



XII Congreso Argentino de Virología

V Simposio de Virología Clínica
III Simposio de Virología Veterinaria

Libro de resúmenes

26 al 28 de septiembre de 2017
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Centro de Convenciones Palais Rouge
Jerónimo Salguero 1443/49
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

PATROCINANTES

Entidades Patrocinantes

Ministerio de Salud de la Nación
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)
Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT)
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)
Embajada de Canadá en Argentina
Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS) - UBA-CONICET

Empresas Patrocinantes Principales

Abbott
Organizacion de Servicios Directos Empresarios (OSDE)
Biomerieux
Biodiagnóstico S.A.
Summit Research S.A.
Tecnolab S.A.

Empresas Patrocinantes

Microlat S.R.L.
Bioquímica S.R.L.
Roche
Biodynamics S.R.L.
La Nación
Alere S.A.
Arcángel Maggio
Inbio Highway S.A.
Lobov y Cía S.A.C.I.
Biocientífica S.A.
BioSystems S.A.
Ecotrade S.R.L.
Center Química
AP Biotech S.R.L.
Embiotec S.R.L.

Empresas colaboradoras

Diagnóstico Maipú S.A.
Federación Odontológica de la Provincia de Buenos Aires
Medicus S.A.
Laboratorios Bagó
Fundación Konex
Vetanco S.A.
Georgalos Hnos. S.A.I.C.A.
Migliore Laclaustra S.R.L.

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente

María M. Ávila (INBIRS-UBA/CONICET)

Vice-presidente

María A. Picconi (ANLIS-Malbrán)

Secretaría General

María A. Pando (INBIRS-UBA/CONICET)

Daniel Cisterna (ANLIS-Malbrán)

Tesorería

María V. Preciado (IMIPP-CONICET)

Nora Lopez (ICT Milstein-CONICET)

Comisión Técnica

Secretario: Mariano Pérez Filgueira (INTA)

Viviana Mbayed (FFyB-UBA)

Mónica Tous (ANLIS-MALBRAN)

Inés Zapiola (Htal. Muñiz)

Carolina Berini (INBIRS-UBA/CONICET)

V Simposio de Virología Clínica

Gabriela Turk (INBIRS-UBA/CONICET)

Paula Aulicino (Htal. Garrahan)

Cristina Videla (CEMIC)

Comisión Científica

Secretaria: Lucía Cavallaro (FFyB-UBA)

Daniela Gardiol (IBR),

Silvana Levis (ANLIS)

Viviana Ré (InViV-FCM-UNC)

Andrea Gamarnik (Fundación Instituto Leloir)

Sandra Cordo (FCEyN-UBA).

III Simposio de Virología Veterinaria

Cecilia Galosi (UNLP)

Ariel Vagnozzi (INTA)

Ana Bratanich (FCV-UBA)

Asociación Argentina de Microbiología

XII Congreso Argentino de Virología / compilado por Lucía Cavallaro. - 1a ed. -
Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2017.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-987-46701-0-6

1. Virología. I. Cavallaro, Lucía, comp. III. Título.

CDD 570.7

ISBN 978-987-46701-0-6



9 789874 670106

componente principal. La potencia de las vacunas antirrábicas obtenidas se evalúa mediante las pruebas recomendadas por SENASA en el modelo murino de desafío intracerebral. Una vez confirmada la protección frente al desafío, es necesario caracterizar el perfil de respuesta inmune (humoral y celular) inducido por los nuevos candidatos vacunales, para lo cual es fundamental disponer de herramientas moleculares que permitan su evaluación en el laboratorio.

