

La Sociedad Argentina de Virología agradece a la
*Agencia Nacional de Promoción Científica y
Tecnológica* por la ayuda económica otorgada.



XXXIII Reunión Científica Anual
Sociedad Argentina de Virología
División de la
Asociación Argentina de Microbiología

Centro de Docencia y Capacitación
Pediátrica "Dr Carlos Giannantonio" (SAP)

Jerónimo Salguero 1244
Buenos Aires, Argentina.

2 y 3 de diciembre de 2013

Comisión Directiva Sociedad Argentina de Virología

Presidente

María Victoria Preciado

Vicepresidente

Lucía Cavallaro

Secretario

Oscar Taboga

Secretaria de actas

Nora Lopez

Prosecretaria

Andrea Mangano

Tesorera

Ana Jar

Protesorera

Cecilia Galosi

Vocal Titular 1º

Victor Romanowski

Vocal Titular 2º

Daniela Gardiol

Vocal Titular 3º

Mauricio Carobene

Vocal Titular 4º

Marta Contigiani

Vocal Suplente 1º

Elsa Baumeister

Vocal Suplente 2º

Cybele García

Vocal Suplente 3º

Irene Álvarez

Vocal Suplente 4º

Silvana Levis

Vocal Suplente 5º

María Avila

Comisión Directiva Asociación Argentina de Microbiología

Presidente

Manuel Gómez Carrillo

Vicepresidente

Gustavo Giusiano

Secretaria

María Cecilia Freire

Secretaria de actas

María I. G. Fernández

Prosecretaria

Adriana Sucari

Tesorero

Manuel Boutureira

Protesorero

Paula Gagetti

Vocal Titular 1º

Jorge Santoianni

Vocal Titular 2º

María José Gallego

Vocal Titular 3º

Marta Rivas

Vocal Titular 4º

María Soledad Ramírez

Vocal Suplente 1º

Angel Cataldi

Vocal Suplente 2º

Susana Vázquez

Vocal Suplente 3º

Isabel Bogado

Vocal Suplente 4º

Juan Stupka

La **Comisión Directiva** de la Sociedad Argentina de Virología agradece la importante colaboración de los Jóvenes Virólogos, quienes han conformado la **Comisión Organizadora** de esta Reunión Científica.

Comisión Organizadora

María Pilar Adamo

Irene Álvarez

Ana Laura Cavatorta

Sandra Cordo

Marcelo Golemba

Viviana Ré

Carolina Torres

Pamela Valva

Maximiliano Wilda

Libro de Resúmenes
Comunicaciones Orales

PROGRAMA

Lunes 2 de diciembre

ACREDITACIÓN: 8.00 - 9.00 hs

Apertura de la Reunión: Sala A: 9.00 - 9.15 hs

SESIÓN 1

Sala A: 9.15 - 11.00 hs

1- Circulación del virus de la Parotiditis en Argentina. Análisis de un brote en tres grupos cerrados de población adulta

Bonaventura, R¹; Cisterna, DM¹; Martinez, L¹; Vizzotti, C²; Caparelli, M²; Freire, MC¹.

¹Servicio de Neurovirosis, INEI, ANLIS "C.G. Malbrán"; ²Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles, Ministerio de Salud de la Nación.

2- Análisis filogenético y filogeográfico del virus Dengue 1 genotipo V desde 1999 a 2010

Tittarelli, E^{1,2}; Lusso, SB¹; Mistchenko, AS^{1,3}; Barrero, PR^{1,2}.

¹Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez; ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); ³Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

3- Análisis filodinámico del Virus de Hepatitis B circulante en la provincia de Misiones, Argentina

Mojsiejczuk, LN¹; Piñeiro y Leone, FG¹; Torres, C¹; Flichman, DM¹; Liotta, DJ²; Campos, RH¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A.; ²Laboratorio de Biología Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. U.Na.M.

4- Caracterización molecular de las cepas de Rotavirus A circulantes en niños con diarrea aguda de la infancia del Sur de la Provincia de Buenos Aires período 2006-2008

Vega, CG¹; Rivero, M²; Parreño, V¹.

¹Lab. de Virus Gastroentéricos, Instituto de Virología, CICVyA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; ²Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

5- Adaptación de un inmunoensayo cualitativo para cuantificar antígeno p24 del VIH en sobrenadantes de cultivo viral

Icardi, G¹; Golemba, M¹; Suris, A²; Fernández, C²; Remesar, M²; Paradiso, P¹; Aulicino, P¹; Mangano, A¹; Sen, L¹.

¹Laboratorio "Biología Celular y Retrovirus" Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof Dr. Juan P. Garrahan"; ²Servicio de Hemoterapia Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof Dr. Juan P. Garrahan".

6- Desarrollo de un método de diagnóstico basado en qPCR para la detección y tipificación de virus del Dengue

Uran, LL¹; Mengual, GD²; Ghiringhelli, D¹; Bilén, M¹.

¹Universidad Nacional de Quilmes; ²Productos Bio-Lógicos SA.

7- Detección de Herpes simple 1 y 2 por PCR en Tiempo Real e identificación por *High Resolution Melting*

Estevez, MS¹; Di Gerónimo, V¹; Quintana, S^{1,2}.

¹Fares Taie Instituto de Análisis, Mar del Plata, Argentina; ²IAC Internacional, Mar del Plata, Argentina.

8- Utilización de la proteína VP7 recombinante del Virus de Lengua Azul en el desarrollo de un ELISA para la detección de anticuerpos

Gonzalez, F; Rodriguez, D; De Stefano, G; Legisa, D; Dus Santos, MJ.
Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar.

9- *Ophioviridae*: estudio de la expresión del genoma

Ocolotobiche, EE; García, ML.

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-La Plata CONICET, Fac. Cs. Exactas, U.N.L.P., La Plata, Argentina.

10- Identificación de un motivo PEST de degradación vía proteasoma en la proteína minoritaria de viroplasma P6 del Mal de Río Cuarto virus (*Fijivirus*, *Reoviridae*)

Llauger, G; de Haro, LA; del Vas, M.

Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA-Castelar, INTA – CONICET.

INTERVALO: 11.00 - 11.30 hs

SESIÓN 2

Sala A: 11.30 - 13.00 hs

11- Ensayos de q-PCR para la detección de actividad anti-adenoviral de azaesteroides sintéticos

Amado, M¹; Ramírez, JA²; Alché, LE¹; Barquero, AA¹.

¹Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica e IQUIBICEN (CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales), Universidad de Buenos Aires, Argentina; ²Departamento de Química Orgánica y UMYMFOR (CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales), Universidad de Buenos Aires, Argentina.

12- Actividad inactivante del disulfuro aromático NSC4492 contra el virus Junín

Sepúlveda, CS¹; García, CC¹; Levingston Macleod, JM²; López, N²; Damonte, EB¹.

¹Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA; ²Centro de Virología Animal, I.C.T. Dr. César Milstein, CONICET, Buenos Aires, Argentina.

13- Caracterización del mecanismo de acción de la euparina frente a poliovirus

Visintini Jaime, MF¹; Martino, VS²; Muschietti, LV²; Campos, RH¹; Cavallaro, LV¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina; ²Cátedra de Farmacognosia, Facultad Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina.

14- Virus de la diarrea viral bovina resistentes a tiosemicarbazonas con citopatogenia alterada en cultivo

Castro, EF; Campos, RH; Cavallaro, LV.

Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

15- Monitoreo masivo y caracterización de la actividad antiviral de nuevos derivados de β -carbolinas sintéticos

Gonzalez, MM^{1,2}; Baiker, A³; Erra-Balsells, R¹; Nitschko, H²; Cabrerizo, FM⁴; Vizoso-Pinto, MG^{2,5}.

¹CIHIDECAR-CONICET, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; ²Max von Pettenkofer Institute, Virology, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany; ³Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim, Germany; ⁴IIB-INTECH-UNSAM-CONICET, Chascomús, Buenos Aires, Argentina; ⁵INSIBIO-CONICET, Departamento Biomédico. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

16- Vigilancia de la susceptibilidad a los antivirales de Influenza en Argentina

Pontoriero, A; Russo, M; Benedetti, E; Avaro, M; Czech, A; Campos, A; Periolo, N; Savy, V; Baumeister, E.

Servicio Virosis Respiratorias, Departamento Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Carlos G. Malbrán".

17- Circulación del virus Influenza A en Argentina en el período post-pandemia

Benedetti, E; Pontoriero, A; Russo, M; Avaro, M; Czech, A; Periolo, N; Campos, A; Baumeister, E.

Servicio Virosis Respiratorias, Departamento Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS Malbrán.

18- Infecciones respiratorias agudas provocadas por influenza A y B en el año 2012 en la provincia de Corrientes. Comparación de dos métodos diagnósticos.

Ruiz Diaz, NE^{1,2}; Andino, GM^{1,2}; Gutnisky, VJ¹; Cóceres, M¹; Espinosa, J¹; Paniagua, A¹; Benegui, J¹.

¹Laboratorio de Central de Redes y Programas. Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Corrientes. ²Cátedra "Virología Clínica" Carrera de Bioquímica. FaCENA. UNNE.

INTERVALO ALMUERZO: 13.00 - 15.00 hs

SESIÓN 3

Sala A: 15.00 - 17.00 hs

19- Caracterización de la región Promotora del Core y la región preCore del virus de la Hepatitis B en pacientes en diferentes estadios infectados con los genotipos F1b y F4

González López Ledesma, MM¹; Soken, L¹; Rodrigo, B¹; Mojsiejczuk, L¹; Sevic, I¹; Mammana, L²; Fainboim, H²; Campos, R¹; Flichman, D¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. ²Hospital de Infecciosas F Muñiz.

20- Polimorfismos virales asociados a carcinoma hepatocelular en la infección por el virus de la Hepatitis C

Pérez, PS¹; Galdame, O²; Mullen, E²; Livellara, B²; Gadano, A²; Flichman D¹; Campos, RH¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ²Hospital Italiano Buenos Aires.

21- Mutaciones de los genes E6 y LCR del Virus Papiloma Humano 16; asociadas a carcinogénesis, detectadas en lesiones cervicales de bajo grado

Mosmann, JP; Frutos, MC; Monetti, MS; Kiguen, AX; Venezuela, RF; Cuffini, CG.

Laboratorio de Chlamydia y Virus Papiloma Humano- Instituto de Virología "Dr. J.M Vanella"- Facultad de Ciencias Médicas- Universidad Nacional de Córdoba.

22- Expresión de proteína E7 de HPV 16 en lesiones premalignas y malignas de cuello uterino

Guerra, F¹; Quintana, S²; Ramirez, N¹; Díaz, L³; Vighi, S³; Cardinal, L³; Prat Gay, G⁴; Camporreale, G⁴; Palaoro, L¹.

¹Hospital de Clínicas, Dpto de Bioquímica Clínica, UBA; ²Laboratorios Fares Taie; ³Hospital de Clínicas, Dpto de Patología; ⁴Instituto Leloir.

23- Análisis de la secuencia codificante completa del gen BNLF1, Proteína Latente de Membrana 1 (LMP1), del virus de Epstein Barr (EBV) en pacientes pediátricos con patología benigna y maligna asociada

Gantuz, M¹; Lorenzetti, M¹; Altcheh, J²; De Matteo, E³; Chabay, P¹; Preciado, MV¹.

¹Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; ²Servicio de Parasitología y Chagas, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; ³Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

24- Asociación y perfil de expresión de antígenos del virus de Epstein Barr (EBV) con el Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB): comparación entre poblaciones pediátrica y adulta

Cohen, M¹; Narbaitz, M²; Metrebian, F²; De Matteo, E³; Preciado, MV¹; Chabay, PA¹.

¹Laboratorio de Biología Molecular, División Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; ²División Patología, Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R. Castex, Academia Nacional de Medicina; ³División Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

25- *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 administrado por vía oral modula favorablemente la respuesta inmunológica al virus sincitial respiratorio en ratones infantes

Chiba, E¹; Vizoso-Pinto, MG²; Kitazawa, H¹; Alvarez, S³; Villena, J^{1,3}.

¹Grupo de Inmunología Nutricional, Universidad de Tohoku, Japón; ²Laboratorio de Biología de las Infecciones, INSIBIO-CONICET, Argentina; ³Laboratorio de Inmunobiotecnología, CERELA-CONICET, Argentina.

26- Ensayos pre-clínicos de anticuerpos recombinantes VHH para el tratamiento de la infección por Rotavirus Grupo A

Maffey, L^{1,2}; Vega, CG²; Garaicoechea, LL^{2,3}; Parreño, V^{2,3}.

¹ANPCyT; ²Instituto de Virología, CICVyA, INTA-Castelar; ³CONICET.

27- Nanoanticuerpos Monoclonales VHH con capacidad de bloquear la interacción HBGA - rVLPs de Norovirus Humano

Aguilar, A¹; Garaicoechea, L¹; Bok, K²; Green, K²; Parreño, V¹.

¹Instituto de virología CICVyA, INTA Castelar; ²Caliciviruses Section, LID-NIAID National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

28- Impacto de los baculovirus derivados de cuerpos de oclusión en la respuesta inmune murina

Molina, GN¹; Molinari, P^{1,2}; Taboga, O^{1,2}.

¹Inst. Biotecnología, INTA, Castelar, Argentina; ²CONICET, Argentina.

SESIÓN 4

Sala B: 15.00 - 17.00 hs

29- Epidemiología de la infección con el Virus de la Leucosis Bovina (BLV) en vaquillonas de un rodeo de tambo de alta prevalencia

Merlini, R; Martinez, C; Politzki, R; Alvarez, I; Trono, K; Gutierrez, G.

Instituto de Virología, CICVyA, INTA.

30- Evidencia de expresión viral en sangre entera de animales naturalmente infectados con el Virus

de la Leucosis Bovina

Alvarez, I^{1,2}; Rondelli, F³; Gutiérrez, G^{1,2}; Trono, K¹.

¹Instituto de Virología, INTA; ²CONICET; ³Universidad Nacional de Rosario.

31- Variabilidad genómica intra-rodeó para el Virus de la Fiebre Aftosa en la epidemia 2000-2002

Götte, MM^{1,3}; Cabanne, GS^{3,4}; Lago, E⁵; Perez, AM^{2,3}; König, GA^{1,3}.

¹Instituto de Biotecnología, INTA-Castelar; ²CECSA (Centro de Estudios Cuantitativos en Sanidad Animal), Universidad Nacional de Rosario; ³CONICET. Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas; ⁴Museo Nacional de Ciencias Naturales; ⁵SENASA. Secretaría Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

32- Circulación activa de los virus del complejo respiratorio bovino en la población de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) de nuestro país

Maidana, SS^{1,3}; Mozgovej, M¹; Ferella, A^{1,3}; Craig, MI^{1,3}; Malacari, D¹; Konrad, JL²; Crudeli, G²; Benitez, D⁴; Romera, SA^{1,3}.

Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, Argentina; ²Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina; ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Argentina; ⁴EEA Mercedes, Instituto de Tecnología Agropecuaria (INTA), Mercedes, Corrientes, Argentina.

33- Mantenimiento y evolución de la infección por picobirnavirus (PBV) durante la etapa adulta en un orangután *Pongo pygmaeus* y diversidad genética de las cepas virales excretada durante un período de tres años

Masachessi, G¹; Martinez, LC¹; Giordano, MO¹; Barril, PA¹; Isa, MB¹; Paván, JV¹; Nates, SV¹.

¹Instituto de Virología Dr. JM Vanella, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

34- Caracterización de un aislamiento local del virus de influenza aviar H1N1 (A/red-winged tinamou/Argentina/MP1/2008). Evaluación de su virulencia en aves de corral

Alvarez, P¹; Araya, P¹; Mattiolo, R²; La Torre, J¹; Mattion, N¹.

¹Centro de Virología Animal, Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein, CONICET, Argentina; ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

35- Estudios preliminares de proliferación y apoptosis en animales infectados con el virus de la leucosis bovina (BLV) con alta y baja carga proviral

Nieto Farías, MV^{1,2}; Lendez, P^{1,2}; Forletti, A^{1,2}; Gutiérrez, S^{1,2}; Ceriani, C^{1,2}; Dolcini, G^{1,2}.

¹Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)-CONICET; ²Laboratorio de Virología, FCV-UNCPBA, Tandil, Argentina.

36- Dinámica de la infección perinatal con BLV

Gutiérrez, G¹; Rondelli, F²; Merlini, R¹; Martinez, C¹; Politzki, R¹; Alvarez, I¹; Trono, K¹.

¹Instituto de Virología, CICVyA, INTA; ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

37- Detección de latencia del herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) en tonsilas y leucocitos de sangre periférica de bovinos

Favier, PA¹; Marin, MS (2,3); Morán, PE¹; Odeón, AC³; Verna, AE³; Pérez, SE^{1,4}.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina; ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina;

³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Argentina; ⁴Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)-CONICET. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina.

38- Estudio del papel de la región 2C en la virulencia de dos virus de la fiebre aftosa serotipo A

Cacciabue, M¹, García Nuñez, S², Taboga, O^{1,2}, Carrillo, E^{1,2}, Gismondi, MI¹.

¹CONICET; ²Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA.

INTERVALO: 17.00 - 17.30 hs

SESIÓN 5

Sala A: 17.30 - 19.00 hs

39- Caracterización de los genotipos del virus de la Hepatitis B en infecciones agudas

Rodrigo, B¹; Torres, C¹; Culasso, A¹; Galdame, O²; Marciano, S²; Gadano, A²; Campos, R¹; Flichman, D¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ²Hospital Italiano Buenos Aires.

40- Estudio de prevalencia de genotipos del virus papiloma humano (HPV) en Mar del Plata, incorporando como método de *screening* el análisis por *High Resolution Meting*

Quintana, S¹; Colace, G¹; Guerra, FR²; Di Gerónimo, V¹; Estevez, MS¹; Palaoro, L².

¹Laboratorio de Biología Molecular, Fares Taie Instituto de Análisis, Mar del Plata, Argentina;

²Laboratorio de Citología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

41- Asociación entre el virus de papiloma humano y agentes causantes de vaginosis bacteriana

Mendoza, LP¹; Mongelos P¹; Paez, M¹; Castro, A¹; Rodriguez-Riveros, I¹; Gimenez, G¹; Araujo, P¹; Echagüe, G¹; Diaz, V¹; Laspina, F¹; Castro, W¹; Jimenez, R¹; Marecos, R²; Ever, S²; Deluca, G³; Picconi, MA⁴.

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay;

²Hospital Regional de Villa Hayes, Ministerio de Salud Pública, Presidente Hayes, Paraguay; ³Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina; ⁴Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS "Dr. Malbrán", Buenos Aires, Argentina.

42- Estudio de infección por el virus Epstein Barr (EBV) en pacientes pediátricos portadores

Vistarop, A¹; Cohen, M¹; De Matteo, E²; Preciado, MV¹; Chabay, PA¹.

¹Laboratorio de Biología Molecular, División Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; ²División Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

43- Evaluación del tropismo del HIV-1 presente en provirus por métodos genotípicos en niños HIV(+) durante la primoinfección

Golemba, M; Aulicino, P; Mangano, A; Sen, L.

Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus del Hospital de Pediatría "JP Garrahan".

44- Cultivos organotípicos tipo *raft*: herramienta clave para el estudio de la biología de VPH y de los procesos neoplásicos asociados

Bugnon Valdano, MP¹; Cavatorta, AL¹; Marziali, F¹; Facciuto, F¹; Boccardo, E²; Gardiol, D¹.

¹Área Virología, IBR/CONICET, Fac. Cs. Bioq. y Farmacéuticas, UNR; ²Laboratorio de Oncovirología, ICB, Universidad de San Pablo.

45- El Virus Herpes Simplex Tipo 1 induce fragmentación del Aparato de Golgi Neuronal vía

activación de la quinasa Src

Martin, CE¹; Arancibia, YV¹; Hott, MV¹; Mardones, G²; Otth, C¹.

¹Instituto de Microbiología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile; ²Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Chile.

46- Efecto de la infección con HSV-1 sobre la distribución intracelular de nuevos derivados liposolubles de la fluoresceína

Dávola, ME^{1,2}; Amado, M¹; Alché, LE¹; Ramírez, JA²; Barquero AA¹.

¹Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica e IQUIBICEN (CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales), Universidad de Buenos Aires, Argentina; ²Departamento de Química Orgánica y UMYMFOR (CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales), Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Plenaria 1

Sala A: 19.15 - 20.00 hs

"Dengue en Colombia: un modelo para armar y nunca ..."

Dr. Juan Carlos Gallego-Gómez.

Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Brindis inaugural de la Reunión: Hall central: 20.00 hs

Martes 3 de diciembre

SESIÓN 6

Sala A: 9.00 - 11.00 hs

47- Influencia de la línea celular utilizada para la propagación del virus DENGUE tipo 2 sobre las etapas tempranas del ciclo de multiplicación viral

Piccini, LE¹; Acosta, EG²; Talarico, LB³; Castilla, V¹; Damonte, EB¹.

¹Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires - IQUIBICEN, CONICET; ²Departamento de Enfermedades Infecciosas, Virología Molecular, Universidad de Heidelberg, Alemania; ³Fundación INFANT, Buenos Aires, Argentina.

48- Mecanismos de entrada del virus Tacaribe en distintas líneas celulares

Roldán, J; Forlenza, MB; Candurra, NA.

Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN, FCEyN, UBA.

49- Entrada de JUNV a células murinas 3T3 que expresan establemente el receptor humano DC-SIGN

Forlenza, MB¹; Roldán, JS¹; Martínez, MG²; García, CC¹; Cordo, SM¹; Candurra, NA¹.

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, IQUIBICEN- CONICET, CABA, Argentina; ²Albert Einstein School of Medicine, Department of Cell Biology, New York, USA.

50- Factores de restricción viral en la infección con virus Junín

Peña Cárcamo, J; Morell, L; Cordo, S; García, C.

Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y

Naturales, Universidad de Buenos Aires- IQUIBICEN, CONICET.

51- Estudio de la síntesis de interferón y respuesta a dicha citoquina en células A549 persistentemente infectadas con virus Junín

Cuervo, E; Scolaro, LA.

Laboratorio de Virología, Dpto. de Química. Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

52- Importancia de las regiones no codificantes en la regulación de la traducción de los ARN mensajeros de arnavirus

Foscaldi, SA; D'Antuono, AL; López, NM.

Centro de Virología Animal (CEVAN)-Instituto de Ciencia y Tecnología "Dr. Cesar Milstein", CONICET.

53- Vehiculización del dominio CD4 de la proteína VP6 de rotavirus en un sistema de generación de VLPs impulsado por la proteína Z del virus Junín

De Ganzó, AF¹; Borio, CS¹; Bilen, MF²; Collado, MS¹; Goñi SE¹; Argüelles, MH³; Glikmann, G³; Lozano, ME¹.

¹Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular (LIGBCM), Área de Virosis Emergentes y Zoonóticas (AVEZ), Instituto de Microbiología Básica y Aplicada (IMBA), DtoCyT, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina; ²Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular (LIGBCM), Área de Virosis de Insectos (AVI), Instituto de Microbiología Básica y Aplicada (IMBA), DtoCyT, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina; ³Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV), Instituto de Microbiología Básica y Aplicada (IMBA), DtoCyT, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina.

54- Genética reversa aplicada a la generación y caracterización de un virus de Influenza A de perdiz

Paredes Rojas, Y¹; Caldevilla, C¹; Matiello, R²; Mattion, N¹; Ibañez, LI¹.

¹Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein, CONICET; ²Área de Medicina, Producción y Tecnología de Fauna Acuática y Terrestre. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

55- El Virus de la Bursitis Infecciosa Aviar utiliza la vía macropinocítica para su internalización celular

Delgui, LR^{1,2}; Giménez, MC³; Rodríguez, JF⁴; Colombo, MI¹.

¹IHEM, UNCuyo-CONICET, Mendoza, Argentina; ²ICB, UNCuyo, Mendoza, Argentina; ³UJAM, Mendoza, Argentina; ⁴CNB-CSIC, España.

56- Estudios funcionales y de localización de la proteína VP5 del Virus de la Bursitis Infecciosa en células de ave

Carballeda, JM^{1,2}; Maroniche, G^{1,3}; Chimenoz, SA^{1,2}; Lucero, MS^{1,2}; Gómez, E^{1,2}; Berinstein, A^{1,2}.

¹CONICET; ²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto de Biotecnología; ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola.

SESIÓN 7

Sala B: 9.00 - 11.00 hs

57- Importancia de la vigilancia ambiental en el monitoreo de virus transmitidos por agua: primera

detección de Hepatitis E en Argentina

Martínez Wassaf, M^{1,3}; Barril, P²; Elbarcha, O^{1,3}; Nates, S²; Ré, V^{1,2}.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba; ²Instituto de Virología "Dr. J.M.Vanella", Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba; ³Área de Virología y Biología Molecular, LACE Laboratorios.

58- Epidemiología molecular del virus Hepatitis E (HEV) en Uruguay

Mirazo, S¹; Ramos, N¹; D`Albora, C¹; Castro, G²; Mainardi, V³; Rocca, V³; Gerona, S³; Arbiza, J¹.

¹Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay; ²Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay; ³Servicio de Enfermedades Hepáticas, Hospital Central de las Fuerzas Armadas, Montevideo, Uruguay.

59- Monitoreo ambiental de virus entéricos e indicadores microbiológicos de contaminación en aguas residuales y recreacionales en la Ciudad de Barros Blancos, Uruguay

Gillman, L¹; Pereira, M²; Alberti, A¹; D`Alessandro, B²; Betancourt, G¹; Acuña, A³; Marinof, N⁴; Berois, M¹.

¹Sección Virología-Facultad de Ciencias, Udelar; ²Servicio de Evaluación de la Calidad y Control Ambiental, Intendencia de Montevideo; ³Departamento de Parasitología y Micología-Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Udelar; ⁴Centro Uruguayo de Tecnologías Apropriadadas (CEUTA).

60- Vigilancia ambiental de rotavirus grupo A en aguas residuales de Córdoba: inferencia del patrón estacional de circulación

Barril, PA^{1,2}; Prez, VE¹; Martínez, LC¹; Giordano, MO¹; Masachessi, G^{1,2}; Isa, MB¹; Gil, PI¹; Ré, VE^{1,2,3}; Pavan, JV¹; Nates, SV¹.

¹Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; ²CONICET; ³Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba.

61- Detección y caracterización de poliomavirus humanos en muestras de agua en Argentina

Torres, C¹; Blanco Fernández, MD¹; Cisterna, D²; Mbayed, V¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires - CONICET, Argentina; ²Servicio de Neurovirosis, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Argentina.

62- Comparación de secuencias virales y celulares obtenidas mediante Co-inmovilización en Membrana, Filtración Tangencial y Cultivo de Huéspedes Infectados

Manrique, JM; Jones, LR.

Laboratorio de Virología y Genética Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia "San Juan Bosco"; Trelew, Chubut, Argentina.

63- Avances en el desarrollo de un producto de huevo en polvo para la prevención de la diarrea neonatal del ternero causada por Rotavirus y Coronavirus

Bok, M¹; Galarza, R²; Frank, F³; Vena, MM; Vega, C^{1,4}; Wigdorovitz, A^{1,4}; Parreño, V¹.

¹Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar; ²EAA INTA Rafaela; ³AproAgro S.A.; ⁴Bioinnovo (primer empresa público privada formada entre investigadores de INTA y Vetanco S.A.

64- La administración intranasal del vector viral MVA-gDs induce a nivel local y sistémico una respuesta de anticuerpos anti-gD de BoHV-1

Esusy, MS¹; Zabal, O²; Calamante, G²; Del Medico Zajac, MP¹.

¹Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA; ²Instituto de Virología, CICVyA, INTA.

65- Rol de la inmunidad de mucosas en ratones BALB/c inmunizados por vía intranasal con la glicoproteína D (gD) recombinante de herpesvirus equino-1 (EHV-1)

Fuentealba, NA^{1,4}; Zanuzzi, CN^{2,3,4}; Scrochi, MR^{1,2,4}; Bravi, ME^{1,6}; Sguazza, GH¹; Gimeno, EJ^{3,4}; Galosi, CM^{1,5}.

¹Cátedra de Virología; ²Cátedra de Histología y Embriología; ³Cátedra de Patología General/Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires; ⁴CCT- CONICET; ⁵Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires; ⁶Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

66- Evaluación de estrategias de vacunación antirrábica en Camélidos Sudamericanos

Ledesma, M¹; Errico, D¹; Micucci, M²; Pérez, O²; Calamante, G³; Zanetti, F³; Leoni, J¹; Ferrari, A¹.

¹Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU Conicet-UBA), Cátedra de Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica; ²Servicio Vacuna Antirrábica del ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"; ³Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA Castelar.

INTERVALO: 11.00 - 11.30 hs

SESIÓN 8

Sala A: 11.30 - 13.00 hs

67- Detección de virus Bunyamwera en equinos con síndrome neurológicos en la provincia de Santa Fe, Argentina

Tauro, LA¹; Lucca, E²; Marino, B³; Rivarola, ME¹; Albrieu Llinas, G¹; Mazzini, R⁴; Contigiani, MS¹.

¹Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología "Dr. J.M. Vanella" FCM-UNC; ²Cátedra de Enfermedades Infecciosas FCV-UNL; ³Cátedra de Microbiología FCV-UNL; ⁴Cátedra de Practicas Hospitalarias de Grandes Animales.

68- Identificación molecular de virus ORF en lesiones vesiculares de cuatro ovinos de la Provincia de Río Negro

Peralta, A¹; Calamante, G²; Robles, C³; Konig, G².

¹CONICET; ²Instituto de Biotecnología, INTA-Castelar; ³EEA-INTA Bariloche.

69- Detección de anticuerpos contra Maedi Visna Virus en ovinos en la región Puna (Jujuy - Argentina)

Echazú, F¹; Porta, N²; Pinto, G²; Vega, C²; Abalos, M¹; Acuña, F¹.

¹EEA INTA Abra Pampa; ²Lab Ref EETs CICVyA INTA Castelar.

70- Virus porcinos emergentes en Uruguay

Ramos, N¹; Cancela, F¹; Mirazo, S¹; Castro, G²; Arbiza, J¹.

¹Sección Virología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay; ²División Sanidad Animal. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Montevideo, Uruguay.

71- Detección del Virus de alas deformadas (DWV) en polinizadores no convencionales

Reynaldi, FJ^{1,3}; Lucia, M²; Sguazza, GH¹; Galosi, CM^{1,4}; Pecoraro, MR¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; ²División Entomología, Museo de La Plata, Universidad Nacional de La Plata, CONICET; ³CCT- CONICET; ⁴Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires.

72- Diseño y expresión de antígenos recombinantes para uso preventivo de infecciones con el virus

de influenza equina

Caldevilla, C¹; Paredes Rojas, Y¹; Ousset, J²; Ibañez, I¹; Mattion, N¹.

¹ICT César Milstein-CONICET; ²Gen-Med S.A.

73- Expresión de la proteína VP2 del Virus de la Lengua Azul para el desarrollo de una vacuna a subunidad

Legisa, D¹; Gonzalez, F¹; Rodriguez, D¹; Ruiz, V^{1,2}; Mozgovej, M^{1,2}; Dus Santos, MJ^{1,2}.

¹Instituto de Virología, INTA; ²CONICET.

74- Generación de la proteína recombinante NS1-HT de los virus encefalitis de *Saint Louis* y *West Nile* en un sistema bacteriano

Lorch, MS¹; Stephan, BI¹; Pubul Martín, PE¹; Lozano, ME¹; Contigiani, MS²; Spinsanti, LI²; Goñi, SE¹.

¹Instituto de Microbiología Básica y Aplicada (IMBA), Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular (LIGBCM), Área de Virosis Emergentes y Zoonóticas (AVEZ), DtoCyT, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina; ²Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología "Dr. Carlos Vanella" (InViV), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

SESIÓN 9

Sala B: 11.30 - 13.00 hs

75- Efecto de la temperatura en la exposición de secuencias blanco de microRNAs (miRNA) descriptos para HIV-1

Cevallos, CG¹; Poli, EE¹; Fernandez Larrosa, N²; Rabinovich, RD¹.

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA; ²Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari.

76- Estudio de la relación funcional entre los dominios cápside de las proteínas Gag de los virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) y de felinos (FIV) utilizando virus quiméricos

Esteva, MJ; Affranchino, JL; González, SA.

Laboratorio de Virología, CONICET- Universidad de Belgrano, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

77- Identificación de los elementos estructurales en la poliproteína Gag del virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV) involucrados en las interacciones homotípicas que conducen al ensamblado viral

Abdusetir Cerfoglio, JC; González, SA; Affranchino, JL.

Laboratorio de Virología, CONICET-Universidad de Belgrano, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

78- Tráfico intracelular de los baculovirus en la infección de células dendríticas murinas

Molinari, P¹; Cebrián, C²; Mayorga, LS²; Morón, GV³; Taboga, O¹.

¹Instituto de Biotecnología, CNIA, INTA Castelar, CC25 (1712), Buenos Aires, Argentina; ²Instituto de Histología y Embriología Mendoza (IHEM)-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.Cuyo, Mendoza, Argentina; ³CIBICI-CONICET, Fac. Cs. Químicas, Univ. Nac. de Córdoba, Córdoba, Argentina.

79- Potencial replicativo total y distribución genómica entre viriones brotados y viriones ocluidos durante la replicación de baculovirus en cultivos de células de insectos

Eberhardt, I^{1,2}; Amable, GF^{1,2}; Micheloud, GA^{1,2}; Gioria, VV^{1,2}; Claus, JD^{1,2}.

¹Laboratorio de Virología, Facultad de Bioquímica y Ciencia Biológica, UNL; ²Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, UNL-CONICET.

80- La región variable del 3'UTR del virus modula de manera diferencial la replicación del virus del Dengue en células de mosquito y mamífero

Sergio Villordo¹, Claudia Filomatori¹, Andrea Gamarnik¹

¹Fundación Instituto Leloir.

81- Evaluación de la respuesta inmune en pollos infectados con el virus de la bronquitis infecciosa. Relevancia del estado inmunitario previo a la infección

Chimeno Zoth, S^{1,3}; Craig, MI²; Carballeda, JM^{1,3}; Gravisaco, MJ¹; Vagnozzi, A²; Berinstein, A^{1,3}.

¹Instituto de Biotecnología, INTA; ²Instituto de Virología, INTA; ³CONICET.

82- Obtención de líneas celulares transgénicas para el estudio genético y la manipulación de baculovirus

Haase, S¹; López, MG²; Pidre, ML¹; Ferrelli, ML¹; Sciocco-Cap, AI³; Taboga, O²; Romanowski, V¹.

¹Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata; ²Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA; ³Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, CICVyA, INTA.

INTERVALO ALMUERZO: 13.00 - 15.00 hs

Sala A: 15.00 - 15.15 hs

Presentación AUGM (Asociación de Universidades Grupo Montevideo)

SESIÓN 10

Sala A: 15.15 - 17.00 hs

83- Primer mapa intraviral de las interacciones proteína-proteína del virus de la hepatitis E

Osterman, A¹; Stellberger, T¹; Baiker, A¹; Nitschko, H¹; Vizoso-Pinto, MG^{1,2}.

¹Max-von-Pettenkofer Institut der LMU, Munich, Alemania; ²Laboratorio de Biología de las Infecciones, CCT-INSIBIO, Fac. de Medicina, UNT, Tucumán, Argentina.

84- Participación de la vía Raf/MEK/ERK en la multiplicación del virus Junín

Brunetti, JE; Rodríguez, ME; Scolaro, LA; Castilla, V.

Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

85- Modulación de la vía Raf/MEK/ERK durante la persistencia del virus Junín en células Vero

Rodríguez, ME; Brunetti, JE; Scolaro, LA; Castilla, V.

Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

86- La infección persistente de células Vero con virus Junín no depende de la vía PI3K/Akt

Linero, FN; Cuervo, E; Fernández Bell-Fano, PM; Castilla, V; Scolaro, LA.

Laboratorio de Virología, Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

87- Evaluación de la modulación del Herpesvirus equino 1 en la muerte por apoptosis sobre cultivos celulares

Scrochi, MR^{1,2,4}; Zanuzzi, CN^{2,4}; Fuentealba, NA^{1,4}; Bravi, ME^{1,7}; Gimeno, EJ^{3,4}; Barbeito, CG^{2,3,4}; Portiansky, EL^{3,4}; Muglia, CI^{4,5}; Galosi, CM^{1,6}.

¹Cátedra de Virología; ²Histología y Embriología; ³Patología General/Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; ⁴CONICET; ⁵Laboratorio de investigaciones del sistema inmune (LISIN), Facultad Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata; ⁶Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires; ⁷FONCYT.

88- Análisis del efecto antiapoptótico del LR de BoHV-5 y su comparación con BoHV-1

Silvestro, C; Bratanich, A.

Catedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

89- Implementación de una plataforma para la obtención de virus fowlpox recombinantes

Federico, CR^{1,2}; Zanetti, FA^{1,2}; Calamante, G².

¹CONICET; ²Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA.

90- Construcción de vectores de transferencia para la obtención de poxvirus recombinantes que expresan antígenos del virus respiratorio sincicial bovino

Ferella, A¹; Del Médico Zajac, MP²; Dus Santos, MJ¹; Mozgoj, M¹; Calamante, G².

¹Inst. de Virología-CICVyA-INTA Castelar; ²Inst. de Biotecnología-CICVyA-INTA-Castelar.

91- Obtención de virus MVA recombinantes que expresan la glicoproteína del virus rábico

Garanzini, D^{1,2}; Pérez, O³; Calamante, G².

¹MINCYT-ANLIS; ²Instituto de Biotecnología-CICVyA-INTA; ³Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB)-ANLIS-Malbrán.

92- Cuerpos de oclusión de baculovirus como estructuras transportadoras de proteínas de interés

López, MG¹; Alfonso, V^{1,2}; Taboga, O^{1,2}.

¹Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar; ²CONICET.

INTERVALO: 17.00 - 17.30 hs

Plenaria 2

Sala A: 17.30 – 18.15 hs

“Herramientas tecnológicas para el estudio de genomas virales”

Dra. Andrea Puebla

Unidad de Genómica, Instituto de Biotecnología, CIVCyA, INTA, Argentina.

Cierre de la Reunión: Sala A: 18.15 – 18.30 hs.

RESÚMENES

SESIÓN 1

Lunes 2/12 - Sala A: 9.15 - 11.00 hs

1- Circulación del virus de la Parotiditis en Argentina. Análisis de un brote en tres grupos cerrados de población adulta

Bonaventura, R¹; Cisterna, DM¹; Martinez, L¹; Vizzotti, C²; Caparelli, M²; Freire, MC¹.

¹Servicio de Neurovirosis, INEI, ANLIS "C.G. Malbrán";

²Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles, Ministerio de Salud de la Nación.

La parotiditis es una enfermedad caracterizada por la tumefacción de las glándulas salivales especialmente las parótidas. El espectro de la enfermedad varía desde una infección subclínica a meningoencefalitis, sordera y orquitis, la severidad aumenta con la edad. Puede ser producida por enterovirus, EBV, virus para influenza y ADV, pero el agente causal más frecuente es el virus de la fiebre urliana. Éste es un virus ARN, envuelto, de polaridad negativa que pertenece a la Flia. *Paramixoviridae*, subfamilia *Paramixorivinae*. Es una enfermedad prevenible mediante el uso de la vacuna triple viral que está incluida en el Calendario Nacional de Inmunizaciones desde 1998. Por otra parte, están descriptos 13 genotipos denominados de A-N. Éstos se definen sobre la base del gen que codifica la proteína hidrófoba pequeña (SH) que es la más variable. En nuestro país, se desconoce los genotipos circulantes en la actualidad. El objetivo de este estudio fue caracterizar un brote de parotiditis ocurrido entre los meses de agosto y noviembre de 2012 en escuelas de aspirantes de Gendarmería y Prefectura localizadas en las provincias de San Juan y Buenos Aires (Ezeiza y Zárate). La mayoría de los casos ocurrió en adultos jóvenes notificándose casos de mayor severidad en muchos de ellos. Se recibieron muestras de saliva, suero y orina de 71 casos. Las mismas fueron estudiadas por serología IgM e IgG y por RT-nested-PCR utilizando cebadores dirigidos a una región del gen que codifica para la proteína SH. Para su tipificación se realizó la secuenciación nucleotídica del fragmento amplificado (205 pb). Se obtuvieron resultados positivos según el lugar de procedencia:

-Ezeiza (n=26): IgG 22, IgM 18, PCR saliva 16,

PCR orina 9, tipificados 15.

