίδιο HA του στελέχους A/equine/Ten/86 προσομοιάζει σε στελέχη H3N8 της περιόδου 1986-1987, το M γονίδιο του παρουσιάζει 99,6% ομοιότητα, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, με τα στελέχη A/equine/Roma/1991, A/equine/Lam/1992 και A/equine/HongKong/1992. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το στέλεχος A/equine/Ten/86 μπορεί να είναι ένα προγονικό στέλεχος των πιο πρόσφατων στελεχών που απομονώθηκαν στην Ευρώπη (Kawaoka et al., 1989, Lindstrom et al., 1998). Επιπλέον, ίδιες με εκείνες του στελέχους A/equine/Ten/86 μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη M2 παρατηρήθηκαν και στα μεταγενέστερα στελέχη του Ευρωασιατικού κλάδου, όπως είναι το A/equine/Lam/1992 και A/equine/HongKong/1992. Οι μεταλλάξεις των εσωτερικών πρωτεϊνών μπορεί να μην είναι τυχαίες αλλά να είναι χαρακτηριστικές του μηχανισμού μέσω του οποίου επηρεάζεται η μετέπειτα εξέλιξη της HA γλυκοπρωτεΐνης (Lindstrom et al., 1998). Στην παρούσα μελέτη επειδή το γονίδιο HA φαίνεται να έχει προσαρτηθεί στα Ελληνικά στελέχη μετά από αναδιάταξη, δεν μπορεί να διαπιστωθεί αν υπάρχει εξελικτική σχέση μεταξύ των πρωτεϊνών M και HA, υπάρχει όμως συσχέτιση μεταξύ των M και NA.

Η μη δομική πρωτεΐνη NS1 αποτελεί παράγοντα παθογονικότητας, σε λοίμωξη *in vivo*, και επομένως αποτελεί πρωτεΐνη ιδιαίτερου ενδιαφέροντος (Hale et al., 2008). Οι ιοί της γρίπης A των διαφόρων ειδών έχουν χωριστεί σε δύο αλληλόμορφες ομάδες, την A και B βάσει της αλληλουχίας της NS1 πρωτεΐνης τους (Ludwig et al., 1991). Η ομάδα A, περιλαμβάνει NS1 αλληλουχίες στελεχών που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο, τους χοίρους, τα πτηνά και τα ιπποειδή. Η ομάδα B, περιλαμβάνει αλληλουχίες στελεχών που έχουν απομονωθεί από πτηνά, καθώς και από το μοναδικό στέλεχος από ιπποειδή, το A/equine/Prague/56 (Suarez and Perdue, 1998). Στην παρούσα μελέτη, η φυλογενετική ανάλυση επί της πρωτεΐνης NS1, αφορούσε μόνο στελέχη ιπποειδών, έτσι το φυλογενετικό δέντρο της πρωτεΐνης αυτής παρουσιάζει ίδια τοπολογία με εκείνο προηγούμενης μελέτης (Bryant et al., 2009) και παρόμοια με το φυλογενετικό δέντρο της πρωτεΐνης HA. Επομένως, τα Ελληνικά στελέχη ως προς την πρωτεΐνη NS1 βρίσκονται φυλογενετικά ανάμεσα σε στελέχη του κλάδου Florida II, τα οποία κυριαρχούν στην Ευρώπη την τελευταία δεκαετία (Bryant et al., 2009). Επίσης, η παρουσία ενός κωδικονίου τερματισμού στην θέση 220 των Ελληνικών στελεχών συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη που αναφέρει την κατάτμηση της NS1 πρωτεΐνης, των ιών H3N8 της γρίπης των ιπποειδών, στη θέση αυτή μετά το 2002 (Bryant et al., 2009). Αυτό το κωδικόνιο λήξης έχει ως

αποτέλεσμα την απώλεια μίας θέσης PDZ, δηλαδή μίας ευρέως διαδεδομένης θέσης που μεσολαβεί στον πολλαπλασιασμό του ιού (Jackson et al., 2008, Jemth and Gianni, 2007). Τονίζεται, ότι όλα τα στελέχη του ιού H3N8 των ιπποειδών, πριν το 2002, παρουσιάζουν συνεχόμενη αλληλουχία της πρωτεΐνης NS1, χωρίς να υπάρχει το κωδικόνιο λήξης στην θέση αυτή. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι αυτό το κωδικόνιο λείπει και στην αντίστοιχη πρωτεΐνη των στελεχών H3N8 του ιού της γρίπης των ιπποειδών που απομονώθηκαν από σκύλους την τελευταία δεκαετία (Rivailler et al., 2010). Η παρουσία ή μη του εν λόγω κωδικονίου μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην εξελικτική πορεία τόσο της NS, όσο και της HA πρωτεΐνης ή ακόμα και στην παθογόνο δράση του ιού. Προκειμένου να μελετηθεί αυτό καλύτερα χρειάζεται διεύρυνση της βάσης των κατατιθεμένων αλληλουχιών στο GenBank ως προς την πρωτεΐνη NS1.

Οι πρωτεΐνες PB1, PB2, PA και NP σχηματίζουν μαζί με το ιικό RNA το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα (RNP). Ο ρόλος τους είναι αμιγώς λειτουργικός, καθώς είναι υπεύθυνες για την αντιγραφή και μεταγραφή του ιού. Δεδομένου ότι είναι εσωτερικές πρωτεΐνες των ιών της γρίπης A και δεν υπόκεινται σε σθεναρή πίεση επιλογής από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, θα περίμενε κανείς να εμφανίζονται συντηρημένες ανάμεσα στα είδη των ξενιστών, αλλά και να συνεξελίσσονται ως μία μονάδα, αφού απαντώνται και ως ένα σύμπλεγμα. Αυτό όμως δεν συμβαίνει, καθώς η εξελικτική πορεία των γονιδίων και των αντίστοιχων πρωτεϊνών του συμπλέγματος RNP έδειξε ότι δεν εξελίσσονται ως μία μονάδα, αλλά κάθε πρωτεΐνη παρουσιάζει διαφορετικό εξελικτικό ρυθμό (Gorman et al., 1990). Αυτό ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Έχει αποδειχτεί ότι οι πρωτεΐνες NP και PA παρουσιάζουν παρόμοια εξελικτική πορεία και η εξέλιξη αυτή θεωρείται ότι σχετίζεται με την προσαρμογή του ιού στον ξενιστή (Gorman, Bean et al., 1990, Gorman et al., 1990). Αντιθέτως, η εξέλιξη των PB1 και PB2 γονιδίων φαίνεται να είναι ανεξάρτητη παραγόντων που σχετίζονται με τον ξενιστή και επομένως τα φυλογενετικά δέντρα των PB1 και PB2 πρωτεϊνών όλων των ιών της γρίπης A παρουσιάζουν μικρότερη απόκλιση μεταξύ τους και πιο αργό ρυθμό εξέλιξης (Gorman et al., 1990). Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης στην παρούσα μελέτη, δείχνουν ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του συμπλέγματος RNP συμπλέγματος των ιών της γρίπης των ιπποειδών H3N8 σχηματίζουν ένα αυτοτελές γενεαλογικό κλάδο, συμπεριλαμβανομένων των Ελληνικών στελεχών. Το γεγονός αυτό, συμφωνεί τόσο με τα αποτελέσματα των

παραπάνω μελετών (Gorman, Bean et al., 1990, Gorman et al., 1990), όσο και με εκείνα μίας πιο πρόσφατης μελέτης των Manuguerra και συνεργατών (2001), που υποστηρίζουν ότι όλα τα στελέχη των ιπποειδών, βάσει των πρωτεϊνών των πολυμερασών, συγκαταλέγονται σε ένα γενεαλογικό κλάδο. Στην προαναφερθείσα μελέτη υποστηρίζεται ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πολυμεράσες των ιών της γρίπης Α παρουσιάζουν γραμμική εξέλιξη. Πρώτοι οι Bean και συνεργάτες (1990), αναφέρουν ότι η αναδιάταξη μεταξύ στελεχών του τύπου Ι και του τύπου ΙΙ, κατά την χρονική περίοδο 1964-1973, οδήγησε στην αντικατάσταση των εσωτερικών γονιδίων των στελεχών του τύπου Ι από εκείνα του τύπου ΙΙ.

Η φυλογενετική ανάλυση των πρωτεϊνών NP, PB1 και PA των Ελληνικών στελεχών παρουσίαζε τον ίδιο ή σχεδόν τον ίδιο (για την πρωτεΐνη PA) διαχωρισμό σε κλάδους και την ίδια (Lai et al., 2001), κατάταξη των Ελληνικών στελεχών στον υποκλάδο ΙΙ της Florida ως προς τις NP και PB1 και στον Αμερικανικό κλάδο ως προς την PA πρωτεΐνη. Επομένως, η φυλογενετική ανάλυση που παρουσιάζεται στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει την άποψη ότι η εξέλιξη των πρωτεϊνών των πολυμερασών των πρόσφατων στελεχών του ιού της γρίπης των ιπποειδών H3N8, βαίνει παράλληλα με εκείνη της HA πρωτεΐνης (Manuguerra et al., 2001). Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα, όμως, αυτό ισχύει μόνο για τις πρωτεΐνες PA και PB1 και όχι για την PB2, διότι η PB2 παρουσιάζεται πιο συντηρημένη και δεν ακολουθεί το ίδιο φυλογενετικό πρότυπο στον διαχωρισμό των κλάδων, όπως αυτό παρατηρείται για τις πρωτεΐνες HA, NA, NP, PA, PB1 και NS1. Ο χαμηλός ρυθμός εξέλιξης της PB2 πρωτεΐνης έχει χρεωθεί σε περιοριστικούς παράγοντες της λειτουργίας της, που σχετίζονται με το εκάστοτε στέλεχος του ιού (Gorman et al., 1990). Επομένως, η συντηρητικότητα του γονιδίου PB2 εξηγεί την έλλειψη που παρουσιάζει στην εξειδίκευσή του ξενιστή και ίσως να μην αποτελεί εμπόδιο στην προσαρμογή του ιού σε άλλο είδος ξενιστή. Παρόλα αυτά, τα ενζωτικά στελέχη H3N8 που απομονώθηκαν την περίοδο 2005-2008 από σκύλους συγκρινόμενα με στελέχη H3N8 των ιπποειδών, εμφανίζουν τις μεγαλύτερες αλλαγές στις HA και PB2 πρωτεΐνες (Rivaller et al., 2010). Αυτές οι αντικαταστάσεις στην PB2 πρωτεΐνη θεωρείται ότι συμμετέχουν στη βελτιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων του RNP συμπλέγματος του ιού με τους παράγοντες υποδοχής του ξενιστή στο περιβάλλον του πυρήνα του κυττάρου (Guilligay et al., 2008). Πιθανόν για τον ίδιο λόγο η PB2 πρωτεΐνη παρουσιάζεται συντηρημένη ανάμεσα στα διάφορα στελέχη H3N8 της γρίπης των ιπποειδών από το 1990 έως σήμερα.

Η μοριακή ανάλυση των Ελληνικών στελεχών από τις δύο επιζωοτίες, έδειξε 100% ομοιότητα μεταξύ τους. Το γεγονός ότι το ίδιο στέλεχος συνέχισε να κυκλοφορεί από το 2003 έως και το 2007 δείχνει επικράτηση του στελέχους αυτού στους ανεμβολίαστους πληθυσμούς των ιπποειδών, στην ίδια περιοχή. Δεδομένου αυτού καθώς και του ότι η πρωτεΐνη HA των εν λόγω στελεχών προέρχεται από εξελικτική στάση, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ίσως να υπάρχει κάποια δεξαμενή του στελέχους αυτού. Επίσης, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η παρούσα μελέτη αφορά ανεμβολίαστα άτομα και επομένως οι διαφορές στην ανοσοποιητική κατάσταση των ζώων αντιπροσωπεύουν διαφορές στην επιλεκτική πίεση των επικρατούντων κάθε φορά στελεχών. Επομένως, μία άλλη υπόθεση που μπορεί να εξηγήσει την παραμονή του ίδιου στελέχους είναι η χαμηλή εξελικτική πίεση που δέχεται αυτό το ανασυνδυασμένο στέλεχος.

Η μοριακή και φυλογενετική ανάλυση των γονιδιακών τμημάτων των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη συμφωνούν στην άποψη, που έχει ήδη διατυπωθεί, ότι διάφορα στελέχη της γρίπης των ιπποειδών συγκυκλοφορούν ανάμεσα στους πληθυσμούς χωρίς τα νέο-αναδυόμενα στελέχη να αντικαθιστούν τα παλαιότερα (Lai et al., 2001, Daly et al., 1996, Bryant et al., 2009). Τόσο η παράλληλη κυκλοφορία στελεχών με διαφορετική φυλογενετική εξέλιξη, όσο και η ανάδυση στελεχών που είχαν παραμείνει σε «στάση» είναι σημαντικοί παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την επιλογή των εμβολιακών στελεχών. Η απλή προσθήκη νέων στελεχών στα εμβόλια δεν θεωρείται σκόπιμη, διότι ο αντιγονικός ανταγωνισμός καταλήγει σε φτωχή ανοσοποιητική απάντηση. Επίσης, κίνδυνο για νέες επιζωοτίες, ακόμα και εμβολιασμένων ιπποειδών, αποτελεί η πιθανή αναδιάταξη μεταξύ διαφορετικών συγκυκλοφορούντων στελεχών ή ανάμεσα σε νέο-αναδυόμενα στελέχη και στελέχη σε εξελικτική στάση, όπως έγινε στην περίπτωση των Ελληνικών στελεχών σε ανεμβολίαστα ζώα.

Συμπερασματικά, από τη συγκεκριμένη μελέτη αποδεικνύεται η παρουσία του ιού της γρίπης Α των ιπποειδών σε ζώα με συμπτώματα αναπνευστικής λοίμωξης στην Ελλάδα, το 2003 και το 2007. Για πρώτη φορά αναφέρεται απομόνωση και μοριακός χαρακτηρισμός στελέχους H3N8 της γρίπης των ιπποειδών στην Ελλάδα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα Ελληνικά στελέχη, που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη, προέκυψαν από ανασυνδυασμό στελεχών που είχαν προκαλέσει σοβαρές επιζωοτίες της νόσου στην Ευρώπη το 2003 και το 1993. Τέτοιου είδους αναδιάταξη δεν αναφέρεται για πρώτη φορά παγκοσμίως. Η έλλειψη συστήματος

επιτήρησης της γρίπης για τα ιπποειδή στην χώρα μας, αλλά και σε άλλες γειτονικές χώρες, καθιστά αδύνατη την εξαγωγή συμπερασμάτων, όπως το αν τέτοια αναδιαταγμένα στελέχη είναι κοινά στην χώρα μας ή αν πρόκειται για στελέχη που απαντώνται σε ανεμβολίαστους πληθυσμούς.

Το γεγονός ότι στελέχη H3N8 της γρίπης των ιπποειδών απομονώθηκαν από τους χοίρους το 2005 και το 2006 (Tu et al., 2009), ενώ επιπλέον προκάλεσαν σοβαρές επιζωοτίες σε σκύλους στις ΗΠΑ, στην Αυστραλία και στο Ηνωμένο Βασίλειο την περίοδο 2003-2008 (Crawford et al., 2005, Rivaille et al., 2010, Newton et al., 2007, Kirkland et al., 2010) υποδηλώνει ότι τα ιπποειδή ίσως να μην αποτελούν πια τον τελικό ξενιστή αυτών των στελεχών. Οι Tu και συνεργάτες (2009), δεν μπόρεσαν να καταλήξουν αν η μετάδοση του ιού H3N8 από τα ιπποειδή στους χοίρους ήταν τυχαίο γεγονός ή σχετίζεται με την εξέλιξη του ιού. Αντιθέτως, η μετάδοση από τα ιπποειδή στους σκύλους, κατά την περίοδο 2003-2008, φαίνεται ότι οδήγησε τελικά στην εμφάνιση ενός διακριτού κλάδου εξέλιξης του ιού H3N8 των σκύλων από εκείνον των ιπποειδών (Rivaille et al., 2010). Επομένως, η μελέτη ανασυνδυασμένων στελεχών ή στελεχών που χαρακτηρίζονται από αλλαγές στην παθογόνο δράση ή στη διάσπαση του φραγμού των ειδών, μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για την εξέλιξη του ιού της γρίπης.

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες μελέτες περιορίζονται στη μοριακή και φυλογενετική ανάλυση του HA γονιδίου, καθώς ο χαρακτηρισμός του μπορεί να δείξει την λοιμογόνο δύναμη του ιού (Daly et al., 1996). Αυτό, όμως, δεν είναι απαραίτητα ενδεικτικό της παθογόνου και λοιμογόνου δράσης. Η παθογόνος δράση του ιού της γρίπης των ιπποειδών είναι πολυγονιαδιακό γνώρισμα (Wright et al., 2007), επομένως η μοριακή και φυλογενετική ανάλυση και των υπόλοιπων γονιδίων του ιού κρίνεται ολόένα και περισσότερο αναγκαία προκειμένου να εξαγχθούν συμπεράσματα για τη δράση των H3N8 στελεχών.

Τα ειδικά ζεύγη εκκινήτων που σχεδιάστηκαν για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης, θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση και το γενετικό χαρακτηρισμό των γονιδίων («εσωτερικών» γονιδίων) που κωδικοποιούν τις εσωτερικές πρωτεΐνες των στελεχών της γρίπης των ιπποειδών. Παράλληλα, η φυλογενετική ανάλυση όλων των γονιδιακών τμημάτων των Ελληνικών στελεχών μαζί με άλλα διεθνή παρέχει πληροφορίες για την κατανόηση της εξέλιξης των H3N8 ιών και αποτελεί θεμέλιο για την περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού ανασυνδυασμού μεταξύ συγκυκλοφορούντων στελεχών διαφορετικών εξελικτικών κλάδων. Ο

μοριακός και φυλογενετικός χαρακτηρισμός των «εσωτερικών» γονιδίων επιτρέπουν τη μελλοντική ανάλυση των αντικαταστάσεων των νουκλεοτιδίων, που χαρακτηρίζουν τους διαφορετικούς εξελικτικούς κλάδους.

Τέλος, η μελέτη όλων των γονιδίων ανασυνδυασμένων στελεχών, όπως είναι τα Ελληνικά στελέχη, μπορεί να αποτελέσει τη βάση ώστε να αποσαφηνιστούν σκοτεινά σημεία που αφορούν την οικολογία και την εξέλιξη των ιών της γρίπης των ιπποειδών. Πιθανόν, τέτοιοι ανασυνδυασμοί να μην είναι τυχαίοι, αλλά αντίθετα να βασίζονται σε κάποιον εξελικτικό μηχανισμό.

Καταλήγοντας τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι τα εξής:

- Στην Ελλάδα, για πρώτη φορά αναφέρεται ο μοριακός χαρακτηρισμός και φυλογενετική ανάλυση του υποτύπου H3N8 της γρίπης Α των ιπποειδών.
- Η μοριακή και φυλογενετική ανάλυση όλων των γονιδίων των απομονωθέντων στελεχών έδειξε ότι ο αιτιολογικός παράγοντας των επιζωοτιών γρίπης ιπποειδών στην Ελλάδα τα έτη 2003 και 2007 ήταν ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος H3N8.
- Διαπιστώθηκε η παρουσία στελεχών που βρίσκονται σε κατάσταση «εξελικτικής στάσης».