El objetivo de este trabajo fue la obtención de una línea celular Sf9 que exprese constitutivamente la proteína RG como herramienta molecular para la evaluación de la respuesta inmune humoral y celular específica mediante ELISA y linfoproliferación, respectivamente. La secuencia codificante de RG se amplificó por PCR utilizando como template una construcción plasmídica disponible en el laboratorio y oligonucleótidos específicos. El amplicon obtenido se clonó en el vector pGEMT-Easy y la identidad del inserto se confirmó mediante secuenciación. Posteriormente, la secuencia de interés se subclonó de manera direccional en el vector pIB/V5-His. Este vector posee un gen de resistencia a blasticidina (para la selección de las células establemente transfectadas), el promotor OplE2 (para la expresión constitutiva del gen de interés en células de insecto) y, por la estrategia de clonado, permite obtener la proteína de interés fusionada a un tracto de seis histidinas en el extremo C-terminal (para su purificación mediante columnas de afinidad). El vector pIB-V5His-RG se transfectó en células Sf9 utilizando el lípido catiónico Cellfectin® y se adicionó blasticidina (80 µg/ml) para la selección de las células establemente transfectadas. Se realizaron pasajes sucesivos de los clones resistentes a blasticidina, disminuyendo paulatinamente la concentración del antibiótico (hasta una concentración de 10 µg/ml). Posteriormente, la presencia y expresión de la secuencia codificante de RG se confirmó mediante amplificación por PCR y Western blot, respectivamente. Finalmente, mediante un ensayo de dot-blot se determinó que los sueros antirrábicos positivos solo reaccionan con los extractos celulares de la línea Sf9-RG mientras no se observó señal específica frente a extractos de células Sf9 no transfectadas.

En este trabajo se obtuvo una línea celular Sf9 que expresa constitutivamente la proteína RG que es reconocida específicamente por sueros antirrábicos. La línea Sf9-RG se utilizará para la evaluación del perfil de respuesta inmune inducida por los nuevos candidatos a vacunas antirrábicas.

VAC 17

GENERACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE ENSAYOS DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE FLAVIVIRUS DE IMPORTANCIA REGIONAL

Lorch M S¹, Collado M S¹, Rota R P², Argüelles M H³, Spinsanti L I⁴, Lozano M E¹, Goñi S E¹

¹Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular (LIGBCM), Área de Virosis Emergentes y Zoonóticas (AVEZ), DTOCyT, Universidad Nacional de Quilmes. ²Laboratorio de Cronobiología, DTOCyT, Universidad Nacional de Quilmes. ³Laboratorio de Inmunología y Virología, DTOCyT, Universidad Nacional de Quilmes. ⁴Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología "Dr. Carlos Vanella" (INVIV), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. ⁵Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular (LIGBCM), Área de Virosis Emergentes y Zoonóticas (AVEZ), DTPCyT, Universidad Nacional de Quilmes.

El diagnóstico para Flavivirus está fuertemente centrado en el empleo de ensayos serológicos, ya sea de forma directa (determinación de antígenos tempranos), o indirecta (determinación IgM o IgG en suero o LCR de pacientes). Sin embargo, las técnicas de *Rapid Diagnostic Tests* (RDTs) no suelen contemplar el complejo escenario de Flavivirus presente en la región, perdiendo especificidad, con lo que se debe recurrir a técnicas más complejas como la neutralización.

Esta situación plantea la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico sencillos que permitan diferenciar una infección producida por estos agentes virales, en cuyo diseño se contemplen los diversos agentes que se encuentran circulando. El objetivo de este trabajo se centra en la expresión de la proteína recombinante NS1 de flavivirus en su forma completa y el diseño de una construcción que presente las regiones de mayor inmunogenicidad, con el fin de generar antígenos que

permitan establecer un ensayo serológico para determinar la identidad del agente etiológico en un cuadro de infección flaviviral.

En este trabajo se utilizaron cepas regionales de los virus *St. Louis Encephalitis*, *West Nile*, *Yellow Fever*, Zika y Dengue para el desarrollo de las siguientes actividades: predicción bioinformática de las regiones inmunogénicas, diseño de construcciones y *primers*, obtención de ARN viral, síntesis de ADNc, amplificación de los fragmentos de interés, clonado de los productos de amplificación, transferencia a los vectores de expresión, ensayos de expresión, purificación y estudio antigénico de las proteínas mediante *Western Blotting* y ELISA.