-San Juan (n=23): IgG 14, IgM 10, PCR saliva 18, PCR orina 7, tipificados 18.

-Zárate (n=22): IgG 15, IgM 15, PCR saliva 20, PCR orina 6 (n=16), tipificados 20.

El análisis de la secuenciación nucleotídica reveló que 48/53 (90,5%) secuencias pertenecían al genotipo K y 5/53 (9,5 %) fueron compatibles con la cepa vacunal Urabe. La mayor homología observada con secuencias previas fue del 97,5-98,5% con una cepa viral descripta en 2007 en Brasil, todas agruparon en el genotipo K.

Se hallaron 5 casos asociados a vacuna en individuos que habían sido vacunados recientemente. Estos resultados aportan información acerca de uno de los genotipos salvajes del virus de parotiditis circulante en la actualidad en nuestro país. Debido a que esta circulación viral ocurrió en poblaciones adultas cerradas no vacunadas se podría plantear la estrategia de vacunación al ingreso a la fuerza. A pesar de que se vacuna masivamente con la triple viral por la eliminación del sarampión y la rubeola no se ha podido eliminar la circulación del virus salvaje de fiebre urliana. Sería importante incorporar a la vigilancia clínica de las parotiditis la vigilancia laboratorial para determinar cuántos de los casos detectados de parotiditis son causados por este virus.

2- Análisis filogenético y filogeográfico del virus Dengue 1 genotipo V desde 1999 a 2010

Tittarelli, E^{1,2}; Lusso, SB¹; Mistchenko, AS^{1,3}; Barrero, PR^{1,2}.

¹Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez; ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); ³Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

El virus del dengue (DV), pertenece a la familia *Flaviviridae* (RNAs+) y se clasifica en cuatro serotipos (DV1-4) que presentan variantes genotípicas. Aproximadamente 390 millones de personas se infectan anualmente por este virus, siendo más de 2500 millones las que se encuentran en riesgo de infección. Actualmente, más de 100 países han reportado transmisión endémica, convirtiéndose en un serio problema para el sistema de salud.

La mayoría de los países limítrofes con Argentina han reportado casos de dengue con co-circulación de más de un serotipo. En Argentina, el DV resurgió en 1997. Algunas provincias han reportado casos autóctonos, pero la mayoría de los casos provienen de países limítrofes, enfatizando el rol del turismo, inmigración y el comercio en la epidemiología del dengue.

En la Ciudad de Buenos Aires el mayor número de casos confirmados de dengue fueron reportados en el año 2009, correspondiéndose a DV-1. En este trabajo, se realizará un análisis filogenético y filogeográfico del DV-1 evaluando su dispersión global y local desde 1999 al 2010.

Se secuenciaron 27 genomas completos de DV-1 de muestras remitidas a nuestro laboratorio en los brotes 1999-2000, 2009 y 2010. Para realizar el análisis se incorporaron a dicho *dataset* secuencias completas disponibles de DV-1 locales y de otros países. Se obtuvieron inferencias filogenéticas mediante distintos métodos: distancia, parsimonia, máxima verosimilitud y métodos bayesianos. Se evaluó el modelo evolutivo apropiado mediante jModelTest. El análisis filogeográfico se realizó mediante el paquete BEAST y los archivos de visualización en Google Earth® se generaron con Spread.

Filogenéticamente, detectamos que todas las muestras analizadas en nuestro laboratorio corresponden al genotipo V del DV-1. A partir del análisis filogeográfico discreto global del genotipo se ha podido datar al ancestro común más reciente en 1935 (HPD 95%: 1916-1951), localizado en Tailandia con una probabilidad de 0.15. Evaluando la reconstrucción demográfica, el tamaño poblacional resultó constante desde el origen, salvo en 1998 y 2007 donde se producen dos descensos, siendo el último más pronunciado probablemente relacionado con el brote de DV-3 de dicho año. La tasa de evolución fue $5.08E-4$ sustituciones/sitio/año (HPD 95%: $4.05E-4$; $6.06E-4$), estos valores coinciden con tasas detectadas por otros autores. De acuerdo a las secuencias analizadas, se puede inferir que las secuencias de nuestro laboratorio del brote 1999-2000 tendrían ancestros comunes provenientes de Paraguay y Brasil. Las secuencias de los brotes 2009 y 2010, presentarían ancestros de Venezuela, Colombia y Brasil.

Sería beneficioso evaluar, mediante modelos continuos, la dispersión del virus en aéreas más restringidas y conocer así como ha sido la dinámica de la población en localidades de interés. Estos datos contribuirían al equipo de salud para que junto con datos epidemiológicos, se logre elucidar la dinámica local de este patógeno.

3- Análisis filodinámico del Virus de Hepatitis B circulante en la provincia de Misiones, Argentina

Mojsiejczuk, LN¹; Piñeiro y Leone, FG¹; Torres, C¹; Flichman, DM¹; Liotta, DJ²; Campos, RH¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A.; ²Laboratorio de Biología Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. U.Na.M.

El virus de la hepatitis B (HBV) se clasifica en ocho genotipos (A-H) y varios subgenotipos que presentan una distribución geográfica característica y se asocian a un origen étnico particular. Estudios previos realizados en la provincia de Misiones evidenciaron una predominancia del genotipo D (58%) de origen europeo frente a los otros genotipos circulantes: F (americano) y A (africano). El objetivo de esta presentación es reconstruir la historia epidemiológica (origen y diversificación) de los genotipos/subgenotipos del HBV que circulan en la provincia de Misiones. Se analizaron 28 secuencias de genomas completos correspondientes a los subgenotipos D2 (n=4), D3 (n=17), F1b (n=3) y F4 (n=4) obtenidas a partir de muestras de plasma de hemodonantes. Para cada subgenotipo se construyó un set de datos compuesto por aislamientos de Misiones y secuencias obtenidas de GenBank. Se realizaron análisis de coalescencia y de reconstrucción demográfica según los modelos de reloj molecular log normal no-correlacionado y de coalescencia *Bayesian Skyline Plot* implementados en el programa BEAST (v1.7.5). La incertidumbre en los parámetros estimados fue evaluada con el intervalo del HPD95%. El análisis de las secuencias del subgenotipo D3 mostró evidencias de al menos dos eventos de introducción en la provincia. Estos linajes, que se agruparon con secuencias del oeste y sur de Europa, presentaron ancestros comunes en los

años 1939 y 1953 y una diversificación temprana entre los años 1940 y 1970. Las secuencias del subgenotipo D2 presentaron un ancestro común en 1970 y un aumento de la diversidad viral desde esa fecha hasta fines de los '80s. Estas secuencias se agruparon con aislamientos provenientes Europa Central y del Este. En cambio, los subgenotipos de origen americano presentan un comportamiento diferente. Los 3 aislamientos del subgenotipo F1b formaron un grupo monofilético, con un ancestro común en 2007 y diversificación posterior. Las secuencias del subgenotipo F4 se intercalaron en el árbol con las provenientes de otras regiones de América, lo que imposibilitó la reconstrucción del proceso de diversificación en la provincia. El mayor número de introducciones observadas para el F4 podría ser consecuencia de la cercanía geográfica de la provincia de Misiones con regiones de alta prevalencia de este subgenotipo, como Bolivia y el norte de Argentina. En conclusión, los diferentes subgenotipos de HBV que circulan en la provincia de Misiones presentan una dinámica poblacional característica, con un origen y diversificación en diferentes momentos históricos. La presencia de los subgenotipos D2 y D3 está relacionada con la inmigración europea producida desde inicios del siglo XX, mientras que la circulación de los subgenotipos F1b y F4 se puede asociar con un crecimiento de la población humana, su concentración en áreas urbanas y una mayor interacción con las poblaciones vecinas en las que estos subgenotipos son altamente prevalentes.

4- Caracterización molecular de las cepas de Rotavirus A circulantes en niños con diarrea aguda de la infancia del Sur de la Provincia de Buenos Aires período 2006-2008

Vega, CG¹; Rivero, M²; Parreño, V¹.

¹Lab. de Virus Gastroentéricos, Instituto de Virología, CICVyA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; ²Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

La diarrea aguda es la 2ª causa de muerte en niños de menos de 5 años causando 1.3 millones de muertes al año a nivel mundial. Rotavirus

grupo A (RVA) es la principal causa de diarrea severa y es responsable de un 29% del total de muertes en el mundo cada año. En la Argentina, se reportan anualmente 120000 casos de diarrea, 20000 hospitalizaciones y 150 muertes asociadas a RVA en niños menores de 5 años. Las vacunas contra RVA ya están disponibles, lo que enfatiza la importancia de conocer la epidemiología de las cepas circulantes. Se han descrito 27 G-tipos y 35 P-tipos de RVA basados en las proteínas de la cápside externa viral, VP7 (G-tipo) y VP4 (P-tipo). Los G-tipos G1 al G4 y G9 combinados con P[4], P[6] y P[8] son los más comúnmente encontrados. La prevalencia de los distintos tipos de RVA puede variar anualmente en las mismas regiones. La vía de transmisión es fecal-oral y muestra una mayor prevalencia durante los meses más fríos, con un pico de detección entre abril y mayo. Las manifestaciones clínicas típicas son fiebre, vómitos y diarrea sin sangre. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de RVA en niños de 2 a 72 meses de edad con diarrea aguda de la infancia y describir la epidemiología de la infección en la zona del sur de la Pcia. de Buenos Aires. En particular, este estudio se centró en la búsqueda de cepas atípicas que pudieran indicar un salto de especie de animales a humanos, especialmente de origen bovino o porcino. Se incluyeron 210 pacientes con diagnóstico de diarrea aguda atendidos en Instituciones de salud de Tandil, Bahía Blanca y El Palomar. Se utilizó la técnica de ELISA para la detección de RVA y RT-PCR para su caracterización molecular. Diez muestras (4,75%) resultaron positivas, correspondiendo 60% al genotipo G9P[8] (julio 2006-julio 2007), 20% al G2P[4] (sin fecha), 10% al G1P[8] (junio 2008) y 10% al G12P[9] (marzo 2008). El promedio de edad fue 27,8 meses (DE 26,9) y el 82% de los casos de produjo en meses fríos. El 88% presentó dolor abdominal, 67% vómitos, 43% fiebre, 33% decaimiento y 25% edema. La diarrea fue acuosa (86%) y mucosa (14%). La alta incidencia de G9P[8] y de G2P[4] coincide con lo reportado por el Programa de Vigilancia de Rotavirus para 2006-2007. Se detectó la circulación de RVA G12P[9] en marzo de 2008, genotipo ya reportado en Argentina. Algunos autores sugieren que su incidencia es mayor en niños de zonas rurales y durante los meses

estivales. La profundización de la caracterización molecular de los RVA encontrados es fundamental determinar su origen, monitoreando los posibles saltos de especie y aparición de nuevas cepas virales no contenidas en las vacunas disponibles.

5- Adaptación de un inmunoensayo cualitativo para cuantificar antígeno p24 del VIH en sobrenadantes de cultivo viral

Icardi, G¹; Golemba, M¹; Suris, A²; Fernández, C²; Remesar, M²; Paradiso, P¹; Aulicino, P¹; Mangano, A¹; Sen, L¹.

¹Laboratorio "Biología Celular y Retrovirus" Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof Dr. Juan P. Garrahan";

²Servicio de Hemoterapia Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof Dr. Juan P. Garrahan".

El surgimiento de inmunoensayos de cuarta generación para diagnosticar la infección por VIH que detectan simultáneamente antígeno (Ag) p24 del VIH y anticuerpos anti VIH, sumado a la discontinuidad local de los test cuantitativos exclusivos para Ag p24 del VIH, nos obligo a buscar una alternativa para poder cuantificar el virus en sobrenadantes (Sn) de cultivo celular. Para ello se evaluó la utilidad del sistema Architect HIV Ag/Ab Combo[®] (Abbott), inmunoensayo de 4^º generación, que originalmente está destinado para la detección cualitativa de la infección en muestras de plasma.

A fin de confirmar la ausencia de inmunoglobulinas en los Sn que provienen de los linfocitos estimulado con fitohemaglutinina se dosaron mediante una técnica de inmunofijación y tinción las IgA, IgG, IgM y las cadenas livianas lambda y kappa demostrando la ausencia de los mismos. Esto nos permitió utilizar el sistema para detectar únicamente el Ag p24 en los Sn de cultivo.

Con el objetivo de cuantificar el Ag p24 en nuestros Sn y frente a la ausencia de un estándar cuantificado para utilizar como referencia, se realizaron diluciones seriadas al medio a partir de un Sn previamente medido con el kit Vironostika[®] HIV-1 antigen (Biomerieux, inmunoensayo tipo sándwich cuantitativo discontinuado) que utiliza una curva de calibración estandarizada. La curva patrón realizada a partir del Sn, tiene un rango de 62,5

a 1000 pg/ml. A fin de determinar el límite de detección se continuó con las diluciones al medio hasta llegar a 1,95 pg/ml.

Las diluciones fueron medidas con el sistema Architect y se obtuvo una correlación positiva ($R^2= 0.997$). El ensayo se repitió 4 veces en días independientes obteniéndose resultados similares. El Coeficiente de Variación inter e intra-ensayo fue de 2,28 y 3,99 %, respectivamente y el límite de detección fue de 7,8 pg/ml.

En conclusión el trabajo demostró por primera vez la utilidad del sistema Architect HIV Ag/Ab Combo[®] para cuantificar el Ag p24 del VIH en Sn de cultivo, esencial para realizar múltiples ensayos in-vitro para la caracterización fenotípica del VIH.

6- Desarrollo de un método de diagnóstico basado en qPCR para la detección y tipificación de virus del Dengue

Uran, LL¹; Mengual, GD²; Ghiringhelli, D¹; Bilén, M¹.

¹Universidad Nacional de Quilmes; ²Productos Biológicos SA.

Introducción:

La fiebre del Dengue (DF) es una enfermedad endémica en Sudamérica. Durante este año, se han confirmado 1.101.290 casos en la región, de severidad variada, y se ha declarado al 2013 como un año epidémico según la Org. Panamericana de la Salud.

El agente etiológico de la DF es un virus de la familia *Flaviviridae* con genoma de ARN (+) conocido como Virus del Dengue (DENV), que presenta 4 serotipos distintos.

En Argentina, las metodologías de diagnóstico más utilizadas se basan en ensayos serológicos, cultivo celular en células C6/36, o análisis molecular mediante qPCR. El empleo de metodologías de qPCR para la detección de DENV, tiene una aplicación limitada en los centros de salud de nuestro país debido a los altos costos de los reactivos y equipos (todos elementos importados).

Este trabajo presenta el desarrollo de una metodología de detección basada en qPCR, empleando reactivos producidos y optimizados por una empresa biotecnológica argentina.

Objetivo:

Desarrollo de un sistema de detección serotipo específico para DENV, empleando un sistema de qPCR optimizado para alcanzar altos niveles de especificidad y la sensibilidad.

Desarrollo de una *master mix* de qPCR optimizada para la detección de DENV.

Metodología:

A partir de un análisis bioinformático de 360 secuencias se detectaron potenciales regiones para el diseño de *primers* consenso, *primers* serotipo-específicos y sondas. Se generaron clones de cDNA conteniendo los fragmentos genómicos (700 pb) de las regiones blanco encontradas. Utilizando estos clones como molde se realizaron reacciones de *end point*-PCR y qPCR para evaluar la sensibilidad, especificidad y estabilidad del sistema. Para ello se analizaron diferentes parámetros de la reacción tales como concentración de *primers*, concentración de Mg+2, *enhancers*, estabilizantes, enzima y temperatura de hibridación, entre otros.

Resultados:

En la región 3' UTR del virus se identificaron varias secuencias blanco específicas de serotipo o genéricas del virus de Dengue, que dieron lugar a la síntesis de distintos *primers* y sondas. Los ensayos de especificidad de los distintos oligonucleótidos diseñados en PCR de tiempo final y qPCR, mostraron un 100% de especificidad respecto a su serotipo. Los ensayos de sensibilidad en qPCR demostraron una capacidad de detección del orden de los 5-500 femtog de molde, equivalentes a 100-10000 moléculas de plásmido. Las pruebas de estabilidad y condiciones de almacenamiento, permitieron verificar que la *master mix* desarrollada conserva sus propiedades hasta 6 meses conservada a -20°C y hasta 20 ciclos de descongelamiento.

Conclusiones:

Se ha desarrollado un sistema de qPCR sensible y específico para la detección del virus del Dengue con potencial uso en muestras clínicas y/o vectores.

Se ha desarrollado una *master mix* nacional de qPCR mediante el trabajo conjunto Universidad/Empresa, abriendo las puertas a nuevos desarrollos y a la sustitución de importaciones.

7- Detección de Herpes simple 1 y 2 por PCR en

Tiempo Real e identificación por *High Resolution Melting*

Estevez, MS¹; Di Gerónimo, V¹; Quintana, S^{1,2}.

¹Fares Taie Instituto de Análisis, Mar del Plata, Argentina; ²IAC Internacional, Mar del Plata, Argentina.

Los Herpes simple 1 y 2 (HSV1 y HSV2) son patógenos virales de distribución mundial que pertenecen a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *alfaherpesviridae*, responsables de lesiones mucocutáneas que pueden progresar a infecciones sistémicas

El HSV1 puede generar cuadros severos y mortales como es el caso de la encefalitis herpética o de la meningitis aséptica. El HSV2 puede producir los mismos cuadros del HSV1 siendo muy severos en el recién nacido, al contraer la infección por contacto con lesiones activas en el canal de parto.

El diagnóstico de las encefalitis y meningitis virales deben ser realizadas por técnicas de detección de ADN ya que los métodos serológicos no son adecuados. Las técnicas de PCR en Tiempo Real permiten obtener resultados de alta sensibilidad y especificidad en pocas horas. La técnica de *High Resolution Melting* (HRM) es un nuevo método de análisis que permite caracterizar productos de PCR en base a la longitud de la secuencia, el contenido de GC y la complementariedad de secuencia de ADN. El análisis por HRM se puede utilizar para determinar genotipos y especies de diferentes virus y bacterias.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método *in house* para la determinación de ambos tipos virales, utilizando PCR en Tiempo Real para la detección y la técnica de HRM para su diferenciación.

Se seleccionaron tres pares de *primers* genéricos para Herpes simple los cuales amplifican fragmentos de diferente tamaño a partir de ADN viral (290 pb, 146 pb, 124 pb). Una vez seleccionados y sintetizados los *primers* se realizó la puesta a punto de la amplificación con los controles positivos de HSV1 y HSV2. En cada caso se buscó obtener las mejores condiciones de amplificación que no produzcan falsos positivos ni falsos negativos. Se seleccionaron los *primers* que amplifican el fragmento de 124 pb dado que presentaron las mejores

características de amplificación. Se realizaron pruebas de sensibilidad para ambos tipos de Herpes simple y de especificidad con otros virus de la familia *Herpesviridae*. Se calculó la eficiencia de reacción para ambos tipos de Herpes siendo de 93 % y de 94% para HSV1 y HSV2, respectivamente. Para diferenciar HSV1 de HSV2 se utilizó la técnica de HRM. HSV1 y HSV2 presentaron diferencias en las curvas de disociación evidenciadas por esta técnica, permitiendo de este modo la diferenciación entre ambos virus.

Se logró desarrollar una técnica de PCR en Tiempo Real para la detección de Herpes simple 1 y 2. La posterior aplicación de la técnica de HRM permitió diferenciar entre ambos tipos virales, logrando de este modo un método sensible y rápido para ser utilizado en la práctica clínica.

8- Utilización de la proteína VP7 recombinante del Virus de Lengua Azul en el desarrollo de un ELISA para la detección de anticuerpos

Gonzalez, F; Rodriguez, D; De Stefano, G; Legisa, D; Dus Santos, MJ.

Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar.

La Lengua Azul (LA) es una enfermedad viral, transmitida por vectores hematófagos del género *Culicoides spp.*, que afecta rumiantes domésticos y salvajes. Es considerada por la OIE como de máxima importancia para el comercio internacional de animales y productos de origen animal. El virus de la lengua azul (VLA) es un virus RNAdc perteneciente a la familia *Reoviridae*, género *Orbivirus*. Hasta la fecha se han identificado 26 serotipos diferentes en el mundo, relacionados directamente con el hábitat del vector

El virus contiene una cápside de tres capas, la externa compuesta por las proteínas virales VP2 y VP5 altamente variables y determinantes de serotipo específico. La remoción de estas dos proteínas expone la capa intermedia, compuesta por la proteína VP7 (altamente conservadas y con estrecha relación en la entrada del virus al vector). Dicha proteína de 349 aminoácidos está codificada por el segmento 7, con un único marco de lectura abierto (ORF).

El diagnóstico serológico requerido por la OIE para realizar estudios de seroprevalencia en los

rodeos y para evaluar el status sanitario de animales cuyos productos o subproductos están destinados a la exportación, se basa en los ensayos de IDGA y ELISA. Actualmente, en Argentina, solo se disponen de kits de ELISA importados de alto costo, por lo que resulta de gran utilidad el desarrollo de un método de ELISA propio. Para ello, se escogió la proteína VP7 ya que es altamente conservada y presenta reactividad frente a todos los serotipos del virus. Previamente, hemos reportado la expresión de la proteína VP7 de un aislado nacional del VLA serotipo 4, la misma se expresó eficientemente en bacterias y fue posteriormente purificada por Cromatografía de afinidad.

Esta proteína fue utilizada para el desarrollo de un ELISA directo para la detección de anticuerpos específicos contra el VLA. Se estandarizaron las condiciones generales del ensayo: tipo de placa, bloqueo, concentración del antígeno y del conjugado y se determinó el punto de corte del ensayo. Con estos parámetros establecidos se evaluaron sueros positivos y negativos previamente caracterizados por IDGA y un ELISA comercial.

La estandarización de este ELISA y su utilización en el laboratorio, favorecerá el diagnóstico serológico de la lengua azul y facilitará el acceso a dicha técnica a laboratorios de menor poder adquisitivo, mejorando, a su vez, la vigilancia epidemiológica en las zonas de circulación del vector.

9- *Ophioviridae*: estudio de la expresión del genoma

Ocolotobiche, EE; García, ML.

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-La Plata CONICET, Fac. Cs. Exactas, U.N.L.P., La Plata, Argentina.

Ophioviridae es una familia de virus de plantas cuyo genoma está constituido por tres o cuatro sRNA de polaridad negativa, no poseen envoltura, el virión consiste de nucleocápsides circulares abiertas o superenrolladas. El miembro tipo de la familia es *Citrus psorosis virus* (CPSV), es tripartito y codifica para 4 genes, todos localizados en la cadena viral complementaria (vc). En el vcRNA3 se encuentra la secuencia que codifica para la proteína de cubierta y en el vcRNA2, aquella para una

proteína de movimiento célula a célula, que además posee actividad supresora. Mediante análisis informático, se determinó que en el extremo 5' de la vcRNA1 se encuentra el gen24k, y separado por una región intergénica, el gen280k, la polimerasa viral o RdRp. La proteína 24K no presenta similitud con ninguna proteína de los bancos de datos, y por su localización genómica resulta de mucho interés. Primeramente, fue demostrada la presencia de la proteína 24K en plantas infectadas usando un antisuero específico. Confirmando la asignación del gen 24k, nos preguntamos ¿cómo se expresan los dos genes del RNA1 de CPsV? Se plantean tres hipótesis: A) un mRNA monocistrónico para cada gen; B) un mRNA bicistrónico; C) un mRNA monocistrónico para el gen 24k y un mRNA transcripto completo del RNA 1 monocistrónico para la RdRp. Éstos transcriptos se encontrarían en muy baja cantidad, ya que aún no han sido detectados por Northern blot. Mediante determinación de los extremos 3' y 5' de los mRNAs, resultados preliminares de 3'RACE indicarían la existencia de un mRNA monocistrónico del gen 24k. Si se tratara de las hipótesis B o C, se podría esperar que la traducción del gen 280k fuera iniciada por reconocimiento de una estructura tipo IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) o por interacción RNA-RNA mediante "Elementos traduccionales en la región 3'UTR independientes de cap". Se realizaron predicciones *in silico* de estructuras sobre la secuencia del vcRNA1 de CPsV, pero éstos elementos no se han encontrado, mientras que la región 5'UTR del vcRNA1 arrojó similitud de estructura con el IRES de Human poliovirus 1. Las modificaciones en los extremos de los mRNAs virales, la adhesión de una estructura tipo cap en el 5' y poliadenilación en el extremo 3' también son objeto de estudio. Hemos determinado, mediante 3'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), que el extremo 3' del mRNA3 de CPsV finaliza en una señal de poliadenilación AAUAAA seguida de poliAs de hasta 76nt, y resultados preliminares indican la existencia de un mRNA24k también poliadenilado. Sobre la base de estos resultados y sabiendo que las partículas virales no sólo presentan RNA viral, sino que también se encapsidan los tres vcRNAs, se evaluó la posibilidad de que éstos vcRNAs pudieran

tratarse de mRNAs virales y por ende, poliadenilados. Resultados preliminares indican que las partículas virales no contienen mRNAs poliadenilados. Se ha demostrado que la mayoría de los virus segmentados de ssRNA de polaridad negativa utilizan el mecanismo de *cap-snatching*, éste estudio está en progreso para CPsV.

10- Identificación de un motivo PEST de degradación vía proteasoma en la proteína minoritaria de viroplasma P6 del Mal de Río Cuarto virus (*Fijivirus, Reoviridae*)

Llauger, G; de Haro, LA; del Vas, M.

Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA-Castelar, INTA – CONICET.

Introducción

El virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) causa la principal enfermedad que afecta al maíz en la Argentina. El virus infecta gramíneas y delfácidos que transmiten la enfermedad: en plantas, produce síntomas severos mientras que en insectos es asintomático. El genoma viral está compuesto por 10 segmentos de ARN doble cadena que codifican para 6 proteínas estructurales (P1, P2, P3, P4, P8 y P10) y 7 no estructurales (P5-1, P5-2, P6, P7-1, P7-2, P9-1 y P9-2). El MRCV replica y se ensambla en estructuras citoplasmáticas denominadas viroplasmas, compuestos por proteínas y ARN virales, y por factores celulares aún desconocidos. Nuestro grupo demostró que P9-1 es la proteína mayoritaria de viroplasma y que P6 cambia su distribución subcelular en presencia de P9-1 cuando son expresadas en células de insecto Sf9. En ensayos de doble híbrido de levaduras determinamos que P6 interactúa con sí misma y con P9-1, sugiriendo que P6 es un componente minoritario de viroplasma. P6 y P9-1 se expresan a niveles muy bajos en hojas de *Nicotiana benthamiana* y en altos niveles en Sf9. Nuestro grupo está interesado en estudiar las posibles causas de esta acumulación diferencial en plantas e insectos.

Objetivo

Estudiar la regulación de la expresión de las proteínas codificadas por MRCV.

Metodología

Se analizaron bioinformáticamente las

secuencias de las 13 proteínas del MRCV utilizando el algoritmo PESTfinder, que detecta motivos de degradación. Se identificaron motivos PEST en las proteínas P6 y P9-1. Se construyeron mutantes de delección de P6 sin el PEST (P6 Δ PEST). Se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con agrobacterias que expresan P6 y P6 Δ PEST, se extrajeron proteínas totales y se cuantificaron los niveles de expresión por "Western blot". Se extrajo ARN total y se cuantificaron mRNAs de P6 y P6 Δ PEST por RT-qPCR.

Resultados

Las proteínas P6 y P9-1 poseen motivos probables de degradación PEST: el de P6 está ubicado en una región desordenada hacia el N-terminal. Se observó que P6 Δ PEST presenta un nivel de acumulación proteica 3,5 veces mayor que P6. Utilizando RT-qPCR se determinó que estas diferencias no son atribuibles a cambios en la acumulación de sus respectivos mRNAs. Por otra parte, no se detectaron motivos PEST en el resto de las proteínas virales.

Conclusión

Se demostró que MRCV P6 contiene un motivo PEST funcional en plantas. Estos motivos son secuencias lineales de aminoácidos ricos en residuos de prolina, glutamato, serina y treonina que sirven como señal de degradación proteolítica por el sistema de ubiquitin-proteasoma (UPS). Nuestros resultados indican que el UPS estaría implicado en la regulación de los niveles de P6 y posiblemente de P9-1 en plantas. Se evaluará su funcionalidad en células de insecto para determinar si este motivo está involucrado en la regulación diferencial de P6 en ambos sistemas. Se discutirán posibles mecanismos de regulación de la funcionalidad del motivo PEST y sus posibles implicancias durante una infección.

Exactas y Naturales), Universidad de Buenos Aires, Argentina; ²Departamento de Química Orgánica y UMYMFOR (CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales), Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Las infecciones por adenovirus (AdV) ocurren principalmente en niños de temprana edad. Este año, en nuestro país, de las infecciones respiratorias agudas virales estudiadas en menores de 2 años, el 15 % correspondió a casos provocados por AdV, siendo además la principal causa de gastroenteritis viral en infantes. En individuos adultos inmunocompetentes AdV puede manifestarse como enfermedades respiratorias, (kerato) conjuntivitis, gastroenteritis y cistitis hemorrágica. Hasta el momento no existe una terapia preventiva ni curativa específica contra AdV, en algunas infecciones se emplean el cidofovir o la ribavirina. Por otra parte, el ciclo de replicación de AdV demora 24 horas en completarse, por lo cual, todas las técnicas para cuantificar actividad antiviral que detectan formación de placas o la reducción de la acción citopática (ACP) pueden llegar a tardar varios días en producir resultados visibles. Actualmente, se dispone de ensayos de PCR cuantitativa (qPCR) más sencillos y rápidos para determinar el título viral. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método rápido para evaluar la actividad anti-AdV de compuestos de síntesis basado en la técnica de qPCR. Primero se tuvieron en cuenta las variables dependientes del virus, como tiempo de infección y multiplicidad de infección (m.i.) para la preparación del templado. Luego, se probaron dos métodos diferentes reportados para la extracción del DNA viral (un kit comercial y otro método basado en la ruptura de la célula por cambios en la presión osmótica). La amplificación se realizó empleando *primers* para dos genes virales diferentes (las proteínas PIII y E1A). Los resultados obtenidos muestran que: no es necesario extraer el ADN viral de las células infectadas para realizar la reacción de PCR, los extractos obtenidos luego de resuspender las células en agua deionizada se pueden utilizar directamente como templado, siendo mejor la eficiencia con el primer para PIII que con el de E1A (pendiente=-3,168 y -2,815, respectivamente). Respecto de la m.i. se

SESIÓN 2

Lunes 2/12 - Sala A: 11.30 - 13.00 hs

11- Ensayos de q-PCR para la detección de actividad anti-adenoviral de azaesteroides sintéticos

Amado, M¹; Ramírez, JA²; Alché, LE¹; Barquero, AA¹.

¹Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica e IQUIBICEN (CONICET-Facultad de Ciencias

observó que a m.i. mayores a 1, aparecen otros productos de reacción no específicos, y no se mantiene la linealidad con las diluciones y los valores de Ct obtenidos. Cuando la m.i. es muy baja (menores a 0,001) aún luego de 48 hs de infección, no se obtienen niveles de amplificación detectables. La normalización se realizó cuantificando DNA total en las distintas muestras empleando un Nano-Drop. Luego se probó la actividad antiviral de cinco azaesteroides sintéticos tanto mediante el ensayo de qPCR como con los métodos de inhibición del rendimiento viral, de la reducción de la ACP, y de la acción sobre la expresión de proteínas virales, a concentraciones no citotóxicas. Los resultados obtenidos indican que tres de ellos poseen una actividad anti-AdV detectada tanto por PCR como por las otras técnicas. En conclusión, se dispone de un ensayo más rápido para la detección de actividad anti-AdV y varios de los compuestos esteroidales presentan propiedades antivirales inéditas frente a este virus.

12- Actividad inactivante del disulfuro aromático NSC4492 contra el virus Junín

Sepúlveda, CS¹; García, CC¹; Levingston Macleod, JM²; López, N²; Damonte, EB¹.

¹Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA; ²Centro de Virología Animal, I.C.T. Dr. César Milstein, CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Los arnavirus son virus envueltos cuyo genoma se compone de dos moléculas de cadena simple de ARN, ambas con una estrategia de codificación ambisentido. Cinco arnavirus causan fiebre hemorrágica severa en humanos representando un serio problema para la salud pública en las zonas endémicas debido a que, hasta el presente, no se dispone de una quimioterapia específica efectiva. Hemos demostrado anteriormente que compuestos antirretrovirales con diversas estructuras químicas, reactivos con los motivos *zinc-finger* de la proteína de la nucleocápside NCp7 de HIV, presentan actividad antiviral y virucida contra los arnavirus. En este trabajo se realizó la caracterización de la potente actividad virucida que el disulfuro aromático derivado de carboxamida NSC4492 presenta contra el virus

Junín (JUNV), agente causante de la Fiebre Hemorrágica Argentina.

Se determinó que la inactivación de JUNV por NSC4492 presentó una cinética de reacción lineal en una forma dependiente de la temperatura, lográndose una reducción del título viral superior al 99% luego de 30 min de incubación a 37°C y completa pérdida de infectividad a los 90 min.

Para profundizar el estudio del mecanismo de inactivación de JUNV, se evaluó la capacidad de los viriones tratados con NSC4492 de llevar a cabo las distintas etapas del ciclo de multiplicación viral en la infección de células Vero. Los viriones inactivados fueron capaces de unirse y entrar en la célula huésped con una eficiencia similar a la de los viriones controles no tratados. En contraste, el tratamiento con NSC4492 bloqueó la capacidad de JUNV para dirigir la síntesis del ARN viral con la subsecuente inhibición de la expresión de las proteínas virales. Además, el análisis de partículas de tipo viral (PTVs) producidas en células que expresan la proteína de matriz Z de JUNV en presencia de NSC4492, reveló que el tratamiento no afecta la capacidad de autobrotación de la proteína. Sin embargo, el análisis mostró una alteración en el perfil electroforético de Z, sugiriendo que el compuesto induciría un cambio conformacional en esta proteína que podría incrementar la afinidad de Z por la polimerasa viral L, con el consecuente bloqueo de la síntesis de RNA.

13- Caracterización del mecanismo de acción de la euparina frente a poliovirus

Visintini Jaime, MF¹; Martino, VS²; Muschiatti, LV²; Campos, RH¹; Cavallaro, LV¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina; ²Cátedra de Farmacognosia, Facultad Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina.

Introducción: La euparina, un benzofurano natural, es activa frente a PV-1, PV-2 y PV-3 con índice de selectividad de 285; 1068 y 855, respectivamente. Este compuesto no es virucida, no induce un estado antiviral en la célula y no interfiere en la etapa de adsorción a las células. El objetivo de este trabajo fue avanzar en el estudio de la caracterización del

mecanismo de acción antiviral de la euparina.

Metodología: 1) Efecto del agregado de euparina a distintos tiempos del ciclo de replicación viral: Células Vero en placa de 24 pocillos fueron infectadas con 100 ufp de PV-2 fotosensible. Luego de 45 min de adsorción a 4°C, se removió el inóculo viral y se agregó medio de infección (Eagle MEM con 2% de suero fetal bovino). A tiempo 0 y cada 10 min p.a. se agregó euparina (10 µM) por duplicado. Luego de 60 min de incubación 37°C, el virus extracelular se inactivó por exposición a la luz durante 10 min. Finalmente, se agregó 1 ml medio de placa (medio de infección con metilcelulosa 0,8%) por pocillo. Se incubó a 37°C durante 48 h y se hizo el recuento de las placas virales obtenidas; 2) Frecuencia natural de mutantes resistentes (FR): se determinó el título viral (ufp/ml) del stock de PV-2 original en ausencia y presencia de cada concentración de euparina (10-40 µM); 3) Aislamiento de clones resistentes: se seleccionaron al azar 9 clones biológicos (Clon 1-9) en presencia de euparina (10-40 µM). 4) Caracterización de la susceptibilidad a euparina: se determinó el título viral en presencia y ausencia de la droga; 5) Estudio del fenotipo dependiente: a) relación entre la replicación viral y la concentración de euparina; b) estabilidad térmica a 37 y 48°C por 30 min de la variante dependiente y del stock de PV-2 original (wt, wild-type).

Resultados: El agregado de euparina a distintos tiempos p.a. demostró que este compuesto ejerce la acción inhibitoria dentro de los 20-30 min p.a. La FR en la población original de PV-2 fue de 0,1% para todas las concentraciones evaluadas. De los 9 clones biológicos de PV-2 aislados, 4/9 resultaron resistentes (nivel de replicación viral similar en presencia y ausencia de euparina), 3/9 sensibles (replicación menor con euparina) y 2/9 dependientes (mayor replicación con droga). El estudio de un clon de PV-2 de fenotipo dependiente mostró que 5 µM de euparina eran suficientes para alcanzar el máximo nivel de replicación viral. Finalmente, se observó una menor estabilidad a la acción de la temperatura para la variante dependiente respecto al wt.

Conclusiones: La euparina interfiere en un tiempo del ciclo viral compatible con la etapa de penetración y desnudamiento del genoma viral

en el interior de la célula. Respecto a la selección de mutantes resistentes, los distintos fenotipos observados en los clones seleccionados reflejarían la heterogeneidad genética de PV-2 en la población original. Se observa además, una rápida evolución a la dependencia en presencia de euparina. Los resultados obtenidos hasta el momento, sugieren que la euparina actuaría en forma similar a otros compuestos denominados inhibidores de cáspide. La secuenciación del genoma viral permitirá conocer las bases moleculares de cada fenotipo y elucidar el blanco viral de este compuesto.

14- Virus de la diarrea viral bovina resistentes a tiosemicarbazonas con citopatogenia alterada en cultivo

Castro, EF; Campos, RH; Cavallaro, LV.
Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

La tiosemicarbazona de 5,6-dimetoxi-1-Indanona (TSC) es un inhibidor no nucleosídico de la ARN polimerasa (NS5B) del virus de la diarrea viral bovina (BVDV). A partir de BVDVwt (NADL citopático -cp-) se seleccionaron 5 poblaciones resistentes a TSC (T1-5) cuyo fenotipo se asoció a mutaciones en NS5B. Para evaluar la estabilidad de la resistencia, se realizaron 20 pasajes de T1-5 sin TSC y se obtuvieron las poblaciones R1-5, las cuales mantuvieron la resistencia fenotípica y genotípica. Tres de ellas, R2;3;5, mostraron una citopatogenicidad menor en células MDBK pero con mayor producción viral.

Objetivo: iniciar la caracterización de R1-5 para comprender los cambios de fenotipo observado. Metodología: se infectaron células MDBK (MOI 0,01) con R1-5 y se cuantificó las células en apoptosis a las 48h p.i. por citometría de flujo utilizando Anexina V-Ficoeritrina y 7-amino-actinomicina. Se detectaron antígenos virales a distintos tiempos p.i. por IFI con Ac anti-BVDV y se cuantificó la producción de ARN viral intracelular a las 24h p.i. (MOI 1) por real time PCR. Se obtuvo la secuencia directa de la región codificante de las proteínas NS de R1-5 y se las comparó con las de T1-5 y BVDVwt.