Ενώ τα οφέλη από την παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

- Η χρήση κυτταροκαλλιιεργειών MDCK υποστηρίζει σε μεγάλο ποσοστό την απομόνωση του ιού της γρίπης των ιπποειδών H3N8.
- Το γονίδιο HA αναπαράγεται με απόλυτη πιστότητα κατά τον πολλαπλασιασμό στελεχών H3N8 σε MDCK κυτταροκαλλιέργειες, χωρίς να προσαρτά μεταλλάξεις από τα κύτταρα-ξενιστές.
- Η χρήση του τεστ του *in vitro* ανοσοπροσδιορισμού, Directigen Flu A, για την ανίχνευση του ιού της γρίπης των ιπποειδών υποστηρίζει με επάρκεια την ανίχνευση του ιού.
- Επιβεβαιώνεται η συγκυκλοφορία διαφόρων στελεχών H3N8 της γρίπης των ιπποειδών που ανήκουν σε διαφορετικούς εξελικτικούς κλάδους.
- Τα ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν κατά την παρούσα μελέτη θα μπορούσαν να αποτελέσουν εργαλείο για την ανίχνευση των «εσωτερικών» γονιδίων της γρίπης των ιπποειδών.
- Η μοριακή και φυλογενετική ανάλυση όλων των γονιδίων των Ελληνικών στελεχών αποτελούν χρήσιμη βάση για περαιτέρω μελέτη, καθώς δεν υπάρχουν πολλές κατατεθειμένες αλληλουχίες των γονιδίων αυτών. Η γενετική ανάλυση

των προαναφερθέντων γονιδίων είναι χρήσιμη όχι μόνο για την Ελλάδα, αλλά και παγκοσμίως, για μελλοντική μελέτη της παθογόνου δράσης και της εξέλιξης των ιών της γρίπης των ιπποειδών.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alymova I.V., Kodihalli S., Govorkova E.A., Fanget B., Gerdil C., Webster R.G. (1998). Immunogenicity and Protective Efficacy in Mice of Influenza B Virus Vaccines Grown in Mammalian Cells or Embryonated Chicken Eggs. *J. Virol* 72: 4472.

Adeyefa C.A., Quayle K., McCauley J.W. (1994). A rapid method for the analysis of influenza virus genes: application to the reassortment of equine influenza virus genes. *Virus Res* 32: 391–399.

Anon, (2008). Summary of the Australian equine influenza outbreak. *Vet Record*. 163: 378.

Barbic L., Madic J., Turk N., Daly J. (2009). Vaccine failure caused an outbreak of equine influenza in Croatia. *Vet Microbiol* 133: 164–171.

Barquero N., Daly J.M., Newton J.R. (2007). Risk factors for influenza infection in vaccinated racehorses: lessons from an outbreak in Newmarket, UK in 2003. *Vaccine* 25: 7520–7529.

Birch-Machin I., Rowan A., Pick J., Mumford J., Binns M. (1997). Expression of the non-structural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of anti-NS1 antibody in post infection equine sera, *J Virol Methods* 65: 255–263.

Borchers K., Daly J., Stiens G., Kreling K., Kreling I., Ludwig H. (2005). Characterisation of three equine influenza A H3N8 viruses from Germany (2000 and 2002): evidence for frozen evolution. *Vet Microbiol* 107:13–21.

Bowes V.A., Ritchie S.J., Byrne S., Sojonky K., Bidulka J.J., Robinson J.H. (2004). Virus characterization, clinical presentation and pathology associated with H7N3 avian influenza in British Columbia broiler breeder chickens in 2004. *Avian Dis* 48:928-34.

Bron R., Kendal A.P., Klenk H.D., Wilschut J. (1993). Role of the M2 protein in influenza virus membrane fusion: effects of amantadine and monensin on fusion kinetics. *Virology* 195(2): 808-11.

Brurrows R., Denyer M. (1982). Antigenic properties of some equine influenza viruses. *Arch Virol* 73: 15-24.

Bryant N.A., Rash A.S., Russell C.A., Ross J., Cooke A., Bowman S., Shona MacRae A., Lewis N.S., Paillot R., Zanoni R., Meier H., Griffiths L.A., Daly J.M., Tiwari A., Chambers T.M., Newton J.R., Elton D.M. (2009). Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. *Vet Microbiol* 38:41–52.

Bryant N.A., Paillot R., Rash A.S., Medcalf E., Montesso F., Ross J., Watson J., Lewis R., Newton J.R., Elton D.M. (2010). Comparison of two modern

vaccines and previous influenza infection against challenge with an equine influenza virus from the Australian 2007 outbreak. *Vet Res* 41:19.

Buonagurio D.A., Nakada S., Desselberger U., Krystal M., Palese P. (1985). Noncumulative sequence changes in the hemagglutinin gene of influenza C virus isolates. *Virology* 146: 221–232.

Buonagurio D.A., Nakada S., Fitch W.M., Palese P. (1986). Epidemiology of influenza C virus in man: multiple evolutionary lineages and low rate of change. *Virology* 153: 12–21.

Callinan I. (2008). Equine Influenza: The August 2007 Outbreak in Australia. Report of the Equine Influenza Inquiry. The Commonwealth of Australia. <http://www.equineinfluenzainquiry.gov.au/ei/exhibits/REP.0001.001.0001.pdf>

Chambers T.M., Shortridge K.F., Li P.H., Powell D.G., Watkins K.L. (1994). Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen FLU-A enzyme immunoassay. *Vet Rec* 135: 275–279.

Chanturiya A.N., Basañez G., Schubert U., Henklein P., Yewdell J.W., Zimmerberg J. (2004). PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes. *J Virol* 78(12): 6304-6312.

Chen W., Calvo P.A., Malide D., Gibbs J., Schubert U., Bacik I., Basta S., O'Neill R., Schickli J., Palese P., Henklein P., Bennink J.R., Yewdell J.W. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 7:1306–1312.

Chu C.M., Andrewes C.H., Glendhill A.W. (1949). Filamentous forms associated with newly isolated influenza virus. *Lancet* 1(6554): 602.

Claas E.C.J., Osterhaus A.D.M. E., Van Beek R., De Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Senne D.A., Krauss S., Shortridge K.F., Webster R. G. (1998). Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351:472-477.

Compans R.W., Meier-Ewert H., Palese P.A. (1974). Assembly of lipid-containing viruses. *J Supramol Struct* 2(2-4): 496-511.

Cook R.F., Sinclair R., Mumford J.A. (1988). Detection of influenza nucleoprotein antigen in nasal secretions from horses infected with A/ equine influenza (H3N8) viruses. *J Virol Methods* 20: 1–12.

Copeland C.S., Doms R.W., Bolzau E.M., Webster R.G., Helenius A. (1986). Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. *J Cell Biol* 103(4): 1179-1191.

Nunes C.I., Ramalho-Santos J., Nir S., Pedroso de Lima M.C. (1999). Interactions of Influenza Virus with Cultured Cells: Detailed Kinetic Modeling of Binding and Endocytosis. *Biochemistry* 38: 1095-1101.

Crawford P.C., Dubovi E.J., Castleman W.L., Stephenson I., Gibbs E.P., Chen L., Smith C., Hill R.C., Ferro P., Pompey J., Bright R.A., Medina M.J., Johnson C.M., Olsen C.W., Cox N.J., Klimov A.I., Katz J.M., Donis R.O. (2005). Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science* 310:482-485.

Cross K.J., Burleigh L.M., Steinhauer D.A. (2001). Mechanisms of Cell Entry by Influenza Virus. *Expert Rev Mol Med* 6: 1-18.

Cullinane A., Weld J., Osborne M., Nelly M., McBride C., Walsh C. (2001). Field studies on equine influenza vaccination regimes in Thoroughbred foals and yearlings. *Vet J* 161: 174-185.

Daly J.M., Yates R.J., Browse G., Swann Z., Newton J.R., Jessett D., Davis-Poynter N., Mumford J.A. (2003). Comparison of hamster and pony challenge models for evaluation of effect of antigenic drift on cross protection afforded by equine influenza vaccines. *Equine Vet J* 35(5): 458-462.

Daly J.M., Lai A.C., Binns M.M., Chambers T.M., Barrandeguy M., Mumford J.A. (1996). Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. *J Gen Virol* 7(4): 661-671.

Daly J.M., Newton J.R., Mumford J.A. (2004). Current perspectives on control of equine influenza. *Vet Res* 35(4): 411-423.

Daly J.M., MacRae S., Newton J.R., Watrang E., Elton D.M. (2010). Equine influenza: A review of an unpredictable virus. *Vet J* doi:10.1016/j.tvjl.2010.06.026

Daly J.M., Whitwell K.E., Miller J., Dowd G., Cardwell J.M., Smith K.C. (2006). Investigation of equine influenza cases exhibiting neurological disease: coincidence or association? *J Comp Pathol* 134: 231-235.

Daly J.M., Blunden A.S., MacCrae S., Miller J., Bowman S.J., Kolodziejek J., Nowotny N., Smith K.C. (2008). Transmission of equine influenza virus to English foxhounds. *Emerg Infect Dis* 14: 461-464.

Damiani A.M., Scicluna M.T., Ciabatti I., Cardeti G., Sala M., Vulcano G., Cordioli P., Martella V., Amaddeo D., Autorino G.L. (2008). Genetic characterization of equine influenza viruses isolated in Italy between 1999 and 2005. *Virus Res* 131: 100-105.

Desselberger U., Racaniello V.R., Zazra J.J., Palese P. (1980). The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* 8(3): 315-328.

- Donis R.O., Bean W.J., Kawaoka Y., Webster R.G. (1989). Distinct lineages of influenza virus H4 hemagglutinin genes in different regions of the world. *Virology* 169(2): 408-417.
- Donofrio J., Coonrod D., Chambers T.M. (1994). Diagnosis of equine influenza by the polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 6: 39-43.
- Endo A., Pecoraro R., Sugita S., Nerome K. (1992). Evolutionary pattern of the H3 haemagglutinin of equine influenza viruses: multiple evolutionary lineages and frozen replication. *Arch Virol* 123: 73-87.
- Fiers W., De Filette M., Birkett A., Neiryck S., Min Jou W. (2004). A "universal" human influenza A vaccine. *Virus Res* 103(1-2): 173-176.
- Fouchier R.A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelswaan G.F., Olsen B., Osterhaus A.D. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79: 2814-2822.
- Fouchier R.A.M., Bestebroer T.M., Herfst S., Van Der Kemp L., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E. (2000). Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol* 38:4096-4101.
- Frommhagen L.H., Knight C.A., Freeman N.K. (1959). The ribonucleic acid, lipid, and polysaccharide constituents of influenza virus preparations. *Virology* 8(2): 176-197.
- Gamblin S.J., Skehel J.J. (2010). Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem*. 285(37):28403-28499.
- Gamblin S.J., Haire L.F., Russell R.J., Stevens D.J., Xiao B., Ha Y., Vasisht N., Steinhauer D.A., Daniels R.S., Elliot A., Wiley D.C., Skehel J.J. (2004). The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science* 303:1838-1842.
- Garcia-Sastre A. (2001). Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology* 279(2): 375-384.
- Gastaminza P., Perales B., Falcón A.M., Ortín J. (2003). Mutations in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not transcription. *J Virol* 77(9): 5098-5108.
- Gavin P.J., Thomson R.B.Jr. (2003). Review of Rapid Diagnostic Tests for Influenza. *Clin Applied Immunol Rev* 4: 151-172.
- Gerdil C. (2003). The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 21: 1776-1779.

- Glass K., Wood J.L.N., Mumford J.A., Jessett D., Grenfell B.T. (2002). Modelling equine influenza 1: a stochastic model of within- and epidemics. *Epidemiol Infect* 128: 491–502.
- Gomez-Puertas P., Albo C., Pérez-Pastrana E., Vivo A., Portela A. (2000). Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* 74(24): 11538-11547.
- Gonzalez S., Ortin J. (1999). Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J* 18(13): 3767-3775.
- Gorman O.T., Bean W.J., Kawaoka Y., Donatelli I., Guo Y.J., Webster R.G. (1991). Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol* 65(7): 3704-3714.
- Gorman O.T., Donis R., Kawaoka Y., Webster R. (1990). Evolution of Influenza A Virus PB2 Genes: Implications for Evolution of the Ribonucleoprotein Complex and Origin of Human Influenza A Virus. *J Virol* 64(10): 4893-4902.
- Gorman O.T., Bean W., Kawaoka Y., Webster R. (1990). Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J Virol* 64(4): 1487-1497.
- Govorkova E.A., Kodohalli S., Alymova I.V., Fanget B., Webster R.G. (1999). Growth and immunogenicity of influenza viruses cultivated in Vero or MDCK cells and in embryonated chicken eggs. In: Brown R., Robertson J.S., Schild G.C., Wood J.M. (Eds.), *Inactivated Influenza Vaccines Prepared in Cell Culture. Dev Biol Stand* Vol. 98, pp. 39–51.
- Govorkova E.A., Murti G., Meignier B., De Taisne C., Webster R.G. (1996). African green monkey kidney (Vero) cells provides an alternative host cell system for influenza A and B viruses. *J Virology* 70: 5519–5524.
- Guilligay D., Tarendeau F., Resa-Infante P., Coloma R., Crepin T., Sehr P., Lewis J., Ruigrok R.W., Ortin J., Hart D.J., Cusack S. (2008). The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* 15 (5):500–506.
- Gulati U., Hwang C.C., Venkatramani L., Gulati S., Stray S.J., Lee J.T., Laver W.G., Bochkarev A., Zlotnick A., Air G.M. (2002). Antibody epitopes on the neuraminidase of a recent H3N2 influenza virus (A/Memphis/31/98). *J Virol* 76(23): 12274-12280.
- Guo Y., Wang M., Zheng G.S., Li W.K., Kawaoka Y., Webster R.G. (1995). Seroepidemiological and molecular evidence for the presence of two H3N8 equine influenza viruses in China in 1993–94. *J Gen Virol* 76:2009–2014.

Guo Y., Wang M., Kawaoka Y., Gorman O., Ito T., Saito T., Webster R.G. (1992). Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. *Virology* 188(1): 245-255.

Gupta M.P., Yadav P.K., Uppal J.A., Mumford J.A., Binns M.M. (1993). Characterisation of equine influenza isolates from the 1987 epizootic in India by nucleotide sequencing of the HA1 gene. *Equine Vet J* 25: 99–102.

Guthrie A.J. (2006). Equine influenza in South Africa, 2003 outbreak. In: Proceedings of the 9th International Congress of World Equine Veterinary Association. International Veterinary Information Service.

Hale, B.G., Randall R.E., Ortin J., Jackson D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* 89(Pt 10): 2359-2376.

Hale B.G., Randall R.E., Ortin J., Jackson D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* 89: 2359–2376.

Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Hannant D., Mumford J.A. (1989). Cell mediated immune responses in ponies following infection with equine influenza virus (H3N8): the influence of induction culture conditions on the properties of cytotoxic effector cells. *Vet Immunol Immunopathol* 21 (3/4): 327–337.

Hannant D., Jessett D.M., O'Neill T., Sundquist B., Mumford J.A. (1987). Nasopharyngeal, tracheobronchial, and systemic immune responses to vaccination and aerosol infection with equine-2 influenza A virus (H3N8). In: Powell D.G. (Ed.), *Equine infectious diseases. V: Proceedings of the Fifth International Conference*, University Press of Kentucky, Lexington, KY, pp. 66–73.

Hannant D., Jessett D.M., O'Neill T., Livesay G.J., Mumford J.A. (1994). Cellular immune responses stimulated by inactivated virus vaccines and infection with equine influenza virus (H3N8). In: H. Nakajima and W. Plowright (Eds), *Equine infectious diseases. VII: Proceedings of the Seventh International Conference on Equine Infectious Diseases*, R & W Publications Ltd., Newmarket, UK, pp. 169–174.

Hannant D., Mumford J.A., Jessett D.M. (1988). Duration of circulating antibody and immunity following infection with equine influenza virus. *Vet Rec* 122: 125–128.

Hatta M., Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses *Science* 293(5536): 1840-1842.

Hay A.J., Lomniczi B., Bellamy A.R., Skehel J.J. (1977). Transcription of the influenza virus genome. *Virology* 83(2): 337-355.

Herrler G., Klenk H.D. (1991). Structure and function of the HEF glycoprotein of influenza C virus. *Adv Virus Res* 40: 213-234.

Herz C., Stavnezer E., Krug R., Gurney T. Jr. (1981). Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells. *Cell* 26(3 Pt 1): 391-400.

Hidaka F., Matsuo S., Muta T., Takeshige K., Mizukami T., Nunoi H. (2006). Amisense mutation of the Toll-like receptor 3 gene in a patient with influenza associated encephalopathy. *Clinical Immunology* 119: 188–194.

Hirst M., Astell C.R., Griffith M., et al (2004). Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. *Emerg Infect Dis* 10:2192-2195.

Hjalmarsson A., Blomqvist P., Brytting M., Linde A., Skoldenberg B. (2009). Encephalitis after influenza in Sweden 1987–1998: a rare complication of a common infection. *Europ Neurol* 61: 289–294.

Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R. (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 146(12): 2275-2289.

Holland J., Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S., VandePol S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215(4540):1577–1585.

Hutchinson E.C., von Kirchbach J.C., Gog J.R., Digard P. (2010). Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol* 91(Pt 2): 313-328.

Ilobi C.P., Henfrey R., Robertson J.S., Mumford J A., Erasmus B.J., Wood J.M. (1994). Antigenic and molecular characterization of host cell-mediated variants of equine H3N8 influenza viruses. *J Gen Virol* 75: 669-673.

Ito M., Nagai M., Hayakawa Y., Komae H., Murakami N., Yotsuya S., Asakura S., Sakoda Y., Kida H. (2008). Genetic analyses of an H3N8 influenza virus isolate, causative strain of the outbreak of equine influenza at the Kanazawa racecourse in Japan in 2007. *J Vet Med Sci* 70 (9): 899–906.

Ito T., Gorman O.T., Kawaoka Y., Bean W.J., Webster R.G. (1991). Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol* 65 (10): 5491–5498.

Ito T.J., Nelson, S.S., Couceiro S., Kelm L., Baum G., Krauss S., Castrucci M.R., Donatelli I., Kida H., Paulson J.C., Webster R.G., Kawaoka Y. (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72:7367-7373.

Jackson D., Hossain M.J., Hickman D., Perez D.R., Lamb R.A. (2008). A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 105 (11): 4381–4386.

Jemth P., Gianni S. (2007). PDZ domains: folding and binding. *Biochemistry* 46 (30): 8701–8708.

Kasel J.A., Couch R.B. (1969). Experimental infection in man and horses with influenza A viruses. *Bull WHO* 41: 447–452.

Kasel JA, Alford R.H., Knight V., Waddell G.H., Sigel M.M. (1965). Experimental infection of human volunteers with equine influenza virus. *Nature* 206: 41–43.

Katz J.M., Wang M., Webster R.E. (1990). Direct sequencing of the HA gene of Influenza virus in original clinical samples reveal sequence identity with mammalian cell-grown virus. *J Virol* 64: 1808-1811.

Kawaoka Y., Webster R.G. (1989). Origin of the hemagglutinin on A/Equine/Johannesburg/86 (H3N8): the first known equine influenza outbreak in South Africa. *Arch Virol* 106: 159–164.

Kawaoka Y., Bean W.J., Webster R.G. (1989). Evolution of the hemagglutinin of equine H3 influenza viruses. *Virology* 169: 283–292.

Kawaoka Y., Gorman O.T., Ito T., Wells K., Donis R.O., Castrucci M.R., Donatelli I., Webster R.G. (1998). Influence of host species on the evolution of the non-structural (NS) gene of influenza A viruses. *Virus Res* 55 (2): 143–156.

Kida H., Ito T., Yasuda J., Shimizu Y., Itakura C., Shortridge K.F., Kawaoka Y., Webster R.G. (1994). Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol* 75:2183-2188.

Kirkland P.D., Finlaison D.S., Crispe E., Hurt A.C. (2010). Influenza virus infection in dogs – transmission during the Australian equine influenza outbreak. *Emerg Infect Dis* 16: 699–702.

