

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2012-2014

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: MISTCHENKO

NOMBRES: ALICIA SUSANA

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: REMEDIOS DE ESCALADA CP: 1826 Tel:

virologiahnrg@gmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACION

Nuevos virus respiratorios en la etiología de la infección respiratoria aguda en niños

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Investigador Independiente Fecha: 1999

ACTUAL: Categoría: Investigador Principal desde fecha: 2012

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Laboratorio de Virología del Hospital de Niños R Gutiérrez

Facultad:

Departamento:

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: Gallo N°: 1330

Localidad: Ciudad de Buenos Aires CP: 1425 Tel: 011-4964-3118

Cargo que ocupa: a/c Laboratorio de Virología

5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres:

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica:

.....

.....

Firma del Director (si corresponde)

Firma del Investigador

¹ Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2014 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2012 al 31-12-2013, para las presentaciones bianuales.

6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Durante el período 2012-2013 se desarrollaron las siguientes líneas de trabajo, todas ellas con fuerte inserción en las problemáticas de Salud de la Región Metropolitana de Buenos Aires.

1)-Finalización del estudio “Nuevos virus, nuevos métodos”

En el transcurso de este proyecto logramos los siguientes resultados:

- Incremento de la sensibilidad de la detección molecular de virus respiratorios versus la detección por inmunofluorescencia. Esto permitió el hallazgo de virus en bajo número de copias y en infecciones múltiples (130 virus detectados por IFI vs. 230 virus detectados por PCR en tiempo real (qPCR).
- Detección de virus por qPCR y que no pueden detectarse por métodos convencionales: Rinovirus, Enterovirus respiratorios,, Bocavirus y Coronavirus. Con la incorporación de la detección de estos virus se incrementó el porcentaje de positividad del 66% al 90% de las muestras analizadas, sólo teniendo en cuenta virus con más de 1000 copias/uL de extracto.
- Detección de coinfecciones: El uso de qPCR permitió aumentar la sensibilidad de detección, ampliar el rango de virus estudiados y como consecuencia detectar coinfecciones en el 53% de las muestras: en 2 muestras se detectaron 6 virus, en 3 muestras 5 virus, en 5 muestras 4 virus, en 26 muestras 3 virus y en 60 muestras 2 virus.

Se está preparando un manuscrito con los datos obtenidos y parte de los resultados se publicaron en: *Molecular typing of adenoviruses in pediatric respiratory infections in Buenos Aires, Argentina (1999-2010)*, *J Clin Virol* 53(2):145-50, 2012.

2)- Caracterización genética de *Metapneumovirus* asociados a infección respiratoria aguda en la región metropolitana, período 2009-2011.

Los resultados están publicados en:

Phylogenetic and phylodynamic analyses of human metapneumovirus in Buenos Aires (Argentina) for a three-year period (2009-2011).

PLoS One. 2013 Apr 30;8(4):e63070. doi: 10.1371/journal.pone.0063070. Print 2013.

3)- Monitoreo y evaluación de la resistencia a los inhibidores de la neuraminidasa en virus influenza estacional y pandémico

Durante el período se estudiaron 12871 aspirados nasofaríngeos (ANF) de niños con infección respiratoria aguda baja, se identificó el virus de Influenza en 726 muestras, de las cuales el 91% correspondieron al tipo A, y el 46.8% fueron H1N1 pandémico.

Se evaluó resistencia a oseltamivir por secuenciación del segmento N4 del gen de la neuraminidasa de los virus H1N1 (en este segmento se encuentran las mutaciones H275Y, S247N, G249R y K262R). El 98% de las muestras resultaron sensibles al oseltamivir y todas fueron wild type para el resto de las mutaciones mencionadas. Dos virus portaban la mutación H275Y.

4)- Análisis genético del virus Dengue 1 en Buenos Aires.