Resultados: Las infecciones con BVDVwt, R1 y R4 produjeron un 15-20% de células muertas y

apoptóticas, mientras que para R2;3;5 se obtuvo un 5-10%, comparable con las células sin infectar. La IFI mostró que los cultivos infectados con R2 y R3 continuaron sin ECP visible y produciendo proteínas virales hasta las 72h p.i mientras que BVDVwt y R1 presentaron más de 80% ECP a las 48h p.i. En infecciones con MOI 1, R2 y R3 presentaron niveles 3-4 veces mayores de ARNv que el virus wt.

Los virus con citopatogenia alterada presentaron mutaciones no sinónimas en la NS5A, en particular V177A en R2 y R5; I9M y N305Y en R2; y K195E y N370K en R3.

Conclusiones: Luego de 20 pasajes de los virus resistentes se seleccionaron poblaciones virales que, aun manteniendo la resistencia, se adaptaron a replicar eficientemente en un medio sin antiviral. Tres de ellas mostraron menor ECP asociado con una reducción de la apoptosis en los cultivos infectados, y produjeron proteínas virales y altos títulos de partículas infectivas por un período prolongado. El ECP de BVDV en cultivo es consecuencia de la apoptosis de las células infectadas y se relacionó con la mayor síntesis de ARNv y mayor producción de NS3 (producto del clivaje de NS2-NS3) en las cepas cp; las cuales tendrían similar eficiencia de producción de partículas virales que las no cp. En este trabajo, los virus con menor ECP mostraron mayor producción viral y de ARNv intracelular y solo mostraron en común cambios en la secuencia de NS5A.

Los resultados obtenidos permitirían establecer una posible asociación entre la NS5A de BVDV y sus mecanismos de patogenia en células MDBK.

15- Monitoreo masivo y caracterización de la actividad antiviral de nuevos derivados de β -carbolinas sintéticos

Gonzalez, MM^{1,2}; Baiker, A³; Erra-Balsells, R¹; Nitschko, H²; Cabrerizo, FM⁴, Vizoso-Pinto, MG^{2,5}.

¹CIHIDECAR-CONICET, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; ²Max von Pettenkofer Institute, Virology, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany; ³Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim, Germany; ⁴IIB-INTECH-UNSAM-CONICET, Chascomús, Buenos Aires, Argentina; ⁵INSIBIO-CONICET, Departamento Biomédico, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de

Tucumán, Argentina.

Introducción y objetivos. Los Virus Herpes Simplex tipo 1 y 2 (HSV-1 y -2) causan infecciones en las mucosas oral y genital. Después de la primoinfección, establecen latencia en las neuronas y pueden reactivarse cuando el huésped se encuentra bajo estrés, se expone a la radiación UV, o sufre algún tipo de inmunosupresión. Con el surgimiento de cepas resistentes al aciclovir y sus derivados, se hace necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos alternativos. En el presente trabajo adaptamos un ensayo de citotoxicidad en microplacas para hacer un monitoreo masivo de la actividad antiviral de una familia de alcaloides llamados β -Carbolinas (β C).

Materiales y métodos. En primer lugar, se determinó la citotoxicidad directa de 21 β C, comerciales y sintéticas a diferentes concentraciones y luego se realizó un *screening* con un ensayo de viabilidad basado en la reducción de una sal de tetrazolio (MTT) y adaptado para monitorear la actividad antiviral. Brevemente, células Vero crecidas en placas de 96 pocillos, fueron infectadas con HSV-1 y HSV-2 tratadas con diferentes concentraciones de β C. En base a ello se seleccionaron las tres sustancias con mayor actividad y se las caracterizó para determinar la EC50 en ensayos de reducción de la formación de placas y se las comparó con aciclovir en curvas de crecimiento. Posteriormente se realizaron ensayos para evaluar el modo de acción de las sustancias seleccionadas: virucida, inhibición de la adhesión y de la internalización, inhibición de la replicación en el interior de la célula. Para ello se expusieron las partículas virales, las células antes de ser infectadas y las células después de ser infectadas a la acción de las β C y se evaluó la replicación viral por el método de recuento de formación de placas.

Resultados. Once de las β C testeadas presentaron inhibición $\geq 60\%$ en el ensayo de monitoreo masivo. Tres β C (metil-*nor*harmano, N-metil-harmano y 6-metoxi-harmano) fueron caracterizadas posteriormente y se confirmó su actividad antiviral en ensayos de reducción de la formación de placa mostrando actividad antiviral igual o superior al Aciclovir. Como resultado de los ensayos para caracterizar su

modo de acción, podemos decir que Metil-norharmano, N-metil-harmano y 6-metoxi-harmano no son virucidas ni bloquean la adhesión y/o entrada del virus en la célula sino que actúan en pasos más tardíos en el ciclo de replicación viral. Además, cuantificando el n° de copias de genoma viral por qPCR pudimos observar que el mismo se encuentra significativamente reducido ($p < 0.05$) en las células tratadas con β C durante la infección con HSV-1 y HSV-2.

Conclusiones. En un *screening* para monitorear la actividad antiviral de 21 β C sintetizadas por el grupo y comerciales, encontramos once con potencial actividad antiviral contra HSV-1 y HSV-2. Metil-norharmano, N-metil-harmano y 6-metoxi-harmano mostraron actividades mayores o iguales al aciclovir y actuarían a nivel de la replicación del ADN.

16- Vigilancia de la susceptibilidad a los antivirales de Influenza en Argentina

Pontoriero, A; Russo, M; Benedetti, E; Avaro, M; Czech, A; Campos, A; Periolo, N; Savy, V; Baumeister, E.

Servicio Virosis Respiratorias, Departamento Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Carlos G. Malbrán".

Introducción: La vigilancia eficaz de la resistencia antiviral de influenza es una herramienta clave que permite el establecimiento de medidas de control y prevención. En el 2010, el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) inició un proyecto de colaboración con la Agencia de Protección de la Salud (HPA), Reino Unido, con el objeto de establecer una red de vigilancia de resistencia antiviral en América del Sur. En este proyecto participaron también Brasil, Chile, Colombia, Perú y Uruguay. Objetivos: Estudiar la susceptibilidad a antivirales de los virus influenza circulantes en Argentina. Materiales y Métodos: El estudio de susceptibilidad fenotípica a los inhibidores de la neuraminidasa (INA), oseltamivir y zanamivir, se llevó a cabo a partir de 149 aislamientos de virus A y B durante el período 2005-2010 utilizando el sustrato MUNANA mediante un ensayo enzimático. Además, se realizó la pirosecuenciación de 46 muestras A(H1N1)pdm09 y 10 aislamientos A(H3N2) para detectar mutaciones que

confieren resistencia. Este estudio se complementó con la implementación de una técnica de RT-PCR en tiempo real a partir de 1372 muestras (79 recolectadas en 2011, 660 en 2012 y 633 en 2013) para la detección de cepas A(H1N1)pdm09 resistentes a oseltamivir que posean la sustitución H275Y en la NA. La susceptibilidad a los adamantanos se estudió mediante la secuencia parcial de 86 segmentos genómicos que codifican para la proteína M2 de cepas de virus influenza A (63 A(H3N2), y 13 A(H1N1)pdm09) aislados entre 2001 y 2011 y la pirosecuenciación de 41 cepas estacionales A(H1N1) (12) y A(H3N2) (33) aisladas durante el período 2005-2008. Resultados: Los ensayos fenotípicos para los INA demostraron que 12 de los 35 cepas A(H1N1) estacionales fueron resistentes a oseltamivir. Todos los aislamientos estudiados fueron sensibles a zanamivir. Mediante los estudios genómicos se detectaron 9 virus A(H1N1)pdm09 resistentes a oseltamivir, presentando la sustitución H275Y. Los estudios de resistencia a los adamantanos demostraron que 20 de las 55 cepas A(H3N2) aisladas en el período 2001-2007 presentaron la sustitución S31N que confiere resistencia a amantadina. Durante el año 2011, temporada post-pandemia, todas las cepas A secuenciadas (31, 18 A(H3N2) y 13 A(H1N1)pdm09) poseían la sustitución S31N. Por pirosecuenciación, 29 de las 33 cepas A(H3N2) aisladas entre 2005 y 2008 fueron resistentes a amantadina, mientras que todos los virus A(H1N1) estacionales estudiados fueron sensibles a estos antivirales. Conclusiones: A pesar de la detección de cepas A(H1N1)pdm09 resistentes a oseltamivir, la prevalencia de cepas resistentes a INA en Argentina y en otros países del mundo es baja. La alta incidencia de resistencia a los adamantanos condujo a la interrupción del uso de esta categoría de antivirales. El establecimiento de la vigilancia local de la susceptibilidad antiviral contribuye a mejorar la comprensión de la emergencia de la resistencia antiviral en relación con la evolución del virus de influenza en todo el mundo.

17- Circulación del virus Influenza A en Argentina en el período post-pandemia

Benedetti, E; Pontoriero, A; Russo, M; Avaro, M; Czech, A; Periolo, N; Campos, A; Baumeister, E.

Servicio Virosis Respiratorias, Departamento Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS Malbrán.

Introducción: Influenza es un problema de salud pública que afecta anualmente del 5 al 20% de la población mundial, causando alta morbilidad y mortalidad especialmente en grupos de riesgo; al mismo tiempo posee un alto potencial pandémico. Debido a su gran variabilidad, la elección de las cepas que van a formar parte de la fórmula vacunal debe ser actualizada anualmente. **Objetivos:** Caracterizar los virus influenza A que circularon en Argentina durante el período post-pandemia y establecer la relación entre ellos y las cepas vacunales del mismo período. **Materiales y Métodos:** Desde el año 2010 hasta el 2013, en el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) se recibieron 7645 muestras positivas para influenza a partir de los laboratorios integrantes de la Red Nacional de Laboratorios de Influenza y Virus Respiratorios. La subtipificación de influenza A se realizó mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real utilizando *primers* y sondas específicos desarrollados por el Centro Colaborador de OMS CDC de Atlanta, USA. A partir de una selección de muestras positivas se llevó a cabo el intento de aislamiento viral en células MDCK y MDCK-SIAT1. Para caracterización antigénica se seleccionaron 9 aislamientos en 2010, 84 en 2011, 46 en 2012 y 45 en 2013 mediante inhibición de la hemaglutinación (IHA). El análisis filogenético se realizó a partir de 148 aislamientos mediante RT-PCR y secuencia de la región HA1 de la hemaglutinina (HA) viral. **Resultados:** Durante el período post-pandemia se detectó circulación de ambos subtipos de influenza A, A(H3N2) y A(H1N1)pdm09, aunque en diferentes proporciones dependiendo del año de estudio. La caracterización antigénica demostró que la mayoría de los virus A(H1N1)pdm09 aislados en Argentina estuvieron relacionados con la cepa vacunal A/California/7/2009. Por su parte, los virus A(H3N2) que circularon en 2010 y 2011 fueron antigénicamente similares a la cepa vacunal A/Perth/16/2009, mientras que los aislamientos 2012 y 2013 se relacionaron con la cepa A/Victoria/361/2011, componente de la fórmula vacunal 2013 del Hemisferio Sur. Los análisis

filogenéticos demostraron que la mayoría de los virus A(H1N1)pdm09 analizados pertenecen a los grupos 5, 6 y 7. Los virus A(H3N2) aislados en 2010 y 2012 pertenecieron en su mayoría al clado Victoria, grupos 5 y 6, mientras que los aislamientos 2013 pertenecieron al grupo 3C. **Conclusiones:** Durante el período post-pandemia se detectó la circulación de virus A pertenecientes a los subtipos (H3N2) y (H1N1)pdm09. A pesar de las diferencias observadas en los estudios filogenéticos, ambos subtipos virales se correlacionaron antigénicamente con su componente vacunal durante todo el período, con excepción del subtipo (H3N2) durante la temporada 2012. La vigilancia eficaz de influenza permite la detección temprana de nuevos virus y aporta información valiosa para la decisión de la formulación vacunal.

18- Infecciones respiratorias agudas provocadas por influenza A y B en el año 2012 en la provincia de Corrientes. Comparación de dos métodos diagnósticos.

Ruiz Diaz, NE^{1,2}; Andino, GM^{1,2}; Gutnisky, VJ¹; Cóceres, M¹; Espinosa, J¹; Paniagua, A¹; Benegui, J¹.

¹Laboratorio de Central de Redes y Programas. Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Corrientes. ²Cátedra "Virología Clínica" Carrera de Bioquímica. FaCENA. UNNE.

Introducción: La influenza es una enfermedad respiratoria aguda, recurrente y común que se conoce desde la antigüedad y se presenta con un elevado impacto para la salud pública mundial. La enfermedad se manifiesta con altas tasas de morbilidad en individuos de todas las edades y elevadas tasas de mortalidad en niños, mayores de 60 años, pacientes con enfermedades crónicas y mujeres en gestación. Los virus influenza evolucionan de forma constante por acumulación de mutaciones en su genoma, que da lugar a la aparición de nuevas variantes antigénicas, adaptadas al hospedero y a las condiciones del ambiente, capaces de causar epidemias de impacto global elevado. El diagnóstico de virus influenza, tanto con fines clínicos como epidemiológicos, se puede realizar mediante la detección del agente o de la respuesta inmune del hospedero. Las técnicas disponibles varían en sensibilidad y especificidad

según el método, el laboratorio donde se realizan y el tipo de muestra utilizada.

Objetivo: Debido a la importancia clínica y epidemiológica de estos procesos respiratorios agudos realizamos un estudio comparativo de nuestras experiencias en el diagnóstico de Influenza A e influenza B a través de dos técnicas distintas: Inmunofluorescencia directa (IFD) y Reacción en Cadena de la Polimerasa de tiempo real (RTqPCR).

Materiales y Métodos: Se realizó un estudio retrospectivo descriptivo de 963 muestras de pacientes pediátricos y adultos, procesadas en el Laboratorio Central de Redes y Programas de la provincia, durante el año 2012, provenientes de diferentes centros de salud; públicos, privados y ambulatorios. Se procesaron las muestras con las técnicas, de tamizaje por IFD y RTqPCR, según los protocolos proporcionados por la Red Nacional de Referencia de Virus Respiratorios.

Resultados: Del total de 963 muestras se obtuvieron 52 positivos de Influenza A (5,4%) y 20 positivos de influenza B (2%) por IFD y por RTqPCR 125 muestras positivas de Influenza A (13%) e influenza B 99 (10%). Encontrándose una fuerza de concordancia moderada para influenza A, al ser evaluadas por el coeficiente Kappa ($k=0,47$; $\chi^2 = 243,07$; $p=0,0001$) y para Influenza B se obtuvo ($k= 0,246$; $\chi^2 = 115,49$; $p=0,0001$) una fuerza de concordancia débil. El estudio de la población por grupo etario, arrojó predominio de pacientes menores a 1 año (37%) y del grupo etario 17-64 años (36%).

Conclusiones: Por medio de la comparación estadística se observa una diferencia significativa entre ambas metodologías, por lo que la utilización en conjunto aportaría una importancia significativa a la hora del diagnóstico de distintas poblaciones etarias, de esta forma se destaca el uso de técnicas de amplificación en el diagnóstico rutinario permitiendo un manejo adecuado de los pacientes, brindando una visión más amplia para el tratamiento y las medidas de prevención en la transmisión de los virus y su control en salud pública.

Core y la región preCore del virus de la Hepatitis B en pacientes en diferentes estadios infectados con los genotipos F1b y F4

González López Ledesma, MM¹; Soken, L¹; Rodrigo, B¹; Mojsiejczuk, L¹; Sevic, I¹; Mammana, L²; Fainboim, H²; Campos, R¹; Flichman, D¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. ²Hospital de Infecciosas F Muñiz.

Introducción

El virus de Hepatitis B (HBV) causa infecciones autolimitadas y persistentes, ello depende de factores virales y del hospedador. Durante el curso de la infección crónica se seleccionan mutantes en la región promotora del Core (BCP) y la región preCore (pC) que regulan negativamente la expresión del antígeno e (HBeAg); el cual es considerado una proteína que induce inmunotolerancia. Asimismo, las mutaciones en el BCP están asociadas a una mayor tasa de replicación. La relevancia de los genotipos de HBV en la evolución de la infección por HBV es motivo de controversia.

Objetivo

Caracterizar la frecuencia de mutaciones en el BCP y la región pC en individuos en diferentes estadios clínicos, infectados con los subgenotipos (g) F1b y F4,

Metodología

Las regiones BCP y pC de muestras de suero de 60 individuos infectados con el gF1b (29 agudas, 20 crónicas HBeAg positivas, 11 crónicas HBeAg negativas) y 38 con el gF4 (10 agudas, 11 crónicas HBeAg positivas, 17 crónicas HBeAg negativas) fueron secuenciadas.

Resultados

La frecuencia de la mutación A1762T/G1764A en la región BCP fue significativamente mayor en el gF1b que en gF4 (38,3% vs 13,9%, $p<0,01$). Esta diferencia se verificó en la fase aguda de la infección (34,5% vs 0,0%, $p=0,031$) y en el estadio HBeAg negativo (72,7% vs 33,3%, $p=0,045$). La frecuencia de la mutación G1896A en la región pC fue significativamente mayor en gF4 en comparación con el gF1b (6,7% vs 30,6%, $p<0,01$), en particular en el estadio HBeAg negativo (27,3% vs 73,3%, $p=0,026$).

Conclusiones

La diferencia observada entre los subgenotipos F1b y F4 podría tener implicancias en las manifestaciones clínicas y la evolución de la

SESIÓN 3
Lunes 2/12 - Sala A: 15.00 - 17.00 hs

19- Caracterización de la región Promotora del

infección. Considerando la propiedad inmunotolerogénica atribuida al HBeAg, la presencia durante la fase aguda, de mutaciones que regulan negativamente su expresión implicaría una respuesta inmune mayor, la cual resultaría en cuadros clínicos de mayor severidad y una menor frecuencia de evolución a la cronicidad. Por otra parte, el patrón diferencial de mutaciones en los subgenotipos F1b y F4 en las infecciones crónicas HBeAg negativas sugiere diferentes estrategias biológicas de adaptación al hospedador en el curso de la infección persistente. Las mutaciones en el BCP están asociadas a una regulación positiva en la expresión del ARNm pregenómica y el concomitante aumento de la tasa de replicación de HBV; su presencia en el estadio crónico HBeAg negativo implicaría cuadros clínicos de mayor severidad.

20- Polimorfismos virales asociados a carcinoma hepatocelular en la infección por el virus de la Hepatitis C

Pérez, PS¹; Galdame, O²; Mullen, E²; Livellara, B²; Gadano, A²; Flichman D¹; Campos, RH¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ²Hospital Italiano Buenos Aires.

Introducción: El carcinoma hepatocelular (HCC) es la quinta causa de cáncer en el mundo y la tercera causal de muertes relacionadas a cáncer. El virus de la hepatitis C (HCV) es uno de los principales agentes etiológicos del HCC. El HCV se clasifica en 6 genotipos y varios subgenotipos. El genotipo 1b se ha asociado a mayor incidencia de HCC. Mutaciones en la proteína Core y en la región determinante de sensibilidad a interferón (ISDR) de la proteína NS5A del genotipo 1b han sido asociadas a desarrollo de HCC.

Objetivo: Caracterizar la distribución de genotipos de HCV e identificar polimorfismos virales asociados a HCC en pacientes con HCC infectados crónicamente por HCV.

Metodología: Se analizaron 31 muestras de suero de 16 pacientes con HCC infectados por HCV. Se amplificaron y secuenciaron en forma directa las regiones Core, E2, NS5A y NS5B. Se realizó el análisis filogenético mediante el método de Máxima Verosimilitud.

Resultados: La distribución de genotipos obtenida a partir del análisis filogenético de la

región NS5B, fue: 1b (10), 3a (3), 1a (2) y 2c (1). En el análisis filogenético, las diferentes secuencias obtenidas de un mismo individuo conformaron grupos monofiléticos; la topología de los árboles obtenidos para las diferentes regiones analizadas fueron concordantes. En la región del Core la mutación R70Q fue observada en 6 de los 10 pacientes infectados con g1b, y en los pacientes infectados con g1a y g3. El análisis de la región NS5A reveló la presencia de sustituciones no sinónimas en la región ISDR. **Conclusiones;** La distribución de genotipos, así como los polimorfismos en las proteínas de Core y NS5A se corresponde con hallazgos previamente descritos en individuos con HCC infectados por HCV. La topología obtenida para las muestras de un mismo paciente indican el origen común de las mismas; mientras que el análisis de la topología entre las diferentes regiones sugiere que no hay presencia de recombinación en las muestras analizadas. La mutación R70Q en infecciones con g1b ha sido ampliamente reportada en asociación al HCC si bien su implicancia es aún motivo de controversia. A pesar del reducido número de casos analizados dicha mutación parecería no ser exclusiva del g1b. La identificación de marcadores moleculares asociados al HCC podría ser de gran utilidad en la prognosis y toma de decisiones en el seguimiento de pacientes infectados crónicamente con HCV.

21- Mutaciones de los genes E6 y LCR del Virus Papiloma Humano 16; asociadas a carcinogénesis, detectadas en lesiones cervicales de bajo grado

Mosmann, JP; Frutos, MC; Monetti, MS; Kiguen, AX; Venezuela, RF; Cuffini, CG.

Laboratorio de Chlamydia y Virus Papiloma Humano- Instituto de Virología "Dr. J.M Vanella"- Facultad de Ciencias Médicas- Universidad Nacional de Córdoba.

Los Virus Papiloma Humano (VPH) están asociados etiológicamente con el carcinoma cervical. El genotipo 16 es el más frecuentemente detectado en la mayoría de las neoplasias de cérvix.

En el análisis de la región LCR del VPH 16, se identifican cuatro variantes: europea (E), asiática-americana (AA) y africanas (AF-1 y AF-2); ésta es la región más variable del genoma

viral.

Algunos autores han demostrado que la existencia de mutaciones puntuales en las secuencias de E6 y LCR tendría relación con la progresión a una lesión de mayor grado.

En mujeres de la ciudad de Córdoba; también se detectó al VPH 16 como el más frecuente; entre los genotipos de alto riesgo, sin embargo, se desconocen las variantes circulantes y las mutaciones asociadas a carcinogénesis; por esta razón el objetivo del trabajo fue, estudiar filogenéticamente secuencias de VPH 16 de muestras de endocervix con lesiones intraepiteliales de diferentes grados, de la provincia de Córdoba, con la finalidad de distinguir los linajes circulantes y analizar la presencia de mutaciones relacionadas a los procesos malignos.

Se estudiaron 15 muestras de pacientes positivos para VPH 16. Las muestras fueron analizadas por PCR para las regiones L1, E6 y LCR y luego secuenciadas.

El análisis filogenético de E6 y LCR fue construido por *Maximun Likelihood* (PhyML software), con parámetros sugeridos por JModelTest3.7.

Este análisis determinó que el 86% de las muestras pertenecen a la variante E, el 7% a la variante AF-1 y el 7% restante a AF-2. El alto porcentaje de variante europea estaría en concordancia con los patrones de migración humana, ya que Argentina presentó una fuerte inmigración europea en las primeras décadas del siglo XX.

La mutación más frecuentemente detectada en la región LCR fue G7521A, en el 80% de las muestras, la cual afecta al sitio de unión del factor de transcripción YY1 (represor responsable de silenciar la transcripción del promotor de E6), pudiendo contribuir a la carcinogénesis.

En la región E6 la mutación más frecuente fue T350G (L83V) detectada en el 67% de las muestras, asociada al incremento del riesgo de una infección persistente. Notablemente, ambas mutaciones fueron halladas, en su mayoría, en lesiones de bajo grado, podríamos inferir que dichas lesiones tienen un riesgo mayor de avanzar a la malignidad.

Estos resultados son los primeros aportes en el campo de la epidemiología molecular del VPH

16 en pacientes de Córdoba, los cuales enfatizan la importancia del estudio de las diferentes variantes y la detección de las mutaciones asociadas con el desarrollo de procesos carcinogénicos.

Apoyo económico: PIO2010-MincytCba. 2011-2013. Ref.Res. MINCYT Cba.Nº170/2011.

22- Expresión de proteína E7 de HPV 16 en lesiones premalignas y malignas de cuello uterino

Guerra, F¹; Quintana, S²; Ramirez, N¹; Díaz, L³; Vighi, S³; Cardinal, L³; Prat Gay, G⁴; Camporreale, G⁴; Palaoro, L¹.

¹Hospital de Clínicas, Dpto de Bioquímica Clínica, UBA; ²Laboratorios Fares Taie; ³Hospital de Clínicas, Dpto de Patología; ⁴Instituto Leloir.

Introducción: La producción continua de la proteína E7 de los tipos de Papilomavirus humanos (HPV) de alto riesgo es la condición necesaria para asegurar la malignidad celular. Sin embargo, la detección de dicha proteína ha sido dificultosa, y los resultados fueron contradictorios.

En el presente trabajo se ensayó un anticuerpo contra proteína E7 de HPV 16, desarrollado en el Instituto Leloir de Buenos Aires, con el fin de evaluar la utilidad del ensayo en el diagnóstico del cáncer cervical y sus lesiones precursoras.

Materiales y métodos: Se utilizaron 40 biopsias de cuello uterino con diagnóstico histológico de lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL,12) y alto grado (HSIL,4), Carcinoma pavimentoso (CP,18) y adenocarcinoma in situ (AIS,3) e invasor (AC,3), todas portadoras de HPV 16. 60 biopsias negativas para HPV 16 fueron descartadas. La tipificación se realizó por RT-PCR, *primers* GP5/6, y secuenciación. Se realizó inmunohistoquímica para la determinación de E7 y E2 (de HPV16) y de p16 (marcador de proliferación).

Resultados: p16 se expresó en 8/12 de los LSILs, en 4/4 de los HSILs, en 16/18 de los CP y en 6/6 de los adenocarcinomas. E2 fue positiva sólo en 6/12 LSILs, y negativa en el resto de los casos. E7 resultó positiva en 6/12 LSILs, y en la totalidad de HSILs y carcinomas.

Discusión y conclusiones: E2 y E7 tienen reactividades opuestas, en general, de acuerdo al cambio de estado episomal a integrado del

HPV, con la pérdida de parte del ORF de E2 que libera la expresión de las oncoproteínas virales. Esto se verifica en 4/12 LSILs donde E2 fue positivo mientras que E7 y p16 no se expresaron, todos los cuales regresaron. En otros 3/12 casos de LSILs ambos marcadores coexistieron (E7 y E2), lo que se interpreta como una integración parcial del virus, y en 5/12 sólo E7 se detectó; la positividad de p16 confirma la progresión de estos últimos 8 casos a HSIL. E7 y p16 se co-expresaron en todos los HSILs y en la mayoría de los carcinomas.

E7 de HPV16 es un marcador de progresión de LSILs en muestras portadores de este tipo viral. p16 es un marcador de progresión para cualquier tipo viral de alto riesgo; su positividad en casi todos los carcinomas y HSILs, acompañando a E7, junto con la evaluación de E2, confirma el valor de la proteína oncogénica viral como complemento del diagnóstico histológico y reafirma el modelo de carcinogenesis del cuello uterino.

23- Análisis de la secuencia codificante completa del gen BNLF1, Proteína Latente de Membrana 1 (LMP1), del virus de Epstein Barr (EBV) en pacientes pediátricos con patología benigna y maligna asociada

Gantuz, M¹; Lorenzetti, M¹; Altcheh, J²; De Matteo, E³; Chabay, P¹; Preciado, MV¹.

¹Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; ²Servicio de Parasitología y Chagas, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; ³Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

Introducción: El EBV, virus linfotrópico y oncogénico, es agente causal de la Mononucleosis Infecciosa (MNI). Su ciclo latente de infección se asocia a procesos linfoproliferativos y linfomas. LMP1, proteína oncogénica del EBV, mimetiza un receptor activado y estimula, independientemente de ligando, las vías de señalización MAPK/ERK, P13K/AKT, NF-κB, JNK. Las variantes de la región más caracterizada, la C-Terminal (aa 195 al 389), se nombran según el lugar en el que se aislaron: China1, China2, China3, Mediterránea+, Mediterránea-, Alaskan, North Carolina. La variación de las regiones N-terminal

citoplasmática (aa 1 al 24) y de 6 dominios transmembrana (25 al 196) ha sido menos explorada, especialmente en niños. Se ha postulado que los polimorfismos F144I, I124V/I152L y F144I/D150A/L152L en los dominios 4 y 5 podrían relacionarse con la linfomagénesis ya que involucra la señalización vía NF-κB. Objetivo: Identificar y caracterizar las variantes moleculares del gen BNLF1, en muestras de pacientes pediátricos con MNI y con linfoma a fin de relacionarlas con la linfomagénesis. Materiales y Métodos: Se analizaron muestras pediátricas de secreciones faríngeas (SF) de 15 casos de MNI (detección por IFI de anticuerpos anti-cápside viral IgM+) y de 26 biopsias ganglionares de linfomas (L) EBV+ (hibridación in situ para EBERs). Se amplificó por PCR anidada la región codificante completa de BNLF1 y se secuenció. Se realizó el alineamiento con Bioedit, el estadístico χ^2 con GraphPad InStat, la reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud en PhyML, incluyendo secuencias disponibles en GenBank. Resultados: En región N-Ter se observó la pérdida del sitio de restricción Xho1 (CTCGAG) en el 7/26 de los L y en el 2/15 de las MNI, pero sin diferencia significativa ($p>0.05$). La región Transmembrana, en comparación a la secuencia de la línea celular prototípica B95.8, presentó polimorfismos tanto en los dominios como en las regiones interdominios en ambas patologías: F144I se observó en 12/26 L y 3/15 MNI, I124V/I152L en 13/26 L y 7/15 MNI y F144I/D150A/L152L en 6/26 L y 1/15 MNI, ninguno de los polimorfismos mostró asociación significativa ($p>0.05$) con las patologías. En la región C-Terminal observamos por agrupamientos filogenéticos que la variante predominante fue China1 en L y MNI (18/26 L, 8/15 MNI). En menor proporción Alaskan (5/26 L), Mediterránea- (1/26 L, 3/15 MNI), Mediterránea+ (1/15 MNI), China 2 (1/26 L, 3/15 MNI), B95.8 (1/26 L). Conclusión: Se describió por primera vez en pacientes pediátricos de Argentina los polimorfismos de las regiones N-Terminal y Transmembrana. Según el C-Terminal la mayoría de los aislamientos agruparon con la variante China 1, confirmando que es la de mayor distribución en Argentina. Si bien ciertos polimorfismos (N-ter y Transmembrana) vinculados a linfomagénesis mostraron mayor predominio en los L, se requiere analizar un

mayor número de muestras para confirmar el significado patológico de esta observación.

24- Asociación y perfil de expresión de antígenos del virus de Epstein Barr (EBV) con el Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB): comparación entre poblaciones pediátrica y adulta

Cohen, M¹; Narbaitz, M²; Metrebian, F²; De Matteo, E³; Preciado, MV¹; Chabay, PA¹.

¹Laboratorio de Biología Molecular, División Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez;

²División Patología, Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R. Castex, Academia Nacional de Medicina; ³División Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

Introducción: La infección por EBV se asocia a diversas patologías linfoides malignas. El LDGCB EBV+ del adulto mayor es una entidad provisoria definida por la OMS (2008) que se presenta en pacientes inmunocompetentes ≥ 50 años, aunque se ha observado en ciertos adultos jóvenes. La expresión de latencia de EBV es tipo II/III y sería consecuencia del déficit de respuesta inmune que ocurre con la edad. En trabajos previos, demostramos que el EBV se asocia también a LDGCB pediátrico con algunas características similares a esta entidad. Objetivo: Estudiar la asociación, expresión de genes y antígenos de latencia viral comparativamente en pacientes con LDGCB en 3 grupos etarios, pediátrico, jóvenes y adultos ≥ 50 años, de nuestro país. Métodos: Se analizaron 51 pacientes adultos ≥ 50 años (51-84 años, mediana 70), 23 jóvenes (18-49 años, mediana 35) y 26 pediátricos (2-16 años, mediana 9) con LDGCB. Relación hombre:mujer 1:1. Sobre cortes de biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina se realizó hibridación in situ (HIS) para EBERs e inmunohistoquímica (IHQ) para las proteínas virales LMP1 y LMP2A. Se extrajo ARN usando una técnica comercial y se determinó la expresión relativa de genes virales (EBNA1, -2, -3C, LMP1, LMP2A, BZLF1) mediante PCR en tiempo-real. Resultados: 11/51 (22%) pacientes adultos, 4/23 (17%) jóvenes y 11/26 (42%) pediátricos fueron EBV+, con un porcentaje variable (5-90%) de células EBERs+. La mediana de edad de casos EBV+ fue de 73 años, 37 años y 4 años vs. 69 años, 34 años y 13 años en EBV-

pero la asociación EBV-edad fue significativa solo en los casos pediátricos ($p < 0.05$, test de Student). No se observó diferencia significativa en la distribución por sexo. La expresión de genes virales fue variable dentro de cada población estudiada. Se observó predominio de la latencia tipo III junto con expresión del gen lítico BZLF1 en 5/11 (45%) casos adultos, 4/4 (100%) jóvenes y 6/11 (55%) pediátricos. 1/11 (10%) adulto presentó latencia II junto con BZLF1, mientras que la latencia I fue detectada en 5/11 (45%) adultos y 1/11 pediátrico (9%). Los niveles de expresión de todos los transcritos virales fueron significativamente mayor en jóvenes vs. adultos ≥ 50 años, pero en pediátricos vs adultos esto solo se evidenció para LMP1 ($p < 0.05$, test de M-W). Conclusiones: La asociación de EBV con los LDGCB fue similar en las 3 poblaciones analizadas. El perfil de latencia III junto con el gen lítico fue predominante en los 3 grupos. La elevada expresión de transcritos de LMP1, que traducen para la principal proteína oncogénica viral, en los jóvenes y pediátricos podría indicar su participación en la linfomagénesis, mientras que los altos niveles de BZLF1 en el grupo de jóvenes podrían reflejar además una mayor actividad lítica viral. Finalmente, la similitud en la asociación de EBV con el LDGCB en los 3 grupos avala la sugerencia reciente de que el criterio de edad definido por la OMS sería arbitrario y debería ser revisado.

25- *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 administrado por vía oral modula favorablemente la respuesta inmunológica al virus sincitial respiratorio en ratones infantiles

Chiba, E¹; Vizoso-Pinto, MG²; Kitazawa, H¹; Alvarez, S³; Villena, J^{1,3}.

¹Grupo de Inmunología Nutricional, Universidad de Tohoku, Japón; ²Laboratorio de Biología de las Infecciones, INSIBIO-CONICET, Argentina; ³Laboratorio de Inmunobiotecnología, CERELA-CONICET, Argentina.

El virus sincitial respiratorio (VSR) es uno de los principales agentes etiológicos de bronquiolitis y neumonías en niños menores de 3 años. La gravedad de la enfermedad está relacionada con factores patogénicos virales y con la respuesta inmune del hospedador. De hecho, la respuesta

inflamatoria exacerbada es responsable en gran parte del daño del tejido pulmonar, el cual está asociado con una elevada morbilidad y mortalidad. Por este motivo, la modulación de la respuesta inmune representaría una estrategia alternativa para el tratamiento de las infecciones por VSR. En trabajos anteriores demostramos que *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 (Lr05) promueve la evolución favorable de infecciones respiratorias bacterianas y regula el balance pro- y anti-inflamatorio en el tracto respiratorio luego del desafío con el agonista de TLR3/RIG-I poly(I:C), disminuyendo así el daño pulmonar.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la administración oral de Lr05 aumenta la resistencia al desafío con VRS y determinar los mecanismos involucrados. Demostramos que en ratones infantiles (BALB/c, 3 semanas) tratados con Lr05 antes del desafío con VSR, el título viral en pulmones se reduce significativamente y hay menor daño local en comparación con los ratones controles desafiados con VSR y sin tratamiento previo con Lr05 ($p < 0.05$). Experimentos empleando anticuerpos para bloquear la acción de IFN- γ o IL-10, nos permitieron demostrar que ambas citoquinas son necesarias para lograr el efecto protector inducido por Lr05. El incremento de IFN- γ estuvo asociado a una estimulación de las células dendríticas pulmonares CD103+ y CD11bhigh ($p < 0.05$), favoreciendo la generación de una respuesta de tipo Th1, la cual se correlacionó con las reducciones del título viral. Por otro lado, los aumentos de IL-10 ($p < 0.05$) mostraron una correlación directa con la protección contra las alteraciones pulmonares inducidas por la respuesta inflamatoria.

Nuestros resultados indican que Lr05 es eficaz para modular el sistema inmune común de mucosas e incrementar la resistencia a VSR en ratones infantiles. Demostramos que Lr05 podría ser usada para contribuir a la evolución positiva de las infecciones virales por VSR, atenuando la respuesta inflamatoria exacerbada y activando la respuesta antiviral que conduce a la disminución del título viral.

26- Ensayos pre-clínicos de anticuerpos recombinantes VHH para el tratamiento de la infección por Rotavirus Grupo A

Maffey, L^{1,2}; Vega, CG²; Garaicoechea, LL^{2,3}; Parreño, V^{2,3}.

¹ANPCyT; ²Instituto de Virología, CICVyA, INTA-Castelar; ³CONICET.

En Argentina, se reportan anualmente 120.000 casos de diarrea y 150 muertes asociadas a Rotavirus grupo A (RVA) en niños menores de 5 años. Dado que no existe un tratamiento específico para el virus, resulta fundamental desarrollar nuevas estrategias de inmunidad pasiva, como los fármacos basados en anticuerpos recombinantes. Los VHH, anticuerpos recombinantes derivados de IgG de llama, son ideales por su pequeño tamaño, bajo costo y escalabilidad. El objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia de dos clones de anticuerpos VHH anti-RVA (3B2 y 2KD1) como tratamiento para esta patología. Se realizó un ensayo con 6 grupos de ratones BALB-c lactantes previamente infectados con RVA murino (RVAM). A cada grupo se le administró un tratamiento oral diario con distintas concentraciones de VHH, durante 4 días. Grupo 1: no tratado, Grupo 2: 2KD1 (100ug), Grupo 3: 3B2 (100ug), Grupo 4: 3B2+2KD1 (100ug c/u), Grupo 5 y Grupo 6: 3B2+2KD1 (80ug c/u). Se evaluó la excreción viral en heces a las 24, 48, 72 y 96 horas post-inoculación (hpi). A las 96 hpi se sacrificaron los ratones de los grupos 1-5 y se midió excreción viral en macerado intestinal por ELISA y UFFF y presencia de VHH en suero por ELISA. El 100% de los ratones tratados con VHH fueron negativos para RVAM en macerado intestinal a las 96 hpi frente a un 16,67% en el control no tratado. Los grupos 2, 3, y 5 presentaron un único pico de excreción viral en heces a las 48 hpi, mientras que los no tratados (Grupo 1) a las 72 y 96 hpi. Los ratones del grupo 4 (2KD1-3B2 100ug) no excretaron virus. Los ratones del grupo 6 fueron sacrificados secuencialmente cada 24 horas y se midieron los mismos parámetros. En este caso, se observó un pico de excreción viral en intestino a las 24 hpi y un pico en heces a las 48 hpi. En ningún grupo se detectó translocación de VHH al suero. Estos resultados muestran la potencialidad de los anticuerpos VHH en el tratamiento de RVA y plantean la necesidad de más estudios preclínicos.

27- Nanoanticuerpos Monoclonales VHH con capacidad de bloquear la interacción HBGA - rVLPs de Norovirus Humano

Aguilar, A¹; Garaicoechea, L¹; Bok, K²; Green, K²; Parreño, V¹.