Kistner O., Barrett P.N., Mundt W., Reiter M., Schober-Bendixen S., Dorner F., (1998). Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine* 16: 960.

Kistner O., Barrett P.S., Mundt W., Reiter M., Schober-Bendixen S., Der G., Dorner F. (1999). Development of a Vero cell-derived influenza whole virus vaccine. In: Brown R., Robertson J.S., Schild G.C., Wood J.M. (Eds.), *Inactivated Influenza Vaccines prepared in Cell Culture. Dev Biol Stand Vol. 98*, pp. 101–110.

Lai A.C., Rogers K.M., Glaser A., Tudor L., Chambers T. (2004). Alternate circulation of recent equine-2 influenza viruses (H3N8) from two distinct lineages in the United State. *Virus Res* 100: 159–164.

- Lai A.C., Chambers T.M., Holland Jr.R.E., Morley P.S., Haines D.M., Townsend H.G., Barrandeguy M. (2001). Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. *Arch Virol* 146 (6): 1063–1074.
- Lamb R.A., Krug R.M. (2007). Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields Virology, Knipe D.M., Howley P.M. (eds), 5th edition, Philadelphia, USA, Lippincott-Raven, pp. 1449-1496
- Latham T., Galarza J.M. (2001). Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J Virol* 75(13): 6154-6165.
- Law J. (1874). Influenza in horses. Report of the Commissioner of Agriculture, 1872. Washington: Government Printing Office.
- Lazarowitz S.G., Compans R.W., Choppin P W. (1973). Proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide of influenza virus. Function of the uncleaved polypeptide HA. *Virology* 52: 199—212.
- Leahy M.B., Dobbyn H.C., Brownlee G.G. (2001). Hairpin loop structure in the 3' arm of the influenza A virus virion RNA promoter is required for endonuclease activity. *J Virol* 75(15): 7042-7049.
- Leahy M.B., Pritlove D.C., Poon L.L., Brownlee G.G. (2001). Mutagenic analysis of the 5' arm of the influenza A virus virion RNA promoter defines the sequence requirements for endonuclease activity. *J Virol* 75(1): 134-142.
- Lindstrom S., Endo A., Sugita S., Pecoraro M., Hiromoto Y., Kamada M., Takahashi T., Nerome K., (1998). Phylogenetic analysis of the matrix and non-structural genes of equine influenza viruses. *Arch Virol* 143: 1585–1598.
- Liu S., Ji K., Chen J., Tai D., Jiang W. et al. (2009). Panorama Phylogenetic Diversity and Distribution of Type A Influenza Virus. *PLoS ONE* 4(3): e5022. doi:10.1371/journal.pone.0005022.
- Livesay G.J., O'Neill T., Hannant D., Yadav M.P., Mumford J.A. (1993). The outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 1989: diagnostic use of an antigen capture ELISA. *Vet Rec* 133: 515–519.
- Lu Z., Chambers T.M., Boliar S., Branscum A.J., Sturgill T.L., Timoney P.J., Reedy S.E., Tudor L.R., Dubovi E.J., Vickers M-L., Sells S., Balasuriya U.B.R. (2009). Development and Evaluation of One-Step TaqMan Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays Targeting Nucleoprotein, Matrix, and Hemagglutinin Genes of Equine Influenza Virus. *J Clin Microbiol* 47(12): 3907-3913.
- Ludwig S., Schultz U., Mandler J., Fitch W.M., Scholtissek C. (1991). Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses. *Virology* 183: 566–577.

Ma K., Roy A.M., Whittaker G.R. (2001). Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. *Virology* 282(2): 215-220.

Manuguerra J.C., Zientara S., Sailleau C. et al., (2000). Evidence for evolutionary stasis and genetic drift by genetic analysis of two equine influenza H3 viruses isolated in France. *Vet Microbiol* 74 (1– 2): 59–70.

Manuguerra J.C., Rousseaux C., Zientara S., Sailleaub C., Gicquelb B., Rijksa I., van der Werf S. (2001). Phylogenetic analysis of the polymerase genes of five equine influenza A(H3N8) viruses isolated in France between 1993 and 1999, *International Congress Series* 1219 : 259–266

Martella V., Eli, G., Decaro N., Di Trani L., Lorusso E., Campolo M., Desario C., Parisi A., Cavaliere N., Buonavoglia C. (2007). An outbreak of equine influenza virus in vaccinated horses in Italy is due to an H3N8 strain closely related to recent North American representatives of the Florida sub-lineage. *Vet Microbiol* 121: 56–63.

Martin K., Helenius A. (1991). Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol* 65(1): 232-244.

Matrosovich M.N., Matrosovich T.Y., Gray T., Roberts N.A., Klenk H.D. (2004). Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* 78(22): 12665-12667.

Matrosovich M., Zhou N., Kawaoka Y., Webster R. G. (1999). The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* 7:1146-1155.

McCauley JU., Mahy A. (1983). Structure and function of influenza virus genome. *Biochem J* 211:281-294

McGeoch D., Fellner P, Newton C. (1976). Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(9): 3045-3049.

Melen K., Fagerlund R., Franke J., Kohler M., Kinnunen L., Julkunen I.(2003). Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem* 278(30): 28193-28200.

Merten O-W., Hannoun C., Manuguerra J.C., Ventre F., Petres S. (1996). Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. *Adv Exp Med Biol* 397:141–151.

Mikhail N., Matrosovich H.D.K., Kawaoka Y. (2006). Receptor specificity, host-range, and pathogenicity of influenza viruses. *Influenza Virology, Current Topics*. Y. Kawaoka, Caister Academic Press, pp. 95-137.

Mikulasova A., Varecková E., Fodor E. (2000). Transcription and replication of the influenza a virus genome. *Acta Virol* 44(5): 273-282.

- Monto A.S., Maassab H.F., Bryan E.R. (1981). Relative efficacy of embryonated eggs and cell culture for isolation of contemporary influenza viruses. *J Clin Microbiol* 13: 233–235.
- Morley P.S., Bogdan J.R., Townsend H.G.G., Haines D.M. (1995). Evaluation of Directigen Flu A assay for detection of influenza antigen in nasal secretions of horses. *Equine Vet J* 27: 131-134.
- Muller I., Pinto E., Santibanez M.C., Celedon M.O., Valenzuela P.D. (2009). Isolation and characterization of the equine influenza virus causing the 2006 outbreak in Chile. *Vet Microbiol* 137: 172–177.
- Mumford J.A., Chambers T. (1998). Equine Influenza. In: Textbook of influenza. Blackwell Healthcare Communication Ltd., pp. 146–162.
- Myers C., Wilson D. (2006). Equine Influenza Virus. *Clin Tech Equine Pract* 5:187-196.
- Nayak DP, Hui EK, Barman S. (2004). Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* 106 (2): 147-165.
- Nelson K.M., Schram B.R., McGregor M.W., Sheoran A.S., Olsen C.W., Lunn D.P. (1998). Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination. *Vaccine* 16 (13): 1306–1313.
- Neumann G., Brownlee G.G., Fodor E., Kawaoka Y. (2004). Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 283: 121-143.
- Neumann G., Noda T., Kawaoka Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459(7249): 931-939.
- Newton J.R., Lakhani K.H., Wood J.L.N., Baker D.J. (2000). Risk factors for equine influenza serum antibody titres in young Thoroughbred racehorses given an inactivated vaccine. *Prev Vet Med* 46: 129–141.
- Newton J.R., Daly J.M., Spencer L., Mumford J.A. (2006). Description of the equine influenza (H3N8) outbreak in the United Kingdom during 2003, during which recent vaccination failed to prevent disease in racehorses in Newmarket. *Vet Rec* 158: 185–192.
- Newton R., Cooke A., Elton D., Bryant N., Rash A., Bowman S., Blunden T., Miller J., Hammond T.A., Camm I., Day M. (2007). Canine influenza virus: cross-species transmission from horses. *Vet Rec* 161: 142–143.
- Noda T., Sagara H., Yen A., Takada A., Kida H., Cheng R.H., Kawaoka Y. (2006). Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles *Nature* 439(7075): 490-492.

OIE (2010). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010. *OIE Terrestrial Manual*, Chapter 2.5.7.: Equine Influenza,
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.07_EQ_IN_F.pdf

O'Neill R.E., Talon J., Palese P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* 17(1): 288-296.

Oxburgh L., Hagstrom A. (1999). A PCR based method for the identification of equine influenza virus from clinical samples. *Vet Microbiol* 67:161–174.

Ozaki H., Sugiura T., Sugita S., Imagawa H., Kida H. (2001). Detection of antibodies to the non-structural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses. *Vet Microbiol* 82: 111–119.

Paillet R., Hannant D., Kydd J.H., Daly J.M. (2006). Vaccination against equine influenza: Quid novi? *Vaccine* 24 (19): 4047-4061.

Palese P., Shaw M. (2007). Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields Virology, Knipe D.M., Howley P.M. (eds), 5th edition, Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins, pp.1648-1689

Palese P., Schulman J. L. (1976). Differences in RNA patterns of influenza A viruses. *J Virol* 17(3): 876-884.

Palese P., Compans R.W. (1976). Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol* 33(1): 159-163.

Palese P., Tobita K., Ueda M., Compans R.W. (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 61(2): 397-410.

Park A.W., Wood J.L.N., Newton J.R., Daly J., Mumford J.A., Grenfell B. T. (2003). Optimising vaccination strategies in equine influenza. *Vaccine* 21: 2862–2870.

Park A.W., Wood J.L.N., Daly J.M., Newton J.R., Glass K., Henley W., Mumford J.A., Grenfell B.T. (2004). The effects of strain heterology on the epidemiology of equine influenza in a vaccinated population. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 271: 1547–1555.

Pasick J., Handel K., Robinson J., Copps J., Ridd D., Hills K., Kehler H., Cottam-Birt C., Neufeld J., Berhane Y., Czub S. (2005). Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *J Gen Virol*, 86:727-731.

Powell D.G., Burrows R., Spooner P., Mumford J., Thompson G., (1977). Field observations on influenza vaccination among horses in Britain, 1971–1976. *Dev Biol Stand* 39: 347–352.

Pritlove D.C., Poon L.L., Devenish L.J., Leahy M.B., Brownlee G.G. (1999). A hairpin loop at the 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)+ mRNA in vitro. *J Virol* 73(3): 2109-2114.

Qi T., Guo W., Huang W., Dai L., Zhao L., Li H., Li X., Zhang X., Wang Y., Yan Y., He N., Xiang W. (2010). Isolation and genetic characterization of H3N8 equine influenza virus from donkeys in China. *Vet Microbiol* doi:10.1016/j.vetmic.2010.01.006.

Quinlivan M., Cullinane A., Nelly M., Van Maanen K., Heldens J., Arkins S. (2004). Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen detection, and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus. *J Clin Microbiol* 42:759–763.

Quinlivan M., Dempsey E., Ryan F., Arkins S., Cullinane A. (2005). Real-time reverse transcription PCR for detection and quantitative analysis of equine influenza virus. *J Clin Microbiol* 43:5055-5057.

Ramsay A.J., Husband A.J., Ramshaw I.A., Bao S., Matthaei K.I., Koehler G., Kopf M. (1994). The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science* 264 (5158): 561–563.

Richardson J.C., Akkina R. K. (1991). NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol* 116(1-4): 69-80.

Ritchey M.B., Palese P., Kilbourne E.D. (1976). RNAs of influenza A, B, and C viruses. *J Virol* 18(2):738-744.

Rivailler P., Perry I.A., Jang Y., Davis C.T., Chen L.M., Dubovi E.J., Donis R.O. (2010). Evolution of canine and equine influenza (H3N8) viruses co-circulating between 2005 and 2008. *Virology* 408(1):71-79.

Robertson J.S., Bottman J.S., Nicolson C., Major D., Robertson E.W., Wood J.M. (1990). Sequence analysis of the HA of the influenza A viruses present in clinical material and comparison with the HA of laboratory-derived virus. *J Gen Virol* 72: 2671-2677.

Robertson J.S. (1979). 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Res* 6(12): 3745-3757.

Rogers G.N., Paulson J.C. (1983). Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 127:361-373.

Rohde W., Scholtissek C. (1980). On the origin of the gene coding for an influenza A virus nucleocapsid protein. *Arch Virol* 64: 213–223.

Rozek W., Purzycka M., Polak M.P., Gradzki Z., Zmudzinski J.F. (2009). Genetic typing of equine influenza virus isolated in Poland in 2005 and 2006. *Virus Res* 145: 121–126.

Sanz-Ezquerro J.J., de la Luna S., Ortín J., Nieto A. (1995). Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J Virol* 69(4): 2420-2426.

Schenell J.R., Chou J.J. (2008). Structure and mechanism of the M2 proton channel of Influenza A virus. *Nature* 451 (7178): 591-595.

Schild G.C., Oxford J.S., de Jong J.C., Webster R.G. (1983). Evidence for host-cell selection of influenza virus antigenic variants. *Nature* 303: 706–709.

Scholtens R.G., Steele J.H. (1964). U.S. epizootic of equine influenza, 1963, epizootiology. *Public Health Rep Washington* 79: 393-398.

Sergeant E.S.G., Kirkland P.D., Cowled B.D. (2009). Field evaluation of an equine influenza ELISA used in New South Wales during the 2007 Australian outbreak response. *Prev Vet Med* 92: 382–385.

Skehel J. J., Wiley D.C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69: 531-569.

Slater J., Hannant D. (2000). Equine immunity to viruses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 16 (1): 49–68.

Soboll G., Horohov D.W., Aldridge B.M., Olsen C.W., McGregor M.W., Drape R.J., Macklin M.D., Swain W.F., Lunn D.P., (2003). Regional antibody and cellular immune responses to equine influenza virus infection, and particle mediated DNA vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 94 (1/2): 47–62.

Sovinova O., Tumova B., Pouska F., Nemeč J. (1958). Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virol* 2: 51-61.

Stegmann T. (2000). Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic* 1(8): 598-604.

Steinhauer D. A., Holland J. J. (1987). Rapid evolution of RNA viruses. *Annu Rev Microbiol* 41: 409-433.

Suarez D.L., Senne D.A., Banks J., Brown I.H., Essen S.C., Lee C.W., Manvell R.J., Mathieu-Benson C., Moreno V., Pedersen J.C., Panigrahy B., Rojas H., Spackman E., Alexander D.J. (2004). Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerg Infect Dis* 10:693–699.

Suarez D.L., Perdue M.L. (1998). Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses. *Virus Res* 54: 59–69.

Subbarao E. K., London W., Murphy B.R. (1993). A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 67(4): 1761-1764.

Suzuki Y., Ito T., Takashi S., Holland R.E. Jr., Chambers T.M., Kiso M., Ishida H., Kawaoka Y. (2000). Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses, *J Virol* 74 (24): 11825-11831.

Suzuki, T., Takahashi T, Guo CT, Hidari KI, Miyamoto D, Goto H, Kawaoka Y, Suzuki Y. (2005). Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication. *J Virol* 79(18): 11705-15.

Suzuki Y., Matsunaga M., Matsumoto M. (1985). N-Acetylneuraminylactosylceramide, GM3-NeuAc, a new influenza A virus receptor which mediates the adsorption-fusion process of viral infection. *J Biol Chem* 260:1362-1365.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

Tasleem Samji, (2009). Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle, *Yale J Biol Med* 82(4): 153–159.

Timoney P.J. (1996). Equine Influenza. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 19 (3): 205-211.

Tobita K., A. Sugiura C., Enomoto C., Furuyama M. (1975). Plaque Assay and Primary Isolation of Influenza A Viruses in an Established Line of Canine Kidney Cells (MDCK) in the Presence of Trypsin, *Med Microbiol Immunol* 162: 9-14.

Togashi T., Matsuzono Y., Narita M., Morishima T. (2004). Influenza-associated acute encephalopathy in Japanese children in 1994–2002. *Virus Res* 103: 75–78.

Toovey S. (2008). Influenza-associated central nervous system dysfunction: a literature review. *Travel Med Infect Dis* 6: 114–124.

Toulemonde Edlund C., Daly J., Sindle T., Guigal P.M., Audonnet J.C., Minke J.M. (2005). Efficacy of a recombinant equine influenza vaccine against challenge with an American lineage H3N8 influenza virus responsible for the 2003 outbreak in the United Kingdom. *Vet Rec* 156:367–371.

Tree J.A., Richardson C., Fooks A.R., Clegg J.C., Looby D. (2001). Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine* 19:3444-3450.

Tu J., Zhou H., Jiang T., Li C., Zhang A., Guo X., Zou W., Chen H., Jin M., (2009). Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from pigs in China. *Arch Virol* 54:887–890.

Van Maanen C., Cullinane A. (2002). Equine influenza virus infections: an update. *Vet Q* 24:79–94.

Virmani N., Bera B.C., Singh B.K., Shanmugasundaram K., Gulati B.R., Barua S., Vaid R.K., Gupta A.K., Singh R.K. (2010). Equine influenza outbreak in India (2008–09): virus isolation, sero-epidemiology and phylogenetic analysis of HA gene. *Vet Microbiol* doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.007.

Virmani N., Singh B.K., Gulati B.R., Kumar S. (2008). Equine influenza outbreak in India. *Vet Rec* 163: 607–608.

Waddell G.H., Teigland M.B., Sigel M.M. (1963). A New Influenza Virus Associated With Equine Respiratory Disease. *J Am Vet Med Assoc* 15(143): 587-590.

Wattrang E., Jessett D.M., Yates P., Fuxler L., Hannant D. (2003). Experimental infection of ponies with equine influenza A2 (H3N8) virus strains of different pathogenicity elicits varying interferon and interleukin-6 responses. *Viral Immunol* 16: 57–67.

Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56(1):152–179.

Webster R.G. (1993). Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *Equine Vet J* 25 (6): 537–538.

Wernery R., Yates P.J., Wernery U., Mumford J.A. (1998). An equine influenza outbreak in a polo club in Dubai, United Arab Emirates in 1995/ 96. In: Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., Kaaden O.-R. (eds.), Proc. 8th Int. Conference on Equine Infections Diseases, Dubai 1998, pp. 342–346.

Wharton S.A., Belshe R.B., Skehel J.J., Hay A.J. (1994). Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: specific reduction in the rate of membrane fusion between virus and liposomes by amantadine. *J Gen Virol* 75 (Pt 4): 945-948.

Whittaker G.R., Helenius A. (1998). Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* 246(1): 1-23.

Wilson W.D. (1993). Equine influenza *Vet Clin North Am Equine Pract* 9 (2): 257–282.

Wise H.M., Foeglein A., Sun J., Dalton R.A., Patel S., Howard W., Anderson E.C., Barclay W.S., Digard P. (2009). A complicated message: Identification of a novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A virus segment 2 mRNA, *J Virol* 83(16): 8021-8031.

Wright, P. F., and R.G. Webster (2001). Orthomyxoviruses. *In B.N. Fields and D.M. Knipe(ed.), Fields Virology* 4th edition Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa, pp.1533 - 1579.

Yamanaka T., Niwa H., Tsujimura K., Kondo T., Matsumura T. (2008). Epidemic of equine influenza among vaccinated racehorses in Japan in 2007. *J Vet Med Sci* 70: 623–625.

Yates P., Mumford J.A. (2000). Equine influenza vaccine efficacy: the significance of antigenic variation. *Vet Microbiol* 74: 173–177.

Yewdell J.W., Bennink J.R., Smith G.L., Moss B. (1985). Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(6): 1785-1789.

Yoon K.J., Cooper V.L., Schwartz K.J., Harmon K.M., Kim W.I., Janke B.H., Strohbahn J., Butts D., Troutman J. (2005). Influenza virus infection in racing greyhounds. *Emerg Infect Dis* 11:1974–1975.

Youil R., Su Q., Toner T.J., Szymkowiak C., Kwan W.S., Rubin B., Petrukhin L., Kiseleva I., Shaw A.R., DiStefano D. (2004), Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines. *J Virol Methods* 120: 23-31.