En las últimas dos décadas se ha detectado un aumento significativo en la incidencia del dengue en América. En nuestro país se han detectado brotes en provincias que limitan con países que tienen transmisión local sostenida, pero no en Buenos Aires, donde el primer brote con transmisión local se detectó en el año 2009. Entre los últimos meses del 2008 y Junio del 2009, un brote de DENV-1 se reportó en Bolivia y algunas provincias del norte argentino, con más de 25000 casos en nuestro país. Este brote alcanzó Buenos Aires, el mayor número de casos fueron confirmados entre febrero y mayo del 2009. Se secuenciaron 27 genomas completos de DENV-1 y se determinaron sus características genómicas y de crecimiento. Se analizaron sus relaciones filogenéticas y la dispersión global y local, con el fin de contribuir al mejor entendimiento de los procesos evolutivos de este patógeno.

Los resultados han sido enviados para publicación

7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO. 7.1 PUBLICACIONES.

Molecular typing of adenoviruses in pediatric respiratory infections in Buenos Aires, Argentina (1999-2010).

Barrero PR, Valinotto LE, Tittarelli E, Mistchenko AS.

J Clin Virol. 2012;53(2):145-50

BACKGROUND: The human adenovirus (HAdV) types most commonly found in respiratory samples belong to HAdV species C (HAdV-C1, -C2, -C5, and -C6) and to HAdV species B (HAdV-B3 and -B7). Several studies in South America have shown the association between severe respiratory infections and subspecies B1.

OBJECTIVES: The aim of this study was to identify the adenovirus types associated with acute lower respiratory tract infections in children, found as single or coinfections, throughout a 12-year period.

STUDY DESIGN: All samples that tested positive for adenovirus by immunofluorescence assay from January 1999 to December 2010 were typed by evaluating a set of four viral genes (E1A, VA, hexon and fiber). Quantitative PCRs for HAdV-B and HAdV-C species were performed to compare the viral load found in single infections and coinfections.

RESULTS: From a total of 743 HAdV, 654 (88%) were single infections and 89 (12%) coinfections. From the 654 single HAdV infections, members of four species were present: species B (n=492, 75.23%), species C (n=138, 21.1%), species E (n=19, 2.91%), and species D (n=5, 0.76%). Only members of species B (n=109, 57.67%) and species C (n=80, 42.33%) were detected in coinfections. HAdV-B7 and HAdV-B3 were the most prevalent types (n=308, 36.54%; n=230, 27.28% respectively) and HAdV-C1, -C2, -E4, -C5, -C6, -D8, -B11, -B14 and -B21 were also detected. Viral loads for species C viruses were higher in single infections than in coinfections ($p<0.01$), whereas the opposite was observed for species B viruses ($p<0.0001$).

CONCLUSIONS: This study provides a thorough description of adenovirus circulation and diversity in Buenos Aires in a 12-year period. The high proportion of coinfections found in this work shows that this phenomenon might be more common than expected.

Grado de participación: Diseño, Muestreo, Análisis, Factibilidad

Molecular evidence of St. Louis encephalitis virus infection in patients in Buenos Aires, Argentina.

Valinotto LE, Barrero PR, Viegas M, Alvarez López MC, Mistchenko AS.

J Clin Virol. 2012;54(4):349-51.

We report two cases of St. Louis encephalitis where the virus was detected in patients' sera directly by molecular techniques allowing subsequent typing. Phylogenetic analysis of both samples showed that NS5 sequences clustered with viruses previously classified as genotype III.

Grado de participación: Detección de los casos. Diseño. Factibilidad

Phylogenetic and phylodynamic analyses of human metapneumovirus in Buenos Aires (Argentina) for a three-year period (2009-2011).

Velez Rueda AJ(1), Mistchenko AS, Viegas M.

PLoS One. 2013, 30;8(4):e63070. doi: 10.1371/journal.pone.0063070.

Human metapneumovirus, which belongs to the Paramyxoviridae family and has been classified as a member of the Pneumovirus genus, is genetically and clinically similar to other family members such as human respiratory syncytial virus. A total of 1146 nasopharyngeal aspirates from pediatric patients with moderate and severe acute lower respiratory tract infections, hospitalized at the Ricardo Gutierrez Children's Hospital (Buenos Aires,