¹Instituto de virología CICVyA, INTA Castelar;

²Caliciviruses Section, LID-NIAID National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

Norovirus (NoV) es uno de los mayores agentes virales responsables de los brotes epidémicos de gastroenteritis en poblaciones de todas las edades y etnias. Se cree que 200.000 personas mueren por año a causa de NoV, principalmente niños de países en desarrollo. Este virus se propaga rápidamente con un cuadro clínico que incluye fiebre, vómitos esporádicos, diarrea crónica y calambres. Una de las mayores dificultades en su investigación es que no se ha podido cultivar *in vitro*, impidiendo la realización de estudios antigénicos y de neutralización viral. A su vez, no existen terapias antivirales o vacunas efectivas contra la infección por NoV. Se especula que la infectividad del virus se relacionaría con la unión a antígenos de grupos histo-sanguíneos (HBGA) de la mucosa intestinal. Tales carbohidratos funcionarían como posibles receptores durante las primeras etapas de infección.

Los nanoanticuerpos VHH son dominios derivados de anticuerpos IgG de cadena pasada presentes en camélidos y representan las moléculas más pequeñas de la naturaleza con capacidad de unión a un antígeno. Estas regiones poseen características especiales como elevada hidrosolubilidad, elevada especificidad de unión por su antígeno específico y resistencia a condiciones físico-químicas extremas

El objetivo específico de este trabajo fue evaluar la reactividad de un panel de anticuerpos monoclonales VHH contra distintas cepas de Norovirus y luego evaluar el potencial de dichos VHHs como herramientas para proteger o tratar la infección por Norovirus. Para ello se realizaron ensayos que permitieron evaluar la capacidad de los VHH de bloquear la interacción entre rVLPs (*recombinant virus like particles*) de NoV y distintas fuentes de HBGA. Se llevaron a cabo ensayos de Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA), bloqueo de la unión de las VLPs a la saliva y bloqueo de la unión de las

VLPs a mucosa gástrica porcina. De un total de 20 VHHs evaluados, con especificidad para reconocer los genotipos de Norovirus Humano GI.1 y GII.4, se encontró que los clones 1 y 5.4 presentaron capacidad de bloquear la interacción de las VLPs de la cepa GII.4 MD-2004 con mayor intensidad, mientras que los clones 6.3, 10.4 y 14.5 fueron efectivos para bloquear la interacción de carbohidratos y la cepa GI.1 Norwalk. Ensayos de WB y ELISA con VLPs quimeras también revelaron que todos los VHH seleccionados reconocieron epítopes conformacionales ubicados en el dominio P de la proteína de cápside VP1 de NoV, excepto para el clon 7.5 que está dirigido a un epítope lineal.

En base a los resultados obtenidos, concluimos que algunos de los VHHs desarrollados se unen a la región de unión a HBGA de las rVLPs, demostrando la capacidad de bloquear la interacción de dichas VLPs con los receptores celulares. Por lo tanto poseen un alto potencial de ser utilizados en el desarrollo de una terapia preventiva o de tratamiento de las diarreas por NoV.

28- Impacto de los baculovirus derivados de cuerpos de oclusión en la respuesta inmune murina

Molina, GN¹; Molinari, P^{1,2}; Taboga, O^{1,2}.

¹Inst. Biotecnología, INTA, Castelar, Argentina;

²CONICET, Argentina.

Los baculovirus son una familia de virus que infectan artrópodos. Son transmitidos oralmente como virus derivados de cuerpos de oclusión (ODVs), los cuales se encuentran incluidos en una matriz de poliedrina (poliedros) y son capaces de infectar las células del intestino de las larvas de lepidoptero. En cambio, un segundo fenotipo, los virus brotados (BVs), están especializados en la infección entre células de los tejidos internos de las mismas.

Estudios previos realizados por nuestro grupo demostraron que el transporte de un antígeno en la cápside de los BVs permite la inducción de una fuerte respuesta citotóxica antígeno específica *in vivo*. Sin embargo, en una segunda inoculación, estos efectos se ven alterados debido a la inmunidad previa específica contra el vector. La respuesta inmune inducida por ODVs y poliedros aún se encuentra poco

estudiada.

En este trabajo se decidió estudiar si los ODVs y los poliedros son capaces de estimular la respuesta inmune innata de mamíferos.

Se inocularon ratones C57 BL/6 por vía intravenosa con BVs (5×10^7 UFP), ODVs (masa equivalente a 5×10^7 UFP de BVs), poliedros y como control poliedrina y medio de cultivo. A las 6 horas se extrajo sangre y se evaluó la presencia de IL-6 e INF- γ mediante ELISA. En los ratones inoculados con BVs se obtuvieron altos valores de IL-6 (7 ng/ml) e INF- γ (55 ng/ml), mientras que en los demás grupos, incluyendo los inoculados con ODVs o poliedros, los niveles fueron significativamente menores ($p < 0,05$).

Adicionalmente, se estudió por medio de microscopía confocal la interacción entre DCs y ODVs, incubándolos 2 horas y revelando con anticuerpo primario anti-VP39 (proteína de cápside). También se analizó la capacidad de las DCs de disolver los poliedros, incubándolos 30 minutos o 24 horas y revelando con anticuerpo primario anti-poliedrina.

Los estudios de microscopía confocal permitieron detectar la presencia de ODVs en las DCs y se observó que a las 24 hs los poliedros habían sido fagocitados pero no disueltos.

Los resultados obtenidos indican que los ODVs y los poliedros son endocitados por las células dendríticas pero no son capaces de impactar en el sistema inmune innato en cuanto a secreción de citoquinas.

SESIÓN 4

Lunes 2/12 - Sala B: 15.00 - 17.00 hs

29- Epidemiología de la infección con el Virus de la Leucosis Bovina (BLV) en vaquillonas de un rodeo de tambo de alta prevalencia

Merlini, R; Martinez, C; Politzki, R; Alvarez, I; Trono, K; Gutierrez, G.
Instituto de Virología, CICVyA, INTA.

La infección con el virus de la leucosis bovina (BLV) está fuertemente instalada en nuestro país con una prevalencia del 90-100% en la mayoría de los rodeos de tambo. En un trabajo previo de nuestro grupo se observó que la gran diseminación de la infección se da luego del primer parto y entrada de los animales al tambo sin embargo la infección ya está presente desde

una temprana edad con alrededor del 11% de los animales infectados durante los primeros días de vida.

Con el fin de conocer la prevalencia de la infección con BLV previo al ingreso al tambo, se analizaron vaquillonas (preparto) pertenecientes a un consorcio de tambos de alta prevalencia de la provincia de Santa Fe.

Se analizó la prevalencia de la infección en 7 grupos de vaquillonas de 27 meses de edad que pasaron por el corral de preparto, entre 2011 y 2013, mediante 2 métodos serológicos desarrollados en nuestro laboratorio, que detectan anticuerpos contra la proteína mayoritaria de cápside (ELISAp24) y contra la partícula viral completa (ELISA Leukofast). En dos de los grupos se analizó además la carga proviral (CPV) mediante PCR en tiempo real y se la comparó con la CPV de rodeos adultos de tambo.

Se analizaron un total de 718 animales. Se encontró que más del 50% de los animales jóvenes se encuentran infectados antes del primer parto (ELISAp24, media: 51,9%, min.: 39,3%, máx.: 60,8%; Leukofast, media: 53,6%, min.: 36,1%, máx.: 66,5%). Al analizar las cargas provirales de dos de estos siete grupos se observó, en el primero 23,8%; 57,1% y 19% de animales de CPV indetectable, baja y alta, respectivamente; mientras que en el segundo grupo 34,7%; 36,7% y 28,6% de CPV indetectable, baja y alta, respectivamente. Al comparar con datos de animales adultos de tambo se observó que no existen diferencias significativas entre los valores de carga proviral de animales jóvenes previo al ingreso al tambo y adultos en producción.

Los resultados arrojados por este trabajo indican que en rodeos de alta prevalencia la infección con BLV circula de manera muy importante en animales jóvenes, llegando hasta el 66,5% de animales seropositivos, muchos de ellos con alta carga proviral comparable a la de animales adultos. Esto sugiere que las medidas de control para reducir la prevalencia no deben ser aplicadas solamente a animales adultos en el tambo y remarca la importancia de tomar medidas desde una edad temprana.

30- Evidencia de expresión viral en sangre entera de animales naturalmente infectados

con el Virus de la Leucosis Bovina

Alvarez, I^{1,2}; Rondelli, F³; Gutiérrez, G^{1,2}; Trono, K¹.

¹Instituto de Virología, INTA; ²CONICET; ³Universidad Nacional de Rosario.

La infección con el Virus de la leucosis bovina (BLV) está ampliamente distribuida en los tambos de nuestro país. El virus provoca una infección persistente, y no existe por el momento una vacuna ni tratamiento efectivo para el control de la infección. La única estrategia válida de control consiste en generar rodeos de animales con bajo nivel de carga proviral para poder así interrumpir el ciclo de transmisión. Inmediatamente después de la infección por BLV, se puede identificar una viremia pasajera que dura 10-12 días post-infección. Posteriormente aparece una respuesta inmune persistente que eliminaría aquellas células que expresan transcritos virales y solo se logra detectar transcritos de BLV en 1:50.000 células de sangre periféricas. La prevalencia de la infección aumenta progresivamente con la edad de los animales llegando a niveles del 90% en animales en lactancia. Los estudios previos sugieren que el momento del parto y comienzo de la lactancia constituyen un punto crítico en la dinámica de la infección a nivel poblacional, ya que en este momento se observa un aumento brusco del nivel de infección. Esto puede ser debido a episodios de reactivación viral in vivo que permiten que los animales más susceptibles estén expuestos a un desafío mayor por parte de los animales infectados con los que comparten el espacio (pre-parto y tambo). El objetivo de este trabajo fue evaluar si existe una expresión viral pasajera a lo largo de un ciclo productivo completo en animales naturalmente infectados con BLV pertenecientes a un rodeo lechero con alta tecnificación. Se trabajó con 7 bovinos, de cargas provirales alta (n = 3) y baja (n = 4), pertenecientes a un tambo de alta producción con alrededor del 90% de prevalencia. Se tomaron muestras de sangre y leche durante un año comenzando en el período pre-parto, pasando por el parto, post-parto, continuando durante la lactancia y preñez en intervalos de 2 meses hasta el siguiente período de secado y parición. Se evaluó la detección de

RNA viral del gen *tax* y del gen *pol* por RT-nested PCR a partir del RNA purificado de SE. En dos de los animales con alta CPV en sangre entera se detectó RNA correspondiente al gen *tax* y al gen *pol* en forma intermitente a lo largo de todo el ciclo productivo. En los animales con baja CPV solo puede ser detectado RNA del gen *tax* y *pol* en forma esporádica en el periodo periparto. No se observó una variación significativa en la carga proviral en sangre entera en ningún momento del periodo estudiado. Este trabajo demuestra la presencia intermitente de RNA de BLV en sangre entera asociada a animales de alta CPV. Deberán profundizarse los estudios para establecer si esta detección intermitente de RNA de BLV corresponde a una reactivación viral asociada a un fenómeno hormonal o de estrés sufrido por el animal, generando un riesgo mayor de transmisión de la infección por BLV y si está relacionado a la carga proviral en sangre entera.

31- Variabilidad genómica intra-rodeo para el Virus de la Fiebre Aftosa en la epidemia 2000-2002

Götte, MM^{1,3}; Cabanne, GS^{3,4}; Lago, E⁵; Perez, AM^{2,3}; König, GA^{1,3}.

¹Instituto de Biotecnología, INTA-Castelar; ²CECSA (Centro de Estudios Cuantitativos en Sanidad Animal), Universidad Nacional de Rosario; ³CONICET. Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas; ⁴Museo Nacional de Ciencias Naturales; ⁵SENASA. Secretaría Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

Introducción

La Fiebre Aftosa es una enfermedad producida por el virus de la Fiebre Aftosa (VFA), cuyo genoma de ARN, está constituido por una molécula de cadena simple y polaridad positiva, posee gran variabilidad y alta tasa evolutiva. En los análisis filogenéticos, se analiza, en general, un aislamiento y se lo toma como representativo del rodeo infectado, sin embargo, si se infectan más animales es altamente probable que las muestras no posean la misma secuencia nucleotídica viral.

Objetivo

Analizar la extensión de la variabilidad genómica intra-rodeo de VFA en la epidemia 2000-2002 para evaluar si una muestra por animal es suficiente para representar al rodeo al cual pertenece.

Metodología

Se muestrearon entre 2 y 4 aislamientos de animales distintos pertenecientes a 8 rodeos infectados de la epidemia 2000-2002 en Argentina. En total, se obtuvieron las secuencias del genoma completo del VFA de 22 aislamientos, las mismas se compararon con la de 29 aislamientos obtenidos a nivel país y 21 de Mar Chiquita, en ambos se cuenta con un aislamiento por rodeo infectado. Se realizó un análisis para determinar si existen diferencias significativas entre distancias de muestras de un mismo rodeo (VIR), a nivel localidad (VMCh) y a nivel Nacional (VN). Se utilizaron como estadísticos el error estándar y AMOVA.

Luego, para analizar la estabilidad de la topología (desaparición y permanencia de grupos y análisis del valor de soporte de bootstrap), se realizó el análisis filogenético ó con una muestra o con todas las muestras de cada rodeo infectado.

Resultados

Se obtuvieron los valores VIR, VMCh y VN, su desvío estándar sin presentarse superposición en el rango de valores. Se observó la mayor tasa de variabilidad en el conjunto de muestras a nivel nacional y la menor en la variabilidad a nivel intra-rodeo.

El test de AMOVA demostró que la variabilidad a nivel Nacional es significativamente superior ($p > 0,001$) a la que se produce dentro de un rodeo.

Las relaciones filogenéticas muestran el patrón monofilético esperado para las muestras de un mismo rodeo, y se obtienen topologías y medidas de soporte similares si se incluye una muestra única de los mismos.

Conclusiones

Los resultados encontrados permiten inferir, al menos para esta epidemia, que la muestra de un animal es representativa del rodeo al que pertenece en un muestreo a nivel nacional.

32- Circulación activa de los virus del complejo respiratorio bovino en la población de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) de nuestro país

Maidana, SS^{1,3}; Mozgovej, M¹; Ferella, A^{1,3}; Craig, MI^{1,3}; Malacari, D¹; Konrad, JL²; Crudeli, G²; Benitez, D⁴; Romera, SA^{1,3}.

Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias veterinarias y Agronómicas (CICVyA),

Instituto de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, Argentina; ²Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina; ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Argentina; ⁴EEA Mercedes, Instituto de Tecnología Agropecuaria (INTA), Mercedes, Corrientes, Argentina.

En Argentina la explotación ganadera ocupa un lugar preponderante en la economía nacional. Gran porcentaje de las pérdidas que tienen lugar en la ganadería son debidas a la incidencia de enfermedades infecciosas ya sea de origen viral, bacteriano, o parasitario. Dentro de las enfermedades infecciosas que causan pérdidas económicas se encuentran los virus respiratorios endémicos del CRB (BoHV1, BVDV, BPI3 y BRSV). En las últimas décadas se han producido grandes cambios en el contexto agropecuario de nuestro país debido principalmente al crecimiento del área sembrada de soja provocando un desplazamiento e intensificación de carga ganadera a campos de menor calidad agrícola y aparición de sistemas de producción mixtos. Un caso particular de estas producciones mixtas son las de bovinos y búfalos. Los animales que cohabitan en un mismo ambiente pueden transmitirse enfermedades, transformándose en reservorios de virus endémicos con el consecuente cambio en la epidemiología de las distintas enfermedades dentro de la población de origen. En este contexto resulta de interés determinar la circulación de virus de importancia económica en rodeos bovinos y bubalinos con especial énfasis en el estudio del rol como reservorio del búfalo de agua. El objetivo del trabajo fue evaluar la circulación de virus respiratorios pertenecientes al CRB en búfalos de agua mediante serología, aislamiento viral y la caracterización molecular de los aislamientos utilizando técnicas desarrolladas para éste trabajo. Se evaluaron sueros de búfalos de Chaco, Formosa, Corrientes y Buenos Aires por seroneutralización para BoHV1, BVDV y BRSV y por inhibición de la hemoaglutinación para BPIV3. Hisopados nasales y genitales de búfalos fueron inoculados en cultivo celular (MDBK) para aislamiento viral. Se registró serología positiva a BoHV1, BPIV3, BVDV y BRSV, con 34% para BoHV1, 30% para BPIV3, 30% para BVDV y 44 % para BRSV en los sueros analizados hasta el momento. Se aislaron y caracterizaron virológicamente 3 PIV3 y 5 herpesvirus de las

muestras de hisopados de búfalos de distintas provincias del NEA. La caracterización molecular y filogenética de los aislamientos de PIV3 determinó que se trataban de parainfluenza bovinos y los herpesvirus de búfalo BuHV1. Los aislamientos de herpes bubalinos fueron analizados por PCR (Claus et al, 2005) indicando que 3 de los 5 aislamientos bubalinos fueron amplificados como BoHV5. Sin embargo cuando los aislamientos fueron sometidos a otra técnica molecular desarrollada por nuestro grupo para subtipificar los BoHV5 (Maidana et al, 2013), estos resultaron diferentes a BoHV1 y a los subtipos de BoHV5. Pudimos comprobar que la técnica molecular desarrollada para la subtipificación de BoHV5 permite además diferenciar los BoHV1 y los BuHV1. Los 8 aislamientos obtenidos de hisopados de búfalo sumados a la serología positiva para los virus del CRB en el ganado bubalino demuestran la circulación activa de estos virus en este nuevo sistema de producción.

33- Mantenimiento y evolución de la infección por picobirnavirus (PBV) durante la etapa adulta en un orangután *Pongo pygmaeus* y diversidad genética de las cepas virales excretada durante un período de tres años

Masachessi, G¹; Martínez, LC¹; Giordano, MO¹; Barril, PA¹; Isa, MB¹; Paván, JV¹; Nates, SV¹.

¹Instituto de Virología Dr. JM Vanella, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Los picobirnavirus (PBV), miembros de la familia *Picobirnaviridae*, constituyen un grupo emergente de virus, considerados potenciales patógenos oportunistas asociados a diarrea. Son partículas desnudas, de genoma bi-segmentado de ARN de doble cadena, identificados en materia fecal de aves y mamíferos (incluyendo humanos). En los últimos años se comenzó a entender la interacción virus-hospedador, así como los factores que facilitan la producción de la progenie viral en un modelo porcino y ñandú. Los resultados demostraron que la infección por PBV se caracteriza por portadores asintomáticos y persistentemente infectados que adquieren la infección por PBV muy temprano en la vida y que sostienen esta infección al menos hasta el inicio de la edad adulta.

El objetivo de este estudio es proporcionar

datos sobre el mantenimiento y la evolución de la infección por PBV durante la edad adulta en un hospedador mamífero, tomando como modelo un orangután adulto (*Pongo pygmaeus*). Para este estudio, se seleccionó un orangután mantenido en cautiverio en el zoológico de la ciudad de Córdoba, infectado con PBV muchos años antes de empezado el estudio. Se llevó a cabo un seguimiento de excreción viral durante 3 años, recolectándose un total de 117 muestras de materia fecal, inmediatamente después de cada deposición. Las heces fueron clasificadas como diarreicas o normales en base a su consistencia. El total de muestras se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida seguida de tinción argéntica (PAGE/SS) y un total de 80 muestras fueron también analizadas por transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando un par de *primers* específico del genogrupo-I (Pico B25/Pico B43) derivado del segmento genómico 2 de la cepa prototipo de PBV 1-CHN-97.

Los resultados del estudio de seguimiento de excreción viral mostraron que la infección PBV en el orangután es asintomática y se caracteriza por períodos intercalados de alta y baja excreción viral activa y por períodos virales silenciosos.

El análisis filogenético mostró que las cepas de PBV excretadas por el orangután pertenecen al genogrupo I (con una identidad nucleotídica entre 64% y 81%). Las cepas detectadas agrupan en un único cluster separado de otras cepas de PBV detectadas en humanos y otras especies animales de diferentes países.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten cerrar el ciclo de la historia natural de la infección por PBV, la cual se caracteriza por hospedadores asintomáticos recién nacidos, juveniles y adultos que de forma persistente excretan en materia fecal cepas estrechamente relacionadas, exponiendo a la infección por PBV a hospedadores susceptibles. Por consiguiente, el PBV podría considerarse un habitante frecuente del tracto gastrointestinal, dejando abierta la pregunta sobre los mecanismos moleculares que regulan la convivencia persistente y asintomática con su hospedador y la potencial conveniencia del hospedero en mantener esta relación.

34- Caracterización de un aislamiento local del virus de influenza aviar H1N1 (A/red-winged tinamou/Argentina/MP1/2008). Evaluación de su virulencia en aves de corral

Alvarez, P¹; Araya, P¹; Mattiello, R²; La Torre, J¹; Mattion, N¹.

¹Centro de Virología Animal, Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein, CONICET, Argentina; ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

La influenza aviar (IA) es una infección en aves causada por un virus ARN (-) perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*. Las aves acuáticas silvestres han sido consideradas "carriers" subclínicos de los virus de IA y se encuentran adaptadas a transportar y transmitir un amplio rango de cepas de virus de influenza en la naturaleza [Slemons RD y col, 1974; Webster RG y col, 1992].

Aunque estas infecciones son habitualmente subclínicas, se ha sugerido que, en aves silvestres migratorias, el virus de influenza aviar de baja patogenicidad podría presentar signos clínicos más severos y un impacto ecológico mayor de lo descrito en la literatura. Por otro lado se cree que la transmisión y posterior circulación de estos virus de baja patogenicidad en aves terrestres desempeña un papel esencial en la adquisición del fenotipo de alta patogenicidad (Banks y col, 2001, Perdue y otros, 1996, Suárez y col, 2004).

En el año 2007, a partir de tareas de vigilancia en aves acuáticas encontradas muertas por actividades de caza ó capturadas vivas (2.995) se detecta por primera vez influenza aviar en Argentina [A/Kelp Gull/Argentina/LDC4/06 (H13N9)] (Pereda A y col, 2008). Posteriormente, en abril de 2008, a partir de trabajos de campo, se encontraron numerosas perdices coloradas (*red-winged tinamous*) muertas en Marcos Paz, provincia de Buenos Aires. A partir del análisis de muestras cloacales y traqueales nuestro grupo determinó la presencia de un virus de influenza H1N1 y se realizó el aislamiento del virus. El aislamiento, denominado A/red-winged tinamou/Argentina/MP1/08, fue secuenciado completamente y se realizó un estudio filogenético del mismo. Este trabajo permitió identificar por primera vez una infección con

influenza aviar en aves silvestres terrestres no migratorias en América del Sur (Alvarez y col, 2010). En el presente trabajo realizamos la evaluación de la virulencia de este primer aislamiento local (A/red-winged tinamou/Argentina/MP1/2008) en aves de corral. Para ello se determinó el Índice de Patogenicidad Intravenoso (IVPI) inoculando 0,2 ml del virus por vía intravenosa en pollos de 4-8 semanas de edad. A partir de los resultados obtenidos se determinó un índice de 0.637. De acuerdo a los parámetros establecidos este valor indica que el virus es no patogénico en aves de corral. Así también, se procesaron órganos extraídos de las aves infectadas (pulmón, hígado y bazo) a los 4 ó 5 días post infección y se analizó la presencia del virus por RT-PCR. A partir de una 2da ronda de amplificación se obtuvo una señal débil del tamaño molecular esperado a partir de las muestras obtenidas al 4° día post infección. Este resultado concuerda con el obtenido en el test de patogenicidad intravenoso.

35- Estudios preliminares de proliferación y apoptosis en animales infectados con el virus de la leucosis bovina (BLV) con alta y baja carga proviral

Nieto Farías, MV^{1,2}; Lendez, P^{1,2}; Forletti, A^{1,2}; Gutiérrez, S^{1,2}; Ceriani, C^{1,2}; Dolcini, G^{1,2}.

¹Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)-CONICET; ²Laboratorio de Virología, FCV-UNCPBA, Tandil, Argentina.

Introducción: El virus de la leucosis bovina (BLV) es un retrovirus exógeno causante de una enfermedad de carácter linfoproliferativa que afecta principalmente a los linfocitos B. Aproximadamente 60% de los animales infectados permanecen asintomáticos, 30% desarrollan linfocitosis persistente, un estado frecuentemente pre-tumoral, y el 10% restante manifiestan linfosarcomas. Produce importantes pérdidas económicas a los productores debido a muertes por linfosarcoma, la disminución en la producción de leche y la pérdida de mercados para el comercio de ganado en pie, carne y semen de animales infectados. El BLV se halla ampliamente diseminado y no existen vacunas comerciales contra esta enfermedad. El control de la enfermedad mediante la eliminación de animales seropositivos se torna impracticable en

los establecimientos con alta prevalencia de infección. Por lo tanto, se hace evidente la necesidad de buscar otras alternativas para evitar el avance de la enfermedad. Dado que los animales con menor número de células infectadas tendrían menos posibilidades de propagar el BLV en un rodeo, para el control de la diseminación viral sería deseable poder seleccionar animales capaces de mantener baja carga proviral. Para ello, se hace imprescindible primero caracterizar ese estado de baja carga proviral que desarrollan ciertos animales infectados. El TNF-alfa es una de las citoquinas involucradas en la proliferación de los linfocitos B y parece tener un rol central en la dinámica de infección por BLV. Su acción está íntimamente relacionada con el balance en la expresión de sus dos receptores: RI (con actividad pro-apoptótica) y RII (con actividad anti-apoptótica). Objetivo: Estudiar la proliferación celular y la respuesta apoptótica en animales con baja y alta carga proviral.

Metodología: Se extrajeron muestras de sangre entera de animales negativos y positivos para BLV. Se determinó el estatus infeccioso por ELISA y la carga proviral por PCR en tiempo real. Se separaron PBMC y se cultivaron en presencia de ConA y rTNF-alfa. Se analizó la proliferación celular por ensayo de reducción del MTT y la apoptosis mediante visualización de fragmentos de ADN en geles de agarosa.

Resultados: En el ADN de los animales con alta carga proviral se visualiza menor fragmentación de ADN frente a estímulos que en los animales de baja carga proviral y los animales negativos para BLV. Por otro lado, en los animales negativos se observa menor fragmentación que en los animales de baja carga proviral. Los animales con alta carga proviral tienen mayor respuesta proliferativa frente a estímulos que los animales con baja carga proviral o negativos para BLV.

Conclusiones: Nuestros estudios preliminares indicarían que las células de los animales infectados que desarrollan alta carga proviral mantienen un estado anti-apoptótico y presentan mayor respuesta proliferativa, en relación a las células de animales que desarrollan baja carga proviral.

36- Dinámica de la infección perinatal con BLV

Gutiérrez, G¹; Rondelli, F²; Merlini, R¹; Martínez, C¹; Politzki, R¹; Alvarez, I¹; Trono, K¹.

¹Instituto de Virología, CICVyA, INTA; ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

La infección con el virus de la leucosis bovina (BLV) esta fuertemente instalada en nuestro país con una prevalencia del 90-100% en la mayoría de los rodeos de tambo. En un trabajo previo de nuestro grupo se observó que la infección con BLV se encuentra presente en los rodeos desde una temprana edad con alrededor del 11% de los animales infectados durante los primeros días de vida, los cuales conviven con el resto de las terneras de su misma edad y/o peso.

Con el fin de conocer la epidemiología de la infección temprana se estudió la dinámica de la carga proviral y del título de anticuerpos en 7 animales con infección periparto, pertenecientes a un tambo de la provincia de Santa Fe (n = 6) y al campo experimental de INTA Castelar (n = 1), durante los primeros 3 años de vida.

Se tomaron muestras de sangre con anticoagulante al nacimiento y periódicamente hasta los 36 meses de edad. Se determinó la carga proviral en sangre por PCR en tiempo real y se titularon los anticuerpos en plasma mediante 2 métodos serológicos desarrollados en nuestro laboratorio, que detectan anticuerpos contra la proteína mayoritaria de cápside (ELISA p24) y contra la partícula viral completa (ELISA Leukofast).

Se encontró una baja carga proviral en la primera muestra de 5 de los 7 terneros analizados. Todos los animales alcanzaron valores de carga proviral alta, mayor al 1% de células infectadas, al año de vida (n = 2) o previamente (n = 2 en el periparto; n = 3 a los 3 meses) y se mantuvieron en esa condición hasta el fin del estudio. El título de anticuerpos tuvo una disminución entre los 3 y 6 meses, y una recuperación de los valores iniciales luego de este período en 6 de 7 animales.

El comportamiento de la carga proviral observado en terneros con infección periparto sugiere que los animales jóvenes no serían capaces de controlar la infección en forma eficiente y, por lo tanto, representarían una fuente de contagio sumamente peligrosa para el

resto del rebaño. El diagnóstico y eliminación rápida de dichos animales debe ser considerado como una medida de control importante de la infección con BLV.

37- Detección de latencia del herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) en tonsilas y leucocitos de sangre periférica de bovinos

Favier, PA¹; Marin, MS (2,3); Morán, PE¹; Odeón, AC³; Verna, AE³, Pérez, SE^{1,4}.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina; ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina; ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Argentina; ⁴Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)-CONICET. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina.

Introducción: El herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) y el herpesvirus bovino 5 (BoHV-5) son neurotrópicos y establecen latencia en ganglio trigeminal. Sitios no neurales de latencia se describieron para BoHV-1. Sin embargo, no existe información sobre otros sitios de latencia para BoHV-5. Objetivo: determinar si la infección aguda, latencia y reactivación de BoHV-5 ocurren en los leucocitos de sangre periférica (PBLs) y tonsilas y establecer comparaciones con la infección por BoHV-1. Métodos: Terneros de 1 año de edad se inocularon por vía intranasal con BoHV-1 y 5. Grupo 1 (Infección aguda): dos grupos de 2 terneros inoculados con $10^{6.3}$ DICC50/ml de cada virus; eutanasia: 6 días post-infección (dpi). Grupo 2 (Latencia): dos grupos de 2 terneros inoculados con 10^3 DICC50/ml; eutanasia: 24 dpi. Grupo 3 (Reactivación): dos grupos de 2 terneros inoculados con 10^3 DICC50/ml y tratados con dexametasona (DEX) a los 21 dpi; eutanasia: 25 dpi. Grupo 4: 2 animales no infectados. Un ternero recibió DEX. Se obtuvieron tonsilas, PBLs y suero. Con ADN de los PBLs se realizó una *nested* PCR para BoHV-1 y 5. Los anticuerpos neutralizantes se determinaron por seroneutralización. Las tonsilas se procesaron para aislamiento viral. Resultados: En los terneros del Grupo 1 infectados con BoHV-5 se observaron hemorragias y petequias en tonsilas. No hubo

lesiones en los órganos linfoides de los terneros infectados con BoHV-1, ni en los Grupos 2, 3 y 4. A los 6 dpi los títulos de anticuerpos contra BoHV-1 y 5 fueron de 1:8; en un ternero infectado con BoHV-5 fue de 1:32. A la eutanasia, los animales de los Grupos 2 y 3 habían seroconvertido. BoHV-1 y 5 se aislaron de las tonsilas a los 6 dpi. Se detectaron diferencias ($p < 0.05$) en los títulos virales en las tonsilas infectadas con respecto al control. No hubo diferencias entre los grupos infectados ($p > 0.05$). A los 24 dpi, no se detectó virus infeccioso en las tonsilas de los terneros inoculados con BoHV-1 o 5. Luego de la administración de DEX, BoHV-5 se aisló de la tonsila de un ternero. La presencia de ADN de BoHV-1 y 5 se detectó intermitentemente entre los 2 a 6 dpi en PBLs correspondientes al Grupo 1 y a distintos dpi en los Grupos 2 y 3. No se detectó genoma viral en el Grupo 4. Conclusión: BoHV-5 establece latencia y se reactiva a partir de las tonsilas. La producción de virus infeccioso en estos tejidos podría contribuir a la transmisión viral en la infección aguda y reactivación con manifestaciones clínicas, a diferencia de la reactivación de BoHV-1. Los títulos similares en las tonsilas sugieren que la replicación en este sitio es una característica común a ambos virus. En este estudio, sólo BoHV-5 se reactivó a partir de las tonsilas, lo cual podría reflejar diferencias en el potencial patogénico de cada virus en este estadio de la infección. Los PBLs alojan los genomas virales durante la latencia y la infección de los mismos podría proveer una vía adicional de acceso del virus al sistema nervioso.

38- Estudio del papel de la región 2C en la virulencia de dos virus de la fiebre aftosa serotipo A

Cacciabue, M¹, García Nuñez, S², Taboga, O^{1,2}, Carrillo, E^{1,2}, Gismondi, MI¹.

¹CONICET; ²Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA.

Introducción: El virus de la fiebre aftosa (VFA) pertenece a la familia *Picornaviridae*, género *Aftovirus*, y produce una enfermedad altamente contagiosa que afecta a animales biungulados ocasionando importantes pérdidas económicas. Previamente, se determinó que dos variantes correspondientes al VFA A/Arg/01 presentaban

diferencias en su patogenicidad en el modelo ratón, siendo VFA-L un virus letal y VFA-NL un virus no letal. Dentro de la región codificante del genoma, estos virus difieren en 6 aminoácidos. Entre estos, VFA-NL presenta las sustituciones Q55R y N224S en la proteína 2C, una de las proteínas no estructurales más conservadas de VFA cuyo papel en la virulencia aún no ha sido completamente dilucidado. El residuo 224 es invariable entre los distintos serotipos virales y se sabe que la sustitución R55W en un VFA de serotipo C aumenta la capacidad del virus de alterar y desprender células BHK-21 de la monocapa. Se propuso la hipótesis de que los cambios en las posiciones 55 y 224 de 2C estarían relacionados con diferencias en la virulencia de los virus VFA-L y VFA-NL y que estas diferencias podrían ser evidenciadas en células BHK-21. Objetivo: Estudiar el papel de las mutaciones en 2C sobre las características fenotípicas de VFA-L y VFA-NL. Metodología: Se diseñó y construyó el virus quimérico Q-2C-L, que presenta los aminoácidos Q55 y N224 de VFA-L en el contexto genómico de VFA-NL. Para esto se amplificó por RT-PCR una región que incluye las posiciones de interés a partir del sobrenadante de cultivo de células infectadas con VFA-L. El producto obtenido fue ligado en un plásmido que contiene el genoma completo de VFA-NL (VFA-NL-Clon). A partir de los plásmidos Q-2C-L y VFA-NL-Clon previamente linealizados se transcribieron *in vitro* los genomas virales completos, que se transfectaron en células BHK-21. En los sobrenadantes de transfección se obtuvieron los virus infecciosos Q-2C-L y VFA-NL-Clon. A fin de evaluar las características fenotípicas tanto del virus quimérico como de los virus parentales, se determinó el tamaño y la morfología de las placas de lisis de cada virus y se evaluó la cinética de crecimiento en un ciclo en términos de producción de partículas virales infecciosas y de ARN viral. Resultados: Todos los virus presentaron placas de lisis de morfología clara, así como tamaños de placas y cinéticas de crecimiento similares. En este sentido, las características biológicas de Q-2C-L resultaron semejantes a las de los virus parentales. Conclusión: Los cambios en 2C no inducen diferencias en la virulencia de las variantes de VFA A/Arg/01 en células BHK-21, lo que sugiere

que la misma sería dependiente de la complejidad del hospedador utilizado en su estudio.

SESIÓN 5

Lunes 2/12 - Sala A: 17.30 - 19.00 hs

39- Caracterización de los genotipos del virus de la Hepatitis B en infecciones agudas

Rodrigo, B¹; Torres, C¹; Culasso, A¹; Galdame, O²; Marciano, S²; Gadano, A²; Campos, R¹; Flichman, D¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ²Hospital Italiano Buenos Aires.

INTRODUCCIÓN

El virus de la Hepatitis B (HBV) es un patógeno distribuido a nivel mundial que puede ocasionar tanto infecciones autolimitadas como persistentes; el curso de la infección depende de factores virales y del hospedador. La epidemiología y relevancia de los genotipos de HBV en la evolución de la infección aguda es motivo de controversia.

OBJETIVO

Caracterizar la epidemiología molecular y la relevancia de los genotipos (g) en la evolución de las infecciones agudas causadas por HBV.

METODOLOGÍA

El genoma completo de 34 casos de infecciones agudas sintomáticas causadas por HBV fue caracterizado mediante secuenciación directa y analizado mediante métodos bioinformáticos de filogenia y coalescencia.

RESULTADOS

Dos de los 34 casos (5,9%) evolucionaron a la cronicidad. La distribución de genotipos fue: gA 26,5%, gB 2,9%, gD 2,9%, gF1b 52,9%, gF2a 2,9% y gF4 11,8%. El análisis coalescencia permitió estimar, para el gF1b, una tasa de sustitución de $1,81 \times 10^{-4} \pm 4,95 \times 10^{-6}$ s/s/y; observándose la diversificación entre 1998-2008. El análisis filogenético comparativo entre los aislamientos del gF1b y secuencias de casos crónicos previamente reportados no mostró agrupamientos específicos que permitan diferenciarlos. En la región promotora del Core (BCP) la mutación A1762T/G1764A fue observada en el 33,3% y 44,4% de las infecciones por gA y gF1b respectivamente.

CONCLUSIONES

La tasa de cronicidad observada se corresponde con la descrita para las infecciones adquiridas en la adultez. En comparación con la distribución descrita en infecciones crónicas, la frecuencia de infecciones agudas causadas por el gF1b fue significativamente mayor, en detrimento de las del genotipo D. Este resultado sugiere un cambio epidemiológico entre el momento en que ocurrieron las infecciones crónicas y el presente, o en su defecto, un sesgo en la distribución de genotipos entre las infecciones agudas sintomáticas y asintomáticas. Ambas hipótesis revelan que el genotipo de HBV podría tener implicancias en la evolución de la infección.

La ausencia de agrupamientos específicos en el análisis filogenético de las secuencias provenientes de infecciones agudas y crónicas pone de manifiesto la relevancia de los factores relacionados con el hospedador en la evolución de la infección.

El antígeno e (HBeAg) del virus de la Hepatitis B es considerado una proteína que induce la tolerancia al virus y favorece el establecimiento de la infección persistente. La presencia de la mutación A1762T/G1764A, que regulan negativamente la expresión del HBeAg, en la fase aguda de infecciones causadas por el gA y el gF1b puede asociarse a infecciones autolimitadas y justificar la diferencia epidemiológica observada en la distribución de genotipos entre las infecciones agudas y crónicas.

40- Estudio de prevalencia de genotipos del virus papiloma humano (HPV) en Mar del Plata, incorporando como método de *screening* el análisis por *High Resolution Mating*

Quintana, S¹; Colace, G¹; Guerra, FR²; Di Gerónimo, V¹; Estevez, MS¹; Palaoro, L².

¹Laboratorio de Biología Molecular, Fares Taie Instituto de Análisis, Mar del Plata, Argentina;

²Laboratorio de Citología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

La relación entre la infección por el virus papiloma humano (HPV) de alto riesgo y el cáncer de cuello de útero ha sido bien demostrada. En la Argentina se observa una alta incidencia de esta patología y en consecuencia se estima una alta prevalencia de infección por

HPV. La técnica de *High Resolution Melting* (HRM) es un nuevo método de análisis que permite caracterizar productos de PCR en base a la longitud de la secuencia, el contenido de GC y la complementariedad de secuencia de ADN. El análisis por HRM se puede utilizar para determinar genotipos y especies de diferentes virus y bacterias.