Yuanji G., Desselberger U. (1984). Genome analysis of influenza C viruses isolated in 1981/82 from pigs in China. *J Gen Virol* 65 (Pt 11): 1857-1872.

Μενασέ Ι., Σείμένης Α., Μυρεσιώτης Α., Σκυριανός Γ., (1970) Έρευνα επί της γρίπης των ιπποειδών εις την Ελλάδα, *Κτηνιατρικά Νέα* 2:15-21

Πασχαλέρη- Παπαδοπούλου Ε., Παπαδόπουλος Ο., Burki F., Ναλμπάντης Ε., Ζωγραφόπουλος Θ., Γιαννακούλας Γ. (1970). Επιζωοτία γρίπης Α2 εις τα ιπποειδή του Νομού Κομοτηνής, *Κτηνιατρικά Νέα* 2: 22

Σπύρου Β., Κοπτόπουλος Γ., Παπαναστασοπούλου Μ., Αρτοποιού Μ. (1999). Προκαταρκτική επιζωοτιολογική έρευνα των ερπητοϊών και του ιού της γρίπης των ιπποειδών στην χώρα μας. *Ελληνική Ιολογία* 4: 40-45.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών αμινοξέων των ελληνικών στελεχών και διεθνών στελεχών κατατεθειμένων στο GeneBank που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα μελέτη.

HA

Alignment: Sequences\H3\.fas

	10	20	30	40	50	60	70
A/equine/Miami/1/1963	VTNATELVQS	TSTGKICNNP	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	YDVFXENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDVPDY
A/equine/Athens/2003	---XTELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Athens/2007	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/eq/Newmarket/2/93	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/swine/Chibi/01/2005	VTNATELVQS	ISIGKICNNP	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Cheltenham/1/01	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYESWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Lincolnshire/1/2002	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYESWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Leicestershire/1/00	VTNATELVQS	ISMGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Switzerland/P112/2007	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Gansu/7/2008	VTNATELVQS	ISMGKICNNS	YRILDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Argentina/1/96	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Kentucky/1/92	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Kentucky/1/90	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/eq/Newmarket/1/93	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Wisconsin/1/03	VTNATELVQS	ISMGKICNNS	YRILDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDAFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Bari/2005	VTNATELVQS	ISMGKICNNS	YRILDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/California/191/2003	VTNATELVQS	ISTGKICNNS	YRILDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDAFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Kentucky/5/2002	VTNATELVQS	ISMGKICNNS	YRILDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Lambourn/22778/92	VTNATELVQS	TSIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equi 2/Avesta/93	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Berlin/1/91	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Roma/5/1991	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Fontainebleau/1976	VTNATELVQS	TSIGKICNNP	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFXENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Romania/1980	VTNATELVQS	TSIGKICNNP	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFXENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Uruguay/1/1963	VTNATELVQS	TSTGKICNNP	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFXGNWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Newmarket/5/2003	VTNATELVQS	ISMGKICNNS	YRILDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Switzerland/173/1993	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY

A/equine/Rook/93753/1989	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/eq/Sussex/89/	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Yorkshire/3/2009	VTNATELVQS	ISMGKICNNS	YRILDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Aboyne/1/05	VTNATELVES	ISMGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYESWD	LFIERSASS	NCYPYDIPDY
A/equine/Berlin/13/02	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Berlin/14/02	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Berlin/1/1989	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Berlin/2/91	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Cheshire/1/2006	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/eq/Ella/89/	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDVFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDISDY
A/equine/Grobois/1/1998	VTNVTELVQS	ISMGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYESWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Hong Kong/1/92	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY
A/equine/Italy/1199/1992	VTNATELVQS	ISIGKICNNS	YRVLDGRNCT	LIDAMLGDPH	CDDFQYENWD	LFIERSSAFS	NCYPYDIPDY

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 80 90 100 110 120 130 140

A/equine/Miami/1/1963	ASLRSIVASS	GTLEFMAEGF	TWTGVTQNGG	SSACRRGSAD	SFFSRLNWL	QSESSYPTLN	VTMPNNDFD
A/equine/Athens/2003	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGG	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Athens/2007	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGG	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/eq/Newmarket/2/93	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGG	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/swine/Chibi/01/2005	ASLRSVASS	GTLEFTAEEF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	ESGSSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Cheltenham/1/01	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Lincolnshire/1/2002	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KFGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Leicestershire/1/00	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	AWTGVTQNGS	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Switzerland/P112/2007	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSENSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Gansu/7/2008	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGNSYPTLN	VTMPNNKNFD
A/equine/Argentina/1/96	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	IWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGNSYPTLN	VTMPNNENFD
A/equine/Kentucky/1/92	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGG	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGNSYPTLN	VTMPNNKNFD
A/equine/Kentucky/1/90	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGG	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGNSYPTLN	VTMPNNKNFD
A/eq/Newmarket/1/93	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGNSYPTLN	VTMPNNKNFD
A/equine/Wisconsin/1/03	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGSSYPTLN	VTMPNNKNFD
A/equine/Bari/2005	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGNSYPTLN	VTMPNNKNFD
A/equine/California/191/2003	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGSSYPTLN	VTMPNNKNFD
A/equine/Kentucky/5/2002	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWL	KSGNSYPTLN	VTMPNNKNFD

A/equine/Lambourn/22778/92	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	NSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equi 2/Avesta/93	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Berlin/1/91	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Roma/5/1991	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Fontainebleau/1976	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACRRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPTLN	VTMPNNNNFD
A/equine/Romania/1980	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGG	SGACRRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPTLN	VTMPNNNNFD
A/equine/Uruguay/1/1963	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SSACRRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPTLN	VTMPNNNDNFD
A/equine/Newmarket/5/2003	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPTLN	VTMPNNKNFD
A/equine/Switzerland/173/1993	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	NSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Rook/93753/1989	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/eq/Sussex/89/	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Yorkshire/3/2009	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPTLN	VTMPNNKNFD
A/equine/Aboyne/1/05	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPTLN	VTMPNNKNFD
A/equine/Berlin/13/02	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	ESGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Berlin/14/02	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	ESGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Berlin/1/1989	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGT	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Berlin/2/91	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Cheshire/1/2006	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPTLN	VTMPNNKNFD
A/eq/Ella/89/	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Grobois/1/1998	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Hong Kong/1/92	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD
A/equine/Italy/1199/1992	ASLRSIVASS	GTLEFTAEGF	TWTGVTQNGR	SGACKRGSAD	SFFSRLNWLT	KSGNSYPILN	VTMPNNKNFD

	150	160	170	180	190	200	210
A/equine/Miami/1/1963	KLYIWGIHHP	STNNEQTKLY	VQASGRVTVS	TKRSQQTIIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISIIYWT	IVKPGDVLMI
A/equine/Athens/2003	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISIIYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Athens/2007	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISIIYWT	IVKPGDILMI
A/eq/Newmarket/2/93	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISIIYWT	IVKPGDILMI
A/swine/Chibi/01/2005	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPLVRG	QSGRISIIYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Cheltenham/1/01	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISIIYWT	IVKPGDVLMI
A/equine/Lincolnshire/1/2002	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISIIYWT	IVKPGDVLMI
A/equine/Leicestershire/1/00	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISIIYWT	IVKPGDVLMI
A/equine/Switzerland/P112/2007	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISIIYWT	IVKPGDILTI

A/equine/Gansu/7/2008	KLYIWGIHHP	SSNQEQTKLY	IQESGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Argentina/1/96	KLYIWGIHHP	SSNNEQTKLY	IQESGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Kentucky/1/92	KLYIWGIHHP	SSNNEQTKLY	IQETGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Kentucky/1/90	KLYIWGIHHP	SSNNEQTKLY	IQESGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/eq/Newmarket/1/93	KLYIWGIHHP	SSNQOQTELY	IQESGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Wisconsin/1/03	KLYIWGIHHP	SSNQEQTKLY	IQESGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Bari/2005	KLYIWGIHHP	SSNQEQTKLY	IQESGRVTVS	TKRSQQTMIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/California/191/2003	KLYIWGIHHP	SSNQEQTKLY	IQESGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Kentucky/5/2002	KLYIWGIHHP	SSNQEQTKLY	IQESGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Lambourn/22778/92	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/eq/2/Avesta/93	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Berlin/1/91	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Roma/5/1991	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Fontainebleau/1976	KLYIWGIHHP	STNNEQTKLY	VQELGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPGVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Romania/1980	KLYIWGIHHP	STNNEQTKLY	VQELGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Uruguay/1/1963	KLYIWGIHHP	STNNEQTKLY	VQASGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Newmarket/5/2003	KLYIWGIHHP	SSNQEQTKLY	IQESGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Switzerland/173/1993	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	TQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Rook/93753/1989	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILTI
A/eq/Sussex/89/	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Yorkshire/3/2009	KLYIWGIHHP	SSNQEQTKLY	IQESGRVTVS	TKRNQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Aboyne/1/05	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Berlin/13/02	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILTI
A/equine/Berlin/14/02	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILTI
A/equine/Berlin/1/1989	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Berlin/2/91	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Cheshire/1/2006	KLYIWGIHHP	SSNQOQTELY	IQESGRVTVS	TKRSQQTIIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/eq/Ella/89/	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Grobois/1/1998	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILMI
A/equine/Hong Kong/1/92	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILTI
A/equine/Italy/1199/1992	KLYIWGIHHP	SSNKEQTKLY	IQESGRVTVS	TERSQQTVIP	NIGSRPWVRG	QSGRISYWT	IVKPGDILTI

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 220 230 240 250 260 270 280

A/equine/Miami/1/1963	NSNGNLIAPR	GYFKMRTGKS	SIMRSDAPID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYVKQSTLK
A/equine/Athens/2003	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Athens/2007	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKITYGKC	PKYIRQNTLK
A/eq/Newmarket/2/93	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKITYGKC	PKYIRQNTLK
A/swine/Chibi/01/2005	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Cheltenham/1/01	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSKCITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKITYGRC	PKYIRQNTLK
A/equine/Lincolnshire/1/2002	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSKCITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGRC	PKYIRQNTLK
A/equine/Leicestershire/1/00	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSKCITPN	GSIPNNKPFQ	NVNKITYGQC	PKYIRQNTLK
A/equine/Switzerland/P112/2007	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDAPID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Gansu/7/2008	NSNGNLVAPR	GYFKLKTGKS	SVMRSDVPID	ICVSECITPN	GSISNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Argentina/1/96	NSNGNLVAPR	GYFKLKTGKS	SVMRSDAPID	ICVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Kentucky/1/92	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGRS	SVMRSDAPID	ICVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Kentucky/1/90	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDAPID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/eq/Newmarket/1/93	NSNGNLVAPR	GYFKLKTGKS	SVMRSDAPID	ICVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Wisconsin/1/03	NSNGNLVAPR	GYFKLKTGKS	SVMRSDVPID	ICVSECITPN	GSISNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Bari/2005	NSNGNLVAPR	GYFKLKTGKS	SVMRSDVPID	ICVSECITPN	GSISNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/California/191/2003	NSNGNLVAPR	GYFKLKTGKS	SVMRSDAPIE	ICVSECITPN	GSISNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Kentucky/5/2002	NSNGNLVAPR	GYFKLKTGKS	SVMRSDVPID	ICVSECITPN	GSISNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Lambourn/22778/92	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equi 2/Avesta/93	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Berlin/1/91	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKXFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Roma/5/1991	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Fontainebleau/1976	NSNGNLVAPR	GYFKMRTGKS	SIMRSDAPID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIKQNTLK
A/equine/Romania/1980	NSNGNLVAPR	GYFKMRTGKS	SIMRSDAPID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGEC	PKYIKQNTLK
A/equine/Uruguay/1/1963	NSNGNLIAPR	GYFKMRTGKS	SIMRSDAPID	TCVSECITPN	GSIPNNKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYVKQSTLK
A/equine/Newmarket/5/2003	NSNGNLVAPR	GYFKLKTGKS	SVMRSDVPID	ICVSECITPN	GSISNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Switzerland/173/1993	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Rook/93753/1989	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDAPID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/eq/Sussex/89/	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALIG	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Yorkshire/3/2009	NSNGNLVAPR	GYFKLKTGKS	SVMRSDVPID	ICVSECITPN	GSISNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Aboyne/1/05	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKITYGRC	PKYIRQNTLK
A/equine/Berlin/13/02	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDAPID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Berlin/14/02	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDAPID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Berlin/1/1989	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDAPID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Berlin/2/91	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQX---

A/equine/Cheshire/1/2006	NSNGNLVAPR	GYFKLKTGKS	SVMRSDAPID	ICVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/eq/Ella/89/	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDAPIG	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Grobois/1/1998	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSKCITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Hong Kong/1/92	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKVITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Italy/1199/1992	NSNGNLVAPR	GYFKLRTGKS	SVMRSDALID	TCVSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNKITYGKC	PKYIRQNTLK
A/equine/Miami/1/1963	LATGMRNV						
A/equine/Athens/2003	LATGMRNV						
A/equine/Athens/2007	LATGMRNV						
A/eq/Newmarket/2/93	LATGMRNV						
A/swine/Chibi/01/2005	LATGMRNV						
A/equine/Cheltenham/1/01	LATGMRNV						
A/equine/Lincolnshire/1/2002	LATGMRNV						
A/equine/Leicestershire/1/00	LATGMRNV						
A/equine/Switzerland/P112/2007	LATGMRNV						
A/equine/Gansu/7/2008	LATGMRNV						
A/equine/Argentina/1/96	LATGMRNV						
A/equine/Kentucky/1/92	LATGMRNV						
A/equine/Kentucky/1/90	LATGMRNV						
A/eq/Newmarket/1/93	LATGMRNV						
A/equine/Wisconsin/1/03	LATGMRNV						
A/equine/Bari/2005	LATGMRNV						
A/equine/California/191/2003	LATGMRNV						
A/equine/Kentucky/5/2002	LATGMRNV						
A/equine/Lambourn/22778/92	LATGMRNI						
A/equi 2/Avesta/93	LATGMRNI						
A/equine/Berlin/1/91	LATGMRNV						
A/equine/Roma/5/1991	LATGMRNV						
A/equine/Fontainebleau/1976	LATGMRNV						
A/equine/Romania/1980	LATGMRNV						
A/equine/Uruguay/1/1963	LATGMRNV						
A/equine/Newmarket/5/2003	LATGMRNV						
A/equine/Switzerland/173/1993	LATGMRNV						
A/equine/Rook/93753/1989	LATGMRNV						

A/eq/Sussex/89/	LATGMRNV
A/equine/Yorkshire/3/2009	LATGMRNV
A/equine/Aboyne/1/05	LATGMRNV
A/equine/Berlin/13/02	LATGMRNV
A/equine/Berlin/14/02	LATGMRNV
A/equine/Berlin/1/1989	LATGMRNV
A/equine/Berlin/2/91	-----
A/equine/Cheshire/1/2006	LATGMRNV
A/eq/Ella/89/	LATGMRNV
A/equine/Grobois/1/1998	LATGMRNV
A/equine/Hong Kong/1/92	LATGMRNI
A/equine/Italy/1199/1992	LATGMRNV

NA

Alignment: H:\PhD\Sequences\ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ\N8 AA.fas

	10	20	30	40	50	60	70
A/equine/Athens/2007	MNPNQKIITI	GSASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNE	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWHNTSA
A/equine/Athens/2003	MNPNQKIITI	GSASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNE	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWHNTSA
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	MNPNQKIITI	GSASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNE	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWHNTSA
A/equine/Gansu/7/2008	MNPNQKIITI	GSASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNE	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWHNTSA
A/Equine/Alaska/1/91 (H3N8), N	MNPNQKIIAI	GSASLGILIL	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNCRNRTII	REYNETVRVE	RITQWYNTST
A/equine/California/8560/2002	MNPNQKIIAI	GFASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWYNTSA
A/equine/Huabei/1/2007	MNPNQKIITI	GSASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNE	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWHNTSA
A/equine/Hubei/6/2008	MNPNQKIITI	GSASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNE	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWHNTSA
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	MNPNQKIITI	GSASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNE	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWHNTSA
A/equine/Kentucky/1/1992	MNPNQKIIAI	GSASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	RITQWYNTST
A/equine/La Plata/1/1993 (~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A/equine/Liaoning/9/2008	MNPNQKIITI	GSASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNE	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWHNTSA
A/equine/Massachussetts/213/20	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A/equine/Mysore/1/2008	MNPNQKIITI	GSASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNE	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWHNTSA

A/equine/New York/452/2003	MNPNQKILAI	GFASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNR	TDLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWYNTST
A/canine/New York/100528-6/200	MNPNQKIIAI	GSASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNK	TDLNCKGTII	REYNETVRVE	KLTQWYNTST
A/equine/Ohio/1/2003	MNPNQKIIAI	GFASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNR	TDLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWYNTST
A/equine/Wisconsin/1/03	MNPNQKIIAI	GFASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNR	TDLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWYNTST
A/equine/Fontainbleu/1/1979	MNPNQKIIAI	GSASLGILIL	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNCNGTII	REYNETVRVE	RITQWYNTNT
A/equine/Kentucky/1/1981	MNPNQKIIAI	GSASLGILIL	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNCNGTII	REYNETVRVE	RITQWYNTNT
A/equine/Kentucky/5/02	MNPNQKIIAI	GFASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWYNTSA
A/Equine/Miami/1/63	MNPNQKIITI	GSASLGLVIL	NVILHVVSII	VTVLVLSNNG	TGPNCNGTII	REYNETVRVE	RITQWYNTNI
A/equine/Newmarket/1/1993	MNPNQKIIAI	GSASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	RITQWYNTST
A/equine/Newmarket/2/1993	MNPNQKIIAI	GSASLGVIL	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNCNGTII	REYNETVRVE	RITQWYNTST
A/equine/Newmarket/5/2003	MNPNQKIIAI	GFASLGILII	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNCKGTII	REYNETVRVE	KITQWYNTSA
A/equine/Roma/5/1991	MNPNQKIIAI	GSASLGILIL	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNCNGTII	REYNETVRVE	RITQWYNTST
A/equine/Romania/1/1980	MNPNQKIIAI	GSASLGILIL	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNCNGTII	REYNETVRVE	RITQWYNTNT
A/equine/Sussex/1/1989	MNPNQKIIAI	GSASLGILIL	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNCNGTII	REYNETVRVE	RITQWYNTST
A/swine/Anhui/01/2006	MNPNQKIIAI	GSASLGVIL	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNYNGTII	REYNETVRVE	RITQWYNTST
A/swine/Chibi/01/2005	MNPNQKIIAI	GSASLGVIL	NVILHVVSII	VTVLVLNNNG	TGLNYNGTII	REYNETVRVE	RITQWYNTST
A/equine/Uruguay/1/1963	MNPNQKIITI	GSASLGLVFL	NVILHVVSII	VTVLVLSNNG	TGPNCNGTII	REYNETVRIE	RITQWYNTNI

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....|

80 90 100 110 120 130 140

A/equine/Athens/2007	IKYIERPPNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVVFVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND
A/equine/Athens/2003	IKYIERPPNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVVFVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	IKYIERPPNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVVFVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND
A/equine/Gansu/7/2008	IKYIERPPNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVVFVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND
A/Equine/Alaska/1/91 (H3N8), N	IEYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVVFVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND
A/equine/California/8560/2002	IKYIERPPNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVVFVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND
A/equine/Huabei/1/2007	IKYIERPPNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVVFVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND
A/equine/Hubei/6/2008	IKYIERPPNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVVFVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	IKYIERPPNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVVFVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND
A/equine/Kentucky/1/1992	IEYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVVFVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND
A/equine/La Plata/1/1993 (~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A/equine/Liaoning/9/2008	IKYIERPPNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVVFVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND
A/equine/Massachussetts/213/20	~~~~~	~MNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVVFVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND
A/equine/Mysore/1/2008	IKYIERPPNE	YYMNNTEPLC	ETQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVIVIREPFV	SCSPSECRTE	FLTQGSLLND