Argentina), were tested by real time RT-PCR for human metapneumovirus. Results showed that 168 (14.65%) were positive. Thirty-six of these 168 samples were randomly selected to characterize positive cases molecularly. The phylogenetic analysis of the sequences of the G and F genes showed that genotypes A2 and B2 cocirculated during 2009 and 2010 and that only genotype A2 circulated in 2011 in Argentina. Genotype A2 prevailed during the study period, a fact supported by a higher effective population size (N_{eff}) and higher diversity as compared to that of genotype B2 (10.9% (SE 1.3%) vs. 1.7% (SE 0.4%), respectively). The phylogeographic analysis of the G protein gene sequences showed that this virus has no geographical restrictions and can travel globally harbored in hosts. The selection pressure analysis of the F protein showed that although this protein has regions with polymorphisms, it has vast structural and functional constraints. In addition, the predicted B-linear epitopes and the sites recognized by previously described monoclonal antibodies were conserved in all Argentine sequences. This points out this protein as a potential candidate to be the target of future humanized antibodies or vaccines.

Grado de participación: Diseño. Factibilidad

Epidemiology of Bordetella pertussis in a children's hospital.

Gentile A, Romanin VS, Juárez Mdel V, Lución MF, Marques M de L, Mistchenko AS.

Arch Argent Pediatr. 2014 Feb;112(1):26-32.

INTRODUCTION: Pertussis or whooping cough continues to be a major cause of morbidity and mortality in infants younger than 1 year old.

OBJECTIVES: To describe the clinical and epidemiological profile of Bordetella pertussis and to analyze the factors associated with confirmation by PCR and case fatality rate.

MATERIAL AND METHODS: Prospective, cohort study conducted between December 2003 and December 2011. The study included children seen at the Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez suspected of pertussis. The factors associated with confirmation by PCR and the case fatality rate by relative risk (RR) with a 95% confidence interval were studied.

RESULTS: Six hundred and twenty patients with a 38% of positive cases (236/620) were included, 3 cases were confirmed by epidemiological link. Confirmed cases (239) showed a seasonal pattern from September through February, a median age of 3 months old, and 89% had received less than three vaccine doses. Eighty six percent of patients were hospitalized: their median length of stay was 7 days. A total of 99% of patients were eu-trophic, 98% were immunocompetent and 17.5% required intensive care. The clinical presentation was analyzed in 480 patients. Of them, 38% (184) had a positive PCR result and their symptoms were: 96.2%, cough; 76.5%, paroxysmal cough; 57.9% cyanosis; 55.7%, respiratory distress; 29%, fever; 22.4%, apnea; 21.9%, vomiting after coughing. A multivariate analysis identified the following as independent predictors associated with confirmation of pertussis by PCR: paroxysmal cough (OR 2.52: 1.50-4.22; $p=0.000$) and leukocytosis upon admission $>20\,000$ white blood cells/mm³ (OR 7.96: 4.82-13.17; $p=0.000$); having developed fever reduced the chance of having a positive PCR result (OR 0.47: 0.29-0.77; $p=0.003$). The case fatality rate for hospitalized patients was 6.8%. Leukocytosis $>30\,000$ white blood cells/mm³ was a predictor of fatality (RR 6.7: 1.88-23.9; $p=0.001$).

CONCLUSIONS: Confirmed cases were mostly infants younger than 1 year old who were healthy before and who had not completed their primary immunization schedule. Paroxysmal cough and leukocytosis were associated with PCR diagnosis, while leukocytosis was a predictor of mortality.

Grado de participación: Detección de los casos. Factibilidad.

Surveillance of group A Rotavirus in Buenos Aires 2008–2011, long lasting circulation of G2P[4] strains possibly linked to massive monovalent vaccination in the region

Marcelo G. Mandiles, Laura E. Esteban, Marcelo H. Argüelles, Alicia Mistchenko, Graciela Glikmann, Alejandro A. Castello

J. Clin Virol available in press 05 May 2014

Background: Group A rotaviruses (RVA) are the most frequent single etiological agents of severe diarrhea in infants. Since 2006 RVA vaccines have been introduced in national schedules of middle and high income countries with substantial declines in rotavirus associated disease burden. However, surveillance must be maintained to, eventually, detect emerging types or variants selected by the new pressure imposed by vaccination.

Objectives: To analyze the molecular epidemiology of group A rotavirus after vaccine introduction in the region in the context of data from more than 15 years of continuous surveillance in Buenos Aires.