El objetivo del presente trabajo fue identificar los genotipos de HPV asociados a casos de lesiones de cuello de útero utilizando las metodologías tradicionales de identificación de genotipos e incorporando la técnica de HRM. Se estudiaron 99 muestras ecto-endo cervicales de mujeres con alteraciones cito-histológicas compatibles con infección por HPV. La puesta a punto de la metodología se realizó analizando controles de los genotipos 6, 11, 16 y 18 de HPV mediante amplificación por PCR en tiempo Real genérica y posterior análisis por HRM, presentando los diferentes genotipos patrones de HRM característicos. La genotipificación fue realizada por amplificación por PCR en tiempo Real del ADN extraído de las muestras con los *primers* genéricos My9-11 y/o GP5-GP6 con posterior análisis por HRM y secuenciación. Aquellas muestras con patrones de *melting* característicos de los genotipos 6, 11, 16 y 18 fueron estudiadas por reacciones de PCR genotipo específicas. Aquellas cuyos patrones de HRM se correspondieron con los genotipos 6, 11, 18 y 16, fueron confirmadas por secuenciación.

De las 99 pacientes estudiadas 95 resultaron positivas para HPV, detectándose 19 genotipos diferentes. Un 38,9% de las muestras resultaron genotipos de bajo riesgo, un 33,6 % de alto riesgo y un 8,4% genotipos de probable alto riesgo. Correspondiendo la mayor frecuencia a HPV-6 (21,78%), seguido por HPV11 (9,9%), HPV 31, 58 (11,88%), HPV 56, 83, 66 (8,91%), HPV 53, 62 de probable alto riesgo (7,92%), HPV 16, 18 (4,95%) y HPV 84, 61, 81 (4,95%). Un 15,8% de las muestras fueron positivas no genotipificables.

La inclusión de la técnica de HRM como método de *screening* permite agilizar el diagnóstico de genotipos de HPV, dado que en los casos de muestras con patrones de *melting* correspondientes a los genotipos 6, 11,16 y 18, se podría efectuar directamente la PCR

específica sin necesidad de llevar a cabo una secuenciación.

Los resultados demuestran que los genotipos de alto riesgo HPV 16 y 18, de mayor prevalencia a nivel mundial, no son los más prevalentes en la población de Mar del Plata. Adicionalmente, otros genotipos de alto riesgo como HPV 31 y 58, como algunos genotipos de probable alto riesgo (HPV 53, 62) también están presentes en nuestra población, lo que podría constituir un rasgo epidemiológico de importancia regional y ser de utilidad en el futuro en los programas de vacunación.

41- Asociación entre el virus de papiloma humano y agentes causantes de vaginosis bacteriana

Mendoza, LP¹; Mongelos P¹; Paez, M¹; Castro, A¹; Rodriguez-Riveros, I¹; Gimenez, G¹; Araujo, P¹; Echagüe, G¹; Diaz, V¹; Laspina, F¹; Castro, W¹; Jimenez, R¹; Marecos, R²; Ever, S²; Deluca, G³; Picconi, MA⁴.

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay; ²Hospital Regional de Villa Hayes, Ministerio de Salud Pública, Presidente Hayes, Paraguay; ³Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina; ⁴Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS "Dr. Malbrán", Buenos Aires, Argentina.

Introducción: La incidencia de cáncer de cuello uterino en Paraguay se encuentra entre las más elevadas a nivel mundial, siendo el virus de papiloma humano (VPH) un factor necesario para el desarrollo de este cáncer. El conocimiento sobre la frecuencia de VPH, de agentes causantes de vaginosis bacteriana y su asociación es limitado. El objetivo de este estudio analítico de corte transversal fue determinar si existe asociación entre infección por VPH y agentes causantes de vaginosis bacteriana. Metodología: Este estudio incluyó 181 mujeres sexualmente activas con diagnóstico citológico normal. Las mismas pertenecieron a las siguientes etnias: Maká (n=40); Nivaclé (n=23); Sanapaná (n=33); Enxet Sur (n=51) y Toba-Qom (n=34). La detección de VPH y agentes causantes de vaginosis bacteriana fue por métodos moleculares (para *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*) y por tinción de gram y/o cultivo

(para *Gardnerella vaginalis*, *Candida sp*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*). Resultados: Del total de mujeres incluidas se observó un 23,2% de resultados positivos para VPH; 10,5% *Trichomonas vaginalis*; 9,9% *Chlamydia trachomatis*; 45,9% *Gardnerella vaginalis*; 30,9% *Mycoplasma hominis*; 20,4% *Ureaplasma urealyticum*; 7,2% *Candida sp*. No fueron detectados casos de infecciones por *Neisseria gonorrhoeae*. Además, se observó una asociación estadísticamente significativa entre VPH y *Chlamydia trachomatis* (p = 0.004). Conclusión: Este estudio multidisciplinario sugiere que es importante implementar programas de detección de VPH y *Chlamydia trachomatis* a fin de incrementar el número de casos diagnosticados especialmente en poblaciones con poco acceso a centros de salud.

42- Estudio de infección por el virus Epstein Barr (EBV) en pacientes pediátricos portadores

Vistarop, A¹; Cohen, M¹; De Matteo, E²; Preciado, MV¹; Chabay, PA¹.

¹Laboratorio de Biología Molecular, División Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; ²División Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

Introducción: En Argentina la primoinfección por EBV ocurre en niños pequeños (1-5 años), usualmente en forma subclínica. En ocasiones el virus puede transformar al linfocito B (LB), su célula blanco, y desarrollar linfomas. En la infección primaria las amígdalas son el sitio de ingreso del EBV donde accede a los LB. Luego establece una infección latente en LB memoria, aunque no se conoce cómo accede a ellos. Existen dos hipótesis estudiadas en pacientes adultos: 1) infecta directamente LB memoria interfoliculares sin pasar por el centro germinal (CG) y 2) infecta LB naive, transita el CG expresando antígenos virales en forma diferencial y madura a LB memoria.

Objetivo: Caracterizar los primeros eventos de la infección por EBV en pacientes pediátricos.

Metodología: Se estudiaron 90 niños: 40 de 1-5 años (primoinfectados y portadores recientes); 32 de 6-10 años (portadores recientes); 18 de 11-15 años (portadores intermedios). A partir de cortes de biopsias de amígdalas fijadas en formol e incluidas en parafina se determinó la

presencia de EBV por PCR para el genoma viral, los transcriptos EBERs por hibridación in situ (HIS) y las proteínas virales LMP1 y LMP2A por inmunohistoquímica.

Resultados: 29/90 (32%) casos fueron positivos para el genoma viral (PCR) y 24/90 (27%) expresaban los transcriptos EBERs (HIS), con predominio en el grupo de 1-5 años (58%, 14/24 EBERs+). La localización histológica de las células EBERs+ se observó en la zona interfolicular en 17 casos, en CG en 2 y en ambas zonas en 5 (71%, 8% y 21% de los 24 casos EBERs+ respectivamente). Al analizar los diferentes grupos etarios, no se encontraron diferencias significativas respecto a la asociación con EBV ni a su localización histológica ($p > 0.05$). El 96% de los casos EBERs+ presentaron marcación LMP1+ exclusivamente en zona interfolicular. El 67% de los casos EBERs+, fue negativo para LMP2A, mientras que el 33% tuvieron escasas células positivas en diferentes zonas de la amígdala.

Conclusiones: Este trabajo es uno de los primeros en indagar estadios tempranos de la infección por EBV en pacientes pediátricos. Respecto a las hipótesis planteadas de primoinfección viral, nuestros resultados preliminares indican infección prevalentemente en región interfolicular, como propone la teoría de infección directa de LB memoria, pero con expresión diferencial de antígenos de latencia, como propone la teoría de tránsito por CG, ambas basadas en estudios en adultos. Cabe destacar que un gran porcentaje de pacientes pediátricos expresan LMP1, la principal proteína oncogénica viral, dato que, sumado a resultados previos de nuestro grupo acerca de infección por EBV en pacientes de corta edad, indica que el virus podría estar relacionado con el desarrollo de linfomas como una complicación tardía de la primoinfección. Para dilucidar la ontogenia específica de la célula blanco, resta caracterizar el tipo de célula infectada por doble marcación para antígenos virales y proteínas de diferenciación de LB.

43- Evaluación del tropismo del HIV-1 presente en provirus por métodos genotípicos en niños HIV(+) durante la primoinfección

Golemba, M; Aulicino, P; Mangano, A; Sen, L.
Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus del Hospital de Pediatría "JP Garrahan".

Una nueva familia de fármacos para el tratamiento de la infección por HIV-1 son los antagonistas de CCR5, que son efectivos para las variantes con tropismo R5. Por ello, para que este tratamiento resulte eficaz, es indispensable establecer la ausencia de variantes X4. Inicialmente, el tropismo viral se determinaba por métodos fenotípicos, pero resultan complejos, laboriosos y costosos. Una alternativa más económica, rápida y factible de realizar en un laboratorio de biología molecular son los ensayos genotípicos en virus libre (plasma) o provirus (CMT).

Los objetivos fueron: a) determinar el tropismo del HIV-1 por métodos genotípicos en niños infectados durante la primoinfección y b) evaluar si el estudio por triplicado aumenta la posibilidad de detectar variantes X4.

Se estudiaron muestras de provirus de 27 niños HIV(+) obtenidas durante la primoinfección previo a recibir tratamiento antirretroviral HAART. Se secuenció el *loop* V3 del gen env y se determinó el tropismo con distintos algoritmos. En 17 de los 27 pacientes se evaluó el tropismo por triplicado.

Para determinar el tropismo se utilizaron los algoritmos Geno2Pheno (G2P) y Position Specific Scoring Matrix (PSSM). El análisis con el G2P para detectar variantes X4 se realizó seleccionando diferentes grados de sensibilidad según porcentajes de FPR (*False Positive Rate*), donde un aumento en el grado de sensibilidad en la detección de variantes X4 produce una disminución en la especificidad. Para el análisis con el PSSM se utilizó la matriz X4/R5.

El análisis del G2P se evaluó con valores de FPR del 5,75%, 10% y 20%. De acuerdo al FPR del 5,75% se detectaron variantes X4 en el 11% (3/27) de los casos, con un FPR del 10% las variantes X4 se hallaron en un 18% (5/27) y con un FPR del 20% las variantes X4 aumentaron al 41% (11/27). Al comparar los resultados obtenidos con el G2P y con el PSSM, todos los R5 clasificados por el G2P también lo fueron por el PSSM, independientemente del valor FPR utilizado. Sin embargo, de los tres pacientes clasificados como X4 con un FPR del 5,75%, dos fueron X4 por el PSSM. De los cinco pacientes que fueron clasificados como X4 con un FPR del 10%, dos fueron X4 por el PSSM, y de los once clasificados como X4 con un FPR del 20%, dos

fueron X4 por el PSSM.

A pesar que el análisis por triplicado reveló que 4 de los 17 pacientes presentaron diferencias en sus secuencias entre las distintas réplicas, con un FPR del 5,75% y 10%, ninguno presentó cambio de tropismo. Sin embargo, con un FPR del 20% se detectó un sólo cambio de R5 a X4.

Los resultados preliminares obtenidos a partir de provirus de niños HIV+ durante la primoinfección muestran que la mayor discordancia se obtuvo cuando se utilizó un FPR del 20%. Además, las diferencias detectadas en el número de variantes X4 con distintos valores de FPR fueron mayores que las observadas entre las distintas replicas. Por otra parte, el análisis por triplicado no aumentó la sensibilidad para detectar variantes X4.

44- Cultivos organotípicos tipo raft: herramienta clave para el estudio de la biología de VPH y de los procesos neoplásicos asociados

Bugnon Valdano, MP¹; Cavatorta, AL¹; Marziali, F¹; Facciuto, F¹; Boccardo, E²; Gardiol, D¹.

¹Área Virología, IBR/CONICET, Fac. Cs. Bioq. y Farmacéuticas, UNR; ²Laboratorio de Oncovirología, ICB, Universidad de San Pablo.

Los papilomavirus humanos (VPH) infectan epitelios de una gran variedad de sitios anatómicos, y se clasifican como de bajo o alto riesgo, según las manifestaciones clínicas asociadas. La infección por VPH mucosotrópicos de alto riesgo es el evento clave en el desarrollo de los carcinomas de cuello de útero y de las lesiones neoplásicas precursoras. Los VPH infectan las células basales del epitelio estratificado y su ciclo de replicación está estrechamente coordinado con el programa de diferenciación de las células epiteliales, expresándose diferencialmente las distintas proteínas virales en los distintos estratos epiteliales. En nuestro laboratorio nos hemos abocado al estudio de la interferencia de las oncoproteínas de VPH con proteínas celulares involucradas en la transmisión de señales y en el mantenimiento de la polaridad celular, clave para la funcionalidad de los epitelios y cuya pérdida se asocia a la progresión de tumores. Sin embargo, dada la mencionada dependencia de la diferenciación del tejido infectado por parte de VPH, resulta imposible comprender los

mecanismos moleculares asociados a la infección por dichos virus en un cultivo celular tradicional. En el presente trabajo desarrollamos cultivos epiteliales organotípicos tipo *raft*, los cuales reproducen fielmente el proceso de diferenciación epitelial in vitro. Para el desarrollo de los mencionados cultivos *raft*, queratinocitos primarios humanos comerciales se cultivaron permitiendo que dichas células proliferen y se diferencien totalmente, ordenándose en forma estratificada, en forma similar a los tejidos epiteliales escamosos. A su vez, dado que nuestro fin último es el estudio de la acción de las oncoproteínas virales sobre sus respectivos blancos celulares, obtuvimos cultivos *raft* con queratinocitos expresando, a partir de vectores retrovirales, las proteínas E6 y E7 de VPH de alto riesgo, como así también de bajo riesgo oncogénico. Las características morfológicas tisulares se analizaron en los tejidos obtenidos, encontrándose que únicamente ante la coexpresión de las proteínas E6 y E7 de VPH de alto riesgo, dichas características diferían de las que se observan para un epitelio normal. Así, ante la coexpresión de las oncoproteínas se observaron características de hiperproliferación, lo que no fue observado, como era esperado, en el caso del VPH de bajo riesgo oncogénico, habiéndose podido recrear en parte lo que ocurre ante un proceso carcinogénico in vivo. La expresión de E6 de VPH se confirmó en todos los casos tanto a nivel de los transcritos por RT-PCR, como proteico mediante tecnología de *Western Blot*; mientras que confirmamos la expresión de los transcritos correspondientes a E7 para cada tipo viral. En conclusión, la metodología aquí presentada nos permitirá validar y profundizar nuestros estudios de los mecanismos por los que las oncoproteínas de VPH interfieren con sus blancos celulares, particularmente aquellos asociados a la polaridad.

45- El Virus Herpes Simplex Tipo 1 induce fragmentación del Aparato de Golgi Neuronal vía activación de la quinasa Src

Martin, CE¹; Arancibia, YV¹; Hott, MV¹; Mardones, G²; Otth, C¹.

¹Instituto de Microbiología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile; ²Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina,

Universidad Austral de Chile, Chile.

El herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1) es un agente de carácter ubicuo, neurotrópico, capaz de establecer una infección persistente latente y causa común de Encefalitis aguda no epidémica. En los últimos años, se ha propuesto como posible factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades neurológicas, ya que afecta estructuras límbicas y podría estar implicado en la inducción de eventos neuropatológicos reiterados que afecten la memoria y procesos cognitivos. En este sentido, estudios evidencian activación de quinasas localizadas en la cara citoplasmática del Complejo de Golgi (CG) - implicadas en procesos de vesiculación dependiente de la proteína dinamina - y alteración de la dinámica del CG durante infección epitelial con HSV-1. Sin embargo, se desconoce el efecto que pueda tener el virus sobre el complejo de Golgi neuronal y en particular sobre el transporte vesicular axonal. El objetivo de este estudio fue determinar si el HSV-1 activa la vía de señalización dependiente de la proteína quinasa Src, afectando la estructura y dinámica del CG. Mediante Western blot e Inmunofluorescencia observamos que la infección neuronal por HSV-1 gatilla la activación de la quinasa Src al fosforilar su residuo Tyr 416 en etapas tempranas de infección y posteriormente ocurre fragmentación y dispersión de las pilas del Complejo de Golgi a las 8 h.p.i. Nuestros hallazgos, sugieren que durante la infección neuronal por HSV-1 se desencadenan eventos de señalización intracelular que logran afectar la estructura e integridad del CG, pudiendo incidir en el transporte exocítico y funcionalidad neuronal. Agradecimientos a: FONDECYT 1120464, CONICYT 24121539.

46- Efecto de la infección con HSV-1 sobre la distribución intracelular de nuevos derivados liposolubles de la fluoresceína

Dávola, ME^{1,2}; Amado, M¹; Alché, LE¹; Ramírez, JA²; Barquero AA¹.

¹Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica e IQUIBICEN (CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales), Universidad de Buenos Aires, Argentina; ²Departamento de Química Orgánica y UMYMFOR (CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales), Universidad de Buenos Aires, Argentina.

La búsqueda de compuestos capaces de marcar la membrana plasmática y/o el sistema de endomembranas celulares se ha convertido en un foco de atención en los últimos años por su amplia variedad de aplicaciones, tales como estudios de migración, adhesión y fusión celular, ensayos de translocación, dinámicas de proteínas y en el caso particular de los virus para estudiar los procesos de entrada, desnudamiento, ensamblaje y brotación. Recientemente, hemos sintetizado novedosos derivados de fluoresceína con largas cadenas carbonadas liposolubles empleando una de las reacciones multicomponentes más versátiles, la reacción Ugi de cuatro componentes (U-4CR), que se basa en la reactividad excepcional del grupo funcional isocianuro. En el presente trabajo el objetivo fue analizar el efecto de la infección con HSV-1 sobre la distribución intracelular de los nuevos derivados sintéticos liposolubles de la fluoresceína. Para ello se estudió la citotoxicidad de los compuestos sobre células A549 a través del ensayo de cristal violeta, concomitantemente con su evaluación sobre la replicación del virus HSV-1 mediante la cuantificación del rendimiento viral luego de distintos esquemas de tratamiento. Finalmente, por microscopía de fluorescencia se analizó la capacidad de los compuestos de marcar membranas celulares y su distribución en células infectadas con HSV-1. Los resultados obtenidos mostraron que los derivados de la fluoresceína (denominados U-FLUO 2, 1B y 5B) no afectaron la viabilidad celular luego de 24hs de tratamiento con concentraciones de hasta 100µM. En relación a la multiplicación viral, el compuesto U-FLUO 2 disminuye el título viral con los tres esquemas de tratamiento ensayados, mientras que U-FLUO 1B y 5B aumentan la replicación viral o no la afectan dependiendo del tipo de tratamiento. Las imágenes de las células A549 tratadas con los derivados de fluoresceína a diferentes tiempos mostraron que éstos se encuentran distribuidos a través de la membrana plasmática y como estructuras granulares en el citoplasma, y su localización no varía con el tiempo. En las células infectadas con HSV-1, el patrón de fluorescencia de los compuestos U-FLUO 2 y 5B cambia considerablemente, se observan gránulos de

mayor tamaño e intensidad más concentrados alrededor del núcleo, al tiempo que la membrana plasmática también se marca mucho más. En conclusión, los nuevos derivados fluorescentes podrían ser de utilidad para seguir por microscopía en células vivas aquellos pasos de la multiplicación viral que involucran el sistema de endomembranas celulares.

SESIÓN 6

Martes 3/12 - Sala A: 9.00 - 11.00 hs

47- Influencia de la línea celular utilizada para la propagación del virus DENGUE tipo 2 sobre las etapas tempranas del ciclo de multiplicación viral

Piccini, LE¹; Acosta, EG²; Talarico, LB³; Castilla, V¹; Damonte, EB¹.

¹Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires - IQUIBICEN, CONICET; ²Departamento de Enfermedades Infecciosas, Virología Molecular, Universidad de Heidelberg, Alemania; ³Fundación INFANT, Buenos Aires, Argentina.

El virus del dengue (DENV), transmitido al hombre por los mosquitos del género *Aedes*, puede causar la fiebre del dengue o formas letales de la enfermedad. Actualmente no se dispone de vacunas ni de terapias antivirales y en este campo una estrategia interesante es el bloqueo de los pasos iniciales del ciclo viral. Se ha demostrado la dependencia del tipo celular a infectar y del serotipo viral en el mecanismo de entrada de DENV. En particular, DENV-2 entra a las células Vero por un mecanismo endocítico no clásico independiente de clatrina y caveolina, mientras que para infectar células de mosquito C6/36 utiliza la endocitosis mediada por clatrina. En la naturaleza DENV alterna ciclos de replicación entre células de mosquitos y humanas. Sin embargo, los laboratorios de investigación suelen producir los stocks virales en un único sistema celular. El objetivo de presente trabajo fue estudiar el efecto de la realización de diez pasajes seriados de DENV-2 en las células de mosquito C6/36 (M10), en las células de mamífero Vero (V10) y la alternancia en ambos tipos celulares (M5V5), sobre la entrada del virus a células Vero y analizar sus

implicancias en la susceptibilidad a carragenanos con actividad antiviral que inhiben la adsorción e internalización de DENV.

La participación de la endocitosis mediada por clatrina en la entrada a células Vero se estudió utilizando el inhibidor farmacológico clorpromazina y mediante la sobreexpresión de una mutante dominante negativa de la proteína Eps15. Luego de cuatro pasajes en células Vero el mecanismo de entrada del virus pasó a ser dependiente de clatrina, mientras que en M10 no se detectó alteración en la vía de entrada a la célula. En el caso de los pasajes alternados se observaron ciclos de susceptibilidad y de resistencia a la clorpromazina. El cambio en el modo de entrada no se relacionó con modificaciones en la glicoproteína E de envoltura, ya que no se encontraron mutaciones en V10 ni M5V5 y sólo M10, variante sin alteración en el mecanismo de entrada, presentó el cambio aminoacídico Q200R.

Se evaluó la susceptibilidad de los pasajes frente a los carragenanos lambda e iota mediante un ensayo de reducción en el número de placas en células Vero. Ambos carragenanos mostraron potente actividad antiviral sobre el virus parental y M10. Por el contrario, la efectividad de los polisacáridos fue mucho menor contra M5V5 y V10, presentando ambas poblaciones virales resistencia antiviral frente a estos compuestos que afectan la entrada de DENV-2 a células Vero.

En conclusión el pasaje seriado de DENV-2 en células Vero conllevó un cambio en la vía de entrada del virus, pasando de un mecanismo endocítico no clásico a uno dependiente de clatrina. Éste fenómeno tiene implicancias en el ensayo de la efectividad de compuestos antivirales que afectan etapas tempranas del ciclo viral, ya que los pasajes en distintos tipos de célula huésped pueden alterar la susceptibilidad del virus a dichos agentes.

48- Mecanismos de entrada del virus Tacaribe en distintas líneas celulares

Roldán, J; Forlenza, MB; Candurra, NA.

Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN, FCEyN, UBA.

El virus Tacaribe (TCRV) es un arenavirus no patógeno perteneciente al grupo B en el cual se

encuentran virus causantes de fiebres hemorrágicas, como Junín (JUNV). Son virus envueltos con un genoma ARN simple cadena, segmentado y ambisentido. Se conoce que el receptor utilizado para ingresar a la célula por los arenavirus de este grupo es el de transferrina de la especie reservorio correspondiente. Sin embargo, aquellos virus capaces de causar fiebres hemorrágicas también utilizan el receptor de transferrina humano (hTfR1). Para estudiar el mecanismo por el cual TCRV ingresa a la célula, se realizaron ensayos en líneas celulares que expresan diferencialmente el TfR1: células CHO provienen de ovario de hámster, células TRVb, derivadas de las CHO que carecen de receptor de transferrina y las TRVb1 que expresan el hTfR1. Dichas células fueron tratadas con distintas concentraciones de cloruro de amonio y concanamina A (ConA); drogas que basifican los lisosomas, dansilcadaverina (DC) y clorpromacina (CZ); bloqueantes de la vía endocítica mediada por clatrina, metil- β -ciclodextrina (M β CD) y nistatina (NT); inhibidores de la entrada dependiente de colesterol; y con dynasore (DYN) que inhibe la endocitosis dependiente de la proteína dinamina-2. Luego del pre-tratamiento con dichas drogas, las mismas fueron infectadas con TCRV (m.i.= 0,2). Los sobrenadantes se utilizaron para cuantificar la producción viral y el porcentaje de células infectadas se determinó por inmunofluorescencia. Como controles se utilizó toxina colérica e infecciones con JUNV. Previo a dichos tratamientos, se comprobó que las concentraciones utilizadas de los compuestos no fueran citotóxicas mediante la técnica de MTS. Tanto el cloruro de amonio como la ConA produjeron una inhibición de la producción viral y del porcentaje de células infectadas en todas las líneas (50-90%). En las células CHO y TRVb pre-tratadas con NT o M β CD no se observó diferencia ni en la producción viral ni en el porcentaje de células infectadas respecto al control, mientras que en las TRVb1 la M β CD disminuyó ambos parámetros en un 70% aproximadamente. El tratamiento con CZ y DC disminuyó tanto la producción viral como el porcentaje de células infectadas en las CHO y TRVb pero en las TRVb1 solo la DC produjo una disminución del 70% aproximadamente. Por otro lado, las tres líneas celulares pre-tratadas

con DYN presentaron un 80% de disminución en ambos parámetros. Los resultados obtenidos nos permiten postular que TCRV utilizaría distintas vías de entrada. En células que no expresan el hTfR1, el virus ingresaría preferentemente por la vía endocítica mediada por clatrina mientras que en células que expresan dicho receptor, la principal vía utilizada aún no se pudo determinar, si bien en las tres líneas ensayadas, la entrada sería dependiente de la proteína dinamina-2 y del pH. Estos resultados están siendo comprobados con construcciones dominantes negativas para las distintas vías endocíticas.

49- Entrada de JUNV a células murinas 3T3 que expresan establemente el receptor humano DC-SIGN

Forlenza, MB¹; Roldán, JS¹; Martínez, MG²; García, CC¹; Cordo, SM¹; Candurra, NA¹.

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, IQUBICEN- CONICET, CABA, Argentina; ²Albert Einstein School of Medicine, Department of Cell Biology, New York, USA.

El virus Junín (JUNV), agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina, utiliza el receptor de transferrina humano para infectar a la célula hospedadora. Estudios previos demostraron que la presencia de proteínas altamente glicosiladas en la envoltura permite el reconocimiento y la internalización del virus por DC-SIGN (dendritic cell- specific ICAM-3 grabbing non- integrin). Esta lectina de tipo C se encuentra presente principalmente en células dendríticas. Distintos mecanismos de endocitosis son utilizados en las infecciones virales: en la vía mediada por clatrina, cuando el virus interacciona con el receptor las moléculas de clatrina lo hacen con las proteínas Eps15 y AP-2 y finalmente se ensambla una GTPasa dinamina que produce la fisión de la vesícula. El tránsito interno involucra endosomas tempranos que se mueven hacia la zona perinuclear. Estos presentan la proteína Rab5 que permite el transporte de la vesícula hacia endosomas tardíos y los últimos presentan una proteína Rab7 que regula la interacción con lisosomas. Diversos estudios demuestran que la vía involucrada para la entrada de patógenos a través de esta lectina es la dependiente de clatrina. Además, varios trabajos demuestran

que la unión e internalización de HIV a DC-SGN depende de la organización de la misma en microdominios enriquecidos en colesterol. En estudios anteriores, se utilizaron tratamientos con los inhibidores farmacológicos para la endocitosis (dynasore), para la vía dependiente de clatrina (dansylcadaverina) y para las vías dependientes de colesterol (metil- β -ciclodextrina). En estos casos, tanto por los ensayos de producción viral por UFP como por inmunofluorescencia indirecta (IFI), se observó inhibición significativa de la entrada de JUNV. El objetivo de este trabajo fue continuar con ensayos que permitan determinar la vía endocítica utilizada por JUNV en células 3T3-DC-SIGN. En esta oportunidad, se utilizaron los compuestos cloruro de amonio y concanamina A como inhibidores de la endocitosis y clorpromazina para la vía dependiente de clatrina. En este caso, además de determinar el efecto sobre la entrada de JUNV por las técnicas de rendimiento viral e IFI a las 24 hs, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real a las 4 hs. En todos los casos, se observó inhibición entre 60 y 90% con respecto al control. Por otro lado, se realizaron transfecciones con construcciones salvajes y dominantes negativas para las proteínas EPS15, dinamina, Rab5 y Rab7. En estos ensayos se determinó por IFI la expresión de la nucleoproteína viral y se observó una inhibición entre el 70 y 90% para dinamina y Eps15, entre el 50 y 70% para Rab5 y no se observó inhibición de JUNV para Rab7. Los resultados obtenidos hasta el momento confirman que el mecanismo de entrada de JUNV en las células 3T3-DC-SIGN es la endocitosis en vesículas recubiertas por clatrina, con cierta dependencia de colesterol, y que utilizaría endosomas tempranos para el transporte citoplasmático.

50- Factores de restricción viral en la infección con virus Junín

Peña Cárcamo, J; Morell, L; Cordo, S; García, C.
Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires- IQUIBICEN, CONICET.

Las estrategias antivirales se centran hoy en la búsqueda de factores celulares de restricción viral. Estos factores forman parte de la

respuesta inmune innata y presentarían la ventaja de ser utilizados contra un amplio espectro de patógenos. Se sabe que el principal receptor de reconocimiento de patrones (PRR) que sensa la entrada de RNA viral de cadena simple en el citoplasma celular es la proteína RIG-I (gen 1 inducible por ácido retinoico). La activación de este PRR induce la producción de interferón (IFN), para finalmente inducir la síntesis de genes estimulados por IFN (ISGs), que actúan inhibiendo alguna de las etapas de la replicación de este tipo de patógenos. Viperina (VIP) es una proteína asociada a retículo cuya expresión es inducida por IFN y ya ha sido reportada como factor de restricción viral para virus como influenza y dengue. El virus Junín (JUNV) es el agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina, enfermedad aguda que comienza como una gripe vulgar y progresa hasta el deceso en 1 a 2 semanas en el 30% de los casos de pacientes infectados y sin tratar. El único tratamiento disponible es la administración de suero de convaleciente con el perjuicio de que el 10% de los tratados puede desarrollar complicaciones neurológicas. Los objetivos del trabajo fueron evaluar la respuesta de IFN y analizar el rol de VIP como posible factor celular de restricción durante la infección con JUNV en la línea celular A549. En primer lugar se analizó la activación de RIG-I frente a la infección con JUNV. Los resultados de PCR cuantitativa mostraron que efectivamente este sensor responde a la presencia del virus en la célula, siempre que este mantuviera su capacidad replicativa. Asimismo, se evaluaron los niveles relativos de mRNAs de otros efectores de esta vía de señalización, como TLR3, TLR7, MyD88, TRAF6, encontrándose todos significativamente aumentados durante la infección con JUNV. También se observó un aumento de IL-6, lo que confirmaría que este tipo de infecciones in vitro activan los ISGs. Luego, con el fin de caracterizar el rol antiviral de VIP en la infección con JUNV, se analizaron los niveles relativos de mRNAs de VIP, y se observó un aumento de estos mRNAs celulares estudiados tanto a las 24 como a las 48 h post infección (p.i.). Finalmente, se transfectaron células con siRNAs específicos para VIP, y luego se infectaron con JUNV, para evaluar el rendimiento viral a las 48 h p.i. Tanto las UFPs

encontradas, como los niveles relativos de mRNAs virales fueron 10 veces más abundantes en las células donde la expresión de VIP estaba reducida por los siRNAs. En conjunto estos resultados sugerirían un rol antiviral de VIP en la infección con JUNV. Nuestro próximo objetivo es evaluar si VIP estaría interactuando con alguna de las proteínas de JUNV para cumplir esta función o si es un efecto indirecto a través de la alteración de estructuras celulares que necesita JUNV para su replicación.

51- Estudio de la síntesis de interferón y respuesta a dicha citoquina en células A549 persistentemente infectadas con virus Junín

Cuervo, E; Scolaro, LA.

Laboratorio de Virología, Dpto. de Química. Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

El virus Junín (JUNV), causante de la fiebre hemorrágica argentina, es capaz de infectar cultivos celulares produciendo infecciones agudas y persistentes. Hemos caracterizado un cultivo de células A549 (adenocarcinoma humano) persistentemente infectadas con JUNV cepa XJCI3, denominadas A3. Las mismas, producen virus infeccioso a bajo título, no presentan efecto citopático y son resistentes a la sobreinfección con JUNV. Asimismo, las células A3 mostraron una deficiencia en la producción de interferón (IFN) frente a estímulos de sobreinfección, de transfección con liposomas o de estimulación con poly(I:C). Se vio anteriormente que la inducción de la expresión de RIG-I, receptor capaz de reconocer ARNdc, fue menor en estas células respecto de células A549 frente al estímulo con poly(I:C) (10 µg/ml) a nivel del mRNA y la proteína. Lo mismo se observó para el mensajero de IFNB. Para continuar con este estudio se analizaron los genes de Viperina y MDA5 (miembro de la familia de receptores tipo RIG-I). Para ambos genes se observó un aumento de su expresión frente al tratamiento con poly(I:C) para las células A549. En el caso de las A3, la inducción de Viperina fue menor y no se observó inducción para MDA5. Para el estímulo por infección con JUNV de las A549 el aumento registrado fue mayor que en el caso de la sobreinfección de las A3 con este virus. Frente a estos resultados se

realizó un ensayo de protección frente a la infección con virus de la estomatitis vesicular (VSV) en ambos tipos celulares estimulados con poly(I:C) o IFN α (4.10⁴ UI/ml). En el caso de las células A3, el tratamiento con poly(I:C) no redujo el número de UFP de VSV colocadas mientras que sí se redujo al tratar con IFN. En células A549, ambos tratamientos redujeron el número de UFP esperado. Se decidió entonces estudiar la expresión de RIG-I, frente al estímulo con IFN. Por western blott se observó un aumento de la expresión de esta proteína al tratar los cultivos celulares con IFN. Al estudiar la expresión de esta proteína por inmunofluorescencia, se observó que las células A549 presentaron un patrón difuso de fluorescencia citoplasmática que cambió a granulado al ser estimuladas con IFN o infectadas con JUNV. En todos los casos, las células A3 presentaron el patrón granulado que se intensificó al tratarlas con IFN y permaneció inalterado al sobreinfectarlas con JUNV. Para comprobar que las diferencias observadas entre las células A549 y las A3 fueran debidas a la presencia de JUNV en las células persistentes y no a algún tipo de selección a nivel genético sufrida por el cultivo, se realizó un clonado biológico evaluándose la respuesta frente a los diferentes estímulos de clones negativos, es decir no infectados, la cual fue comparable a la de las células A549. Estos resultados permiten concluir que la infección persistente de JUNV en células A549 modula negativamente la respuesta de IFN a nivel de su inducción pero no así a nivel de la susceptibilidad al mismo.

52- Importancia de las regiones no codificantes en la regulación de la traducción de los ARN mensajeros de arnavirus

Foscaldi, SA; D'Antuono, AL; López, NM.

Centro de Virología Animal (CEVAN)-Instituto de Ciencia y Tecnología "Dr. Cesar Milstein", CONICET.

El genoma de los arnavirus codifica para cuatro proteínas que se expresan a partir de ARN mensajeros (ARNm) subgenómicos. Estos ARNm poseen estructura Cap en su extremo 5' y contienen una región 3' no codificante, carente de poliA, cuya estructura secundaria predicha es muy estable. Usando como modelo de estudio al virus Tacaribe (TCRV), un arnavirus no

patógeno muy relacionado antigénica y genéticamente con el virus Junín, previamente estudiamos la participación de las regiones no codificantes (RNC) de los ARNm en su traducción. Para ello se generaron plásmidos portadores del marco abierto de lectura de la proteína reportera Firefly Luciferasa (FLUC) flanqueado por las RNC 5' y 3' salvajes o mutadas. A partir de los mismos, se crearon transcritos con las características de un ARNm viral o transcritos mutantes, respectivamente, mediante transcripción *in vitro* en presencia del análogo de Cap m7GpppA. Los ARNm sintéticos fueron transfectados en células eucariotas y la traducción del gen reportero fue evaluada mediante la determinación de la actividad de FLUC en los lisados celulares. Se observó que los niveles de actividad FLUC obtenidos para transcritos con delección parcial de las RNC 5' o 3' fueron de 3 a 5 veces menores que los medidos para el transcrito salvaje.

Para establecer si esos resultados reflejan diferencias en la eficiencia de traducción o son consecuencia de una relativa menor estabilidad de los ARNm mutantes, se analizó la variación de los niveles intracelulares de ARNm durante el tiempo experimental empleado. Para eso, los transcritos salvaje o mutantes fueron transfectados por triplicado en células eucariotas. Se extrajo ARN total al finalizar la transfección (tiempo CERO) y 4 horas más tarde, cuando se realizó la medición de actividad FLUC. Se generaron ADN copia con oligonucleótidos específicos para la amplificación posterior de un fragmento del gen blanco FLUC o del gen endógeno de referencia gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por medio de PCR en tiempo real. A partir de los valores obtenidos, se calculó la proporción R para cada transcrito, que representa la cantidad de ARNm blanco al final del experimento con respecto a su valor a tiempo CERO. Los resultados mostraron que el R de los transcritos mutantes fue similar al del transcrito salvaje, indicando que las diferencias de expresión de FLUC a partir de los mutantes no estarían dadas por una mayor inestabilidad de éstos respecto al ARNm salvaje. En conclusión, nuestros resultados apoyan la idea de que las RNC 5' y 3' poseen determinantes necesarios para la traducción eficiente de los ARNm de TCRV. La naturaleza de dichos

determinantes será definida mediante un nuevo grupo de transcritos mutantes, actualmente en construcción, en los que las RNC serán reemplazadas por secuencias no estructuradas o por motivos estructurales o funcionales específicos.

53- Vehiculización del dominio CD4 de la proteína VP6 de rotavirus en un sistema de generación de VLPs impulsado por la proteína Z del virus Junín

De Ganzo, AF¹; Borio, CS¹; Bilen, MF²; Collado, MS¹; Goñi SE¹; Argüelles, MH³; Glikmann, G³; Lozano, ME¹.

¹Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular (LIGBCM), Área de Virosis Emergentes y Zoonóticas (AVEZ), Instituto de Microbiología Básica y Aplicada (IMBA), DtoCyT, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina; ²Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular (LIGBCM), Área de Virosis de Insectos (AVI), Instituto de Microbiología Básica y Aplicada (IMBA), DtoCyT, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina; ³Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV), Instituto de Microbiología Básica y Aplicada (IMBA), DtoCyT, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina.