A/equine/New York/452/2003	IKYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPSECRTF	FLTQGSLLND
A/canine/New York/100528-6/200	IKYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPSECRTF	FLTQGSLLND
A/equine/Ohio/1/2003	IKYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPSECRTF	FLTQGSLLND
A/equine/Wisconsin/1/03	IKYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPSECRTF	FLTQGSLLND
A/equine/Fontainbleu/1/1979	IEYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPLECRTF	FLTHGSLLND
A/equine/Kentucky/1/1981	IEYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPLECRTF	FLTQGSLLND
A/equine/Kentucky/5/02	IKYIERPPNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPSECRTF	FLTQGSLLND
A/Equine/Miami/1/63	IEYIEEPSNE	YYMSNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPLECRTF	FLTQGSLLND
A/equine/Newmarket/1/1993	IEYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPSECRTF	FLTQGSLLND
A/equine/Newmarket/2/1993	IEYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPSECRTF	FLTQGSLLND
A/equine/Newmarket/5/2003	IKYIERPPNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPSECRTF	FLTQGSLLND
A/equine/Roma/5/1991	IEYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPSECRTF	FLTQGSLLND
A/equine/Romania/1/1980	IEYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPLECRTF	FLTHGSLLND
A/equine/Sussex/1/1989	IEYIERPSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPSECRTF	FLTQGSLLND
A/swine/Anhui/01/2006	IEYIERSSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPSECRTF	FLTQGSLLND
A/swine/Chibi/01/2005	IEYIERSSNE	YYMNNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPSECRTF	FLTQGSLLND
A/equine/Uruguay/1/1963	IEYIERPSNE	YYMSNTEPLC	EAQGFAPFSK	DNGIRIGSRG	HVFEVIREPFV	SCSPLECRTF	FLTQGSLLND

	150	160	170	180	190	200	210
A/equine/Athens/2007	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	IGVTGPDNQA	IADVNYGGVP
A/equine/Athens/2003	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	IGVTGPDNQA	IADVNYGGVP
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	IGVTGPDNQA	IADVNYGGIP
A/equine/Gansu/7/2008	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	IGVTGPDNQA	IADVNYGGIP
A/Equine/Alaska/1/91 (H3N8), N	KHSNGTMKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFEAVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	VADVNYGGVP
A/equine/California/8560/2002	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	IADVNYGGVP
A/equine/Huabei/1/2007	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	IGVTGPDNQA	IADVNYGGIP
A/equine/Hubei/6/2008	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	IGVTGPDNQA	IADVNYGGIP
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	IGVTGPDNQA	IADVNYGGIP
A/equine/Kentucky/1/1992	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	IADVNYGGVP
A/equine/La Plata/1/1993 (~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~X	IADVNYGGVP
A/equine/Liaoning/9/2008	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	IGVTGPDNQA	IADVNYGGIP
A/equine/Massachussetts/213/20	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	IADVNYGGVP
A/equine/Mysore/1/2008	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	IGVTGPDNQA	IADVNYGGIP

A/equine/New York/452/2003	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	IADVNYGGVP
A/canine/New York/100528-6/200	KHSNGTIKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	KFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	IAIVNYGGVP
A/equine/Ohio/1/2003	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	IADVNYGGVP
A/equine/Wisconsin/1/03	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	IADVNYGGVP
A/equine/Fontainbleu/1/1979	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	VGQSPNVYQA	RFEAVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDQA	VAVVHYGGVP
A/equine/Kentucky/1/1981	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	VGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	VAVVNYGGVP
A/equine/Kentucky/5/02	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	IADVNYGGVP
A/Equine/Miami/1/63	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVE	VGQSPNVYQA	RFEAVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDAQA	VAVVHYGGVP
A/equine/Newmarket/1/1993	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	IADVNYGGVP
A/equine/Newmarket/2/1993	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	IADVNYGGVP
A/equine/Newmarket/5/2003	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	IADVNYGGVP
A/equine/Roma/5/1991	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	VAVVNYGGVP
A/equine/Romania/1/1980	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	VGQSPNVYQA	RFEAVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDQA	VAVVHYGGVP
A/equine/Sussex/1/1989	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	VAVVNYGGVP
A/swine/Anhui/01/2006	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	VAVVNYGGVP
A/swine/Chibi/01/2005	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVK	IGQSPNVYQA	RFESVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDNQA	VAVVNYGGVP
A/equine/Uruguay/1/1963	KHSNGTVKDR	SPYRTLMSVE	VGQSPNVYQA	RFEAVAWSAT	ACHDGKKWMT	VGVTGPDAQA	VAVVHYGGVP

....|....||....| .
 220 230

A/equine/Athens/2007	VDIINSWAGD	ILRTQESSRT	C
A/equine/Athens/2003	VDIINSWAGD	ILRTQESSRT	C
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	VDIINSWEGD	ILRTQESSCT	C
A/equine/Gansu/7/2008	VDIINSWAGD	ILRTQESSCT	C
A/Equine/Alaska/1/91 (H3N8), N	VDIINSWAGD	ILRTQESSCT	C
A/equine/California/8560/2002	VDIINSWAGD	ILRTQESSCT	C
A/equine/Huabei/1/2007	VDIINSWEGD	ILRTQESSCT	C
A/equine/Hubei/6/2008	VDIINSWEGD	ILRTQESSCT	C
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	VDIINSWEGD	ILRTQESSCT	C
A/equine/Kentucky/1/1992	VDIINSWAGD	ILRTQESSCT	C
A/equine/La Plata/1/1993 (VDIINSWAGD	ILRTQESSCT	C
A/equine/Liaoning/9/2008	VDIINSWEGD	ILRTQESSCT	C
A/equine/Massachussetts/213/20	VDIINSWAGD	ILRTQESSCT	C
A/equine/Mysore/1/2008	VDIINSWAGD	ILRTQESSCT	G

A/equine/New York/452/2003	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/canine/New York/100528-6/200	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/equine/Ohio/1/2003	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/equine/Wisconsin/1/03	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/equine/Fontainbleu/1/1979	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/equine/Kentucky/1/1981	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/equine/Kentucky/5/02	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/Equine/Miami/1/63	VDVINSWAGD ILRTQESSCT C
A/equine/Newmarket/1/1993	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/equine/Newmarket/2/1993	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/equine/Newmarket/5/2003	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/equine/Roma/5/1991	VDVINSWAGD ILRTQESSCT C
A/equine/Romania/1/1980	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/equine/Sussex/1/1989	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/swine/Anhui/01/2006	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/swine/Chibi/01/2005	VDIINSWAGD ILRTQESSCT C
A/equine/Uruguay/1/1963	VDVINSWAGD ILRTQESSCT C

NP

Alignment: H:\PhD\Sequences\ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ\NP AA.fas

	10	20	30	40	50	60	70
A/equine/Yokohama/aq19/2009 (H3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A/equine/Alaska/29759/1991 (H3N	~~~~~XHSL	SDIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	ELKLNDEGR
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	~~~~~XHSL	SDIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	ELKLNDEGR
A/equine/Avesta/1/1993 (H3N8))	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	~~~~~XSL	SDIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	ELKLNDEGR
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3	~~~~~XL	SDIKVMASQG	TKRSYEQMET	GGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	ELKLNDEGR
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	~~~~~	~~~~~MASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	ELKLNDEGR
A/equine/Athens/2003	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~XVGG	IGRFYVQMCT	ELKLNDEGR
A/equine/California/8560/2002 (~~~~~XSL	SDIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	ELKLNDEGR

A/equine/Athens/2007	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~XVGG	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) NP	~~~~~	~XIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Heilongjiang/10/2008 (~~~~~	~XIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8) NP	~~~~~	~XIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8) N	~~~~~	~~~~~MASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	~~~~~	~XIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8) N	SKSRVDNHSL	SDIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/La Plata/1/1993 (H3N8)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	~~~~~	~XIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) NP	~~~~~XSL	SDIKAMASQG	TKRSYEQMET	GGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLSDEHGR
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	~~~~~	~~~~~MASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	~~~~~	~~~~~MASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8) NP	~~~~~	~~~~~MASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8) NP	~~~~~X	SDIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
(A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)	~~~~~XHSL	SDIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Switzerland/173/1993 (~~~~~XHSL	SDIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8)	~~~~~XHSL	SDIKAMASQG	TKRSYEQMET	GGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLSDEHGR
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	~~~~~	~~~~~MASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
(A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8	~~~~~	~XIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	~~~~~	~XIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	~~~~~	~~~~~MASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	~~~~~	~XIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	~~~~~	~XIKVMASQG	TKRSYEQMET	DGERQNATEI	RASVGRMVGG	IGRFYVQMCT	IGRFYVQMCT	ELKLNDEHGR

	80	90	100	110	120	130	140	
A/equine/Yokohama/aq19/2009 (H3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A/equine/Alaska/29759/1991 (H3N	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN	
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWI	RELILHDKEE	IMRVWRQANN	
A/equine/Avesta/1/1993 (H3N8))	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN	
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRRDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN	
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN	
A/equine/Athens/2003	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN	

A/equine/California/8560/2002 (LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Athens/2007	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) NP	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Heilongjiang/10/2008 (LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8) NP	LIQNSITIGR	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8) N	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8) N	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/La Plata/1/1993 (H3N8)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) NP	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRRDGKWM	RELILYDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWI	RELILHDKEE	IMRVWRQANN
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8) NP	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8) NP	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWI	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
(A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Switzerland/173/1993 (LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWI	RELILHDKEE	IMRVWRQANN
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8)	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRRDGKWM	RELILYDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
(A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	LIQNSITIER	MVLSAFDERR	NKYLEEHPSA	GKDPKKTGGP	IYRRKDGKWM	RELILHDKEE	IMRIWRQANN

	150	160	170	180	190	200	210
A/equine/Yokohama/aq19/2009 (H3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A/equine/Alaska/29759/1991 (H3N	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMEIIR
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMIMELIR
A/equine/Avesta/1/1993 (H3N8))	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMIMELIR
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTIIVMEIIR
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMEIIR

A/equine/Athens/2003	GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/California/8560/2002 (GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Athens/2007	GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) NP	GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Heilongjiang/10/2008 (GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8) NP	GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8) N	GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8) N	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/La Plata/1/1993 (H3N8)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) NP	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMIMELIR
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8) NP	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8) NP	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMIMELIR
(A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Switzerland/173/1993 (GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMIMELIR
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8)	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	GEDATAGLTH	MMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
(A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8	GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LMQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	GEDATAGLTH	IMIWHSNLND	TTYQRTRALV	RTGMDPRMCS	LTQGSTLPRR	SGAAGAAVKG	VGTMVMELIR

	220	230	240	250	260	270	280
A/equine/Yokohama/aq19/2009 (H3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~XAQ	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Alaska/29759/1991 (H3N	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAQ	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAQ	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Avesta/1/1993 (H3N8))	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~XAQ	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAQ	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAQ	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI

A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Athens/2003	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/California/8560/2002 (MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Athens/2007	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) NP	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LTFLARSALI
A/equine/Heilongjiang/10/2008 (MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LTFLARSALI
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8) NP	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LTFLARSALI
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8) N	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LTFLARSALV
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LTFLARSALI
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8) N	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/La Plata/1/1993 (H3N8)	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~XQ	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LTFLARSALI
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) NP	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8) NP	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8) NP	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
(A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Switzerland/173/1993 (MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8)	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LIFLARSALI
(A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LTFLARSALI
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LTFLARSALI
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LTFLARSALI
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LTFLARSALI
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	MIKRGINDRN	FWRGENGRRT	RIAYERMCNI	LKGKFQTAAG	RAMMDQVREG	RNPGNAEIED	LTFLARSALI

	290	300	310	320	330	340	350
A/equine/Yokohama/aq19/2009 (H3	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Alaska/29759/1991 (H3N	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Avesta/1/1993 (H3N8))	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS

A/equine/Fontainebleu/1/1979 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	ASGYDFEKEG	YSLVGVDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Athens/2003	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/California/8560/2002 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Athens/2007	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) NP	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Heilongjiang/10/2008 (H3N8) NP	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8) NP	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8) N	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Inner Mongolia/8/2008 (H3N8) NP	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGHDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8) N	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/La Plata/1/1993 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) NP	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	ASGYDFEREG	YSLVGIDPFK	LLQNSQVFSL	IRPNENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8) NP	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8) NP	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
(A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Switzerland/173/1993 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	ASGYDFEREG	YSLVGIDPFK	LLQNSQVFSL	IRPNENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
(A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8))	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	LRGSVAHKSC	LPACVYGLAV	TSGYDFEKEG	YSLVGIDPFK	LLQNSQIFSL	IRPKENPAHK	SQLVVMACHS

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 360 370 380 390 400 410 420

A/equine/Yokohama/aq19/2009 (H3N8)	AAFEDLRVLN	FIRGTVKIPR	GQLTTRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Alaska/29759/1991 (H3N8)	AAFEDLRVLN	FIRGTVKIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8)	AAFEDLRVLN	FIRGTVKIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Avesta/1/1993 (H3N8))	AAFEDLRVLN	FIRGTVKIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ

A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSRY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Fontainebleu/1/1979 (H3	AAFEDLRVSN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSRY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLTTRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Athens/2003	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/California/8560/2002 (AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLTTRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Athens/2007	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) NP	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Heilongjiang/10/2008 (AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8) NP	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8) N	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8) N	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLTTRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/La Plata/1/1993 (H3N8)	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) NP	AAFEDLRVSN	FIRGTVVPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSRY	WAIRTRSGGN	TNQQRASAGQ
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSRY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8) NP	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLTTRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8) NP	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSRY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
(A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSRY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Switzerland/173/1993 (AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSRY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8)	AAFEDLRVSN	FIRGTVVPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSRY	WAIRTRSGGN	TNQQKASAGQ
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLTTRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
(A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	AAFEDLRVLN	FIRGTVIPR	GQLATRGVQI	ASNENMETID	SSTLELRSKY	WAIRTRSGGN	TSQQRASAGQ

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 430 440 450 460 470 480 490

A/equine/Yokohama/aq19/2009 (H3	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Alaska/29759/1991 (H3N	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI

A/equine/Avesta/1/1993 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENARSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENARSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Athens/2003	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDE~~~~~
A/equine/California/8560/2002 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Athens/2007	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDE~~~~~
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) NP	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Heilongjiang/10/2008 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8) NP	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8) N	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Inner Mongolia/8/2008 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8) N	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/La Plata/1/1993 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSGD	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) NP	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENARSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8) NP	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8) NP	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
(A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENARSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Switzerland/173/1993 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENARSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
(A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMENARSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8))	ISVQPTFSVQ	RNLPPERATI	MAAFTGNTEG	RTSDMRTEII	RMMESAKSED	VSFQGRGVFE	LSDEKATNPI

....|....||....||....| ..
 500 510 520

A/equine/Yokohama/aq19/2009 (H3N8))	VPSFDMS~~~	~~~~~	~~~~~	~~
A/equine/Alaska/29759/1991 (H3N8))	VPSFDMSNEG	SYFFGDNTEE	FDS*X~~~~	~~

A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/equine/Avesta/1/1993 (H3N8))	VPSFX~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*~~~~~	~~
A/equine/Athens/2003	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~
A/equine/California/8560/2002 (VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/equine/Athens/2007	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) NP	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/equine/Heilongjiang/10/2008 (VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8) NP	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8) N	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*~~~~~	~~
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8) N	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*RKIPLF	LX
A/equine/La Plata/1/1993 (H3N8)	VPSFDMX~~~	~~~~~	~~~~~	~~
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) NP	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDN*RK~~~~	~~
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*~~~~~	~~
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*~~~~~	~~
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8) NP	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*RKIPFV	ST
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8) NP	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
(A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/equine/Switzerland/173/1993 (VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*RKX~~~	~~
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8)	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDN*X~~~~~	~~
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*~~~~~	~~
(A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*~~~~~	~~
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	VPSFDMSNEG	SYFFGDNAEE	FDS*X~~~~~	~~

NS1

Alignment: H:\PhD\Sequences\ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ\ns_aa.fas

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....|

	10	20	30	40	50	60	70
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/ATHENS/2003 NS	~~~~~	~XCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/ATHENS/2007 NS	~~~~~	~XCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Essex/1/2005 (H3N8)) s	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRRRSITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Switzerland/P112/2007	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLDIETATRA	GKQIVEQILE
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLNIETATRA	GKQIVEQILE
A/equine/Aboyne/1/2005 (H3N8))	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLNIEIATRA	GKQIVEQILE
A/equine/Ahmedabad/1/2009 (H3N8	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVCK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRRRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLDIETATRA	GKQIVEQILE
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLDIETATRA	GKQIVEQILE
A/equine/California/1/2007 (H3N	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGSTL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/California/2/2007 (H3N	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGSTL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/California/8560/2002 (MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/California/8560/2002 (MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Cheshire/1/2006 (H3N8)	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLNIETATRA	GKQIVEQILE
A/equine/Cheshire/1/2007 (H3N8)	MDSNPVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Cheshire/2/2007 (H3N8)	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Cheshire/3/2007 (H3N8)	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Florida/2/2006 (H3N8))	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGSTL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Fontainebleau/1979 (H3	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLDIETATRA	GKQIVERILE
A/equine/Grobois/1/98 (H3N8)) n	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLDIETATRA	GKQIVEQILE
A/equine/Horsham/1/2007 (H3N8))	MDSNSSFQVD	CFLWHVRKRF	ADQELGDAPF	LDRLRRDQKS	LRGRGITLGL	DIETATHAGK	QIVEQILEKE
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRRRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Kentucky/4/2007 (H3N8)	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGSTL	GLDIETATHA	GKQIVKQILE
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8))	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Kentucky/7/2007 (H3N8)	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGSTL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Kentucky/9/2004 (H3N8)	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGSTL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Lanark/1/2006 (H3N8))	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Lincolnshire/1/2002 (H	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGNTL	GLDIEIATRA	GKQIVEQILE
A/equine/Lincolnshire/1/2006 (H	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLNIEIATRA	GKQIVEQILE
A/equine/Maidstone/2/2007 (H3N8	MDSNTVSSFQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE

A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) s	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGSTL	GLDIETATRA	GKQIVERILE
A/equine/New Market/1979 (H3N8)	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	ALDIETATRA	GKQIVERILE
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8)	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLDIETATRA	GKQIVEQILE
A/equine/Avesta/1/1993 (H3N8)	-XSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLDIETATRA	GKQIVEQILE
A/eq/Hong Kong/1/92 (H3N8) non	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLDIETATRA	GKQIVEQILE
A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8)	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLDIETATRA	GKQIVEQILE
A/eq/Lambourn/22778/92 (H3N8)	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLEGRGGAL	GLDIETAARA	GRQMVGRILE
A/equine/Newmarket/1/2007 (H3N8)	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8)	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLDIETATRA	GKQIVEQILE
A/equine/Switzerland/173/1993 (MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRSSTL	GLDIETATRA	GKQIVEQILE
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8) tr	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGSTL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Richmond/1/2007 (H3N8)	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/eq/Roma/5/91 (H3N8) nonstruc	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLKGRGSTL	GLDIETATRA	GKQIVEQIME
A/equine/Southampton/1/2006 (H3	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE
A/equine/Southampton/1/2007 (H3	MDSNTVSSSQ	VDCFLWHVRK	RFADQELGDA	PFLDRLRRDQ	KSLRGRGITL	GLDIETATHA	GKQIVEQILE