Las regiones codificantes propuestas fueron empleadas para su inserción en vectores de expresión pET, dando lugar a la generación de una proteína recombinante unida a un tag de histidinas. Además, como una alternativa a la proteína completa, se realizaron las predicciones de sitios de mayor inmunogenicidad de NS1^{LEV} y se diseñó una construcción que permitiera la expresión de varios epítopes separados por residuos de glicinas, teniendo además la opción de combinar los diferentes constructos para obtener una mayor respuesta. Las condiciones de expresión fueron optimizadas para las distintas proteínas, y la identidad confirmada a través de *Western Blotting* con sueros específicos y con sueros comerciales que reconocen el tag. Finalmente, se realizaron las optimizaciones a los procesos de purificación de las proteínas y su posterior empleo para la adhesión a las placas multipocillos. Al comenzar a emplear sueros específicos pudo observarse que los antígenos son reconocidos por en este formato, restando aún definir los valores de corte para cada caso, ya que en ese caso es necesario contar con una amplia batería de muestras de pacientes. Asimismo, se espera poder ensayar varios formatos de RDTs, como captura de anticuerpo en los formatos directo y sandwich, la captura de antígeno y la determinación de avidéz para diferenciar infecciones primarias o secundarias.

VAC 18

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN ANIMALES INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA CON ALTA Y BAJA CARGA PROVIRAL

Nieto Farias M V^{1,2}, Lendez P², Marinez Cuesta L^{1,2}, Ceriani C^{1,2}, Dolcini G^{1,2}

¹Laboratorio de Virología-Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV)-Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, Argentina. ²CIVETAN (Centro de Investigación Veterinaria de Tandil)-CONICET-Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, Argentina.

El virus de la leucosis bovina (BLV) es causal de una enfermedad linfoproliferativa. El desarrollo de los perfiles de infección de alta carga proviral (ACPV) o baja carga proviral (BCPV) estaría relacionado a factores genéticos e inmunológicos. Además de afectar a los linfocitos B, el BLV altera el normal funcionamiento de los linfocitos T y monocitos, resultando en una producción diferencial de citoquinas. La alteración en su expresión podría tener significancia en cuanto a la capacidad de los bovinos infectados para la respuesta inmune frente a infecciones y vacunas. Existen datos de la bibliografía controvertidos respecto a la expresión de citoquinas en animales infectados que presentan o no linfocitosis persistente y/o linfosarcoma. Sin embargo, no está descrita dicha respuesta en relación a la carga proviral.

El objetivo de este trabajo fue cuantificar la expresión de ARNm para IL-6, IL-10, IL-12, IFN-γ y TNF-α en PBMC extraídos de vacas Holando Argentino no infectadas con el BLV (grupo control) e infectadas con ACPV o BCPV. A partir de muestras de sangre de 4 animales con ACPV, 4 con BCPV y 4 negativas a BLV, se separaron los PBMC mediante gradiente de Ficoll. Por un lado se conservaron células sin estímulo (*ex vivo*) y por otro lado se cultivaron *in vitro* durante 48hs PBMC en presencia de Concanavalina A (ConA). Los ensayos de expresión de ARNm de citoquinas se realizaron mediante cuantificación relativa por PCR en tiempo real, utilizando SybrGreen y amplificando GAPDH como gen endógeno. Los resultados se analizaron con REST© (Relative Expression Software Tool) 2009. Se evidenció que los PBMC de animales con ACPV, tanto estimulados con ConA como *ex vivo*, presentan mayor expresión de ARNm para IL-6 con respecto al control: 172 veces mayor en PBMC *ex vivo* (p=0,010) y 37 mayor en PBMC incubados con ConA (p=0,663). La expresión de los ARNm para las otras citoquinas resultó ser muy heterogénea, aunque no significativamente diferente entre grupos. En

PBMC ex vivo de los animales con BCPV, con respecto al control, se evidenciaron diferencias de expresión en: TNF- α (se expresa 0,032 veces menos; $p=0,012$), IFN- γ (se expresa 0,044 veces menos; $p=0,044$), IL-10 (se expresa 0,067 veces menos; $p=0,009$) e IL-6 (se expresa 0,045 veces menos; $p=0,005$). En las células de los animales con BCPV estimulados con ConA, el TNF- α se expresa 0,026 veces menos ($p=0,006$), la IL-10 se expresa 0,0625 veces menos ($p=0,011$) y la IL-6 se expresa 0,0162 veces menos ($p=0,02$).

Estos estudios preliminares muestran que los PBMC de los animales con ACPV tienen una expresión de citoquinas más heterogénea, tendiente a una mayor respuesta de tipo Th2, que los animales con BCPV. Sin embargo, los animales con BCPV tendrían un perfil de expresión de citoquinas, tanto Th1 como Th2, similar al de los animales no infectados, aun existiendo diferencias significativas, evidenciándose una conducta más homogénea en relación al grupo control y dentro del mismo grupo.