La proteína Z de los arenavirus presenta tres dominios principales: la región amino terminal contiene la señal para la modificación por miristoilación y anclaje a membrana; la región central en forma de dominio *Zinc Finger*; y la región carboxilo terminal en la cual se identificaron dominios tardíos (LD, *Late Domains*) altamente conservados en proteínas de matriz virales. Los LD poseen la capacidad de interactuar con componentes de la maquinaria celular de direccionamiento proteico vacuolar que median el tránsito endosomal (ESCRT-I, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport-1*) e iniciar el proceso de brotación viral. Esta capacidad de dirigir el proceso de brotación es autónoma incluso en ausencia de otras proteínas del virión, siendo útil para generar partículas tipo virales (VLPs, *Virus-Like Particles*). Las VLPs son de utilidad como herramienta biotecnológica debido a su estructura y morfología: están formadas por proteínas estructurales con capacidad de autoensamblarse e imitar la estructura viral, carecen de infectividad al no poseer genoma y

son capaces de brotar de manera autónoma. Asimismo, las VLPs derivadas de virus envueltos se presentan como una alternativa segura y eficiente para vehicular antígenos de naturaleza proteica. En trabajos previos en nuestro laboratorio se ha demostrado que la proteína Z del virus Junín fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP, *Green Fluorescent Protein*) conserva la capacidad de brotación autónoma en sistemas de expresión eucariota (mamíferos e insectos) y que las VLPs producidas estimulan una respuesta inmune en ratones desafiados. En este trabajo se ensayó la capacidad de Z del virus Junín de generar VLPs fusionada al antígeno CD4 de la proteína VP6 de rotavirus. Las construcciones diseñadas implican fusiones entre Z, CD4 y eGFP como proteína indicadora y se espera que las VLPs generadas contengan en su interior la proteína recombinante Z-CD4 o Z-CD4-eGF. Para evaluar la expresión e integridad de las VLPs en células HEK 293T/17, se realizaron ensayos de transfección transitoria seguido de inmunodetección con anticuerpos específicos y ensayos de protección a proteasas. Asimismo, mediante microscopía de fluorescencia, fue posible visualizar la expresión de Z-CD4-EGFP. Estos resultados confirmarían que la capacidad de la proteína Z de dirigir el proceso de brotación se conserva aún en fusiones proteicas que incluyen no solo eGFP sino también antígenos virales de reducido tamaño y, sumados a ensayos de inmunización exitosos en animales de laboratorio, permitirían iniciar el desarrollo de una herramienta biotecnológica para ensayar la vehiculización antígenos de importancia epidemiológica.

54- Genética reversa aplicada a la generación y caracterización de un virus de Influenza A de perdiz

Paredes Rojas, Y¹; Caldevilla, C¹; Matiello, R²; Mattion, N¹; Ibañez, L¹.

¹Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein, CONICET; ²Área de Medicina, Producción y Tecnología de Fauna Acuática y Terrestre. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

Introducción: En el año 2008 se aisló un virus de influenza H1N1 en perdices coloradas provenientes de la provincia de Buenos Aires.

Este virus denominado A/red-winged tinamou/Argentina/MP1/2008 fue secuenciado parcialmente y presenta interesantes características moleculares, las cuales no han sido estudiadas en profundidad. El sistema de genética reversa es ampliamente utilizado para el estudio de nuevas cepas de influenza. El más conocido se basa en el uso de 8 plásmidos obtenidos a partir del vector pHW2000, el cual permite clonar el cADN viral entre un promotor de la ARNpol I en un sentido y el de la ARNpol II en el sentido inverso, para obtener vARN y mARN desde el mismo templado. Además, por la estrategia de clonado aplicada, permiten trabajar con virus cuyas secuencias de genes son desconocidas.

Objetivos: El objetivo de este trabajo fue obtener los 8 segmentos del virus de perdiz mediante genética reversa con el fin de generar partículas virales infecciosas que puedan ser fácilmente caracterizadas a nivel molecular.

Materiales y Métodos: Para llevar a cabo este proyecto se puso a punto en el laboratorio la técnica de genética reversa basada en 8 plásmidos. El paso inicial fue retro-transcribir la información genética del virus utilizando un primer universal. Posteriormente se realizó una reacción de PCR utilizando primers que reconocen regiones dentro de las secuencias no codificantes del virus. Los fragmentos específicos obtenidos fueron usados como *megaprimers* en una segunda reacción de PCR. Dicha reacción fue posteriormente tratada con la enzima DpnI con el fin de eliminar las secuencias parentales que sirvieron de templado y finalmente fue transformada en bacterias DH5alfa. Las colonias obtenidas fueron analizadas con la enzima BglII para poder identificar colonias que contenían el inserto incorporado.

Resultados: Se puso a punto la reacción de retro-transcripción utilizando un buffer específico para secuencias ricas en GC y el primer universal uni12. La primera reacción de PCR dio como resultado los 8 fragmentos esperados, inclusive fragmentos de más de 2000 pares de bases correspondientes a las polimerasas virales. La reacción de PCR basada en *megaprimers* se realizó con éxito para el fragmento correspondiente a la HA viral, la cual luego del tratamiento con BglII dio como

resultado el patrón de restricción esperado. Actualmente se está avanzando en el clonado de los genes NS, NA, NP y M.

Conclusiones: Se puso a punto un sistema de genética reversa que permitirá caracterizar el genoma del virus de perdiz utilizando técnicas como mutagénesis dirigida o intercambio de segmentos genómicos. Hasta el momento se ha clonado el fragmento correspondiente a la HA. Se espera clonar los fragmentos restantes para poder generar virus infectivo, lo que permitirá avanzar con el objetivo de caracterizar molecularmente este patógeno aviario y obtener en un futuro antivirales que permitan la inhibición de la infección provocada por el mismo.

55- El Virus de la Bursitis Infecciosa Aviar utiliza la vía macropinocítica para su internalización celular

Delgui, LR^{1,2}; Giménez, MC³; Rodríguez, JF⁴; Colombo, MI¹.

¹IHEM, UNCuyo-CONICET, Mendoza, Argentina; ²ICB, UNCuyo, Mendoza, Argentina; ³UJAM, Mendoza, Argentina; ⁴CNB-CSIC, España.

El *Virus de la Bursitis Infecciosa Aviar* (IBDV) es un importante patógeno aviar integrante de la familia *Birnaviridae*, cuyo genoma está compuesto de ARN de doble cadena cubierto por una cápside proteica. Es el agente etiológico de una severa enfermedad inmunosupresora que produce una altísima mortalidad de las aves afectadas y graves pérdidas económicas en la industria avícola. Nuestro grupo de investigación está centrado en estudiar los aspectos celulares y moleculares de la interacción virus-célula, con especial énfasis en describir posibles nuevas formas de control de la patología aviar.

En el presente trabajo, nuestro objetivo ha comprendido la caracterización de la vía de internalización viral. Así, hemos abordado el estudio de la endocitosis como posible mecanismo involucrado en la infección por IBDV. Para ello, hemos empleado los siguientes inhibidores específicos: dynasore (inhibidor de dinamina), clorpromacina (inhibidor de endocitosis mediada por clatrina), metil- β -ciclodextrina y filipina III (inhibidores de la endocitosis mediada por colesterol), citocalacina D y latrunculina B (inhibidores de la

polimerización de actina), etilisopropilamiloride (inhibidor de macropinocitosis) y bafilomicina A1 (inhibidor de la acidificación intravesicular). Además, se empleó la sobreexpresión de proteínas mutantes: EGFP-DynK44A (mutante dominante negativa de dinamina), EGFP-Rab5S34N y EGFP-Rab7T22N (mutantes dominante negativas de Rab5 y Rab7, respectivamente). En todos los casos, el análisis de la internalización viral se realizó mediante la cuantificación de células infectadas por Microscopía confocal y la determinación de los niveles de proteína viral VP3 por la técnica de Western blot tras 12 horas de la infección con el virus. Hemos empleado, con fines comparativos, ligandos bien establecidos para cada una de las vías endocíticas analizadas: transferrina (endocitosis clatrina- y dinamina-dependiente), la subunidad B de la toxina colérica (vías colesterol- y caveolina-dependientes) y el dextrano (macropinocitosis). Además, con el fin de describir morfológicamente la entrada del virus, hemos realizado estudios ultraestructurales de la cinética de internalización viral.

Nuestros estudios indican que la internalización de IBDV ocurre de una manera clatrina-, caveolina-, colesterol- y dinamina-independiente. En cambio, IBDV utiliza una vía endocítica con características macropinocíticas evidenciado por: el tamaño de vesícula que contiene los viriones internalizados, el requerimiento de la integridad del citoesqueleto de actina y la funcionalidad del intercambiador de Na⁺/H⁺membranal. Luego de la internalización, las partículas virales transitan a través de endosomas tempranos marcados por Rab5, y requieren el pH bajo intravesicular, y una vía endocítica funcional para completar su ciclo de replicación.

En conjunto, nuestros resultados indican fuertemente que IBDV utiliza la vía macropinocítica como el principal mecanismo de internalización celular.

56- Estudios funcionales y de localización de la proteína VP5 del Virus de la Bursitis Infecciosa en células de ave

Carballeda, JM^{1,2}; Maroniche, G^{1,3}; Chimeno Zoth, SA^{1,2}; Lucero, MS^{1,2}; Gómez, E^{1,2}; Berinstein, A^{1,2}.

¹CONICET; ²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto de Biotecnología; ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola.

El virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), es responsable de una enfermedad aguda muy contagiosa que afecta pollos de más de 3 semanas y causa importantes pérdidas económicas a la industria avícola en todo el mundo, particularmente porque causa inmunosupresión, lo que deja susceptible al animal a sucesivas enfermedades. Es un virus desnudo, con genoma ARN de doble cadena bisegmentado, perteneciente a la familia *Birnaviridae*.

El virus posee 5 proteínas, VP2 y VP3 conforman la cápside, VP1 es una ARN polimerasa ARN dependiente y VP4, una proteasa autocatalítica. La proteína VP5 de IBDV es no estructural y se desconocía su existencia hasta hace algunos años. La función de VP5 es contradictoria en la bibliografía respecto a su capacidad para inducir o inhibir la apoptosis en células infectadas con el virus. Por otra parte, aunque fue demostrada su acumulación en la membrana plasmática en distintos tipos celulares, no se conoce la topología de la misma y se la ha encontrado también localizada en otros compartimentos subcelulares como las mitocondrias. VP5 posee un dominio hidrofóbico que fue propuesto como putativo dominio transmembrana.

En la reunión SAV 2012 mostramos, a través de un ensayo que consiste en la protección a la acción de una proteasa de VP5 fusionada a proteínas fluorescentes, que se trataría de una proteína asociada a la membrana y no de transmembrana como se había propuesto en la bibliografía ya que no expondría al espacio extracelular ni su dominio carboxilo ni el amino terminal. En este trabajo presentamos por una parte la confirmación de estos resultados utilizando proteínas de membrana fusionadas a proteínas fluorescentes que sí exponen dominio al espacio extracelular. De este modo pudimos confirmar que, en células aviares, VP5 se localiza en la membrana plasmática pero no la atraviesa. Por otra parte, un aspecto central del rol de VP5 es también su función en la apoptosis. Algunos

trabajos sugieren que se trataría de una proteína antiapoptótica, mientras que otros la apuntan como inductora de este proceso. De todos modos, es probable que VP5 muestre distintas funciones a lo largo del ciclo de infección viral. En ese sentido, estudiamos la expresión génica de distintas proteínas relacionadas a la apoptosis en células infectadas con IBDV o transfectadas con vectores de expresión de VP5. En particular, Caspasa 3 es activada durante la apoptosis y tiene un rol indispensable en este proceso. Utilizando qPCR estudiamos la expresión génica de Caspasa 3 a 24 y 48 horas después de la transfección con vectores de expresión eucariota que portan VP5 en el marco correcto y en células infectadas. Luego de confirmar la expresión de VP5, se observó una fuerte disminución en la expresión génica de Caspasa 3 en las células transfectadas. Este hecho no se observó en células infectadas con IBDV.

Los resultados obtenidos contribuyen a esclarecer el rol de una proteína importante para el desarrollo de la infección con IBDV.

SESIÓN 7

Martes 3/12 - Sala B: 9.00 - 11.00 hs

57- Importancia de la vigilancia ambiental en el monitoreo de virus transmitidos por agua: primera detección de Hepatitis E en Argentina

Martínez Wassaf, M^{1,3}; Barril, P²; Elbarcha, O^{1,3}; Nates, S²; Ré, V^{1,2}.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba; ²Instituto de Virología "Dr. J.M.Vanella", Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba; ³Área de Virología y Biología Molecular, LACE Laboratorios.

Durante los últimos años la actividad humana ha provocado la contaminación de los recursos hídricos en una magnitud sin precedentes relacionado entre otras causas con un manejo inadecuado de las aguas residuales. En este marco se ve favorecida la diseminación de virus entéricos en matrices acuosas superficiales provocando contaminación de espacios acuáticos destinados a recreación, constituyendo un riesgo de infección para la población expuesta. Dentro del grupo de

patógenos entéricos que pueden causar hepatitis encontramos al virus de la hepatitis E (HEV) responsable de provocar cuadros de hepatitis aguda similares a la hepatitis A pero con mayor gravedad en embarazadas, con una alta tasa de fallo hepático fulminante. El HEV se transmite por vía fecal-oral y es considerado una zoonosis, siendo detectado en casos de hepatitis agudas esporádicas y brotes epidémicos en áreas con condiciones higiénico-sanitarias deficientes. La aplicación de técnicas de biología molecular ha confirmado la contaminación de alimentos y del ambiente con virus entéricos y su detección en cloacas y cursos de agua urbanos permite la identificación de las cepas virales circulantes en la comunidad y su ambiente. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de HEV en muestras de cloacas y de agua del río que atraviesa la ciudad de Córdoba para aportar datos de la distribución local, diseminación, frecuencia y caracterización genética de las cepas circulantes. Para esto se tomaron muestras de aguas residuales mensualmente en los años 2007 y 2009 a 2011 del caño principal de entrada a la planta de tratamiento que recibe las descargas cloacales de aproximadamente el 61% de la población de la ciudad de Córdoba. Las muestras de agua de río fueron colectadas estacionalmente durante el año 2010 en ocho puntos de muestreo que cubre todo su recorrido a través de la ciudad, excepto en primavera donde uno de los puntos no pudo ser recolectado. La presencia de HEV se determinó utilizando RT-Nested PCR amplificando fragmentos del ORF-1 y ORF-2 y se estableció el genotipo viral circulante utilizando técnicas de secuenciación y análisis filogenético. HEV se detectó en un 6,3% de las muestras de aguas residuales (3/48: abril 2007, septiembre 2010 y marzo 2011) y en un 3,2% en las muestras de agua de río (1/31: primavera 2010). El análisis genético determinó que las cepas corresponden a genotipo 3, coincidentemente con otros estudios en humanos y cerdos en Argentina y países vecinos como Brasil y Uruguay. La detección del HEV en las muestras de aguas residuales indica su circulación en la población, constituyendo un potencial riesgo para los individuos susceptibles. La presencia de HEV en muestras ambientales, desconocido hasta ahora, es de gran

importancia y alerta a los sistemas de salud en el diagnóstico de casos de hepatitis agudas de causa desconocida. Este estudio demuestra las ventajas de la vigilancia ambiental como una nueva herramienta de monitoreo de virus entéricos.

58- Epidemiología molecular del virus Hepatitis E (HEV) en Uruguay

Mirazo, S¹; Ramos, N¹; D'Albora, C¹; Castro, G²; Mainardi, V³; Rocca, V³; Gerona, S³; Arbiza, J¹.

¹Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay; ²Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay; ³Servicio de Enfermedades Hepáticas, Hospital Central de las Fuerzas Armadas, Montevideo, Uruguay.

La infección por el virus Hepatitis E (HEV) es un importante problema de salud pública en regiones endémicas, causando grandes brotes epidémicos. Sin embargo, en los últimos años se ha reportado la ocurrencia de casos de hepatitis E esporádicos autóctonos en países industrializados y/o zonas no endémicas. Si bien el virus se trasmite fundamentalmente por la vía fecal-oral, la transmisión zoonótica desde reservorios animales también se ha sugerido y reportado. Las cepas humanas de HEV se clasifican en 4 genotipos, 1-4, los cuales a su vez se subclasifican en subtipos.

Los datos relativos a la caracterización molecular de los aislados de HEV detectados en Sudamérica aún es escaso. Recientemente hemos reportado la caracterización molecular de las primeras cepas aisladas de casos autóctonos de infección por HEV en Uruguay. El análisis molecular y la reconstrucción filogenética de la región hipervariable (HVR) viral y el gen de la cápside (ORF2) mostró que las cepas detectadas formaron un cluster dentro de genotipo 3 y estaban muy estrechamente relacionados con un conjunto de cepas de origen europeo, pero no presentaron similitud con los aislados de Sudamérica. Posteriores análisis realizados en base a una región de la metiltransferasa viral (dentro del ORF1) revelaron la co-circulación de los subtipos de 3h y 3i en nuestro país.

En este trabajo nos propusimos tres objetivos principales. Por un lado, continuar con la

detección de HEV en casos de hepatitis aguda con serología positiva como forma de monitorear la epidemiología molecular viral. Para ello, se investigó la presencia de ARN viral en suero y/o materia fecal en pacientes en fase aguda mediante dos sistemas de nested-RT-PCR. Esta metodología permitió identificar la primer cepa de genotipo 1, asociado a grandes brotes epidémicos en regiones endémicas, aislado de un caso autóctono de infección por HEV. El análisis molecular y la reconstrucción filogenética reveló una muy alta identidad nucleotídica con cepas epidémicas de India y con aislados Cubanos y Venezolanos reportados recientemente. Como segundo objetivo, nos abocamos a investigar la presencia de ARN de HEV en 180 muestras de cerdos domésticos y jabalíes, los dos principales reservorios de los genotipos 3 y 4, en establecimientos y poblaciones de todo el país. Mediante los sistemas de detección no se evidenció la presencia de cepas de genotipo 3 o 4 en ninguna de las muestras analizadas, sugiriendo que el riesgo de transmisión zoonótica de HEV en nuestro país es bajo. Sin embargo, en este análisis se detectó una cepa de genotipo 1 en una muestra de hígado de cerdo. Este caso posee un único antecedente reportado a nivel mundial, e implica un drástico cambio en la concepción de la virología de HEV. Como último objetivo, buscamos desarrollar un eficiente sistema para el aislamiento de cepas de HEV en cultivos celulares. Mediante el empleo de la línea celular A549 se optimizó un modelo para la infección y replicación de HEV in vitro.

59- Monitoreo ambiental de virus entéricos e indicadores microbiológicos de contaminación en aguas residuales y recreacionales en la Ciudad de Barros Blancos, Uruguay

Gillman, L¹; Pereira, M²; Alberti, A¹; D'Alessandro, B²; Betancourt, G¹; Acuña, A³; Marinof, N⁴; Berois, M¹.

¹Sección Virología-Facultad de Ciencias, Udelar;

²Servicio de Evaluación de la Calidad y Control Ambiental, Intendencia de Montevideo;

³Departamento de Parasitología y Micología-Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Udelar; ⁴Centro Uruguayo de Tecnologías Apropriadas (CEUTA).

Barros Blancos es una localidad de Canelones,

Uruguay cuya población de 31600 habitantes presenta un alto índice de pobreza e indigencia. Gran parte de las viviendas de la zona son irregulares y carecen en algunos casos de baños o son viviendas regulares que poseen pozos negros sin mantenimiento regular. En muchos casos los efluentes domésticos, tanto de humanos como de otros animales que habitan en o alrededor de las viviendas pueden transitar a la red de cunetas y así contaminan otros cuerpos de agua como pozos y cañadas del lugar. Por otro lado, los niños de la zona, que en estudios previos han mostrado altos niveles de parasitosis, utilizan habitualmente estos depósitos de agua como espacios de baño y recreación. Con el objetivo de evaluar las rutas de contaminación de microorganismos en la población se han establecido dieciséis puntos de muestreo que incluyen aguas de distintos orígenes: cunetas, pozos, cañadas y tajamares. Estos puntos fueron muestreados en el período setiembre 2011 a febrero 2012 bajo cuatro condiciones ambientales distintas, tomando en cuenta principalmente parámetros pluviométricos y de temperatura, a fin de comparar su efecto en la presencia viral y de los otros microorganismos evaluados.

En este marco nos planteamos como objetivo específico evidenciar la presencia de Rotavirus y Norovirus (genogrupos I y II) mediante PCR cuantitativa con sondas específicas y Picobirnavirus (genogrupos I y II) por PCR a tiempo final. Para esto, las partículas virales presentes en 50 mL de agua superficial fueron concentradas mediante sucesivas ultracentrifugaciones, su ARN genómico fue extraído y empleado como molde para síntesis del ADN copia con cebadores randómicos hexaméricos. Los resultados muestran que los niveles de detección para los tres virus son similares a los que nuestro grupo ha encontrado para aguas residuales. En cuanto a Norovirus, se observó una disminución del número de detecciones positivas como el de copias genómicas/mL asociado al aumento de la temperatura ambiente. Por otro lado los resultados muestran la prevalencia del genogrupo II con respecto al genogrupo I como ya ha sido notada en trabajos anteriores.

En aquellos puntos de muestreo en los cuales el riesgo de contaminación fecal esperado era alto

y que fue confirmado por indicadores bacterianos, se encontraron valores de copias genómicas/mL para Rotavirus que superaban en dos a tres órdenes el promedio de valores obtenidos.

En cinco muestras se observaron productos de PCR del tamaño esperado para Picobirnavirus, confirmando por secuenciación que tres de ellos pertenecen al genogrupo II.

Dado el pequeño volumen de agua analizado, que solo siete muestras fueran negativas para los tres virus estudiados y los altos niveles de contaminación fecal medido con indicadores bacterianos, entendemos que estas aguas constituyen un riesgo sanitario que pueden conducir a episodios de gastroenterocolitis en estas poblaciones vulnerables.

60- Vigilancia ambiental de rotavirus grupo A en aguas residuales de Córdoba: inferencia del patrón estacional de circulación

Barril, PA^{1,2}; Prez, VE¹; Martínez, LC¹; Giordano, MO¹; Masachessi, G^{1,2}; Isa, MB¹; Gil, PI¹; Ré, VE^{1,2,3}; Pavan, JV¹; Nates, SV¹.

¹Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; ²CONICET; ³Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba.

Las aguas cloacales son importantes nodos para monitorear los virus entéricos que circulan en la comunidad. La enfermedad por rotavirus presenta variaciones estacionales, siendo más frecuente en los meses de otoño e invierno, por lo que es de esperar que los niveles de rotavirus en las aguas residuales aumenten durante estos meses. Sin embargo, un estudio previo realizado en aguas residuales de la ciudad de Córdoba reveló una distribución uniforme de rotavirus a lo largo de un año de estudio. Para dilucidar el carácter estacional de rotavirus en nuestra comunidad, en el presente estudio se realizó un análisis cuantitativo de rotavirus en aguas cloacales, en relación con variables físicas ambientales, como temperatura y humedad. Durante el período Febrero 2009 y Diciembre 2011 se colectaron mensualmente aguas residuales de la planta depuradora de efluentes cloacales de la ciudad de Córdoba (n=35). Las muestras fueron concentradas 100X mediante centrifugación y precipitación con

polietilenglicol. Se realizó RT-heminested PCR para la detección y caracterización de los genes VP7/VP4 de rotavirus y PCR en tiempo real para la cuantificación viral. En 29 de las 35 muestras analizadas (82.8%) se detectó la presencia de rotavirus mediante RT-PCR convencional, sin observarse una distribución temporal de genotipos. Las variantes virales dominantes a lo largo de todo el período estudiado fueron G1 (32.2%) y P[8] (67.9%), seguidos de G2 (23.7%), G9 (22%) y P[4] (32.1%). Mediante PCR cuantitativa se detectó el genoma de rotavirus en 32 de las 35 muestras cloacales (91.4%), con concentraciones virales que variaron entre 2.2×10^2 copias de genoma/litro (cg/L) y 4.1×10^5 cg/L. Esta técnica permitió observar variaciones estacionales en la concentración media del virus, con cargas virales significativamente mayores en los meses de otoño e invierno ($P < 0,0001$). El análisis de la carga viral en aguas cloacales urbanas en relación a variables físicas ambientales, reveló una relación indirecta de la concentración de rotavirus y la temperatura (menor temperatura, mayor carga viral), mientras que no se observó relación entre la carga viral y la humedad relativa. La diseminación de rotavirus en el ambiente es compleja, y los factores climáticos por sí solos no pueden explicar completamente el patrón estacional de la infección por rotavirus. Probablemente rutas alternativas de transmisión, cambios en las conductas humanas y en la susceptibilidad del hospedador, alteraciones en la estabilidad y supervivencia del virus, y la interacción virus-hospedador, pueden en conjunto contribuir a la estacionalidad de rotavirus.

61- Detección y caracterización de poliomavirus humanos en muestras de agua en Argentina

Torres, C¹; Blanco Fernández, MD¹; Cisterna, D²; Mbayed, V¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires - CONICET, Argentina; ²Servicio de Neurovirosis, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Argentina.

Introducción

Los poliomavirus son virus pequeños con genoma de ADN circular doble cadena (4,8- 5,5 kpb). En los últimos años, a los ya conocidos

poliomavirus JC (JCPyV) y BK (BKPyV) se ha sumado la descripción de diez nuevos poliomavirus humanos, entre los que se encuentran el poliomavirus Merkel-Cell (MCPyV) y el Malawi (MWPyV). Estos virus establecerían infecciones persistentes y presentarían manifestaciones clínicas en poblaciones específicas, como individuos con inmunosupresión. De los recientemente descritos, hasta la fecha sólo el MCPyV ha sido asociado a una patología determinada (carcinoma de células de Merkel).

Objetivo

Detectar y caracterizar poliomavirus humanos (JCPyV, BKPyV, MCPyV, otros) a partir de muestras de agua provenientes del Río Matanza-Riachuelo durante el período 2005-2006.

Materiales y métodos

Las muestras de agua del Río Matanza-Riachuelo se obtuvieron en forma quincenal entre octubre de 2005 y febrero de 2006 (n=25), a partir de tres puntos de muestreo ubicados a la altura del Puente La Noria, Puente Uriburu y el Arroyo Cildañez. Las muestras se concentraron a partir de 2 litros de agua por el método de adsorción-elusión en membranas con carga negativa. La detección se realizó por PCRs genéricas y específicas dirigidas contra una región genética parcial codificante de las proteínas VP2/VP1. La caracterización se llevó a cabo por secuenciación directa y análisis filogenético.

Resultados

El 76,0 % de las muestras presentó al menos un poliomavirus humano, mientras que en el 20,0 % se detectó más de uno. La mayor frecuencia de detección se observó para MCPyV: 48,0 % (12/25), seguido por BKPyV: 40,0 % (10/25), JCPyV: 20,0 % (5/25), y el MWPyV: 4,0 % (1/25). La caracterización molecular del BKPyV indicó que todas las muestras pertenecerían al subtipo I, mientras que para el JCPyV se observó la presencia de al menos dos tipos virales. A su vez, algunas secuencias del virus MCPyV (únicas secuencias de este virus provenientes de Argentina) se encontraron entremezcladas entre aislamientos de distintos países, sin embargo, siete secuencias formaron un grupo monofilético y presentaron mutaciones no sinónimas en la VP1 no descritas previamente. Finalmente, la secuencia del MWPyV es la

primera secuencia de este virus de América del Sur.

Conclusiones

Este trabajo constituye una primera aproximación para el estudio de las características genéticas y evolutivas de los poliomavirus humanos que circulan en nuestro país. Se observó un alto nivel de detección y de diversidad viral, lo que involucró incluso la caracterización de virus no descritos previamente en Argentina.

La vigilancia ambiental constituye una herramienta importante para describir la epidemiología viral en población general, sobre todo de aquellos virus por cuyas infecciones no se consulta a un servicio asistencial de salud en forma rutinaria.

62- Comparación de secuencias virales y celulares obtenidas mediante Co-inmovilización en Membrana, Filtración Tangencial y Cultivo de Huéspedes Infectados

Manrique, JM; Jones, LR.

Laboratorio de Virología y Genética Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia "San Juan Bosco"; Trelew, Chubut, Argentina.

El tamizado e inmovilización de complejos virus-huésped mediante filtración por impacto, o Co-inmovilización en Membrana (MCI), es una estrategia relativamente nueva para el estudio de los virus del plancton. Una de las características más interesantes del método es la posibilidad de generar secuencias de potenciales hospedadores sin la necesidad de cultivar los mismos, ya que no existen protocolos de cultivo para la mayoría de los organismos planctónicos. La MCI ha sido aplicada exitosamente al estudio de virus de picoalgas (Virus Genes 45:316; ISME J 7:1678). Sin embargo, no se han realizado estudios que comparen los datos obtenidos mediante MCI con datos obtenidos mediante técnicas tradicionales. En el presente estudio, se compararon datos genéticos obtenidos mediante MCI con datos obtenidos mediante Filtración Tangencial (FT) y aislamiento de *Ostreococcus sp.* (Mamiellophyceae) infectados con *Ostreococcus Virus* genotipo 1. Se obtuvieron bibliotecas génicas del gen 18S y de

la polimerasa viral a partir de los virus y huéspedes obtenidos. Los análisis de las mismas, que incluyeron Parsimonia Estadística, análisis filogenéticos y Análisis de la Variancia Molecular (AMOVA), demostraron un alto grado de parentesco entre las secuencias virales y celulares obtenidas mediante estas tres técnicas, indicando que las mismas producen resultados equivalentes. Se observaron diferencias menores entre las secuencias virales obtenidas mediante FT y aislamiento de huéspedes infectados y entre las secuencias celulares generadas mediante aislamiento y MCI. La divergencia observada entre las células cultivadas y las obtenidas mediante MCI podría deberse a presiones selectivas impuestas por las condiciones de cultivo, mientras que el correlato observado para las correspondientes secuencias virales podría obedecer a un efecto tipo *hitchhiking* evolutivo.

63- Avances en el desarrollo de un producto de huevo en polvo para la prevención de la diarrea neonatal del ternero causada por Rotavirus y Coronavirus

Bok, M¹; Galarza, R²; Frank, F³; Vena, MM; Vega, C^{1,4}; Wigdorovitz, A^{1,4}; Parreño, V¹.

¹Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar; ²EEA INTA Rafaela; ³AproAgro S.A.; ⁴Bioinno (primer empresa público privada formada entre investigadores de INTA y Vetanco S.A.).

Rotavirus bovino grupo A (RVA) y Coronavirus (CoV) bovino son los agentes virales de mayor impacto en el síndrome de la Diarrea Neonatal del Ternero (DNT) la cual genera pérdidas económicas en las producciones bovinas de todo el país. Los terneros se infectan tempranamente luego de su nacimiento y la ausencia de la manifestación de la enfermedad depende de la presencia continua en el lumen intestinal de anticuerpos (Acs) neutralizantes homólogos adquiridos a través del calostro/leche y/o heterólogos administrados de manera pasiva en la leche. Estas dos estrategias se pueden complementar mediante la vacunación de las madres en el último tercio de la gestación con vacunas específicas y la suplementación de la dieta láctea del ternero con anticuerpos de yema de huevo (IgY). El objetivo de este desarrollo es obtener un producto efectivo

basado en polvo de huevo completo de gallinas ponedoras hiperinmunizadas con RVA y CoV bovino para ser utilizado como aditivo en la dieta láctea de terneros para la prevención de las diarreas causadas por estos agentes. Se inmunizaron 200 gallinas ponedoras con 4 dosis vía intramuscular de 0.5 ml de una vacuna polivalente conteniendo RVA bovino cepas IND G6P[5] y B223 G10P[11], CoV bovino cepas Mebus y Argentina-95 en adyuvante oleoso específico para aves. A partir de la detección de una óptima respuesta inmune a la vacunación, se inició la recolección de huevos e inmediato seca por spray. Se obtuvieron 13 lotes de polvo con un peso total de 311 Kg. Cada lote fue analizado microbiológicamente y composicionalmente. Los títulos de IgY anti RVA y CoV de cada lote fueron determinados en suspensiones de 10 mg de polvo de huevo/ml de PBS alcanzando títulos de Ac IgY de 16384 y 1024 respectivamente. A modo de ensayo piloto, en una guachera que presentaba circulación de RVA y CoV se probó la eficacia del polvo de huevo para tratar animales enfermos de diarrea con 40 g de polvo en 1.5 litros de leche fluida dos veces al día. Los terneros tratados resolvieron la diarrea en 3 días luego de iniciado el tratamiento. Por otro lado, se llevó a cabo un ensayo a campo en la guachera de la EEA INTA Rafaela en el cual se probaron terneros alimentados con 2 Litros dos veces al día con los siguientes tratamientos: 1) sustituto lácteo + 20 g de polvo de huevo, 2) sustituto lácteo, 3) leche del tambo + 20 g de polvo de huevo, 4) leche del tambo. Se tomaron muestras de materia fecal al día 0, 7, 14 y 21 post nacimiento. Se evaluaron parámetros como ganancia de peso, severidad de la diarrea, presencia de RVA y CoV. De los terneros que resultaron positivos a RVA, el 45% pertenecían al grupo 4, el 23% al grupo 3, el 18% al grupo 2, y el 14% al grupo 1. Todos los terneros resultaron negativos a CoV. La severidad de la diarrea fue mayor en los terneros controles (grupos 2 y 4). La ganancia de peso fue mayor en el grupo 1. Estos resultados preliminares indican que fue posible el escalado industrial de un producto eficaz para la prevención de la DNT.

64- La administración intranasal del vector viral MVA-gDs induce a nivel local y sistémico una

respuesta de anticuerpos anti-gD de BoHV-1

Esusy, MS¹; Zabal, O²; Calamante, G²; Del Medico Zajac, MP¹.

¹Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA; ²Instituto de Virología, CICVyA, INTA.

El virus vaccinia Ankara modificado (MVA) es una cepa altamente atenuada del virus vaccinia que posee grandes deleciones genéticas. Su uso como vehículo seguro (vector viral no replicativo) para la expresión de antígenos foráneos e inmunomoduladores está siendo evaluado en numerosos ensayos clínicos de vacunas contra el cáncer, malaria, tuberculosis y sida. El herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) es el agente causal de infecciones respiratorias y genitales y puede llevar a que se produzcan infecciones bacterianas secundarias. La infección con BoHV-1 está distribuida mundialmente, en Argentina, Brasil y Uruguay, la infección es endémica y la vacunación no es obligatoria. En este contexto, cobra gran importancia el desarrollo de vacunas seguras y eficaces contra BoHV-1, que además permitan diferenciar animales vacunados de infectados. Previamente, en nuestro laboratorio, se obtuvo el virus MVA-gDs que codifica para la versión secretada de la glicoproteína D de BoHV-1. La administración de MVA-gDs por vía intranasal en combinación con la toxina colérica como adyuvante, indujo anticuerpos IgA en lavados nasales y broncopulmonares, como también, anticuerpos IgG en suero.

El objetivo del presente trabajo es la evaluación de la respuesta humoral sistémica y de mucosas en ratones vacunados por vía intranasal con el vector MVA-gDs sin adyuvante.

Para ello se inmunizaron ratones BALB/c de 6 semanas de edad por vía intranasal con los virus purificados MVA-gDs o MVA no recombinante. La dosis fue de $1,5 \times 10^7$ UFP y se aplicaron dos dosis separadas 30 días. A los 14 días post revacunación, los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron los lavados nasales y broncopulmonares. Además, se tomaron muestras de suero los días de revacunación y sacrificio. Los niveles de anticuerpos fueron evaluados por ELISA.

Se observó que los animales del grupo inmunizado con MVA-gDs presentaron niveles de anticuerpos IgA específicos contra la

glicoproteína D significativamente mayores a los inducidos por el grupo inmunizado con MVA, tanto en lavados nasales como broncopulmonares ($p=0,0245$ y $p=0,0159$, respectivamente). En cuanto a los anticuerpos séricos, la inmunización con dos dosis de MVA-gDs indujo una respuesta específica significativamente mayor que la observada en el grupo vacunado con dos dosis de MVA o una dosis de MVA-gDs ($p=0,005$ y $p=0,0052$, respectivamente). Por último, con el propósito de analizar el perfil Th1/Th2 de la respuesta, se evaluaron los isotipos séricos IgG1 e IgG2a, obteniéndose un valor promedio del cociente IgG2a/IgG1 de 1,082.

Conclusión: La administración intranasal del inmunógeno MVA-gDs formulado sin adyuvante induce una respuesta humoral específica tanto sistémica como de mucosas.

65- Rol de la inmunidad de mucosas en ratones BALB/c inmunizados por vía intranasal con la glicoproteína D (gD) recombinante de herpesvirus equino-1 (EHV-1)

Fuentealba, NA^{1,4}; Zanuzzi, CN^{2,3,4}; Scrochi, MR^{1,2,4}; Bravi, ME^{1,6}; Sguazza, GH¹; Gimeno, EJ^{3,4}; Galosi, CM^{1,5}.

¹Cátedra de Virología; ²Cátedra de Histología y Embriología; ³Cátedra de Patología General/Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires; ⁴CCT- CONICET; ⁵Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires; ⁶Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

El EHV-1 causa sintomatología respiratoria, nerviosa, abortos y síndrome neonatal. La infección genera producción de anticuerpos con capacidad neutralizante de corta duración. La protección depende de la respuesta humoral y celular específica, y de la inmunidad de mucosas local, que representa la primera línea de defensa contra la infección. Las glicoproteínas virales que juegan un rol principal en la infectividad y virulencia, son el blanco principal del sistema inmune.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de IgA específica en el tracto respiratorio de ratones BALB/c inmunizados por vía intranasal (IN) con gD recombinante purificada.

Se utilizaron 4 grupos de ratonas BALB/c de 5 semanas de edad divididos de la siguiente manera: A) gD, vía IN y desafiados con EHV-1 AR8; B) gD, vía IN; C) vacuna comercial vía intramuscular (IM) y desafiados; D) no inmunizados y desafiados. Se realizaron 3 inmunizaciones con 15 días de intervalo. Todos los animales fueron sangrados por punción de la vena maxilar previo al desafío (~15 días de la 3ra inmunización) para determinar presencia de IgA por ELISA. Se sacrificaron animales de cada grupo a las 24-48-72-96 h y 5-10-20 días posdesafío (pd) y se sangraron a blanco con y sin heparina. Se realizó la detección de IgA a partir de: 1) suero; 2) lavados broncoalveolares; 3) sobrenadantes de cultivos de pulmón, tráquea y mucosa nasal evaluados al día 4 pos cultivo. Se realizó la técnica de aislamiento viral a partir de plasma rico en leucocitos y se tituló la infectividad en pulmón sobre cultivos de células RK13. En ambos casos se confirmó la presencia de virus por PCR.

Se detectó IgA en suero de los días 1, 2 y 3 pd en los dos grupos inmunizados con gD por vía IN (grupos A y B) y en el pool de suero obtenido antes del desafío, mientras que en los grupos C y D no se detectó. En los lavados broncoalveolares se detectó IgA en los grupos A y B al día 5 pd, mientras que en los grupos C y D la detección fue negativa.

Se detectó IgA en los sobrenadantes de cultivo de pulmón del grupo A hasta el día 5 pd y en el grupo B al día 3 pd, mientras que en los grupos C y D no se detectó. En el caso de los cultivos de tráquea se detectó IgA solamente en el grupo A del día 1 al 3 pd y en los cultivos de mucosa nasal en el grupo B al día 3 pd.

El virus fue aislado a partir de sangre de los animales de los grupos C y D a las 24 h pd. En el grupo A se recuperó virus de pulmón al día 1 pd a partir de la muestra pura en una de las cuatro replicas, mientras que en el grupo C se recuperó virus al día 1, 2 y 3 hasta la dilución 1/100 en dos de las 4 réplicas. En el grupo D (control de infección) se recuperó virus de pulmón hasta el día 5 pd.

Se concluye que la inmunización IN estimulo la inmunidad de mucosas con producción de IgA secretoria en el árbol respiratorio y la respuesta inmune sistémica, e impidió la viremia y la llegada del virus al pulmón contrariamente a la

inmunización IM con la vacuna comercial.

66- Evaluación de estrategias de vacunación antirrábica en Camélidos Sudamericanos

Ledesma, M¹; Errico, D¹; Micucci, M²; Pérez, O²; Calamante, G³; Zanetti, F³; Leoni, J¹; Ferrari, A¹.

¹Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU Conicet-UBA), Cátedra de Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica; ²Servicio Vacuna Antirrábica del ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"; ³Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA Castelar.

Introducción: la rabia es una zoonosis viral que afecta a la mayoría de los mamíferos. Su importancia en la Salud Pública radica en la alta letalidad que presenta, alcanzando al 100% de los enfermos. Durante 2012 se registraron 24 casos de rabia en alpacas en Bolivia, por lo que la susceptibilidad de la especie se encuentra descripta y sería importante contar con una estrategia de profilaxis para la prevención de brotes en el norte de nuestro país.