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 80 90 100 110 120 130 140

A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8)	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/ATHENS/2003 NS	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/ATHENS/2007 NS	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Essex/1/2005 (H3N8) s	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) s	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Switzerland/P112/2007	EESDEAFKMT	IASVPASRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8)	EESDEALKMT	IASVPASRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Aboyne/1/2005 (H3N8)	EESDEELKMT	IASIPVSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFEK
A/equine/Ahmedabad/1/2009 (H3N8)	KESNEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFET
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)	EESDEALKMT	IASVPASRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8)	EESDEALKMT	IASVPASRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/California/1/2007 (H3N	KESDEALKMT	IASVPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/California/2/2007 (H3N	KESDEALKMT	IASVPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/California/8560/2002 (KESDEALKMT	IASVPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/California/8560/2002 (KESDEALKMT	IASVPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Cheshire/1/2006 (H3N8)	DESDEALKMT	IASVPASRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER

A/equine/Cheshire/1/2007 (H3N8)	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Cheshire/2/2007 (H3N8)	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Cheshire/3/2007 (H3N8)	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Florida/2/2006 (H3N8))	KESDEALKMT	IASVPSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	ITGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Fontainebleau/1979 (H3	EESDEALKMT	IASVPASRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCVRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Grobois/1/98 (H3N8)) n	EESDEALKMT	IASVPVSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFEM
A/equine/Horsham/1/2007 (H3N8))	SDEALKMTIA	SIPTSRYLTD	MTLDEMSRDW	FMLMPKQKVT	GSLCIRMDQA	IMDKNIILKA	NFSVIFERLE
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Kentucky/4/2007 (H3N8)	KESDEAFKMT	IASVPSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8))	KESDEALKMT	IASVPSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Kentucky/7/2007 (H3N8)	KESDEALKMT	IASVPSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Kentucky/9/2004 (H3N8)	KESDEALKMT	IASVPSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Lanark/1/2006 (H3N8))	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Lincolnshire/1/2002 (H	EESDEALKMT	IASIPASRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Lincolnshire/1/2006 (H	EESDEALKMT	IASIPVSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIVDKNIIL	KANFSVIFEK
A/equine/Maidstone/2/2007 (H3N8	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s	EESDEALKMT	IASVPASRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VAGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/New Market/1979 (H3N8)	EESDEALKMT	IASVPASRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8)	EESDEAFKMT	IASVPVSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Avesta/1/1993 (H3N8))	EESDEALKMT	IASVPVSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/eq/Hong Kong/1/92 (H3N8)) non	EESDEALKMT	IASVPVSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VIGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8)	EESDEALKMT	IASVPASRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/eq/Lambourn/22778/92 (H3N8))	EESDEALKMT	IASVPVSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Newmarket/1/2007 (H3N8	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	EESDEALKMT	IASVPVSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Switzerland/173/1993 (EESDEALKMT	IASVPVSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) tr	KESDEALKMT	IASVPSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Richmond/1/2007 (H3N8)	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/eq/Roma/5/91 (H3N8)) nonstruc	EESDEALKMT	IASVPVSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Southampton/1/2006 (H3	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTLDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER
A/equine/Southampton/1/2007 (H3	KESDEALKMT	IASIPTSRYL	TDMTFDEMSR	DWFMLMPKQK	VTGSLCIRMD	QAIMDKNIIL	KANFSVIFER

	150	160	170	180	190	200	210
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/ATHENS/2003 NS	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/ATHENS/2007 NS	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Essex/1/2005 (H3N8)) s	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Switzerland/P112/2007	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGFKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Aboyne/1/2005 (H3N8))	LETLILLRAF	TEEGTVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIEI	LIGGFKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Ahmedabad/1/2009 (H3N8	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	KIRISETLQR	FAWRSCHEG
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/California/1/2007 (H3N	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/California/2/2007 (H3N	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/California/8560/2002 (LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/California/8560/2002 (LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Cheshire/1/2006 (H3N8)	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGFKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Cheshire/1/2007 (H3N8)	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSYENG
A/equine/Cheshire/2/2007 (H3N8)	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSYENG
A/equine/Cheshire/3/2007 (H3N8)	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Florida/2/2006 (H3N8))	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Fontainebleau/1979 (H3	LETLIILRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRVSEALQR	FAWRSSNENG
A/equine/Grobois/1/98 (H3N8)) n	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIRV	LIGGFKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRNSHENG
A/equine/Horsham/1/2007 (H3N8))	TLILLRAFTE	EGAVVGEISP	LPSLPGHTNE	DVKNAIGVLI	GGLKWNDNTV	RISETLQRFA	WRSSHENGRP
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Kentucky/4/2007 (H3N8)	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8))	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Kentucky/7/2007 (H3N8)	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Kentucky/9/2004 (H3N8)	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Lanark/1/2006 (H3N8))	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRISETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Lincolnshire/1/2002 (H	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSFPGHT	NEDVKNAIGI	IIGGFKWNDN	TVRVSEILQR	FAWRSSHENG
A/equine/Lincolnshire/1/2006 (H	LETLILLRAF	TEEGAVVGEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIEI	LIGGFKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSYENG

A/equine/Maidstone/2/2007 (H3N8	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRIVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLEWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/New Market/1979 (H3N8)	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRIVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Avesta/1/1993 (H3N8))	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSHENG
A/eq/Hong Kong/1/92 (H3N8)) non	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8)	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRIVSETLQR	FAWRSSHENG
A/eq/Lambourn/22778/92 (H3N8))	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Newmarket/1/2007 (H3N8	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRIVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Switzerland/173/1993 (LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) tr	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRIVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Richmond/1/2007 (H3N8)	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRIVSETLQR	FAWRSSYENG
A/eq/Roma/5/91 (H3N8)) nonstruc	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Southampton/1/2006 (H3	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRIVSETLQR	FAWRSSHENG
A/equine/Southampton/1/2007 (H3	LETLILLRAF	TEEGAVVEI	SPLPSLPGHT	NEDVKNAIGV	LIGGLKWNDN	TVRIVSETLQR	FAWRSSYENG

....|....||....| .
 220 230

A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/ATHENS/2003 NS	RPSFPPKQK*	KMERTTKPE.	.
A/equine/ATHENS/2007 NS	RPSFPPKQK*	KMERTTKPE.	.
A/equine/Essex/1/2005 (H3N8)) s	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Switzerland/P112/2007	RPSFPPKQKR	KMERTIESEV	*
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	RSSFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Aboyne/1/2005 (H3N8))	RPTFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Ahmedabad/1/2009 (H3N8	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	RPSFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	RPSFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/California/1/2007 (H3N	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/California/2/2007 (H3N	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/California/8560/2002 (RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/California/8560/2002 (RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*

A/equine/Cheshire/1/2006 (H3N8)	RSSFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Cheshire/1/2007 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Cheshire/2/2007 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Cheshire/3/2007 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Florida/2/2006 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Fontainebleau/1979 (H3N8)	RPSFPPKQKR	KMARTIESEV	*
A/equine/Grobois/1/98 (H3N8)	RPTFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Horsham/1/2007 (H3N8)	SFPSKQK*KM	ERTIKPEI* .	.
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Inner Mongolia/8/2008 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Kentucky/4/2007 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Kentucky/7/2007 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Kentucky/9/2004 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Lanark/1/2006 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Lincolnshire/1/2002 (H3N8)	RPTFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Lincolnshire/1/2006 (H3N8)	RPTFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Maidstone/2/2007 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)	RPSFPPKQKR	KMARTIESEV	*
A/equine/New Market/1979 (H3N8)	RPSFPPKQKR	KMARTIESEV	*
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8)	RPSFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Avesta/1/1993 (H3N8)	RPSFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/eq/Hong Kong/1/92 (H3N8)	RPSFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8)	RPSFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/eq/Lambourn/22778/92 (H3N8)	RPSFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Newmarket/1/2007 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8)	RPTFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Switzerland/173/1993 (H3N8)	RPSFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Richmond/1/2007 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/eq/Roma/5/91 (H3N8)	RPSFPPKQKR	KMERTIEPEV	*
A/equine/Southampton/1/2006 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*
A/equine/Southampton/1/2007 (H3N8)	RPSFPSKQK*	KMERTIKPEI	*

PA

Alignment: H:\PhD\Sequences\ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ\PA aa.fas

	10	20	30	40	50	60	70
A/equine/Newmarket/5/2003 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/Athens/2003 PA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Athens/2007 PA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Gansu/7/2008 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIDSGDPNA
A/equine/Newmarket/2/1993 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/Newmarket/1/1993 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/Austria/421/1992 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/Huabei/1/2007 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIDSGDPNA
A/equine/Hubei/6/2008 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIDSGDPNA
A/equine/Roma/5/1991 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/Switzerland/173/1993	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/Xinjiang/1/2007 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIDSGDPNA
A/equine/Avesta/1/1993 PA	-----	-----XEKA	XKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/California/8560/2002	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/Fontainbleu/1/1979 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/Heilongjiang/10/2008	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIDSGDPNA
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIDSGDPNA
A/equine/Kentucky/5/02 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/La Plata/1/1993	-----	-----XEKA	XKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/Liaoning/9/2008 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIDSGDPNA
A/equine/Miami/1/1963 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFIDELGES	VVIESGDPNA
A/equine/Ohio/1/2003 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/Sussex/1/1989 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIESGDPNA
A/equine/Uruguay/1/1963 PA	MENFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINERGES	VVIESGDPNA
A/equine/Wisconsin/1/03 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELSES	VVIESGDPNA
A/equine/Xinjiang/2/2007 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIDSGDPNA
A/equine/Xinjiang/3/2007 PA	MEDFVRQCFY	PMMVVLAGKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIDSGDPNA
A/equine/Xinjiang/4/2007 PA	MEDFVRQCFN	PMIVELAIEKA	MKEYGEDPKI	ETNKFAAICT	HLEVCFMYS	FHFINELGES	VVIDSGDPNA

A/equine/Newmarket/5/2003 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Athens/2003 PA	-----	-----RAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Athens/2007 PA	-----	-----RAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Gansu/7/2008 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATRAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Newmarket/2/1993 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMGTKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Newmarket/1/1993 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Austria/421/1992 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Huabei/1/2007 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATRAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Hubei/6/2008 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATRAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Roma/5/1991 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Switzerland/173/1993	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Xinjiang/1/2007 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATRAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Avesta/1/1993 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGX---	-----	-----
A/equine/California/8560/2002	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Fontainbleu/1/1979 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Heilongjiang/10/2008	EKTHIHIFSF	TGEEMATRAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	EKTHIHIFSF	TGEEMATRAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Kentucky/5/02 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/La Plata/1/1993	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWX-	-----	-----
A/equine/Liaoning/9/2008 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATRAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Miami/1/1963 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Ohio/1/2003 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Sussex/1/1989 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMGTKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Uruguay/1/1963 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASKGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Wisconsin/1/03 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATKAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Xinjiang/2/2007 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATRAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Xinjiang/3/2007 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATRAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMAMRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT
A/equine/Xinjiang/4/2007 PA	EKTHIHIFSF	TGEEMATRAD	YTLDEESRAR	IKTRLFTIRQ	EMASRGLWDS	FRQSERGEET	IEERFEITGT

....|....||....||....||....||....||....||....|

220 230 240 250 260 270 280

A/equine/Newmarket/5/2003 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFEPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Athens/2003 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFKPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Athens/2007 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFKPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTTPRPLKM	PGGPPCHQRS

A/equine/Gansu/7/2008 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFKPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Newmarket/2/1993 PA	MRRLANYSLP	PNFSSLGFR	VYVDGFEPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKI	PGGPPCHQRS
A/equine/Newmarket/1/1993 PA	MRRLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFEPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Austria/421/1992 PA	MRRLANYSLP	PNFSSLESFR	VYVDGFEPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKI	PGGPPCHQRS
A/equine/Huabei/1/2007 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFKPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Hubei/6/2008 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFKPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Roma/5/1991 PA	MRRLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFEPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKI	PGGPPCHQRS
A/equine/Switzerland/173/1993	MRRLANYSLP	PNFSSLESFR	VYVDGFEPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKI	PGGPPCHQRS
A/equine/Xinjiang/1/2007 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFKPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Avesta/1/1993 PA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/California/8560/2002	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFEPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Fontainbleu/1/1979 PA	MRRLANYSLP	PNFSSLENFR	AYVDGFEPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLRI	PGGPPCHQRS
A/equine/Heilongjiang/10/2008	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFKPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFKPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Kentucky/5/02 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFEPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/La Plata/1/1993	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Liaoning/9/2008 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFKPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Miami/1/1963 PA	MRRLADHSLP	PNFSSLENFR	AYVDGFEPNG	CIEGKLSQMS	KEVNARIEPF	LKTTTPRPLRI	PGGPPCSQRS
A/equine/Ohio/1/2003 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFEPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Sussex/1/1989 PA	MRRLANYSLP	PNFSSLESFR	VYVDGFEPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKI	PGGPPCHQRS
A/equine/Uruguay/1/1963 PA	MRRLANHSLP	PNFSSLENFR	AYVDGFEPNG	CIEGKLSQMS	KEVNARIEPF	LKTTTPRPLRI	PGGPPCSQRS
A/equine/Wisconsin/1/03 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFEPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Xinjiang/2/2007 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFKPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Xinjiang/3/2007 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFKPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS
A/equine/Xinjiang/4/2007 PA	MRKLANYSLP	PNFSSLENFR	VYVDGFKPNG	CIESKLSQMS	KEVNARIEPF	SKTTPRPLKM	PGGPPCHQRS

	290	300	310	320	330	340	350
A/equine/Newmarket/5/2003 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIK	MKTFFGWKEP	SIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Athens/2003 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIK	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Athens/2007 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIK	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Gansu/7/2008 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIK	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Newmarket/2/1993 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIK	MKTFFGWKEP	SIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLAELQDLEN
A/equine/Newmarket/1/1993 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIK	MKTFFGWKEP	SIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLAELQDLEN

A/equine/Austria/421/1992 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	SIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLAELQDLEN
A/equine/Huabei/1/2007 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Hubei/6/2008 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Roma/5/1991 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	SIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLAELQDLEN
A/equine/Switzerland/173/1993	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	SIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLAELQDLEN
A/equine/Xinjiang/1/2007 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Avesta/1/1993 PA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/California/8560/2002	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	SIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Fontainbleu/1/1979 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	SIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLAELQDIEN
A/equine/Heilongjiang/10/2008	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Kentucky/5/02 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	SIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/La Plata/1/1993	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Liaoning/9/2008 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Miami/1/1963 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLAELQDLEN
A/equine/Ohio/1/2003 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	SIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Sussex/1/1989 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	SIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLAELQDLEN
A/equine/Uruguay/1/1963 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLAELQDLEN
A/equine/Wisconsin/1/03 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	SIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLAELQDLEN
A/equine/Xinjiang/2/2007 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Xinjiang/3/2007 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN
A/equine/Xinjiang/4/2007 PA	KFLLMDALKL	SIEDPSHEGE	GIPLYDAIKC	MKTFFGWKEP	NIVKPHEKGI	NPNYLQAWKQ	VLEEIQDLEN

	360	370	380	390	400	410	420
A/equine/Newmarket/5/2003 PA	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIQSE	FNKACELTDS
A/equine/Athens/2003 PA	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIQSE	FNKACELTDS
A/equine/Athens/2007 PA	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIQSE	FNKACELTDS
A/equine/Gansu/7/2008 PA	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIQSE	FNKACELTDS
A/equine/Newmarket/2/1993 PA	EKTPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDINDL	KQYDSDEPET	RSLASWIQSE	FNKACELTDS
A/equine/Newmarket/1/1993 PA	EKTPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIQSE	FNKACELTDS
A/equine/Austria/421/1992 PA	EKTPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDINDL	KQYDSDEPET	RSLASWIQSE	FNKACELTDS
A/equine/Huabei/1/2007 PA	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIQSE	FNKACELTDS
A/equine/Hubei/6/2008 PA	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIQSE	FNKACELTDS

A/equine/Roma/5/1991 PA	EKTPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDINDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Switzerland/173/1993	EKTPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDINDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Xinjiang/1/2007 PA	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Avesta/1/1993 PA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/California/8560/2002	EERTPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Fontainbleu/1/1979 PA	EAKIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Heilongjiang/10/2008	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Kentucky/5/02 PA	EERTPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/La Plata/1/1993	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Liaoning/9/2008 PA	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Miami/1/1963 PA	EKIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPEA	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Ohio/1/2003 PA	EERTPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDXDEPXT	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Sussex/1/1989 PA	EKTPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDINDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Uruguay/1/1963 PA	EKIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPEP	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Wisconsin/1/03 PA	EKDPKTKNM	KKTSQLKWAL	SENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Xinjiang/2/2007 PA	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Xinjiang/3/2007 PA	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS
A/equine/Xinjiang/4/2007 PA	EERIPKTKNM	KKTSQLKWAL	GENMAPEKVD	FEDCKDISDL	KQYDSDEPET	RSLASWIOQE	FNKACELTDS

	430	440	450	460	470	480	490
A/equine/Newmarket/5/2003 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KGVYINTALL	NASCAAMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Athens/2003 PA	SWIELDEIGE	DVAP.....
A/equine/Athens/2007 PA	SWIELDEIGE	DVAP.....
A/equine/Gansu/7/2008 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KGVYINTALL	NASCATMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Newmarket/2/1993 PA	SWIELDEIGE	DIAPIEYIAS	MRRNYFSAEF	SHCRATEYIM	KGVYINTALL	NASCAAMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Newmarket/1/1993 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KGVYINTALL	NASCAAMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Austria/421/1992 PA	SWIELDEIGE	DIAPIEYIAS	MRRNYFTA EV	SHCRATEYIM	KGVYINTALL	NASCAAMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Huabei/1/2007 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KGVYINTALL	NASCATMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Hubei/6/2008 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KGVYINTALL	NASCATMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Roma/5/1991 PA	SWIELDEIGE	DIAPIEYIAS	MRRNYFTA EV	SHCRATEYIM	KGVYINTALL	NASCAAMDEY	QLIPMISKCR
A/equine/Switzerland/173/1993	SWIELDEIGE	DIAPIEYIAS	MRRNYFTA EV	SHCRATEYIM	KGVYINTALL	NASCAAMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Xinjiang/1/2007 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KGVYINTALL	NASCATMDEF	QLIPMISKCR

A/equine/Avesta/1/1993 PA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/California/8560/2002	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCAAMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Fontainbleu/1/1979 PA	SWIELDEIGE	DIAPIEYIAS	MRRNYFTA EV	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCAAMDDF	QLIPMISKCR
A/equine/Heilongjiang/10/2008	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCATMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCATMDEL	QLIPMISKCR
A/equine/Kentucky/5/02 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCAAMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/La Plata/1/1993	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Liaoning/9/2008 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCATMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Miami/1/1963 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEH IAS	MRRNYFTA EV	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCAAMDDF	QLIPMISKCR
A/equine/Ohio/1/2003 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCAAMDEF	QXIPMISKCR
A/equine/Sussex/1/1989 PA	SWIELDEIGE	DIAPIEYIAS	MRRNYFTA EV	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCAAMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Uruguay/1/1963 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEH IAS	MRRNYFTA EV	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCAAMDDF	QLIPMISKCR
A/equine/Wisconsin/1/03 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EV	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCAAMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Xinjiang/2/2007 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCATMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Xinjiang/3/2007 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCATMDEF	QLIPMISKCR
A/equine/Xinjiang/4/2007 PA	SWIELDEIGE	DVAPIEYIAS	MRRNYFTA EI	SHCRATEYIM	KG VYINTALL	NASCATMDEF	QLIPMISKCR