VAC 19

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA L1 DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO TIPO 16 PARA EL DESARROLLO DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO

Collado M S, Iglesias N G, Lorch M S, Rota R P, Goñi S E, Lozano M
Universidad Nacional de Quilmes.

El cáncer cervical es el segundo tipo de cáncer más común en las mujeres a nivel mundial. La infección persistente con diferentes tipos de virus papiloma humano (HPV, por Human Papilloma Virus) oncogénico, es un factor necesario para el desarrollo del mismo. Las vacunas que actualmente se encuentran en el mercado están basadas en la habilidad de la proteína de la cápside viral (L1), para formar partículas similares a virus (VLPs, por *Virus Like Particles*), las cuales se parecen en forma y tamaño a los viriones salvajes e inducen altos niveles de anticuerpos neutralizantes. La respuesta serológica frente a vacunas de HPV basadas en VLPs de tipo específicos es universal y los títulos de anticuerpos son muy superiores a los generados por la infección natural. Todavía no se conoce con exactitud la duración de la protección que confieren estas vacunas, aunque sí se conoce que los títulos de anticuerpos se mantienen significativamente por encima del título normal al menos 60 meses después de la vacunación.

El objetivo de este trabajo es producir antígenos de HPV-16 que permitan desarrollar ensayos de detección serológica *in house* para el diagnóstico así como el seguimiento de la respuesta en la población vacunada.

A partir de los datos de secuencia completas de la proteína L1 de HPV-16 obtenidos de GenBank, se llevó a cabo un alineamiento que fue posteriormente empleado para la predicción bioinformática de las regiones inmunogénicas y el diseño de los *primers*. A partir de muestras de pacientes con HPV-16 positivo se amplificaron diferentes versiones de L1. Luego de su amplificación fueron insertadas en un vector de clonado y transferidas al vector de expresión pGEX-5X-1, dando lugar a una fusión a GST (Glutathione S-transferase) en su extremo amino, lo cual debería impactar positivamente en la producción y solubilidad de estas proteínas recombinantes. De esta forma, se generaron 6 variantes donde se abarcan de forma escalonada y desde el N terminal los distintos epítopes descritos en bibliografía. Las mismas son denominadas GST-L1₂₇, GST-L1₄₀, GST-L1₄₈, GST-L1₆₀, GST-L1₇₁, GST-L1₈₀ y GST-L1₈₃. Es importante destacar que esta última proteína representa nuestra secuencia de base, y presenta la delección de los primeros 30 residuos, ya que constituyen la región hidrofóbica de la proteína, pudiendo influir negativamente en su expresión. Una vez obtenidas todas las construcciones se llevó a cabo la optimización de la expresión y purificación de las mismas, procediendo luego a la caracterización antigénica de las mediante *Western Blotting* y enzimoinmunoensayo (EIE).

De esta forma, fue posible observar la detección de las distintas variantes empleando tanto sueros de pacientes y comerciales para GST, a través de *Western Blotting*. Por otro lado, se optimizó un EIE, determinando las condiciones óptimas para la adhesión de los antígenos al soporte de placa multipocillo, y observando respuestas diferenciales dependiendo del o los epítopes abarcados.

VAC 20

EL USO DE UN ADYUVANTE DE NUEVA GENERACIÓN (ISPA) EN VACUNA CONTRA EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA AUMENTA LA INMUNOGENICIDAD Y FAVORECE LA PROTECCIÓN INDUCIDA FRENTE AL DESAFÍO VIRAL

Bidart J E^{1,2}, Gammella M¹, Kornuta C^{1,2}, Soria I^{1,2}, Langellotti C^{1,2}, Mongini C^{1,2}, Calvino L³, Quattrocchi V¹, Marcipar I^{2,4}, Zamorano P^{1,2}

¹Instituto de Virología-CICVyA, INTA; ²CONICET; ³EEA Rafaela, INTA; ⁴Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral.

La Fiebre Aftosa (FA) es una enfermedad altamente contagiosa y económicamente importante. Las vacunas comerciales formuladas con Virus de Fiebre Aftosa inactivo (VFAi) y adyuvantes son eficaces, sin embargo se busca utilizar un adyuvante de origen nacional que resulte también eficaz y económico.