Objetivos: evaluar la efectividad de las distintas estrategias de vacunación contra la rabia en Camélidos Sudamericanos.

Metodología: se evaluaron tres generaciones de vacunas antirrábicas: de primera generación (virus amplificado en tejido nervioso de rata lactante e inactivado), de segunda generación (virus crecido en células BHK-21 e inactivado) y de tercera generación (virus canarypox recombinantes que expresan la glicoproteína del virus rábico). Se inocularon 0,5 ml, vía intramuscular en dos llamas por generación de vacunas. En las muestras de suero preinmune, 15 días, 2 y 5 meses post vacunación se evaluó la presencia de anticuerpos séricos totales y los isotipos IgG e IgM específicos por ELISA y/o Western Blot (WB). Para la muestra que mayor título se obtuvo, se realizó un ensayo de seroneutralización junto con el suero preinmune del mismo animal.

Resultados: la vacuna de tercera generación fue la única que aumentó significativamente los Ac totales (3,4 veces el valor de DO preinmune), siendo el isotipo respondedor IgG, estos Ac resultaron protectores en el ensayo de seroneutralización. Los sueros preinmunes mostraron valores altos de DO (de 0,4 a 0,9) siendo el isotipo de estos últimos IgG ó IgG e IgM, estos Ac no fueron protectores. El patrón

de bandas reactivas en el WB denota cambios entre los animales preinmunes y los inmunizados, incluso en aquellos donde el título no varía.

Conclusiones: la vacuna de tercera generación fue la única efectiva en término de aumento de Ac específicos, los cuales resultaron ser protectores contra la infección. Los valores altos de los sueros preinmunes podrían indicar que en esta especie animal existen Ac preformados que reconocen al virus pero no lo neutralizan in vivo. Los perfiles de bandas denotan el cambio del reconocimiento de los sueros preinmune e inmune. Estos ensayos preliminares constituyen el primer estudio de vacunación antirrábica en llamas en Argentina.

SESIÓN 8

Martes 3/12 - Sala A: 11.30 - 13.00 hs

67- Detección de virus Bunyamwera en equinos con síndrome neurológicos en la provincia de Santa Fe, Argentina

Tauro, LA¹; Lucca, E²; Marino, B³; Rivarola, ME¹; Albrieu Llinas, G¹; Mazzini, R⁴; Contigiani, MS¹.

¹Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología "Dr. J.M. Vanella" FCM-UNC; ²Cátedra de Enfermedades Infecciosas FCV-UNL; ³Cátedra de Microbiología FCV-UNL; ⁴Cátedra de Practicas Hospitalarias de Grandes Animales.

El virus Bunyamwera -BUNV- (Familia *Bunyaviridae*, Género *Orthobunyavirus*) incluye 27 cepas /aislamientos alrededor del mundo. En Argentina han sido recuperadas dos cepas de este virus, CbaAr-426 de mosquitos *Ochlerotatus albifasciatus* (Córdoba 1964-1965) y AG83-1746 de mosquitos *Psorophora varinervis* (Santa Fe, 1982). En EEUU la infección por este virus está asociada a la producción de malformaciones congénitas, abortos y enfermedad del Sistema Nervioso Central (SNC) tanto en humanos como en animales domésticos. Si bien diversas encuestas serológicas realizadas en Argentina han permitido la detección de elevadas prevalencias de infección para BUNV en humanos y animales domésticos y silvestres, solo hay antecedentes de enfermedad febril producida por este virus en humanos.

Durante el otoño del año 2013 en la provincia de Santa Fe se produjo la muerte de dos caballos

con síndrome neurológico, uno (Eq001) perteneciente a un campo ubicado en proximidades de la localidad de Esperanza (Departamento de Las Colonias) y otro (Eq002) en la localidad de Arrufo (Departamento de San Cristóbal). El análisis para los diferentes virus y bacterias causantes de enfermedad del SNC resultaron todos negativos. Conociendo que BUNV es un virus asociado a la producción de enfermedades neurológicas, este trabajo tuvo como objetivo detectar la infección por BUNV en los equinos muertos. A partir del cerebro, riñón, bazo e hígado de cada uno de los caballos muertos se prepararon homogenizados que fueron analizados por la técnica de RT-PCR genérica para *Orthobunyavirus* (251 pb del segmento S). Del cerebro del caballo Eq001 y del hígado y riñón del caballo Eq002 se amplificó el fragmento genómico esperado. El secuenciamiento y el posterior análisis filogenético realizado a partir del segmento S del genoma de los *Orthobunyavirus* mostro que las 2 secuencias resultaron ser idénticas entre si y agruparon dentro del serogrupo *Bunyamwera* con la cepa BeAr8226 (aislada en Brasil) de BUNV.

Simultáneamente se inocularon los homogenizados de cada uno de los órganos en monocapas de células de mosquitos C6/36 (*Aedes albopictus*) resultando positivos por RT-PCR genérica para *Orthobunyavirus* el segundo pasaje del cerebro del caballo Eq001 y del bazo del caballo Eq002. Estos hallazgos ponen en evidencia la circulación de BUNV en la provincia de Santa Fe durante el otoño del año 2013 y constituyen la primer evidencia de una posible asociación entre la infección por BUNV y síndrome neurológico en animales domésticos para Centro y Sudamérica. Por otra parte estos resultados remarcan la importancia de intensificar la vigilancia epidemiológica de BUNV para mejorar el diagnostico diferencial y así poder determinar el verdadero agente etiológico causante de enfermedad en animales domésticos teniendo en cuenta que en nuestro país circulan otros virus (virus West Nile), también asociados a la producción de síndrome neurológico en equinos.

68- Identificación molecular de virus ORF en lesiones vesiculares de cuatro ovinos de la

Provincia de Río Negro

Peralta, A¹; Calamante, G²; Robles, C³; König, G².
¹CONICET; ²Instituto de Biotecnología, INTA-Castelar;
³EEA-INTA Bariloche.

El Ectima Contagioso (EC) es una enfermedad zoonótica viral causada por el virus Orf (ORFV), de amplia distribución mundial que afecta principalmente a ovinos y caprinos. ORFV es un virus epiteliotrópico que genera lesiones en labios, nostrilas, mucosas orales y ubres de ovejas y cabras. Las lesiones en estas áreas son dolorosas y pueden producir anorexia e inanición, que producen menor rendimiento corporal en animales adultos y pueden conducir a la muerte a los corderos jóvenes. El diagnóstico de la infección se brinda a través de la observación del cuadro clínico, aislamiento viral a partir de las escaras y observación mediante microscopía electrónica. Sin embargo, el único método confiable y aceptado mundialmente es la detección del ADN viral mediante la amplificación de secuencias específicas utilizando la técnica de PCR.

La prevención de la enfermedad se realiza mediante vacunación con cepas atenuadas y es especialmente importante que las cepas utilizadas en las vacunas estén relacionadas con las circulantes. En nuestro país se comercializa una vacuna viva atenuada por pasajes en cultivos celulares de riñón de borrego, obtenida a partir de una cepa uruguaya. Sin embargo, teniendo en cuenta que en nuestro país no se realizó la identificación ni la caracterización de las cepas circulantes en los rodeos ovinos, se desconoce la relación filogenética entre la cepa vacunal utilizada y las cepas presentes en el campo, situación epidemiológica riesgosa para el estado sanitario de los planteles ovinos.

El objetivo general de este trabajo es la identificación y caracterización molecular del virus Orf causante del EC en ovinos y caprinos en Argentina.

A partir de 4 ovejas con cuadro clínico de EC, pertenecientes a un establecimiento en la zona cercana a Bariloche, se tomaron muestras de las lesiones y se conservaron refrigeradas hasta su llegada al laboratorio. Se analizaron distintos procedimientos para la extracción del ADN así como distintas condiciones para una reacción de amplificación por PCR basada en la detección de

una región del gen ORF045, secuencia altamente conservada entre todas las cepas depositadas en el Gene Bank. Se amplificaron fragmentos del tamaño esperado y sus identidades se confirmaron por secuenciación. Luego, en las mismas muestras se analizaron mediante amplificación por PCR los genes E2L y VIR que presentan variabilidad y permiten realizar un análisis filogenético de las cepas. Se obtuvieron amplicones de los tamaños esperados y se realizó la secuenciación de los mismos. Las secuencias obtenidas fueron comparadas entre sí y con cepas brasileras, únicas de Sudamérica depositadas en el Gene Bank.

En este trabajo se implementaron las condiciones para el diagnóstico molecular de EC mediante amplificación por PCR y se confirmó molecularmente la presencia de ORFV en los 4 ovinos con cuadro clínico de EC. En el futuro, se continuará la caracterización molecular de las cepas vacunales y circulantes en nuestro país.

69- Detección de anticuerpos contra Maedi Visna Virus en ovinos en la región Puna (Jujuy - Argentina)

Echazú, F¹; Porta, N²; Pinto, G²; Vega, C²; Abalos, M¹; Acuña, F¹.

¹EEA INTA Abra Pampa; ²Lab Ref EETs CICVyA INTA Castelar.

Introducción: Maedi/Visna está causada por un virus exógeno no oncogénico de la familia *Retroviridae*, subfamilia *Lentivirinae*, que causa una infección persistente en ovejas y cabras que se transmite por calostro y leche, menos frecuente por vía respiratoria, agujas y vía trasplacentaria. Es una enfermedad altamente fatal de los ovinos, la cual está caracterizada por inicio insidioso de lenta pero progresiva debilidad, disnea y que sólo una escasa proporción de los animales de más de 2-3 años de edad exhiben signos clínicos. El diagnóstico está basado en las lesiones, signos clínicos, resultados serológicos o un aislamiento viral; aunque en la actualidad tienen mayor importancia los procedimientos serológicos. Son comunes los casos mezclados de Maedi/Visna y Adenomatosis Pulmonar Ovina (APO). Esta enfermedad se encuentra incorporada en la Ley N° 3959 de denuncia obligatoria, interdicción preventiva ante la presencia de casos y acciones

profilácticas. El 80% de las cabras del mundo occidental están infectadas, mientras que en el tercer mundo solamente lo está un 10%. La Puna de Jujuy cuenta 349.963 cabezas de ovinos distribuidas 3.044 explotaciones agropecuarias en su mayoría de tipo familiares de campesinos de escasos recursos, donde este ganado tiene gran importancia. La majada de INTA Abra Pampa cuenta ovinos razas Corriedale (154), Merino (73) y Manchega (141) y tiene como antecedente el hallazgo de APO en 2008 (Marin et al. 2008) y estudio longitudinal de APO durante 2010 y 2011 (Spath et. al. 2012). Se presentan los resultados de un estudio transversal de detección de anticuerpos Maedi Visna Virus (MVV) realizado durante el 2012. Materiales y métodos: Se analizó el total de los ovinos existentes con un total de 373 muestras de animales de 2,5 a 6 años de edad de las tres razas existentes. Sobre los sueros obtenidos se realizó análisis duplicados de ELISA comercial para la detección de MMV en ovinos (IDEXX Laboratories, CheKit CAEV/MVV Screening). Resultados: Se detectó la presencia de anticuerpos anti MVV en al menos 37 (10%) de las muestras y se encontraron un total de 6 muestras con resultados dudosos que fueron analizadas dos veces para poder clarificar el resultado. Conclusiones: La enfermedad de Maedi Visna presenta escasa incidencia clínica y prevalencia de acuerdo al diagnóstico serológico; sin embargo es relevante en cuanto a la policía sanitaria e incumbencias en la ganadería ovina. La importancia del estudio radica en el hallazgo de una enfermedad nunca descrita en la zona en una especie de gran relevancia en la economía local. Es una limitante la imposibilidad de establecer estudios diagnósticos en productores de la zona, al igual que se hiciera en el caso de APO. En cuanto a la majada se plantea el interrogante de mantener los animales existentes en saneamiento o iniciar un nuevo plantel. Se plantea a futuro tratar de realizar el aislamiento viral.

70- Virus porcinos emergentes en Uruguay

Ramos, N¹; Cancela, F¹; Mirazo, S¹; Castro, G²; Arbiza, J¹.

¹Sección Virología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay; ²División Sanidad Animal. Ministerio de Ganadería Agricultura

y Pesca. Montevideo, Uruguay.

Las virosis emergentes de cerdos han resultado ser en los últimos años una de las principales preocupaciones de los productores y autoridades zoo-sanitarias, debido a los posibles efectos devastadores que ocasionan en la industria porcina, una actividad económica relevante de potencial crecimiento. El Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) es un ejemplo de virus emergente de gran impacto económico que provoca serias patologías en cerdos. Otros virus, como el Torque Teno Virus Porcino 1 y 2 (TTSuVs), si bien no constituyen un factor importante de preocupación para el sector productivo, revisten considerable interés por su posible impacto zoonótico y su eventual riesgo en potenciar el desarrollo de ciertas enfermedades del cerdo, en particular las asociadas a PCV2.

El objetivo principal de este trabajo fue identificar por primera vez en Uruguay la circulación de PCV2 y TTSuVs en cerdos pertenecientes a diferentes criaderos y caracterizar a nivel molecular las cepas detectadas.

Para ello, muestras de suero y órganos de animales asintomáticos y con sintomatología compatible con PCV2, recolectadas durante los años 2011-2013, fueron testeadas mediante PCR para evidenciar la presencia de ADN de ambos virus. A su vez, fueron amplificadas otras regiones del genoma viral que permitieron la caracterización molecular de las cepas identificadas, incluyendo el análisis de secuencias y la construcción de árboles filogenéticos.

Se han constatado casos de PCV2 durante los dos años de estudio y la caracterización molecular permitió identificar la circulación de cepas del genotipo PCV2b-1A, relacionadas estrechamente con cepas Brasileñas y del genotipo PCV2b-1C nunca antes reportadas en Sudamérica. Paralelamente, se pudo evidenciar una gran circulación de cepas recombinantes por primera vez en la región, probablemente de origen Europeo. En relación a TTSuV, se observó la presencia ubicua del virus en criaderos Uruguayos con prevalencias similares a las reportadas en otros países, observándose principalmente coinfecciones de ambas especies

virales. A su vez, la mayoría de los animales infectados con PCV2 resultaron coinfectados con al menos una de las especies de TTSuV, apoyando la hipótesis de la posible función de estos virus como cofactores en las enfermedades asociadas a PCV2.

Mientras que la investigación de PCV2 en nuestro país, promueve el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento, permitiendo generar respuestas más rápidas y eficaces; el estudio de TTSuV constituye una prueba más de una distribución global del virus que permite evaluar los efectos del comercio mundial en la heterogeneidad viral y cómo el movimiento de cerdos afecta a las poblaciones de virus y a su evolución.

Los escasos reportes de PCV2 y TTSuV en Sudamérica, constituyen un argumento importante para profundizar los estudios en estas virosis emergentes, aportando valiosísima información sobre su situación epidemiológica en un contexto regional.

71- Detección del Virus de alas deformadas (DWV) en polinizadores no convencionales

Reynaldi, FJ^{1,3}; Lucia, M²; Sguazza, GH¹; Galosi, CM^{1,4}; Pecoraro, MR¹.

¹Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; ²División Entomología, Museo de La Plata, Universidad Nacional de La Plata, CONICET; ³CCT-CONICET; ⁴Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires.

Las abejas son los principales polinizadores de las Angiospermas y constituyen el conjunto más diverso de los visitantes florales; de allí su importancia en ecosistemas, tanto naturales como agrícolas. El género *Xylocopa* (Hymenoptera: Apidae) comprende aproximadamente 470 especies de distribución cosmopolita, alcanzando su mayor diversidad en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Este grupo es comúnmente conocido con el nombre de "abejas carpinteras" debido a su preferencia por la madera como sustrato de nidificación. Sus nidos constan generalmente de un sistema de galerías conectadas con el exterior por medio de una entrada circular en las que construyen celdas de cría, cada una, aprovisionada con una masa de polen y néctar

sobre la cual la hembra deposita un único huevo. Cada celda es cerrada y aislada del exterior por medio de un tabique fabricado con una mezcla de aserrín y saliva. Debido al escaso conocimiento acerca de los patógenos que afectan a las especies del género *Xylocopa*, se propone determinar la presencia de agentes virales en los estados inmaduros y adulto de una especie de *Xylocopa* presente en la provincia de Buenos Aires. Se procesaron diez larvas y diez adultos de la especie *X. augusti* provenientes de nidos utilizados para estudios biológicos, con el fin de detectar la presencia de virus que comúnmente infectan a las abejas. Cada muestra (adulto o larva) fue macerada en bolsas tipo Stomacher con 1 ml de PBS y clarificada por centrifugación a 1500 g durante 15 min. El ARN total se extrajo a partir de 500 µl del sobrenadante usando Trizol y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total fue resuspendido en 50 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl (aproximadamente 3 µg) del mismo se utilizaron para la síntesis de ADN complementario con MMLV (Promega). Posteriormente, 2.5 µl del ADNc fueron utilizados en una reacción de 25µl conteniendo 2.5 U de Taq ADN-polimerasa (Promega), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP y 10 µM de cada cebador. Para la reacción de PCR, se realizó una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C; a continuación se realizaron 30 ciclos de 30 segundos cada uno a 94 °C, 60 °C y 72 °C. Luego se realizó una elongación final a 72 °C durante 10 min. El producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 2.5%. De todos los virus evaluados, solamente se detectó la presencia del virus de alas deformadas (DWV) en estados inmaduros. Fue hallado en cuatro de las diez larvas procesadas, sin embargo, no fue encontrado en muestras de adultos a pesar que tres de ellos presentaban signos de este virus. Los resultados evidencian la primera detección DWV en una especie de *Xylocopa* en Argentina. Debido a que la larva se cría en una celda aislada hasta que emerge como adulto, el único contacto con el medio ambiente durante su desarrollo, se da cuando la hembra aprovisiona la celda con polen y néctar. Por lo tanto, se podría plantear la hipótesis de que la hembra adquiere las partículas virales durante la búsqueda de alimento y las introduce al nido

infectando a la cría. La imposibilidad de detectar DWV en adultos con signos de este virus podría deberse a una infección aguda en la etapa larval que produce la deformación de las alas, seguido por una eliminación del virus en la etapa adulta. Se necesitan más estudios para comprender la forma de eliminación del virus de DWV en los adultos.

72- Diseño y expresión de antígenos recombinantes para uso preventivo de infecciones con el virus de influenza equina

Caldevilla, C¹; Paredes Rojas, Y¹; Ousset, J²; Ibañez, I¹; Mattion, N¹.

¹ICT César Milstein-CONICET; ²Gen-Med S.A.

Introducción: La influenza equina (IE) es una enfermedad infecciosa causada por el virus influenza tipo A. Este virus es altamente contagioso y la IE es considerada una enfermedad respiratoria de gran importancia económica en las poblaciones equinas. La hemaglutinina (HA) es la principal proteína de la envoltura viral e induce anticuerpos capaces de neutralizar la entrada del virus a la célula. Sin embargo, debido a su alta variabilidad antigénica genera baja reactividad cruzada. Trabajos recientes demuestran la existencia en la HA de epitopes neutralizantes altamente conservados entre las distintas cepas de influenza ubicados en la región del tallo de la proteína, especialmente en el dominio HA2, y que pueden ser utilizados para mejorar dicha respuesta.

Objetivo: Diseñar y generar dos inmunógenos basados en la HA viral tipo A/H3 equina que se utilizarán como vacunas. El primero será una proteína recombinante expresada en células procariontas (Δ HAq). El segundo será una secuencia de ADN que se expresará en células eucariotas (Δ HA-GCN4). Dichas moléculas contienen solamente la región del tallo de la HA-equina y exponen el dominio conservado HA2 que no se encuentra accesible en la proteína nativa. Con esta estrategia se desea aumentar la reactividad inmune cruzada inducida por estos inmunógenos contra diferentes cepas de virus equinos.

Metodología: La secuencia que codifica para Δ HAq (H3N8) (A/Equi/Argentina/93) fue clonada en el vector pET22b y transformada en células

BL21. Se desarrollaron ensayos de inducción con diferentes concentraciones de IPTG a distintos tiempos, temperaturas y medios de cultivo. Por otro lado, la secuencia Δ HA-GCN4 fue subclonada en dos vectores para expresión, pCI-neo y pCDNA4HisMaxC que fueron transfectados en células HEK 293T por el método de fosfato de calcio. La expresión de ambas proteínas se analizó mediante SDS-PAGE y *Western blot* (WB).

Resultados: Se demostró la expresión de Δ HAq (33 KDa) mediante SDS-PAGE y su identidad fue confirmada por WB. No se observaron diferencias en los niveles de expresión a distintas concentraciones de IPTG y la proteína recombinante se obtuvo a partir de la fracción insoluble. Por otro lado, se confirmó la expresión de Δ HA-GCN4 (44KDa) en células eucariotas con ambos vectores de expresión.

Conclusiones: Se logró optimizar la expresión de la HA del virus de influenza equina, tanto en su versión optimizada para expresión en *E. coli* como en su forma optimizada para expresión en células eucariotas. Se espera poner a punto los ensayos de purificación de Δ HAq desde cuerpos de inclusión, para posteriormente ser utilizada como vacuna a proteína recombinante. Por otro lado se espera obtener plásmido libre de LPS en el caso de la construcción Δ HA-GCN4, la cual será utilizada como vacuna a ADN. Posteriormente, se inmunizarán ratones y se evaluará la capacidad de dichas vacunas para otorgar protección cruzada y prevenir la infección con virus de influenza pertenecientes a distintos serotipos.

73- Expresión de la proteína VP2 del Virus de la Lengua Azul para el desarrollo de una vacuna a subunidad

Legisa, D¹; Gonzalez, F¹; Rodriguez, D¹; Ruiz, V^{1,2}; Mozgovej, M^{1,2}; Dus Santos, MJ^{1,2}.

¹Instituto de Virología, INTA; ²CONICET.

La Lengua Azul (LA) es una enfermedad viral, transmitida por vectores hematófagos del género *Culicoides spp*, afectando rumiantes domésticos y salvajes. Es considerada por la OIE como de máxima importancia para el comercio internacional de animales y productos de origen animal. El agente que ocasiona esta infección es el virus de la lengua azul (VLA), integrante de la

familia *Reoviridae* del género *Orbivirus*, identificándose hasta la fecha 26 serotipos diferentes, los cuales se encuentran en distintas zonas geográficas.

Los principales propósitos de la vacunación contra el VLA son: prevenir la enfermedad, limitar la dispersión del virus, lograr la erradicación de la enfermedad en un área o región determinada mediante la reducción de la circulación viral y permitir el movimiento de animales susceptibles entre zonas afectadas y zonas libres. En las últimas décadas se han desarrollado vacunas atenuadas e inactivadas eficientes para LA. Sin embargo, las desventajas en cuanto a bioseguridad y efectos adversos impulsan el desarrollo de vacunas a subunidad, no infecciosas como alternativa a las vacunas convencionales.

La proteína VP2 es responsable de la neutralización viral y de la especificidad por serotipo. La existencia de 26 serotipos descriptos hasta la fecha hace que la protección proporcionada por las vacunas sea serotipo dependiente. El desarrollo de vacunas recombinantes expresando antígenos inmunorelevantes y optimizando su presentación al sistema inmune constituye una estrategia factible para generar una vacuna con la eficacia deseada.

En este proyecto se propone expresar la proteína VP2 sola y fusionada a una molécula capaz de direccionar a células presentadoras de antígeno con el objetivo final de desarrollar una vacuna a subunidad para el VLA.

La secuencia codificante de la proteína VP2 fue obtenida a partir de un aislamiento nacional de serotipo 4. A partir de ella se generaron los vectores para la expresión en células de insecto utilizando el sistema de baculovirus recombinante. De esta manera se expresó la proteína VP2 sola y fusionada a la molécula denominada APCH, la cual es un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) que comprende una región que reconoce la cadena β del antígeno DR (Región D) de Clase II. La expresión de ambas proteínas en células de insecto se corroboró por western blot utilizando anticuerpos específicos. Para evaluar la inmunogenicidad de estos antígenos recombinantes se inmunizaron cobayos con dos dosis de cada proteína y se determinó la respuesta de anticuerpos por

seroneutralización.

Los resultados obtenidos indican que es factible la expresión de la proteína VP2 en células de insecto para el desarrollo de una vacuna a subunidad para el VLA.

74- Generación de la proteína recombinante NS1-HT de los virus encefalitis de *Saint Louis* y *West Nile* en un sistema bacteriano

Lorch, MS¹; Stephan, BI¹; Pubul Martín, PE¹; Lozano, ME¹; Contigiani, MS²; Spinsanti, LI²; Goñi, SE¹.

¹Instituto de Microbiología Básica y Aplicada (IMBA), Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular (LIGBCM), Área de Virosis Emergentes y Zoonóticas (AVEZ), DtoCyT, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina; ²Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología "Dr. Carlos Vanella" (InViV), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

El género *Flavivirus* está compuesto por un alto número de integrantes que se agrupan antigénicamente en complejos bien definidos. El virus de la encefalitis de <St. Louis> (SLEV) integra el complejo de la encefalitis Japonesa, y se ha constituido como una zoonosis emergente de importancia sanitaria en nuestro país. Por otro lado, nuestro país enfrenta la emergencia del flavivirus *West Nile* (WNV), el cual ha provocado brotes importantes en Norteamérica luego de su introducción en el año 1999.

El diagnóstico definitivo de una infección con flavivirus depende casi exclusivamente de la serología. Para su identificación se debe realizar el hallazgo de anticuerpos tipo inmunoglobulina M por la técnica de enzoinmunoensayo de captura en suero o LCR. Sin embargo esta técnica no es capaz de diferenciar flavivirus antigénicamente relacionados como SLEV y WNV, tal que un resultado positivo debe ser confirmado por técnicas más específicas como el ensayo de Neutralización.

En una infección secuencial con flavivirus, el pico de anticuerpos es más alto y persisten por períodos más largos que en la respuesta primaria. Las reacciones serológicas cruzadas deben ser resueltas mediante Neutralización con una batería de virus del mismo género circulantes en la región. Sin embargo, los resultados serológicos resultantes de infecciones secundarias frecuentemente son

indeterminados o de difícil interpretación.

Esta situación plantea la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico sencillos que permitan diferenciar una infección producida por estos agentes virales. El objetivo de este trabajo se centra en la expresión de la proteína recombinante NS1 de SLEV y WNV para generar antígenos que permitan establecer un ensayo serológico claro y preciso para determinar la identidad del agente etiológico que da lugar a un cuadro de infección relacionado con flavivirus.

En este trabajo se utilizaron las cepas CbaAr-4005 de SLEV y ArEq001 de WNV para el desarrollo de las siguientes actividades: diseño de *primers*, obtención de ARN viral, síntesis de ADNc, amplificación de los fragmentos de interés, clonado de los productos de amplificación, transferencia de los marcos abiertos de lectura a vectores de expresión, ensayos de expresión, purificación y estudio antigénico de las proteínas mediante *Western Blotting*.

Se amplificaron las regiones codificantes propuestas, clonándose luego en vectores comerciales y transfiriéndose al vector de expresión pET-22b. Este vector permite obtener la secuencia de NS1 unida a una cola de seis histidinas, generándose la proteína recombinante NS1-HT. Se optimizaron las condiciones de expresión, obteniéndose buenos niveles de NS1-HT de ambos virus. Se logró confirmar su identidad a través de *Western Blotting* con sueros específicos y con sueros comerciales que reconocen a la cola de histidinas fusionada en el extremo carboxilo.

SESIÓN 9

Martes 3/12 - Sala B: 11.30 - 13.00 hs

75- Efecto de la temperatura en la exposición de secuencias blanco de microRNAs (miRNA) descriptos para HIV-1

Cevallos, CG¹; Poli, EE¹; Fernandez Larrosa, N²; Rabinovich, RD¹.

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA; ²Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari.

Introducción

Los microRNAs son RNAs regulatorios de pequeño tamaño (aproximadamente 22 nucleótidos de longitud) procesados desde un precursor con estructura en stem-loop. Fueron descriptos en diversas especies y son capaces de unirse a los mRNA interfiriendo su traducción por lo que se consideran una forma de regulación génica post-transcripcional. Se ha reportado que existen microRNAs de origen humano que tienen como blanco genes virales. Dado que los virus pueden replicar a distintas temperaturas, ya sea en distintos órganos, durante infecciones o estados inflamatorios de diverso origen, es de importancia conocer si la temperatura puede modular el funcionamiento de los microRNAs.

Objetivo

El objetivo de este trabajo es determinar *in silico* el efecto de la temperatura cuando mRNAs codificados por el virus HIV-1 son expuestos a microRNAs humanos.

Metodología

Se obtuvieron las secuencias de los genes *env*, *vif*, *vpr* y *nef* de la cepa SF-2, Subtipo B y de la cepa ETH 2220 Subtipo C de HIV-1 a partir de la base de datos Los Alamos HIV, y las secuencias de los microRNAs descriptos para dichos genes a partir de miRBase. Los software utilizados para dicho análisis fueron: RNAhybrid, mFOLD 2.3 y Ensemble calc en UNAFOLD.

Se calculó la energía libre (ΔG) correspondiente al plegado en la zona de complementariedad y el número de nucleótidos desapareados en dicha zona para cada mRNA, en un rango de temperaturas de 35°C a 50°C para los genes de la cepa SF-2, Subtipo B y de la cepa ETH 2220 Subtipo C de HIV-1, además se calculó el ΔG de hibridación y se determinaron cualitativamente las concentraciones de microRNA, mRNA y microRNA-mRNA en el estado de equilibrio.

Resultados

En todos los análisis realizados el valor de ΔG disminuyó con el aumento de la temperatura y se demostró que la unión del microRNA al mRNA blanco esta favorecida termodinámicamente a todas las temperaturas analizadas.

Por otro lado el número de nucleótidos desapareados para los genes *vpr* (ambas cepas), *env* y *vif* (cepa SF-2), aumentaron en la zona de complementariedad entre el mRNA blanco y el

microRNA correspondiente a cada uno de ellos. A diferencia de esto, para los genes *nef* (ambas cepas), *env* y *vif* (cepa ETH 2220), el número de nucleótidos desapareados en dicha zona permaneció invariante.

Conclusión

Estos resultados *in silico* sugieren un rol de la temperatura en la modulación del plegado de los mRNAs virales, al aumentar el número de nucleótidos desapareados en el mRNA blanco este quedaría disponible para hibridar con microRNAs, los cuales actuarían promoviendo la degradación de los respectivos mRNA virales o inhibiendo la síntesis proteica. Este fenómeno podría ser relevante en episodios de fiebre o aumento de temperatura localizada o durante la aplicación terapéutica de los microRNA en el futuro.

76- Estudio de la relación funcional entre los dominios cápside de las proteínas Gag de los virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) y de felinos (FIV) utilizando virus quiméricos

Esteva, MJ; Affranchino, JL; González, SA.
Laboratorio de Virología, CONICET- Universidad de Belgrano, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Introducción: La poliproteína Gag de los lentivirus contiene toda la información necesaria tanto para el ensamblado en partículas virales como para la brotación de las mismas al medio extracelular. De hecho, nuestro laboratorio ha demostrado que las proteínas Gag de SIV y FIV expresadas en células eucariotas en ausencia de otras proteínas virales forman partículas cuya morfología es similar a la de los viriones auténticos. Además, hemos establecido las condiciones que permiten que las proteínas Gag de estos virus, producidas en *Escherichia coli*, se autoensamblen *in vitro*. Durante la brotación de los viriones, se produce su maduración como consecuencia del procesamiento de Gag por la proteasa viral para generar las proteínas matriz, cápside (CA) y nucleocápside (NC). Estudios realizados en SIV por nuestro grupo indican que la proteína CA cumple dos roles diferentes. Como dominio de Gag, la CA participa de las interacciones proteína-proteína que conducen a la multimerización de Gag en partículas, mientras que al formar el core del virión maduro, la CA protege al complejo NC-ARN

genómico viral y a los componentes virales esenciales para el inicio del siguiente ciclo de replicación.

Objetivo: Dado que el conocimiento sobre las proteínas CA de SIV y de FIV es aún limitado, el objetivo de nuestro trabajo fue establecer, mediante estrategias genéticas y bioquímicas, la relación estructural y funcional entre las CA de estos lentivirus.

Metodología: Generamos SIV quiméricos sustituyendo parcial o totalmente su dominio CA por el de FIV para luego comparar el fenotipo de los virus quiméricos resultantes con el de SIV salvaje.

Resultados y conclusiones: Al caracterizar el fenotipo del virus quimérico SIV(CAFIV) observamos que éste se ensambla en viriones con una eficiencia similar a la del SIV salvaje. Por otro lado, al analizar la composición de los viriones del SIV(CAFIV), además de detectar a la CA de FIV, se visualizan subproductos de la misma lo que sugiere cierto grado de inestabilidad del core formado por la CA de FIV en el virus quimérico. Cabe destacar que al reemplazar el dominio carboxilo de la CA y la región amino de la NC de la proteína Gag de SIV por la región equivalente de FIV se logra la producción eficiente de viriones que exhiben un core estable. Un fenotipo similar se obtiene al generar un SIV quimérico llevando el dominio carboxilo de la CA de FIV. En cambio, la sustitución de la región amino de la CA de SIV por la de FIV inhibe la producción de partículas. Nuestros resultados indican que, en el contexto de la proteína Gag de SIV, el dominio carboxilo de la CA de FIV permite el ensamblado de viriones sin afectar la estabilidad del core de la partícula madura. Estos estudios contribuyen a incrementar el conocimiento sobre la morfogénesis de los lentivirus y podrán ser de utilidad para el desarrollo de estrategias antivirales ya que la CA, dada sus funciones, es un blanco adecuado hacia el cual dirigirlas.

77- Identificación de los elementos estructurales en la poliproteína Gag del virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV) involucrados en las interacciones homotípicas que conducen al ensamblado viral

Abdusetir Cerfoglio, JC; González, SA; Affranchino, JL.

Laboratorio de Virología, CONICET-Universidad de Belgrano, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Introducción: FIV, además de ser un lentivirus que causa en gatos domésticos un síndrome de inmunodeficiencia similar al SIDA de humanos, comparte características tanto con los virus de la inmunodeficiencia de humanos (HIV) y de simios (SIV) como con los lentivirus de animales ungulados (virus Maedi-Visna, virus de la encefalitis y artritis caprina y virus de la anemia infecciosa equina). El estudio de FIV resulta relevante ya que contribuye a dilucidar cómo han evolucionado las estrategias de replicación en los lentivirus. La poliproteína Gag de FIV se ensambla en la membrana plasmática de las células infectadas en partículas virales que brotan luego al medio extracelular. La proteasa viral cataliza el procesamiento de Gag para generar las proteínas matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (NC) así como el péptido espaciador p1 y el péptido C-terminal p2.

Objetivo: Nuestro grupo ha demostrado previamente que la MA de FIV media el transporte de Gag a la membrana plasmática y que la NC además de empaquetar al ARN genómico viral cumple un rol esencial en el ensamblado. Sin embargo, no se han identificado aún las regiones en Gag de FIV que participan de las interacciones proteína-proteína que conducen al ensamblado viral.

Metodología: Con el propósito de mapear los dominios de Gag de FIV involucrados en su multimerización, generamos una serie de subdominios de esta proteína y estudiamos su capacidad para interactuar in vivo con Gag salvaje y ser reclutados en partículas pseudovirales extracelulares.

Resultados y conclusiones: Al caracterizar el fenotipo de asociación con Gag salvaje de los diferentes subdominios derivados de esta proteína encontramos que la región CA-NC interactúa eficientemente con Gag y representa una proporción sustancial de la masa proteica total de las partículas pseudovirales. Otros subdominios de Gag, como el que comprende a la MA y a la CA exhiben una menor capacidad de asociación con Gag salvaje y una menor contribución a la composición de las partículas virales. En cambio, para las proteínas maduras derivadas de Gag (MA, CA o NC) no se

detecta interacción con Gag salvaje y, por lo tanto, no son reclutadas en las partículas extracelulares. Nuestros estudios sugieren que la CA junto con el dominio de la NC capaz de empaquetar al ARN genómico son necesarios para las interacciones Gag-Gag que promueven la formación de partículas.

78- Tráfico intracelular de los baculovirus en la infección de células dendríticas murinas

Molinari, P¹; Cebrián, C²; Mayorga, LS²; Morón, GV³; Taboga, O¹.

¹Instituto de Biotecnología, CNIA, INTA Castelar, Argentina; ²Instituto de Histología y Embriología Mendoza (IHEM)-CONI CET, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.Cuyo, Mendoza, Argentina; ³CIBICI-CONICET, Fac. Cs. Químicas, Univ. Nac. de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Los baculovirus (BVs) son una familia de virus que infectan artrópodos. Son virus envueltos a ADN doble cadena y patógenos para los insectos. Los BVs tienen fuertes propiedades adyuvantes en mamíferos, promoviendo respuestas humorales y celulares contra antígenos coadministrados. Asimismo, estimulan la maduración de células dendríticas (DCs) y la producción de mediadores inflamatorios. Estudios previos realizados por nuestro grupo demostraron que el transporte de un antígeno en la cápside de los BVs induce una fuerte respuesta citotóxica antígeno específica in vivo. Sin embargo, dicha respuesta no se desencadena cuando el antígeno es transportado en la superficie del BV.

Para entender el mecanismo de presentación del antígeno modelo ovoalbúmina (OVA) expresado en la cápside de los BVs, se estudió el tráfico intracelular de BV-OVA en DCs mediante inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal y electrónica.

Los estudios realizados permitieron demostrar que BV-OVA alcanza compartimentos Lamp1+ a una hora post-infección. Además, se determinó que las proteínas mayoritarias de la envoltura (GP64) y de la cápside (VP39) permanecen juntas hasta las 3 horas de infección, para luego desasociarse. Por otro lado, se observó un reclutamiento temprano (1 hora post-infección) de moléculas MHCI a los compartimentos BVs+. También se estudió la colocalización del virus con marcadores del retículo endoplasmático y

lisosomas. Finalmente, mediante microscopía electrónica se pudo visualizar al virus en las diferentes instancias de infección de las DCs, es decir, en membrana plasmática, compartimentos intracelulares y en el citoplasma.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que los BVs ingresan íntegros a compartimentos subcelulares de las DCs, y tras un proceso de acidificación mediado por vesículas lisosomales, la cápside viral alcanza el citoplasma.

79- Potencial replicativo total y distribución genómica entre viriones brotados y viriones ocluidos durante la replicación de baculovirus en cultivos de células de insectos

Eberhardt, I^{1,2}; Amable, GF^{1,2}; Micheloud, GA^{1,2}; Gioria, VV^{1,2}; Claus, JD^{1,2}.

¹Laboratorio de Virología, Facultad de Bioquímica y Ciencia Biológica, UNL; ²Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, UNL-CONICET.