	500	510	520	530	540	550	560
A/equine/Newmarket/5/2003 PA	TKEGRRKTNL	YGFI I KGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Athens/2003 PA
A/equine/Athens/2007 PA
A/equine/Gansu/7/2008 PA	TKEGRRKTNL	YGFI I KGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Newmarket/2/1993 PA	TKEGRRKTNL	YGFI I KGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Newmarket/1/1993 PA	TKEGRRKTNL	YGFI I KGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Austria/421/1992 PA	TKEGRRKTNL	YGFI I KGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Huabei/1/2007 PA	TKEGRRKTNL	YGFI I KGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Hubei/6/2008 PA	TKEGRRKTNL	YGFI I KGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Roma/5/1991 PA	TKEGRRKTNL	YGFI I KGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Switzerland/173/1993	TKEGRRKTNL	YGFI I KGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Xinjiang/1/2007 PA	TKEGRRKTNL	YGFI I KGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Avesta/1/1993 PA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/California/8560/2002	TKEGRRKTNL	YGFI I KGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Fontainbleu/1/1979 PA	TKEGRRKTNL	YGFI I KGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RLEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP

A/equine/Heilongjiang/10/2008	TKEGRRKTNL	YGFIIKGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	TKEGRRKTNL	YGFIIKGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Kentucky/5/02 PA	TKEGRRKTNL	YGFIIKGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/La Plata/1/1993	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Liaoning/9/2008 PA	TKEGRRKTNL	YGFIIKGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Miami/1/1963 PA	TKEGRRKTNL	YGFIIKGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RLEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Ohio/1/2003 PA	TKEGRRKTNL	YGFIVKGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Sussex/1/1989 PA	TKEGRRKTNL	YGYIIKGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Uruguay/1/1963 PA	TKEGRRKTNL	YGFIIKGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RLEQHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Wisconsin/1/03 PA	TKEGRRKTNL	YGFIVKGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Xinjiang/2/2007 PA	TKEGRRKTNL	YGFIIKGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Xinjiang/3/2007 PA	TKEGRRKTNL	YGFIIKGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP
A/equine/Xinjiang/4/2007 PA	TKEGRRKTNL	YGFIIKGRSH	LRNDTDVVNF	VSMEFSLTDP	RFEPHKWEKY	CVLEIGDMLL	RTAVGQVSRP

	570	580	590	600	610	620	630
A/equine/Newmarket/5/2003 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE
A/equine/Athens/2003 PA
A/equine/Athens/2007 PA
A/equine/Gansu/7/2008 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPRGVEE
A/equine/Newmarket/2/1993 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE
A/equine/Newmarket/1/1993 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE
A/equine/Austria/421/1992 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPRGVEE
A/equine/Huabei/1/2007 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPRGVEE
A/equine/Hubei/6/2008 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPRGVEE
A/equine/Roma/5/1991 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE
A/equine/Switzerland/173/1993	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE
A/equine/Xinjiang/1/2007 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPRGVEE
A/equine/Avesta/1/1993 PA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/California/8560/2002	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE
A/equine/Fontainbleu/1/1979 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE
A/equine/Heilongjiang/10/2008	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPRGVEE
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FYENKSETWP	IGESPRGVEE
A/equine/Kentucky/5/02 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE

A/equine/La Plata/1/1993	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Liaoning/9/2008 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPRGVEE
A/equine/Miami/1/1963 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE
A/equine/Ohio/1/2003 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE
A/equine/Sussex/1/1989 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE
A/equine/Uruguay/1/1963 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE
A/equine/Wisconsin/1/03 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPKGVEE
A/equine/Xinjiang/2/2007 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPRGVEE
A/equine/Xinjiang/3/2007 PA	MFLYVRTNRT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPRGVEE
A/equine/Xinjiang/4/2007 PA	MFLYVRTNGT	SKIKMKWGME	MRRCLLQSLQ	QIESMIEAES	SVKEKDMTKE	FFENKSETWP	IGESPRGVEE

	640	650	660	670	680	690	700
A/equine/Newmarket/5/2003 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Athens/2003 PA
A/equine/Athens/2007 PA
A/equine/Gansu/7/2008 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Newmarket/2/1993 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Newmarket/1/1993 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Austria/421/1992 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Huabei/1/2007 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Hubei/6/2008 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Roma/5/1991 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Switzerland/173/1993	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Xinjiang/1/2007 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Avesta/1/1993 PA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/California/8560/2002	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Fontainbleu/1/1979 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Heilongjiang/10/2008	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Kentucky/5/02 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/La Plata/1/1993	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Liaoning/9/2008 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Miami/1/1963 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKILLVQ	ALRDNLEPGT	FDLGGGLYESI	EECLINDPWV

A/equine/Ohio/1/2003 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Sussex/1/1989 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Uruguay/1/1963 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKILLIVQ	ALRDNLEPGT	FDLGGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Wisconsin/1/03 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Xinjiang/2/2007 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Xinjiang/3/2007 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSV	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV
A/equine/Xinjiang/4/2007 PA	GSIGKVCRTL	LAKSVFNLSY	ASPQLEGFSA	ESRKLLLVQ	ALRDNLEPGT	FDIGGLYESI	EECLINDPWV

....|....||..
710

A/equine/Newmarket/5/2003 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Athens/2003 PA
A/equine/Athens/2007 PA
A/equine/Gansu/7/2008 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Newmarket/2/1993 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Newmarket/1/1993 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Austria/421/1992 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Huabei/1/2007 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Hubei/6/2008 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Roma/5/1991 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Switzerland/173/1993	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Xinjiang/1/2007 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Avesta/1/1993 PA	-----	-----
A/equine/California/8560/2002	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Fontainbleu/1/1979 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Heilongjiang/10/2008	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Kentucky/5/02 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/La Plata/1/1993	-----	-----
A/equine/Liaoning/9/2008 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Miami/1/1963 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Ohio/1/2003 PA	LL-----	-----
A/equine/Sussex/1/1989 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*
A/equine/Uruguay/1/1963 PA	LLNASWFNSF	LTHALK*

A/equine/Wisconsin/1/03 PA LLNASWFNSF LTHALK*
 A/equine/Xinjiang/2/2007 PA LLNASWFNSF LTHALK*
 A/equine/Xinjiang/3/2007 PA LLNASWFNSF LTHALK*
 A/equine/Xinjiang/4/2007 PA LLNASWFNSF LTHALK*

PB2

Alignment: H:\PhD\Sequences\ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ\PB2 aa.fas

	
	10	20	30	40	50	60 70	
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8)	-----M	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Athens/2003 PB2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Athens/2007 PB2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s	-----XNM	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	-----XM	ERIKELRDLM	SQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8))	-----XNM	ERIKELRDLM	SQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	-----M	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	-----XNM	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	-----XNM	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	-----M	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	-----XNM	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	-----XM	ERIKELRDLM	SQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/California/8560/2002 (-----XFNM	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/California/191/2003 (H	-----YYNM	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3	-----XNM	ERIKELRDLM	SQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8))	SESRSNIFNM	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	-----XNM	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Massachussetts/213/20	---XTLYFNM	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s	-----XNM	ERIKELRDLM	SQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/New York/452/2003 (H3N	-----XM	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/New York/146066/2007 (-----M	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB	-----	-----	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8)	-----FNM	ERIKELRDLM	SQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	-----M	ERIKELRDLM	LQSRTREILT	KTTVDHMAII	KKYTSGRQEK	NPALRMKMMM	AMKYPITADK

A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8) s -----XNM ERIKELRDLM LQSRTREILT KTTVDHMAII KKYTSGRQEK NPALRMKWMW AMKYPIITADK
 A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8 -----M ERIKELRDLM LQSRTREILT KTTVDHMAII KKYTSGRQEK NPALRMKWMW AMKYPIITADK
 A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8 -----M ERIKELRDLM SQSRTREILT KTTVDHMAII KKYTSGRQEK NPALRMKWMW AMKYPIITADK
 A/equine/Roma/5/1991 (H3N8) se -----XNM ERIKELRDLM LQSRTREILT KTTVDHMAII KKYTSGRQEK NPALRMKWMW AMKYPIITADK
 A/equine/Switzerland/173/1993 (-----XNM ERIKELRDLM SQSRTREILT KTTVDHMAII KKYTSGRQEK NPALRMKWMW AMKYPIITADK

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 80 90 100 110 120 130 140
 A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8 RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Athens/2003 PB2 ----- ---XTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Athens/2007 PB2 ----- ---XTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) s RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPATSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8) RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8) RIMGMIERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTVHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8) RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8) RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPATSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8) RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPATSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8) RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8) RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPATSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8) RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/California/8560/2002 (RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/California/191/2003 (H RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3 RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8) RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8) RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPATSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Massachusetts/213/20 RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) s RIMGMIERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTVHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/New York/452/2003 (H3N RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/New York/146066/2007 (RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Austria/421/1992 (H3N8 RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8)) RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPATSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPATSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG
 A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8 RIMEMIPERN EQGQTLWSKT NDAGSDRVMV SPLAVTWWRN NGPTTSTIHY PKVYKTYFEK VERLKHGTFG

A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	RIMEMIPERN	EQQQSLWSKT	NDAGSDRVMV	SPLAVTWWNR	NGPTTSTIHY	PKVYKTYFEK	VERLKHGTFG
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8)) se	RIMEMIPERN	EQQQTLWSKT	NDAGSDRVMV	SPLAVTWWNR	NGPTTSTIHY	PKVYKTYFEK	VERLKHGTFG
A/equine/Switzerland/173/1993 (RIMEMIPERN	EQQQTLWSKT	NDAGSDRVMV	SPLAVTWWNR	NGPTTSTIHY	PKVYKTYFEK	VERLKHGTFG

	150	160	170	180	190	200	210
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Athens/2003 PB2	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Athens/2007 PB2	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8))	PVHFRNQVKI	RRRVDINPGH	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/California/8560/2002 (PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/California/191/2003 (H	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8))	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Massachussetts/213/20	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s	PVHFRNQVKI	RRRVDINPGH	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/New York/452/2003 (H3N	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/New York/146066/2007 (PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKITPL
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKISPL
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8)) se	PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL

A/equine/Switzerland/173/1993 (PVHFRNQVKI	RRRVDVNP	ADLSAKEAQD	VIMEVVPNE	VGARILTSES	QLTITKEKKE	ELQDCKIAPL

	220	230	240	250	260	270	280
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Athens/2003 PB2	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVK	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Athens/2007 PB2	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVK	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVK	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8))	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVK	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVK	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVK	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/California/8560/2002 (MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/California/191/2003 (H	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8))	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVK	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Massachussetts/213/20	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDVDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/New York/452/2003 (H3N	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/New York/146066/2007 (MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB	MVAYMLEREL	IRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVK	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVK	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8)) se	MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT
A/equine/Switzerland/173/1993 (MVAYMLEREL	VRKTRFLPVA	GGTSSVYIEV	LHLTQGTCWE	QMYTPGGEVR	NDDIDQSLII	AARNIVRRAT

	290	300	310	320	330	340	350
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Athens/2003 PB2	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Athens/2007 PB2	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8))	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILRQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILEQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/California/8560/2002 (VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/California/191/2003 (H	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8))	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Massachussetts/213/20	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILRQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/New York/452/2003 (H3N	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/New York/146066/2007 (VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8)) se	VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE
A/equine/Switzerland/173/1993 (VSADPLASLL	EMCHSTQIGG	IRMVDILKQN	PTEEQAVDIC	KAAMGLRISS	SFSFGGFTFK	RTSGSSVKRE

	360	370	380	390	400	410	420
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Athens/2003 PB2	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVF-----
A/equine/Athens/2007 PB2	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVF-----
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) s	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8))	EEVLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	FQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRSL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	FQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRSL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/California/8560/2002 (EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/California/191/2003 (H	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3	EEVLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKETRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8))	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Massachussetts/213/20	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s	EEVLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRGAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQENDCMI
A/equine/New York/452/2003 (H3N	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/New York/146066/2007 (EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAVIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKTTRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKATRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8)) se	EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKETRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI
A/equine/Switzerland/173/1993 (EEMLTGNLQT	LKIRVHEGYE	EFTMVGRRAT	AILRKETRRL	IQLIVSGRDE	QSIAEAIIVA	MVFSQEDDCMI

	430	440	450	460	470	480	490
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS

A/equine/Athens/2003 PB2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Athens/2007 PB2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) s	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8))	KAARGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/California/8560/2002 (KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/California/191/2003 (H	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Fontainebleu/1/1979 (H3	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8))	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Massachussetts/213/20	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/New York/452/2003 (H3N	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/New York/146066/2007 (KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8)) se	KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS
A/equine/Switzerland/173/1993 (KAVRGDLNFV	NRANQRLNPM	HQLLRHFQKD	AKVLFQNWGI	EPIDNVMGMI	GILPDMTPST	EMSLRGVRVS

	500	510	520	530	540	550	560
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	KMGVDEYSST	ERVVVSIDRF	LRVRDQRGNI	LLSPEEVSET	QGTEKLTIIY	SSSMMWEING	PESVLVNTYQ
A/equine/Athens/2003 PB2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Athens/2007 PB2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)) KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8)) KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNV LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)) KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8) KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8) KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8) KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8) KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8)) KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/California/8560/2002 (KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/California/191/2003 (H KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3 KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNV LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8)) KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8) KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Massachussetts/213/20 KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNV LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/New York/452/2003 (H3N KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/New York/146066/2007 (KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8 KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8)) KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8 KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8 KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8)) se KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ
A/equine/Switzerland/173/1993 (KMGVDEYSST ERVVVSIDRF LRVRDQRGNI LLSPEEVSET QGTEKLTIIY SSSMMWEING PESVLVNTYQ

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 570 580 590 600 610 620 630

A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8 WIIRNWEIVK IQWSQDPTML YNKIEFEPFQ SLVPRATRSQ YSGFVRTLFQ QMRDVLGTFD TAQIIKLLPF
A/equine/Athens/2003 PB2 -----
A/equine/Athens/2007 PB2 -----
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s WIIRNWEIVK IQWSQDPTML YNKIEFEPFQ SLVPRATRSQ YSGFVRTLFQ QMRDVLGTFD TAQIIKLLPF
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)) WIIRNWEIVK IQWSQDPTML YNKIEFEPFQ SLVPRATRSQ YSGFVRTLFQ QMRDVLGTFD TAQIIKLLPF

A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8))	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKMEFEPFQ	SLVPRAARGQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TVQIIKLLPF
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	HNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/California/8560/2002 (WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/California/191/2003 (H	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Fontainebleu/1/1979 (H3	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8))	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Massachusetts/213/20	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKMEFEPFQ	SLVPRAARGQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TVQIIKLLPF
A/equine/New York/452/2003 (H3N	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/New York/146066/2007 (WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8)) se	WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF
A/equine/Switzerland/173/1993 (WIIRNWEIVK	IQWSQDPTML	YNKIEFEPFQ	SLVPRATRSQ	YSGFVRTLFQ	QMRDVLGTFD	TAQIIKLLPF

	640	650	660	670	680	690	700
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	AAAPPEQSRM	QFSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Athens/2003 PB2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Athens/2007 PB2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s	AAAPPEQSRM	QFSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	AAAPPEQSRM	QFSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8))	AAAPPEQSRM	QFSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	AAAPPEQSRM	QFSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL

A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8))	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/California/8560/2002 (AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/California/191/2003 (H	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8))	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Massachussetts/213/20	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/New York/452/2003 (H3N	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/New York/146066/2007 (AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNRA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALIEDPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8)) se	AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL
A/equine/Switzerland/173/1993 (AAAPPEQSRM	QFSSSLTVNVR	GSGMRILVRG	NSPVFNYNKA	TKRLTVLGKD	AGALTEPDE	GTAGVESAVL

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....|

710 720 730 740 750 760 770

A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Athens/2003 PB2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Athens/2007 PB2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	RGFLILGKEN	KKYGPALSIN	ELSKLTKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8))	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSNLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*-
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C

A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAS	KRIRMAIN*-
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8)	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLTKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/California/8560/2002 (RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/California/191/2003 (H	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAINX-
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLTKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8))	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8)	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Massachussetts/213/20	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAINX-
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSNLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/New York/452/2003 (H3N	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAINY-
A/equine/New York/146066/2007 (RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*-
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDI	VLVMKRKRDS	X-----	-----
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLTKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*-
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLAKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLTKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLTKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8)) se	RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLTKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C
A/equine/Switzerland/173/1993 (RGFLILGKEN	KRYGPALSIN	ELSKLTKGEK	ANVLIGQGDV	VLVMKRKRDS	SILTDSQTAT	KRIRMAIN*C

....|....|
780

A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	*IX-----
A/equine/Athens/2003 PB2	-----
A/equine/Athens/2007 PB2	-----
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s	-----
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	*IV*-----
A/equine/Uruguay/1/1963 (H3N8))	RIV*-----
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	-----
A/equine/Xinjiang/1/2007 (H3N8)	-----
A/equine/Xinjiang/2/2007 (H3N8)	-----
A/equine/Xinjiang/3/2007 (H3N8)	-----
A/equine/Xinjiang/4/2007 (H3N8)	-----

```

A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8) ) *IV*-----
A/equine/California/8560/2002 ( *IV*-----
A/equine/California/191/2003 (H -----
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3 *IV*-----
A/equine/Kentucky/5/02 (H3N8) ) *IV*KRPCFY
A/equine/Liaoning/9/2008 (H3N8) -----
A/equine/Massachussetts/213/20 -----
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) ) s RIV*-----
A/equine/New York/452/2003 (H3N -----
A/equine/New York/146066/2007 ( -----
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8) ) PB -----
A/equine/Austria/421/1992 (H3N8 *IV*-----
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8) ) -----
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8) ) s -----
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8 *IX-----
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8 *IX-----
A/equine/Roma/5/1991 (H3N8) ) se *IV*-----
A/equine/Switzerland/173/1993 ( *IV*-----

```

PB1

Alignment: H:\PhD\Sequences\ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ\PB1 aa 2.fas