EL ISPA (immunostimulant particle) es un adyuvante tipo ISCOM, que contiene liposomas formulados con dipalmitoil-fosfatidilcolina, colesterol, esteralamina, cargado con QuilA y es de origen nacional.

En este trabajo se evaluó si ISPA potencia la respuesta inmune contra VFA A2001. Se utilizó el modelo murino que predice la calidad de vacunas contra FA en bovinos.

Se inmunizaron ratones BALB/c ($n=5$ por grupo) con (I) VFAi; (II) VFAi+ISPA (5 μ g); (III) VFAi+ISPA (10 μ g); (IV) ISPA y (V) PBS controles negativo. Los grupos I y II fueron inmunizados los días 0 y 14, y desafiados a 28 dpv. Los grupos I y III fueron inmunizados el día 0 y desafiados a 21 dpv.

Se escogió 0,3 μ g/ dosis de VFAi porque a los 21 dpv induce protección en el 40% de los animales vacunados y desafiados con virus.

A los 28 dpv, en el grupo II: VFAi+ISPA (5 μ g) (con booster a 14 dpv), el 100% de los animales estuvo protegido frente al desafío viral, en los grupos: VFAi o VFAi+adyuvante comercial, sólo el 80%. Al momento del desafío, los Acs totales α VFA fueron: 6,2 \pm 0,1 en el grupo VFAi+ISPA, mayores ($p<0,001$) que en los grupos: VFAi y VFAi+adyuvante comercial (4,6 \pm 0,4 y 5,9 \pm 0,1 respectivamente). Los Acs medidos por Elisa en fase líquida, mostraron una diferencia significativa en el grupo VFAi+ISPA ($p<0,01$) en comparación con los animales vacunados con VFAi y VFAi+adyuvante comercial (3,08 \pm 0,02; 2,0 \pm 0,3 y 1,8 \pm 0,7 respectivamente). El % de avidez de los sueros en los grupos VFAi+ISPA y VFAi+Adyuvante comercial fue significativamente superior al grupo VFAi ($p<0,05$). Cuando se estudiaron los isotipos inducidos (28 dpv), se encontró un incremento significativo de IgG1, IgG2a e IgG2b en el grupo VFAi+ISPA con respecto a los grupos que recibieron VFAi o VFAi+adyuvante comercial.

A los 21 dpv, en el grupo VFAi+ISPA (10 μ g) sin booster, los Acs totales α VFA, medido por Elisa sandwich, fue de: 5,06 \pm 0,07 significativamente mayor a los niveles detectados en los ratones vacunados con VFAi ($p<0,05$). El perfil de isotipos fue similar al detectado en el grupo VFAi+ISPA (5 μ g) a los 28 dpv. Todos los animales estuvieron protegidos frente al desafío viral (100%) mientras que en el grupo: VFAi solo el 40%. En la evaluación de inmunidad celular, a los 21 dpv, se utilizaron esplenocitos de ratones y se realizó linfoproliferación (CFSE). En los animales vacunados con VFAi+ISPA 10 μ g se detectó mayor proliferación que en los grupos VFAi o VFAi+ adyuvante comercial ($p<0,05$) cuando los esplenocitos fueron estimulados *in vitro* con VFAi. Se están evaluando otros parámetros de inmunidad celular.

La inclusión de ISPA en la vacuna contra FA indujo un incremento en la inmunidad humoral y celular, protectivos frente al desafío viral.

VAC 21

EVALUACIÓN DE UNA VACUNA A SUBUNIDAD CONTRA IBVD EN GALLINAS DE PRODUCCIÓN AVÍCOLA. UNA ALTERNATIVA A LAS VACUNAS INACTIVADAS

Lucero M S¹, Richetta M^{1,2}, Chimenoz S^{1,2}, Canet Z³, Pinto S⁴, Berinstein A^{1,2}, Gómez E^{1,2}

¹Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA, Hurlingham, Argentina. ²CONICET, Argentina. ³EEA INTA Pergamino, Argentina. ⁴Facultad de Veterinaria, UBA, Argentina.

El Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) es el agente etiológico de una enfermedad altamente contagiosa e inmunosupresora que afecta pollos jóvenes causando importantes pérdidas económicas en