Los baculovirus (familia *Baculoviridae*) son virus con genoma de DNA de doble cadena, específicos de artrópodos, que se caracterizan por replicarse a través de un ciclo bifásico que da origen a dos progenies diferentes que comparten la misma nucleocápside: los viriones brotados (BVs) y los viriones ocluidos (OVs), retenidos en cuerpos de oclusión (OBs), la progenie viral con capacidad insecticida. La producción *in vitro* de OBs implica la infección de cultivos de células de insecto susceptibles con un inóculo de BVs, como resultado de la cual se obtienen tanto BVs como OBs. Se verificó previamente que la producción de OBs es afectada por la variación de dos parámetros de infección, la multiplicidad de infección (MOI) y la densidad celular inicial (DCI), pero en cambio se desconoce si la manipulación de estos parámetros permite influir sobre el potencial de replicación viral total, que incluye las dos progenies, y su distribución entre ambas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la variación de la capacidad replicativa total, y su distribución entre BVs y OVs, en respuesta a las modificaciones de la MOI y la DCI, en cultivos celulares infectados asincrónicamente. Para ello, empleando un diseño factorial completo de dos factores a dos niveles, cultivos en suspensión de

la línea celular saUFL-AG-286, en el medio libre de suero UNL-10, se infectaron con el *virus de la poliedrosis nuclear múltiple de Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), utilizando dos valores diferentes de MOI (0,1 y 0,01 TCID₅₀/célula) y de DCI (1,5 y 6,0x10⁵ células/mL). La producción de cada progenie se determinó por cuantificación genómica, mediante qPCR. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado, y los resultados fueron analizados por ANOVA. La cantidad de OVs ocluidos por OB, que varió entre 33 y 206, fue afectada por la MOI y la DCI, aunque el nivel de oclusión dependió de la combinación de niveles de ambos factores. La producción volumétrica de OVs solo fue afectada por la interacción de MOI y DCI, mientras que la producción específica de OVs por célula se redujo en promedio 4,7 veces al incrementar la DCI. Por otro lado, la producción volumétrica (7,82x10⁷-1,72x10⁹ partículas/mL) y específica (51-7310 partículas/cel) de BVs fueron afectados por la DCI y MOI, siendo el primero el factor de mayor significación y sentido negativo. Considerando el número total de genomas ocluidos, el porcentaje de nucleocápsides destinadas a la producción de OVs varió entre 77,6 y 97,2%, y ese porcentaje se incrementó con el aumento de la DCI. Los resultados obtenidos indican que, en las condiciones de infección analizadas, la variación de los parámetros de infección afecta cuantitativamente la distribución de genomas entre BVs y OBs, pero su efecto es mucho más notable sobre el potencial replicativo total.

80- La región variable del 3'UTR del virus modula de manera diferencial la replicación del virus del Dengue en células de mosquito y mamífero

Sergio Villordo¹, Claudia Filomatori¹, Andrea Gamarnik¹

¹Fundación Instituto Leloir.

El genoma del virus del dengue (DENV) es una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva de 11 kb. Flanqueando un único marco de lectura abierto se encuentran las regiones 5' y 3' no codificantes (UTRs), de 96 y 451 nucleótidos respectivamente. El 3' UTR está organizado en 4 regiones denominadas (de proximal a distal) A1, A2, A3 y A4. Las regiones

A2, A3 y A4 son muy conservadas a nivel de secuencia y presentan estructuras de RNA definidas que son requeridas para la replicación viral. Por el contrario la región A1, también conocida como región variable (RV) presenta gran diversidad de secuencia entre los distintos aislados de dengue y muy poco se conoce sobre su función durante la infección viral.

Un aspecto fundamental del ciclo de infección del DENV durante un brote epidémico es la alternancia del virus entre el humano y el mosquito vector. De esta manera durante su evolución el DENV ha adaptado su genoma para replicar en hospedadores distintos. En estudios recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio ha sido caracterizada una estructura de RNA presente en A4 que regula la replicación viral de manera diferencial en células de mosquito y mamífero. Con el objetivo de detectar nuevas regiones del genoma viral que funcionen como determinantes específicos de hospedador, se ha estudiado la variabilidad nucleotídica del 3'UTR en el contexto de la replicación viral en células de mosquito y mamífero. Para ello se sintetizó in vitro RNA genómico viral y este se utilizó para transfectar células BHK-21, como modelo de mamífero y C6/36 como modelo de insecto. Los sobrenadantes fueron cosechados luego de 48-96hs y se utilizaron para infectar nuevamente células frescas. Posteriormente, este procedimiento fue repetido durante 10 ciclos continuos o generaciones. Al término de estos ensayos se extrajeron los RNA virales a partir de los sobrenadantes y se estudió la secuencia de las regiones UTRs del genoma viral utilizando técnicas de *deep-sequencing* y clonación en plásmido comercial. Tanto en las muestras del RNA input como en los virus que recuperados de células BHK no se encontraron cambios. Sin embargo, en experimentos independientes realizados en células de mosquito se obtuvieron un gran espectro de variantes virales con mutaciones y deleciones sobre la región A1 del 3'UTR. A continuación se evaluó el efecto de estas mutaciones sobre la replicación viral haciendo uso de un virus reportero. En estos ensayos pudo verificarse que dichas mutaciones incrementan el *fitness* viral durante la replicación del DENV en células de mosquito mientras que disminuyen la replicación en células de mamífero. Estudios ulteriores de

predicción y *probing* químico, permitieron determinar que dichas mutaciones afectan una estructura de RNA denominada VAR2 y modifican el patrón de fragmentos subgenómicos generados durante la infección del DENV.

En su conjunto estos resultados sugieren que la región variable del 3'UTR cumple un rol diferencial durante la replicación a células de mosquito y mamífero. Mientras que la estructura VAR2 es requerida durante la infección en mamíferos, en mosquito se seleccionan mutaciones que alteran su estructura secundaria y terciaria, cambian el patrón de fragmentos subgenómicos e incrementan el *fitness* viral.

81- Evaluación de la respuesta inmune en pollos infectados con el virus de la bronquitis infecciosa. Relevancia del estado inmunitario previo a la infección

Chimeno Zoth, S^{1,3}; Craig, MI²; Carballeda, JM^{1,3}; Gravisaco, MJ¹; Vagnozzi, A²; Berinstein, A^{1,3}.

¹Instituto de Biotecnología, INTA; ²Instituto de Virología, INTA; ³CONICET.

La industria avícola argentina ha experimentado en los últimos años un crecimiento muy importante dentro del mercado local como del internacional. El tipo de cría intensiva utilizada en este sector facilita la aparición de factores que perjudican la estabilidad de los planteles, afectando su status sanitario. Las enfermedades respiratorias como las inmunosupresoras suelen estar íntimamente asociadas con este tipo de crianza. La bronquitis infecciosa aviar es causante de grandes pérdidas económicas debido a que las aves infectadas presentan poca ganancia de peso y una rápida disminución en la producción y calidad de los huevos. Durante este año se han registrado casos de mortalidad elevada en pollos parrilleros en granjas de la provincia de Entre Ríos, la que concentra el 50 % de la producción avícola nacional. Los casos observados fueron ocasionados por cepas variantes del virus de la bronquitis infecciosa (IBV). Factores como la falta de un nivel adecuado de bioseguridad y la incapacidad de desarrollar respuestas inmunes eficientes, debido a la existencia de otras infecciones que producen inmunosupresión son agravantes de

esta situación. El virus de la bursitis infecciosa (IBDV) ataca especialmente a pollos jóvenes produciendo, en los casos más severos, inmunosupresión. En este contexto, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto de la infección con una cepa de IBV circulante en Argentina en pollos previamente infectados con IBDV. Se infectaron pollos SPF de 7 días de edad con la cepa Winterfield de IBDV por vía oral y 7 días después se desafiaron con un aislamiento autóctono de IBV. Se tomaron hisopados traqueales a 3dpi y a 7 dpi los animales fueron sacrificados. Se extrajeron tonsilas cecales, bursa y riñones, a fin de detectar genoma de IBV por RT-PCR. A partir de tonsilas y bursa se aislaron células mononucleares para su posterior análisis por citometría de flujo. Asimismo, se conservó un trozo de bursa y de riñón en RNAlater para luego realizar síntesis de ADNc y cuantificación de citoquinas por RT-qPCR en tiempo real. Los ensayos de RT-PCR realizados a partir de las muestras de hisopados traqueales confirmaron la presencia de genoma de IBV en todos los animales que habían sido desafiados. Todos ellos mostraron la presencia de genoma viral en las muestras de riñón, mostrando que el virus del desafío replicó en este órgano. La cuantificación por RT-qPCR en tiempo real de IL-6 e IFN γ en riñón y bursa no reveló diferencias significativas entre los grupos tratados con IBDV, IBV o ambos, aunque en bursa se observó una leve sobreexpresión de IL-6 en animales coinfectados con IBDV e IBV. Asimismo, el análisis por citometría de flujo reveló diferencias en la frecuencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ en tonsilas cecales y bursa en el grupo infectado con ambos virus respecto de los correspondientes controles. Los resultados obtenidos revelan la importancia del estado inmunitario de los planteles previo a la infección con IBV.

82- Obtención de líneas celulares transgénicas para el estudio genético y la manipulación de baculovirus

Haase, S¹; López, MG²; Pidre, ML¹; Ferrelli, ML¹; Sciocco-Cap, AI³; Taboga, O²; Romanowski, V¹.

¹Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata; ²Instituto de

Biotecnología, CICVyA, INTA; ³Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, CICVyA, INTA.

Introducción y objetivos.

La línea celular de lepidópteros Tn5B1-4 (Hi5) es susceptible a la infección por varios baculovirus y, generalmente, proporciona una producción de proteínas recombinantes superior en comparación con otras líneas celulares de insectos. Los títulos de partículas infectivas son determinados en las líneas Sf-21 y Sf-9, ya que las placas producidas por AcMNPV (*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus) se distinguen fácilmente, aunque no ocurre lo mismo con otros baculovirus. Por otra parte, los baculovirus producen cuerpos de oclusión (OB) de una forma característica. Las interacciones específicas entre la proteína de la matriz de los OBs y otros componentes virales que controlan la oclusión de los viriones y la morfología de los OBs aún no se comprenden con claridad. Para abordar este problema se desarrollaron líneas celulares que expresan la poliedrina de dos baculovirus, AcMNPV y AgMNPV (*Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus).

Materiales y métodos.

Mediante métodos estándar de ingeniería genética se construyeron vectores de expresión derivados del plásmido comercial pIB incluyendo genes reporteros lacZ y egfp y de la poliedrina de AcMNPV y AgMNPV bajo el control del promotor viral muy tardío de poliedrina. Luego de las transfecciones de monocapas de Hi5, se aislaron clones celulares y se caracterizó la expresión de las proteínas heterólogas inducibles por infección.

La línea celular que expresa GFP fue sembrada en una placa de 96 pocillos e infectada con diluciones seriadas de un virus de título conocido. Se compararon los títulos de centros de infección y los valores de fluorescencia de eGFP luego de la lisis celular. Por otra parte, las líneas celulares que expresan la poliedrina de AcMNPV y AgMNPV fueron infectadas con virus deficientes en poliedrina y se evaluó la aparición de cuerpos de oclusión. Los cuerpos de oclusión obtenidos se utilizaron luego para infectar larvas susceptibles.

Resultados.

Se generaron líneas celulares establemente transformadas con genes de interés bajo un

promotor inducible por la infección viral. La línea celular que expresa GFP fue utilizada para establecer un método de titulación semiautomatizado que aprovecha la lectura de la fluorescencia para estimar el número de partículas infectivas. Las líneas celulares que expresan poliedrina de AcMNPV y AgMNPV se utilizaron para evaluar la complementación funcional de estos genes. Los resultados demuestran que la poliedrina de AgMNPV puede empaquetar viriones de AcMNPV y que los cuerpos de oclusión generados son infectivos al ser inoculados por vía oral a larvas susceptibles.

Conclusiones.

Se estableció un sistema de titulación rápido y simplificado. Se generaron líneas transgénicas útiles para el análisis de complementación funcional de genes de baculovirus. La generación de OBs en líneas celulares empaquetadoras permite producir baculovirus con capacidad de dispersión autolimitada.

SESIÓN 10

Martes 3/12 - Sala A: 15.15 - 17.00 hs

83- Primer mapa intraviral de las interacciones proteína-proteína del virus de la hepatitis E

Osterman, A¹; Stellberger, T¹; Baiker, A¹; Nitschko, H¹; Vizoso-Pinto, MG^{1,2}.

¹Max-von-Pettenkofer Institut der LMU, Munich, Alemania; ²Laboratorio de Biología de las Infecciones, CCT-INSIBIO, Fac. de Medicina, UNT, Tucumán, Argentina.

La hepatitis E es una enfermedad aguda que se transmite por vía fecal-oral y generalmente es autolimitante pero que en embarazadas está asociada a una elevada mortalidad (~20-30%). Su agente etiológico es un virus ARN monocatenario positivo (+ssRNA) no envuelto cuyo genoma es de aprox. 7,2 kb y pertenece a la familia *Hepeviridae*. Debido a la falta de un modelo animal pequeño y a las dificultades de propagar el virus en cultivos celulares, se conoce relativamente poco acerca de su biología y patobiología. El sistema de híbrido de dos levaduras (Y2H) permite detectar interacciones binarias de proteínas. Este sistema de screening se basa en la expresión de las proteínas de interés como proteínas fusionadas a DBD "DNA-

binding domain" y al dominio AD "activation Domain" de un transactivador en levaduras. De esta forma, cuando ambas proteínas interactúan entre sí, el factor de transcripción se reconstituye y se activa el gen reportero que le permite crecer en condiciones selectivas utilizando una cepa auxotrófica de levaduras. Utilizamos un monitoreo en matriz para evaluar las interacciones binarias entre todas las proteínas del genoma del virus de la hepatitis E (HEV) con fusiones N- y C-terminales para incrementar la especificidad. Mediante el mismo describimos por primera vez el interactoma completo de HEV utilizando Y2H y asu vez como validación del ensayo pudimos confirmar interacciones ya descritas en la literatura como por ejemplo ORF2-ORF2 y ORF2-ORF3. En estudios futuros nos proponemos validar este mapa con otras tecnologías de detección de proteína-proteína. Este tipo de datos son muy útiles porque aquellas interacciones esenciales para el ciclo viral pueden ser usadas como blanco en el diseño inteligente de agentes antivirales

84- Participación de la vía Raf/MEK/ERK en la multiplicación del virus Junín

Brunetti, JE; Rodríguez, ME; Scolaro, LA; Castilla, V.

Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Introducción

La regulación de las vías de señalización celular es una de las estrategias utilizadas por los virus para favorecer su propia replicación. Se ha comprobado que la infección con diversos virus con genoma de RNA desencadena la activación de la vía Raf/MEK/ERK. En trabajos previos hemos demostrado que la infección de células Vero con el arnavirus Junín (JUNV) provoca la fosforilación de ERK y que el agregado de U0126 (inhibidor de la vía) a estos cultivos provoca una reducción del rendimiento viral.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue ampliar los estudios previos analizando la participación de la vía Raf/MEK/ERK en la multiplicación de JUNV en líneas celulares humanas y determinar el efecto de la activación y del silenciamiento de

ERK sobre la producción de virus infeccioso.

Materiales y métodos

Se utilizaron las líneas celulares Vero (riñón de mono), A549 (pulmón humano) y U937 (monocitos humanos) y la cepa atenuada XJCI3 de JUNV. Las células se infectaron, en medio libre de suero, a una multiplicidad de infección de 1 UFP/célula en presencia o ausencia de U0126 o de los activadores de ERK: forbol miristato acetato (PMA) o suero bovino. A las 24 hs post- infección (p.i.) se cuantificó la producción de virus liberado al medio de cultivo (por el método de formación de placas) y el grado de fosforilación de ERK (mediante un ensayo de western blot) como parámetro indicador de su activación. El silenciamiento de ERK se llevó a cabo utilizando la técnica de RNA de interferencia (siRNA) utilizando un pool de siRNAs específicos para ERK1 y ERK 2 y el nivel de silenciamiento se corroboró por western blot. Los cultivos transfectados con los siRNAs específicos o con RNA control se infectaron 24 hs más tarde con JUNV y a las 72 hs p.i. se determinó el rendimiento viral.

Resultados

Se comprobó que JUNV induce la fosforilación de ERK en las líneas celulares humanas y que el tratamiento con U0126 en estas células provoca la inhibición dosis dependiente de la fosforilación de ERK y de la producción viral. Se observó una reducción de más del 95% del título viral en los cultivos tratados con U0126 20µM. El tratamiento con PMA incrementó tanto el grado de fosforilación de ERK como la multiplicación viral, observándose un aumento de más de 6 veces en el título de virus en los cultivos tratados con PMA 100nM como así también con suero bovino. Asimismo, la presencia de suero en los cultivos tratados con el inhibidor U0126 logró restablecer en forma parcial tanto la fosforilación de ERK como la multiplicación viral. Finalmente, se corroboró que el pool de siRNAs específicos para ERK fue capaz de silenciar la expresión de ERK 1/2 y que dicho silenciamiento provocó una inhibición del rendimiento viral de 91,6% y 65,5% en células A549 y Vero, respectivamente.

Conclusiones

La infección con JUNV induce la activación de la vía Raf/MEK/ERK en cultivos celulares de distinto origen y dicha activación es necesaria

para la multiplicación viral.

85- Modulación de la vía Raf/MEK/ERK durante la persistencia del virus Junín en células Vero

Rodriguez, ME; Brunetti, JE; Scolaro, LA; Castilla, V.

Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Introducción

El virus Junín (JUNV) causa infecciones persistentes tanto en su hospedador natural, el ratón de campo *Calomys musculus*, como en cultivos celulares. Las células Vero persistentemente infectadas con la cepa XJCI3 de JUNV (denominadas V3) se caracterizan por no presentar efecto citopático ni producir virus infeccioso, pero sí es posible detectar genoma viral y elevados niveles de proteína de nucleocápside, N. Las células V3 son además resistentes a la sobreinfección con JUNV u otros arnavirus antigénicamente relacionados.

Objetivo

Teniendo en cuenta que la activación de la vía de señalización celular Raf/MEK/ERK es necesaria para la multiplicación de JUNV en las células Vero durante la infección aguda, el objetivo de este trabajo fue analizar los niveles de fosforilación de ERK en las células V3 y evaluar el efecto de moduladores de la vía Raf/MEK/ERK en estas células a fin de aportar al conocimiento de los factores celulares involucrados en el mantenimiento de la persistencia viral.

Materiales y métodos

Las células V3 o Vero, infectadas o no con JUNV, se trataron con el compuesto U0126, inhibidor de la vía Raf/MEK/ERK, o con forbol miristato acetato (PMA), activador de la misma vía. Los niveles de fosforilación de ERK se determinaron por western blot y los niveles de expresión de las proteínas virales se determinaron por western blot y por ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Los títulos virales se cuantificaron mediante un ensayo de formación de placas.

Resultados

El nivel de fosforilación de ERK en las células V3 fue similar al de las células Vero sin infectar y la sobreinfección de las células V3 con JUNV

provocó una marcada reducción de los niveles basales de fosforilación de ERK medidos a las 24 hs post-infección (p.i.). Al analizar la cinética de activación de ERK se determinó que la infección aguda mostró dos fases de activación, durante la adsorción viral y a partir de las 7 hs p.i., mientras que la sobreinfección de las células V3 mostró sólo un incremento inicial y transitorio de la fosforilación de ERK. El tratamiento de las células V3 con U0126 o PMA modificó los niveles de fosforilación de ERK de acuerdo a lo esperado pero no alteró los niveles de expresión de N ni la incapacidad de estos cultivos de producir virus. U0126 provocó una marcada reducción del de por sí escaso nivel de infectividad obtenido luego de la sobreinfección de las células V3, sin embargo los niveles de expresión de proteína viral N no se vieron alterados. Por el contrario, el tratamiento con PMA incrementó hasta 6 veces de la producción de virus.

Conclusiones

En las células V3 existiría un mecanismo de regulación negativa de la activación de ERK capaz de contrarrestar la estimulación de esta vía en las células sobreinfectadas con JUNV. El tratamiento con moduladores de la vía Raf/MEK/ERK no alteró las características de los cultivos persistentemente infectados pero sí la producción de virus cuando los mismos fueron sobreinfectados.

86- La infección persistente de células Vero con virus Junín no depende de la vía PI3K/Akt

Linero, FN; Cuervo, E; Fernández Bell-Fano, PM; Castilla, V; Scolaro, LA.

Laboratorio de Virología, Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio demostraron que el virus Junín (JUNV, Fam. *Arenaviridae*) estimula la vía de la fosfatidil-inositol-3-quinasa/protein-quinasa B (PI3K/Akt) en células Vero promoviendo la expresión en membrana plasmática del receptor que JUNV utiliza para adsorberse a estas células. Esta vía de señalización regula, entre otros procesos, la supervivencia y la proliferación celular. Otros virus la modulan a fin de optimizar su multiplicación retrasando la apoptosis que desencadena la infección, como así también

para establecer una infección persistente del cultivo celular. Siendo el fenómeno de persistencia una característica saliente de la biología de JUNV en este trabajo se estudió la capacidad por parte de este virus de desarrollar este tipo de infección en células Vero en relación con la vía de PI3K/Akt.

A fin determinar si JUNV era capaz de activar Akt (por fosforilación), modulando negativamente la apoptosis, se analizaron los niveles de núcleos apoptóticos detectados en cultivos infectados con JUNV, en forma aguda y persistente, utilizando la técnica de tinción fluorescente de Hoechst. Las células persistentemente infectadas, denominadas V3, presentaron un porcentaje de núcleos apoptóticos que no superó el 1%, similar al encontrado para células sin infectar mientras que las infectadas a una moi de 1 UFP/cél. y analizadas a las 72 h p.i. alcanzaron un 12±3 %. Este porcentaje no se incrementó al tratar a los cultivos con Ly294002, un inhibidor de la vía, sugiriendo que el modesto porcentaje de núcleos apoptóticos detectados durante la infección aguda no se debe a una modulación positiva de la vía. Por otro lado, todos los cultivos mostraron un porcentaje similar de núcleos apoptóticos al ser tratados con staurosporina 0.1 µM, un inductor de apoptosis, independientemente del estadio de la infección.

La modulación de esta vía no pareció estar relacionada con el establecimiento de la persistencia, ya que cuando las células infectadas se trataron con 4 esquemas de Ly294002 (0-7, 7-14, 14-21 y 21-28 días p.i.) en todos los casos el virus logró establecer persistencia. Independientemente del esquema empleado, todos los cultivos de células V3, evaluados a los 70 y 120 días p.i., presentaron una marcada expresión de la nucleoproteína viral (N), detectada por inmunofluorescencia y western blot. El tratamiento con Ly294002 de células V3, realizado a los 150 días p.i., si bien inhibió la fosforilación de Akt, no tuvo efecto sobre la síntesis de N. En las células V3 se comprobó la funcionalidad de la vía de PI3K/Akt mediante ensayos de endocitosis de transferrina marcada y de fosforilación de Akt en respuesta al tratamiento con insulina 100 nM.

Los resultados encontrados indican que el establecimiento y el mantenimiento de la

persistencia de JUNV en células Vero no dependen de la modulación de la vía de PI3K/Akt a pesar de que dicha vía se encuentra funcional en este tipo de cultivos.

87- Evaluación de la modulación del Herpesvirus equino 1 en la muerte por apoptosis sobre cultivos celulares

Scrochi, MR^{1,2,4}; Zanuzzi, CN^{2,4}; Fuentealba, NA^{1,4}; Bravi, ME^{1,7}; Gimeno, EJ^{3,4}; Barbeito, CG^{2,3,4}; Portiansky, EL^{3,4}; Muglia, CI^{4,5}; Galosi, CM^{1,6}.

¹Cátedra de Virología; ²Histología y Embriología; ³Patología General/Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; ⁴CONICET; ⁵Laboratorio de investigaciones del sistema inmune (LISIN), Facultad Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata; ⁶Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires; ⁷FONCYT.

El Herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1) es un agente infeccioso que produce signos respiratorios, nerviosos, aborto y síndrome neonatal en equinos. A diferencia de otros alphaherpesvirus que modulan la apoptosis celular, se desconoce si el EHV-1 puede ejercer dicha acción y qué mecanismos podrían estar implicados en ella. Hasta el momento solo se demostró un efecto inhibitor, en estudios in vitro, sobre neuronas infectadas. La muerte por apoptosis, un tipo de muerte celular programada, puede actuar como un mecanismo de protección contra agentes infecciosos. Como adaptación a este proceso, muchos virus han implementado diversas estrategias moduladoras de la respuesta apoptótica. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de EHV-1 en cultivos celulares no neurales. Se utilizaron células Madin-Darby bovine kidney (MDBK) infectadas con la cepa AR8 (MOI=10) y luego inducidas a la apoptosis a las 3, 9, y 18 hs posinfección (pi) mediante su incubación con sorbitol 1M durante 1 h a 37 °C (Inf+/ Apo+). Para cada uno de los tiempos analizados se realizaron controles positivos y negativos de infección, de apoptosis y de células sin tratamiento. La apoptosis, se evaluó cuantitativamente mediante la tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina y se detectó la exteriorización de fosfatidilserina

mediante Anexina V FICT e yoduro de propidio por citometría de flujo. Asimismo, se reconocieron cambios ultraestructurales por microscopía electrónica de transmisión (MET). El análisis conjunto de las técnicas permitió determinar que solo a las 9 hs pi el índice de apoptosis fue significativamente menor en el grupo (Inf+/ Apo+) respecto al control positivo de la misma (Inf-/Apo+). A través de la MET se confirmó la presencia del virus y los cambios ultraestructurales característicos del proceso apoptótico. Se concluye que la infección por EHV-1 estaría interfiriendo en la muerte por apoptosis de las células infectadas durante la primera etapa del ciclo de replicación viral, efecto que podría favorecer su replicación. Estos resultados preliminares concuerdan con otros ya presentados, en los que evaluamos el clivaje de la citoqueratina 18, proteína blanco de las caspasas efectoras.

88- Análisis del efecto antiapoptótico del LR de BoHV-5 y su comparación con BoHV-1

Silvestro, C; Bratanich, A.

Catedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Introducción: Los herpesvirus bovino tipo 1 y 5 (BoHV-1 y BoHV-5) son alfa-herpesvirus que afectan la industria ganadera. BoHV-5 es un virus mayormente neuropatogénico que provoca encefalitis no supurativa, mientras que BoHV-1 se encuentra asociado a síndromes respiratorios, invadiendo raramente sistema nervioso central o causando enfermedad neurológica en grado importante. Los alfa-herpesvirus se caracterizan por generar latencia en ganglios sensoriales. El gen Relacionado a la Latencia (LR) es el único transcripto hallado en BoHV-1 durante la latencia y se demostró su acción antiapoptótica durante la infección aguda y la reactivación de la latencia. Se desconoce si LR del tipo 5 comparte esta acción. Esta acción antiapoptótica se debe principalmente a una proteína (ORF-2) codificada en BoHV-1, de la cual no se halló el homólogo en BoHV-5. Si bien BoHV-1 y BoHV-5 son virus muy emparentados, el gen LR es el menos conservado de sus genomas, compartiendo una similitud del 70%. Se desconoce si el LR es conservado entre los distintos tipos 5

Objetivos: a) Analizar el grado de homología del gen LR de diferentes cepas de BoHV-5; b) Analizar in vitro las habilidades antiapoptóticas del gen LR5 en comparación con el LR de BoHV-1 (LR1) utilizando construcciones que expresen dichas regiones.

Materiales y Métodos:

Para la comparación de secuencias del gen LR de distintos BoHV-5 se obtuvieron fragmentos de DNA genómico digerido con distintas enzimas clonando aquellos que contenían, según digestiones virtuales, el gen de interés. Las secuencias obtenidas se compararon con ClustalX.

Para los experimentos de apoptosis se construyeron plásmidos de expresión conteniendo la región codificante del LR de BoHV-1 y BoHV-5 que fueron luego cotransfectados con un plásmido que expresa B-galactosidasa en la línea celular Neuro2A; 48hs después se indujo apoptosis por shock de frío (2hs en hielo + 1h a 37°C). Las células fueron posteriormente fijadas, teñidas y contadas. Cada construcción se testeó por triplicado en experimentos repetidos tres veces.

Resultados:

La secuenciación de distintos LR5 mostro un alto grado de homología entre ellos seleccionando entonces uno como representativo en los experimentos de apoptosis. En los ensayos de B-galactosidasa se observó que las células transfectadas con LR de BoHV-1 tenían una sobrevivencia de 1 vez y media más que las transfectadas con el vector vacío. Sin embargo, las transfectadas con el LR de BoHV-5, lograron solamente un 0,40 veces más sobrevivencia que el vector vacío.

Conclusiones:

-El gen LR es altamente conservado entre las distintas cepas de BoHV-5

-El LR5 presenta menor capacidad antiapoptótica al compararlo con el LR de BoHV-1, pudiendo ser este un factor que contribuya a su mayor neurovirulencia.

Palabras clave: Herpesvirus bovino, latencia, apoptosis, BoHV-5.

89- Implementación de una plataforma para la obtención de virus fowlpox recombinantes

Federico, CR^{1,2}; Zanetti, FA^{1,2}; Calamante, G².

¹CONICET; ²Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA.

El virus fowlpox (FWPV) es el avipoxvirus mejor estudiado y caracterizado. Posee un genoma de ADN doble cadena que replica en el citoplasma de las células hospedadoras. Estos virus son capaces de infectar productivamente sólo especies aviares aunque pueden causar infecciones abortivas en células no aviares, convirtiéndolos en buenos candidatos para el desarrollo de vacunas de nueva generación tanto para aves como para mamíferos. Teniendo en cuenta que los sistemas de obtención de poxvirus recombinantes no están disponibles comercialmente, resulta estratégico implementar metodologías de manera local para utilizarlas en el diseño de estas vacunas.

El objetivo de este trabajo consistió en el desarrollo de una plataforma que permita obtener FWPV recombinantes que expresen proteínas de interés, utilizando como modelo a la proteína fluorescente verde (GFP).

Debido a que el tamaño del genoma de los poxvirus impide la manipulación directa del ADN se utilizan vectores de transferencia con secuencias genéticas que permiten la recombinación homóloga con el virus salvaje. Mediante amplificación por PCR se obtuvieron dos regiones, denominadas izquierda y derecha, que serán el sitio blanco de recombinación y corresponden a las posiciones 1321-1619 y 1676-1970 del gen FPV030, el cual no es esencial para la replicación viral in vitro. Los amplicones obtenidos se clonaron en el vector *TopoTA*, sus identidades se confirmaron por secuenciación y se subclonaron direccionalmente en *pBlueScript*. Luego, entre ambas regiones, se introdujeron secuencialmente construcciones genéticas que comprenden: a) el promotor temprano pE/L del virus vaccinia río arriba de un sitio de clonado múltiple y b) un *cassette* para la expresión del gen marcador *uidA* (codifica para la enzima beta-glucuronidasa bacteriana, GUS). El plásmido así obtenido constituye el vector de transferencia universal (VT) en el cual se clonó el gen codificante para la proteína GFP río abajo del promotor pE/L. Este VT se transfectó en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo previamente infectados con una cepa vacunal de FWPV y se incubó hasta la aparición de efecto citopático generalizado. Posteriormente, el aislamiento de los virus

recombinantes se realizó por clonado de las partículas infectivas bajo agar mediante su capacidad de formar placas de lisis azules en presencia de X-Gluc, sustrato de la enzima GUS. Luego, se aisló un stock viral en el cual se confirmó la presencia y expresión de la región codificante del gen *gfp* mediante PCR y microscopía confocal, respectivamente.

En este trabajo se obtuvieron FWPV recombinantes que expresan la proteína GFP. Además, se implementó por primera vez en nuestro país la plataforma que permitirá obtener FWPV recombinantes para la expresión de distintas proteínas de interés con múltiples aplicaciones tales como el desarrollo de vacunas de nueva generación.

90- Construcción de vectores de transferencia para la obtención de poxvirus recombinantes que expresan antígenos del virus respiratorio sincicial bovino

Ferella, A¹; Del Médico Zajac, MP²; Dus Santos, MJ¹; Mozgovej, M¹; Calamante, G².

¹Inst. de Virología-CICVyA-INTA Castelar; ²Inst. de Biotecnología-CICVyA-INTA-Castelar.

Los virus canarypox (CNPV) y vaccinia Ankara modificado (MVA) se utilizan como vectores para el desarrollo de vacunas seguras y efectivas contra enfermedades infecciosas. Teniendo en cuenta la efectividad de las vacunas basadas en poxvirus y que el virus respiratorio sincicial bovino (bRSV) es una de las principales causas de enfermedad respiratoria en bovinos jóvenes generando importantes pérdidas económicas a nivel productivo es de gran importancia obtener nuevas vacunas contra este agente infeccioso. En este trabajo se propone obtener CNPV recombinantes que expresen simultáneamente las proteínas F y G de bRSV y MVA recombinantes que expresen estas proteínas individualmente desde la base genética de un vector de MVA en el que se ha eliminado el gen codificante para la proteína de unión a IL-18 (MVA008). Se seleccionaron las proteínas G y F por ser inductoras de inmunidad protectora. El gran tamaño del genoma de los poxvirus descarta la manipulación directa del ADN y los poxvirus recombinantes se obtienen por recombinación homóloga entre el genoma del virus y un vector de transferencia (VT) que porta

el gen de interés flanqueado por regiones genómicas que serán el blanco de inserción.

El objetivo de este trabajo fue la construcción de las herramientas moleculares que permitan la obtención de MVA008 y CNPV recombinantes que expresan antígenos de bRSV.

La secuencia codificante de la proteína G se clonó en los VT-134lacZ que permitirá obtener CNPV recombinantes por inserción en la región intergénica entre CNPV134 y CNPV135. En el caso de MVA las secuencias codificantes de las proteínas G y F se clonaron en el VT-MTK-GUS que permitirá la recombinación homóloga con la secuencia genómica viral correspondiente al gen MVA086R. En todos los casos, la expresión del gen foráneo está dirigida por el promotor temprano poxviral pEL. Además, los vectores de transferencia portan un cassette para la expresión de enzimas marcadoras [beta-galactosidasa (betaGal) o beta-glucuronidasa (GUS)]. Los genes de interés se obtuvieron por amplificación por PCR y se clonaron direccionalmente en los VT correspondientes mediante la inclusión de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción en los oligonucleótidos iniciadores. El VT-134-G y los VT-MTK-F o VT-MTK-G se transfectaron en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo infectados con CNPV o MVA008, respectivamente. El aislamiento de los virus recombinantes se realiza por su capacidad de formar placas de lisis azules en presencia de Blu-gal o X-Gluc, sustratos de las enzimas marcadoras betaGal y GUS.

En este trabajo se construyeron los VT que portan las secuencias codificantes de las proteínas inmunogénicas F o G de bRSV y se comenzó el proceso de aislamientos de los poxvirus recombinantes respectivos.

91- Obtención de virus MVA recombinantes que expresan la glicoproteína del virus rábico

Garanzini, D^{1,2}; Pérez, O³; Calamante, G².

¹MINCYT-ANLIS; ²Instituto de Biotecnología-CICVyA-INTA; ³Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB)-ANLIS-Malbrán.

La disponibilidad de nuevas vacunas que eliminen la manipulación del virus rábico y que permitan el control de la enfermedad es de importancia estratégica nacional y regional. La

necesidad de disponer a nivel mundial vacunas antirrábicas seguras, efectivas y de bajo costo ha llevado al desarrollo y evaluación de nuevos inmunógenos desde hace aproximadamente tres décadas. En este sentido, existen numerosos informes en la bibliografía que describen la utilización de vectores virales (replicativos o no) para el clonado y expresión de la glicoproteína RG del virus rábico, principal antígeno responsable de inducir inmunidad celular y humoral protectora en el hospedador. Los virus canarypox (CNPV) y vaccinia Ankara modificado (MVA) se utilizan como vectores para el desarrollo de vacunas seguras y efectivas contra enfermedades infecciosas. Sin embargo no existen trabajos donde se compare la eficacia de estos vectores frente al desafío con cepas patógenas. Teniendo en cuenta la efectividad de las vacunas basadas en poxvirus y que en el norte de nuestro país el virus rábico circula en animales domésticos y silvestres, nos propusimos obtener y comparar la eficacia de nuevas vacunas antirrábicas basadas en CNPV y MVA recombinantes. Previamente, en nuestro laboratorio se obtuvieron CNPV recombinantes que expresan la proteína RG que indujo inmunidad protectora en el modelo murino (potencia de 3.5 UI/ml).

El objetivo de este trabajo es la obtención de MVA recombinantes que expresen la proteína RG del virus rábico.

El gran tamaño del genoma de los poxvirus descarta la manipulación directa del ADN y los poxvirus recombinantes se obtienen por recombinación homóloga entre el genoma del virus y un vector de transferencia (VT) que porta el gen de interés flanqueado por regiones genómicas que serán el blanco de inserción. Para la obtención de los MVA recombinantes la secuencia codificante de la proteína RG se subclonó direccionalmente en el VT-Mtk-GUS río abajo del promotor poxviral. Este vector contiene además un cassette para la expresión de la enzima beta-glucuronidasa (GUS) y secuencias flanqueantes correspondientes al gen MVA086R (sitio blanco de recombinación). La identidad del gen de interés se confirmó por secuenciación. El VT-Mtk-RG se transfectó en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo infectados con MVA y los virus recombinantes se aislaron por su capacidad de formar placas de

lisis azules en presencia del sustrato de la enzima GUS (X-Gluc). La presencia y expresión de la secuencia codificante de la proteína RG se confirmó mediante amplificación por PCR y Western blot, respectivamente. Además, se confirmó la pureza del stock viral recombinante MVA-RG por amplificación por PCR de la región genómica viral del sitio blanco de inserción. En este trabajo se obtuvieron MVA recombinantes que expresan la proteína RG del virus rábico. Su capacidad inmunogénica y protectora se evaluará en el modelo murino.

92- Cuerpos de oclusión de baculovirus como estructuras transportadoras de proteínas de interés

López, MG¹; Alfonso, V^{1,2}; Taboga, O^{1,2}.

¹Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar; ²CONICET.

Los baculovirus son virus de insectos usados principalmente en el control biológico de plagas y la expresión de proteínas recombinantes. La característica de estos virus de generar estructuras de resistencia llamadas cuerpos de oclusión (OBs o poliedros) conformados mayoritariamente por la proteína poliedrina (POLH), los hace especialmente atractivos desde el punto de vista biotecnológico.

El objetivo de este trabajo consiste en desarrollar un método de obtención de poliedros quiméricos mediante fusiones traduccionales entre poliedrina y proteínas de interés, de manera de producir altos rendimientos de antígenos fácilmente purificables a bajo costo, en un sistema eucariota. Para ello se diseñaron y obtuvieron baculovirus que expresan la fusión POLHpprGFP como modelo, siendo ppr un sitio de clivaje para la proteasa PreScission (GE). Para aumentar la probabilidad de formación de poliedros que incorporan proteínas, se coexpresó una copia extra del gen poliedrina salvaje. Se ensayaron distintas condiciones de infección aportando esa copia en cis (en el genoma del baculovirus, polh+) o en trans (aportada por líneas celulares que expresan polh). Así, se determinó que la mayor proporción de poliedros fluorescentes se obtiene cuando se infectan líneas trans-empaquetadoras con baculovirus POLH-GFP de genotipo polh+. En particular, la línea que

mostró mayor producción de poliedros quiméricos al ser infectada fue la Sf9POLHmut, que expresa una copia de poliedrina mutada en el residuo de aminoácido 44 que genera poliedros de mayor tamaño y con escasa oclusión viral. Los poliedros quiméricos obtenidos bajo las condiciones de infección mencionadas fueron aislados en base a su insolubilidad a pH neutro y analizados en su composición de manera cualitativa por Western blot, demostrando la presencia de la proteína quimérica y escasa presencia de viriones ocluidos. La proteína GFP quimérica presente en los poliedros disueltos con Na₂CO₃ fue eficientemente reconocida en ensayos de ELISA, demostrando que la fusión a poliedrina no afectó su reconocimiento inmunológico. Asimismo, los poliedros disueltos tratados con la proteasa PreScission dieron altos rendimientos de proteína GFP soluble. En conjunto, estos resultados alientan el potencial uso de este sistema como herramienta de expresión y purificación de antígenos de interés en el sistema baculovirus.

NOTAS

NOTAS

NOTAS

NOTAS

NOTAS

NOTAS

NOTAS

NOTAS