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50          60          70
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8 MDVNPTLLFL KVPAQNAIST TFPYTGDPY SHGTGTGYTM DTVNRTHQYS EKGKWTNTTE IGAPQLNPID
Influenza A virus (A/equine/At -----
Influenza A virus (A/equine/At -----
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) ) s MDVNPTLLFL KVPAQNAIST TFPYTGDPY SHGTGTGYTM DTVNRTHQYS EKGKWTNTTE IGAPQLNPID
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8) ) MDVNPTLLFL KVPAQNAIST TFPYTGDPY SHGTGTGYTM DTVNRTHQYS EKGKWTNTTE IGAPQLNPID
A/equine/Inner Mongolia/8/2008 MDVNPTLLFL KVPAQNAIST TFPYTGDPY SHGTGTGYTM DTVNRTHQYS EKGKWTNTTE IGAPQLNPID
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) ) s MDVNPTLLFL KVPAQNAIST TFPYTGDPY SHGTGTGYTM DTVNRTHQYS EKGKWTNTTE TGAPQLNPID

```


A/equine/California/8560/2002 (MDVNPTLLFL	KVPAQNAIST	TFPYTGDP	SHGTGTGYTM	DTVNRTHQYS	EKGKWTNTE	IGAPQLNPID
)							
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8)	MDVNPTLLFL	KVPAQNAIST	TFPYTGDP	SHGTGTGYTM	DTVNRTHQYS	EKGKWTNTE	IGAPQLNPID
)							
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)	MDVNPTLLFL	KVPAQNAIST	TFPYTGDP	SHGTGTGYTM	DTVNRTHQYS	EKGKWTNTE	IGAPQLNPID
)							
s							
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)	MDVNPTLLFL	KVPAQNAIST	TFPYTGDP	SHGTGTGYTM	DTVNRTHQYS	EKGKWTNTE	IGAPQLNPID
)							
PB							
A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8)	MDVNPTLLFL	KVPAQNAIST	TFPYTGDP	SHGTGTGYTM	DTVNRTHQYS	EKGKWTNTE	IGAPQLNPID
)							
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8)	MDVNPTLLFL	KVPAQNAIST	TFPYTGDP	SHGTGTGYTM	DTVNRTHQYS	EKGKWTNTE	IGAPQLNPID
)							
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8)	MDVNPTLLFL	KVPAQNAIST	TFPYTGDP	SHGTGTGYTM	DTVNRTHQYS	EKGKWTNTE	IGAPQLNPID
)							
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	MDVNPTLLFL	KVPAQNAIST	TFPYTGDP	SHGTGTGYTM	DTVNRTHQYS	EKGKWTNTE	IGAPQLNPID
)							
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	MDVNPTLLFL	KVPAQNAIST	TFPYTGDP	SHGTGTGYTM	DTVNRTHQYS	EKGKWTNTE	IGAPQLNPID
)							
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)	MDVNPTLLFL	KVPAQNAIST	TFPYTGDP	SHGTGTGYTM	DTVNRTHQYS	EKGKWTNTE	IGAPQLNPID

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 80 90 100 110 120 130 140

A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVIQQTRVD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
Influenza A virus (A/equine/At	-----	-----	-----	-----CLET	MEVIQQTRMD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
Influenza A virus (A/equine/At	-----	-----	-----	-----CLET	MEVIQQTRMD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVIQQTKMD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
s							
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVIQQTRVD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVIQQTRMD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
s							
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVVQQTRVD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
s							
A/equine/California/8560/2002 (GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVIQQTRVD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVIQQTRMD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
s							
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVIQQTRMD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
s							
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVIQQTRVD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
PB							
A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVVQQTRVD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVVQQTRVD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVVQQTRVD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVIQQTRVD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVIQQTRMD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA
)							
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)	GPLPEDNEPS	GYAQTDCVLE	AMAFLEESHP	GIFENSCL	MEVVQQTRVD	KLTQGRQTYD	WTLNRNQPAA

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 150 160 170 180 190 200 210

A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8) RLNRKSYLIR TLTLNMTMKD AERGKLRRA IATPGMQIRG FVYFVETLAR RICEKLEQSG LPVGGNEKKA
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8) RLNRKSYLIR TLTLNMTMKD AERGKLRRA IATPGMQIRG FVYFVETLAR RICEKLEQSG LPVGGNEKKA
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8) RLNRKSYLIR ALTLNMTMKD AERGKLRRA IATPGMQIRG FVYFVETLAR RICEKLEQSG LPVGGNEKKA

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 290 300 310 320 330 340 350

A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8) KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNQP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
Influenza A virus (A/equine/At KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNQP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
Influenza A virus (A/equine/At KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNQP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)) KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNQP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/equine/Inner Mongolia/8/2008 KLANVVRKMT TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNP KWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRMFLA MITYITRNQP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/equine/California/8560/2002 (KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNQP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8)) KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNQP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8) KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRMFLA MITYITRNQP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8) KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNQP EWFRNVLSIA TIMFSNKMAR
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8) KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRMFLA MITYITRNQP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)) KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNQP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8) KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRIFLA MITYITRNP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)) KLANVVRKMM TNSQDTELSF TITGDNTKWN ENQNPRMFLA MITYITRNQP EWFRNVLSIA PIMFSNKMAR

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....|
 360 370 380 390 400 410 420

A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8) LGKGYMFESK SMKLRAQIPA EMLASIDLKY FNDSTKKKIE KIRPLLVDGT ASLSPGMMMG MFNMLSTVLG
Influenza A virus (A/equine/At LGKGYMFESK SMKLRAQIPA EMLASIDLKY FNDSTKEKIE KIRPLLVDGT ASLSPGMMMG MFNMLSTVLG
Influenza A virus (A/equine/At LGKGYMFESK SMKLRAQIPA EMLASIDLKY FNDSTKEKIE KIRPLLVDGT ASLSPGMMMG MFNMLSTVLG
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s LGKGYMFESK SMKLRTQIPA EMLASIELKY FNDSTKKKIE KIRPLLVDGT ASLSPGMMMG MFNMLSTVLG
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)) LGKGYMFESK SMKLRTQIPA GMLASIDLKY FNDPTKKKIE KIRPLLVDGT ASLSPGMMMG MFNMLSTVLG
A/equine/Inner Mongolia/8/2008 LGKGYMFESK SMKLRTQIPA EMLASIELKY FNDSTKKKIE KIRPLLVDGT ASLSPGMMMG MFNMLSTVLG
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s LGKGYMFESK SMKLRTQIPA EMLASIDLKY FNDSTKKKIE KIRPLLIDGT ASLSPGMMMG MFNMLSTVLG

A/equine/California/8560/2002 (LGKGYMFESK	SMKLRAQIPA	EMLASIDLKY	FNDSTKKKIE	KIRPLLVDGT	ASLSPGMMMG	MFNMLSTVLG
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	LGKGYMFESK	SMKLRTQIPA	EMLASIELKY	FNDSTKKKIE	KIRPLLVDGT	ASLSPGMMMG	MFNMLSTVLG
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	LGKGYMFESK	SMKLRTQIPA	EMLASIELKY	FNDSTKKKIE	KIRPLLVDGT	ASLSPGMMMG	MFNMLSTVLG
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB	LGKGYMFESK	SMKLRTQIPA	EMLASIDLKY	FNDSTKKKIE	KIRPLLVDGT	ASLSPGMMMG	MFNMLSTVLG
A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8)	LGKGYMFESK	SMKLRTQIPA	EMLASIDLKY	FNDSTKKKIE	KIRPLLVDGT	ASLSPGMMMG	MFNMLSTVLG
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8)	LGKGYMFESK	SMKLRTQIPA	EMLASIDLKY	FNDSTKKKIE	KIRPLLVDGT	ASLSPGMMMG	MFNMLSTVLG
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8)	LGKGYMFESK	SMKLRTQIPA	GMLASIDLKY	FNDSTKKKIE	KIRPLLVDGT	ASLSPGMMMG	MFNMLSTVLG
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	LGKGYMFESK	SMKLRTQIPA	GMLASIDLKY	FNDPTKKKIE	KIRPLLVDGT	ASLSPGMMMG	MFNMLSTVLG
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	LGKGYMFESK	SMKLRTQIPA	EMLASIELKY	FNDSTKKKIE	KIRPLLVDGT	ASLSPGMMMG	MFNMLSTVLG
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	LGKGYMFESK	SMKLRTQIPA	EMLASIDLKY	FNDSTKKKIE	RIRPLLVDGT	ASLSPGMMMG	MFNMLSTVLG

	430	440	450	460	470	480	490		
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHEGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
Influenza A virus (A/equine/At	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHEGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
Influenza A virus (A/equine/At	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHEGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHGGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHEGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHGGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHEGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/California/8560/2002 (VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHEGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHGGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHGGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHEGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8)	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHEGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8)	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHEGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8)	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHEGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHEGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHGGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	VSILNLGQRK	YTKTTYWWDG	LQSSDDFALI	VNAPNHEGIQ	AGVDRFYRTC	KLVGINMSKK	KSINRTGTF		

.....
500	510	520	530	540	550	560			

A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8 Influenza A virus (A/equine/At Influenza A virus (A/equine/At A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)) A/equine/Inner Mongolia/8/2008 A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s A/equine/California/8560/2002 (A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8)) A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8) A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8) A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8) A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)) A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8) A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))

EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINN... ..
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINN... ..
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR
 EFTSFFYRYG FVANFSMELP SFGVSGINES ADMSIGVTVI KNNMINNDLG PATAQMALQL FIKDYRYTYR

.....|.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....||.....|

570 580 590 600 610 620 630

A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8 Influenza A virus (A/equine/At Influenza A virus (A/equine/At A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8)) s A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)) A/equine/Inner Mongolia/8/2008 A/equine/Miami/1/1963 (H3N8)) s A/equine/California/8560/2002 (A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8)) A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8) A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8) A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8)

CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP

 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDDDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDDDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKAGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY QGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDDDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDDDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP
 CHRGDTQIQT RRSFELKKLW EQTRSKTGLL VSDGGPNLYN IRNLHIPEVC LKWELMDEDY KGRLCNPLNP

A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	CHRGDTQIQT	RRSFELKKLW	EQTRSKTGLL	VSDGGPNLYN	IRNLHIPEVC	LKWELMDEDY	KGRLCNPLNP
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	CHRGDTQIQT	RRSFELKKLW	EQTRSKTGLL	VSDGGPNLYN	IRNLHIPEVC	LKWELMDDDDY	KGRLCNPLNP
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)	CHRGDTQIQT	RRSFELKKLW	EQTRSKTGLL	VSDGGPNLYN	IRNLHIPEVC	LKWELMDEDY	KGRLCNPLNP

	640	650	660	670	680	690	700
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8)	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
Influenza A virus (A/equine/At)
Influenza A virus (A/equine/At)
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) s	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) s	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/equine/California/8560/2002 (FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8)	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8) s	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8) PB	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8)	FVSHKEIESV	NSAIVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8)	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8)	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8)	FVSHKEIESV	NSAVVMPAHG	PAKSMEYDAV	ATTHSWIPKR	NRSILNTSQR	GILEDEQMYQ	KCCNLFKFF

	710	720	730	740	750	760	770
A/equine/Newmarket/5/2003 (H3N8)	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKDEF	AEIMKICSTI	EELRRQK**I	*LDL.....
Influenza A virus (A/equine/At)
Influenza A virus (A/equine/At)
A/equine/Gansu/7/2008 (H3N8) s	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKDEF	AEIMKICSTI	EELRRQK*..
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8)	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKDEF	AEIMKICSTI	EELRRQK*..
A/equine/Inner Mongolia/8/2008	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKDEF	AEIMKICSTI	EELRRQK*..
A/equine/Miami/1/1963 (H3N8) s	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKDEF	AEIMKICSTI	EELRRQK**I	*LDLHE....

A/equine/California/8560/2002 (PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKDEF	AEIMKICSTI	EELRRQK**I	*LDLH.....
A/equine/Huabei/1/2007 (H3N8))	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKDEF	AEIMKICSTI	EKLRRQK*..
A/equine/Hubei/6/2008 (H3N8)) s	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKDEF	AEIMKICSTI	EELRRQK*..
A/equine/Ohio/1/2003 (H3N8)) PB	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKDEF	AEIMKICSTI	EELRRQK**I	*LDLHEKMPC
A/equine/Kentucky/1/1992 (H3N8)	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKDEF	AEIMKICSTI	EELRRQK**I	*LDLRE....
A/equine/Newmarket/1/1993 (H3N8	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKEEF	AEIMKICSTI	EELRRQK**I	*LDLREKMPC
A/equine/Newmarket/2/1993 (H3N8	PSSSYRRPVG	ISSMVEAVVS	RARIDARIDF	ESGRIKKEEF	AEIMKICSTI	EELRRQK**I	*LDL.....
A/equine/Wisconsin/1/03 (H3N8))	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKDEF	AEIMKICSTI	EELRRQK*..
A/donkey/Xinjiang/5/2007 (H3N8)	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKDEF	AEIMKICSTI	EELRRQK*..
A/equine/Sussex/1/1989 (H3N8))	PSSSYRRPVG	ISSMVEAMVS	RARIDARIDF	ESGRIKKEEF	AEIMKICSTI	EELRRQK**I	*LDLRE....

Βιογραφικό Σημείωμα

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο	Μαρία Μπουντούρη
Τηλέφωνο	0030 6947401735
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο	mbountouri@yahoo.gr
Επάγγελμα	Κτηνίατρος (Απόφοιτος ΑΠΘ), DVM, MSc
Ηλικία	32 ετών
Οικογενειακή κατάσταση	Έγγαμη με ένα παιδί

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΠΕΙΡΑ

- Επωνυμία εργοδότη
- Ημερομηνίες (από – έως)
- Απασχόληση ή θέση που κατείχατε
- Επωνυμία εργοδότη
- Ημερομηνίες (από – έως)
- Επωνυμία εργοδότη
- Ημερομηνίες (από – έως)
- Είδος της επιχείρησης
- Απασχόληση ή θέση που κατείχατε
- Κύριες δραστηριότητες και αρμοδιότητες
- Επωνυμία εργοδότη
- Ημερομηνίες (από – έως)
- Απασχόληση ή θέση που κατείχατε
- Επωνυμία εργοδότη
- Ημερομηνίες (από – έως)
- Απασχόληση ή θέση που κατείχατε

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

2006 έως σήμερα

Υποψήφια Διδάκτωρ

Δ/ση Κτηνιατρικής Περιφέρειας Πελοποννήσου με έδρα την Αρκαδία

Ιούλιος 2007 –σήμερα

Οργανισμός Πληρωμών & Ελέγχου Κοινοτικών Ενισχύσεων Προσανατολισμού & Εγγυήσεων (ΟΠΕΚΕΠΕ)

Σεπτέμβριος 2003 έως Ιούλιο 2007

Εποπτευόμενος Οργανισμός του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων

Εισηγήτρια στην εφαρμογή και επιτήρηση του ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης και ελέγχου (ΟΣΔΕ) – Τμήμα Ζωικής Παραγωγής,

Ενασχόληση σε θέματα εφαρμογής, επιτήρησης και ελέγχου της κοινής οργάνωσης αγορών (ΚΟΑ) στους τομείς των κρεάτων και των ζώων, και ειδικότερα σε θέματα παρεμβατικών δραστηριοτήτων και πρωμοδοτήσεων, καθώς και με θέματα σχετικά με την Νέα ΚΑΠ. Ενασχόληση με θέματα πολλαπλής συμμόρφωσης (Ανάπτυξη και συμμόρφωση κτηνοτροφίας με σκοπό την προστασία του περιβάλλοντος)

Εργαστήριο Βιοχημείας- Nottingham Trent University

Σεπτέμβριος 2002 –Σεπτέμβριος 2003

Στα πλαίσια της προετοιμασίας της μεταπτυχιακής μου μελέτης

Δ/ση Κτηνιατρικής Τρίπολης-

Ιανουάριος 2002 –Σεπτέμβριος 2002

Αγροτικός Κτηνίατρος

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

Βασικός Τίτλος Σπουδών

- Επωνυμία και είδος του οργανισμού που παρείχε την εκπαίδευση ή κατάρτιση
- Ημερομηνίες (από – έως)
- Τίτλος
- Βαθμός αποφοίτησης

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών

Τμήμα Κτηνιατρικής

Σεπτέμβριος 1996- Σεπτέμβριος 2001

Πτυχίο Κτηνιατρικής

«Λίαν Καλώς»

Μεταπτυχιακός Τίτλος Σπουδών

- Επωνυμία και είδος του οργανισμού που παρείχε την εκπαίδευση ή κατάρτιση
- Ημερομηνίες (από – έως)
- Τίτλος
- Θέμα μεταπτυχιακής εργασίας
- Βαθμός αποφοίτησης

Nottingham Trent University

Life Sciences Department

United Kingdom

Σεπτέμβριος 2002- Σεπτέμβριος 2003

MSc Applied Bioscience / Biotechnology & Molecular Biology

Effects of PSP on cell signalling pathways and the cytoskeleton in differentiating N2a cells

«Λίαν Καλώς»

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ Κ' ΑΛΛΕΣ ΓΝΩΣΙΕΣ

ΑΓΓΛΙΚΑ	Άριστη γνώση (Πτυχίο Proficiency Cambridge) και Επάρκεια από το Υπουργείο Παιδείας
ΓΑΛΛΙΚΑ	Καλή γνώση (Πτυχίο Certificat)
ΓΝΩΣΗ Η/Υ	Πολύ καλή γνώση (Office , Internet)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ- ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

1. Bountouri M., Fragkiadaki E., Ntafis V., Xylouri E., (2011), Phylogenetic and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from Greece (2003 and 2007): Evidence for reassortment between evolutionary lineages, *Virology Journal, In Press*
2. Μ. Μπουντούρη, Β. Ντάφης, Ε. Φραγκιαδάκη, Ε. Ξυλούρη (2010), Απομόνωση, ταυτοποίηση και γενετική ανάλυση του ιού της γρίπης των ιπποειδών H3N8 στην Ελλάδα, *9^ο Παν. Συνέδριο Κτηνιατρικής Ζώων Συντροφιάς, Αθήνα 2010*
3. M. Bountouri, (2009), Effects of PSP on cell signalling pathways and the cytoskeleton in differentiating N2a cells, Poster presentation , 1rst Agricultural Biotechnology Congress, Athens, October 2009
4. M. Bountouri, E. Plakokefalos, V. Ntafis, E. Fragkiadaki, E. Xilouri (2008), Isolation and molecular characterisation of equine influenza in Greece, *Presentation Virology Congress, Athens, November 2008.*
5. Μ. Μπουντούρη, Β. Ντάφης, Η. Πλακοκέφαλος, Ε. Φραγκιαδάκη, Ε. Ξυλούρη (2008), Γρίπη των Ιπποειδών στην Ελλάδα, Συνέδριο EZE, Άρτα 2008
6. Hargreaves AJ, Fowler MJ, Sachana M, Flaskos J, Bountouri M., Coutts IC, Glynn P, Harris W, Graham McLean W. (2006) Inhibition of neurite outgrowth in differentiating mouse N2a neuroblastoma cells by phenyl saligenin phosphate: Effects on MAP kinase (ERK 1/2) activation, neurofilament heavy chain phosphorylation and neuropathy target esterase activity. *Biochem Pharmacol.* 2006 Apr 14;71(8):1240-7
7. M.Sachana, J.Flaskos, M.Bountouri, A.J.Hargreaves (2003), Potential molecular markers related to the neurotoxicity of chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl in N2a neuroblastoma cells, *J Vet.Pharmacol. Therap* 26(1), 82-307, Blackwell Publishing Ltd.
8. M.Sachana, J.Flaskos, M.Bountouri, A.J.Hargreaves (2003), Potential molecular markers related to the neurotoxicity of chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl in N2a neuroblastoma cells, *Παρουσίαση στο 9^ο Διεθνές Συνέδριο EAVC (European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology), Λισσαβόνα 13-18 Ιουλίου 2003*
9. Μπουντούρης Θ., Μητρόπουλος Ι., Μπουντούρη Μ.,(2003), «Το Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του Γενικού Νοσοκομείου Τρίπολης», *Επιθεώρηση Υγείας* 14(83), σελ.20-23

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ-ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

- Παρακολούθηση σεμιναρίων με θέμα «Καλύτερη εξυπηρέτηση του πολίτη» (12 Διδακτικές ώρες), Αθήνα 2004
- 9^ο Διεθνές Συνέδριο EAVC (European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology), Λισσαβόνα 13-18 Ιουλίου 2003
- Πανελλήνια Κτηνιατρικά Συνέδρια
- Συνέδρια ΕΚΕ

**ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΥΡΩΠΑΪΚΑ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ**

ConFluTech

Βασικές μοριακές τεχνικές για την διάγνωση της γρίπης των πτηνών,
Δεκέμβριος 2007, Βουκουρέστι.

Ως διδάσκων σε σεμινάρια εθνικού επιπέδου με θέμα την απομόνωση
ιού της γρίπης σε κυτταρικές σειρές. Νοέμβριος 2008, Αθήνα.

- 2-εβδομάδων εκπαιδευτικό σεμινάριο με θέμα “Advanced molecular diagnosis and characterization of Influenza A H5N1 and H1N1”, Σεπτέμβριος 2009, Βιέννη, Αυστρία
- Εκπαιδευτικό σεμινάριο με θέμα «Epidemiological tools», Δεκέμβριος 2010, Βερολίνο, Γερμανία.

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- Χρηματικό βραβείο από το Ίδρυμα Θ.Μπουζαλά (1996)
- Υποτροφία για 1 έτος από την Ευρωπαϊκή Ένωση (European Student Funding, ESF, 2002-2003)

**ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ
ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

Εκπαίδευση προσωπικού εταιρειών τροφίμων περί Υγιεινής Τροφίμων
(Πρόγραμμα εκπαίδευσης του ΕΦΕΤ)