Study design: RVA positive diarrhea samples collected in Buenos Aires from 2008 to 2011 were genotyped by RT-PCR. Selected samples were sequenced to gain insight on evolution of common and globally emerging human RVA strains.

Results: Lineage III G12P[8] strain emerged in 2008 in Buenos Aires and shared co-dominancy with G3 strains during 2009. An atypical long lasting circulation of G2P[4] strains since 2004 reached rates around 80% in 2011 in Buenos Aires. Sequencing of the VP7 and VP4 genes of representative G2P[4] isolates suggests Brazil as the origin of the 2010–2011 strains.

Conclusions: Globally emergent G12 lineage III strains could be established as dominant strains in a very populated area in two years since emergence. In this work it was also shown that the persistence of G2P[4] strains during 8 years could be related to massive immunization with the monovalent vaccine in the region.

Grado de participación: Detección de los casos.

7.5 COMUNICACIONES.

Análisis genético y filogenético de los virus dengue aislados en 2009-2010 en Buenos Aires, Argentina.

Barrero, PR; Lusso, SB; Tittarelli, E; Mistchenko, AS.

Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología, Vaquerías, Córdoba. Dic 2012

Evaluación de la carga viral presentada en casos de infección por virus dengue 1 correspondientes al brote del año 2009

Tittarelli, E; Alvarez López, MC; Mistchenko, AS; Barrero PR

Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología, Vaquerías, Córdoba. Dic 2012

Where is HRSV during the summer?

Viegas M.; Velez Rueda A.J.; Mistchenko, A.S.

presentado en el 8th Annual Respiratory Syncytial Virus Symposium 2012.

September 27 – 30, 2012 Santa Fe, New Mexico. USA

Molecular Evolution of Human Metapneumovirus in Buenos Aires, Argentina during 2009-2011.

Velez Rueda A.J., Mistchenko, A.S., Viegas M.

presentado en forma oral en el 8th Annual Respiratory Syncytial Virus Symposium 2012.

September 27 – 30, 2012 Santa Fe, New Mexico. USA

Rotavirus circulation in Buenos Aires, dominance of G12 strains during 2009 and high frequencies of G2 strains during the last years.

Marcelo G. Mandile, Laura E. Esteban, Marcelo H. Argüelles, Alicia S. Mistchenko, Graciela R. Glikmann, Alejandro A. Castello.

11th International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses November 27 - December 1, 2012. San Juan, Puerto Rico

Análisis filogenético y filogeográfico del virus Dengue genotipo V desde 1999 a 2010.

Tittarelli E, Lusso SB, Mistchenko AS, Barrero PR

Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología, 2013, Buenos Aires.

Inpatient Variation of the Respiratory Syncytial Virus Attachment Protein Gene in patients through time.

Mariana Viegas, Ana Julia Velez Rueda, Alicia S. Mistchenko

XV International Conference on Negative Strand Viruses, Granada, Spain. Junio 2013

Factores de riesgo de infección por virus influenza en niños internados en un hospital pediátrico durante los años 2000-2012 en Argentina.

Lucion, MF; Juarez, MV; Bakir,J; Romanin, V; Umido,V; Barrero,P; Mistchenko,A. Gentile,A
Presentación Oral en el 3° Encuentro Nacional de Epidemiología Pediátrica. Buenos Aires, 15 de noviembre de 2013

Patrón clínico epidemiológico del Virus Sincicial Respiratorio en niños internados en un hospital pediátrico durante los años 2000-2012 en Argentina.

Juarez, MV; Lucion, MF; Bakir,J; Romanin, V; Umido,V; Viegas M; Mistchenko,A, A Gentile
Trabajo presentado como Presentación Oral en el 3° Encuentro Nacional de Epidemiología Pediátrica. Buenos Aires, 15 de noviembre de 2013

Factores de riesgo de infección por virus influenza en niños internados en un hospital pediátrico durante los años 2000-2012 en Argentina.

Lucion, MF; Juarez, MV; Bakir,J; Romanin, V; Umido,V; Barrero P, Mistchenko,A., Gentile,A.
Trabajo presentado como Presentación oral de trabajos libres seleccionados en el 35° Congreso Argentino de Pediatría. Sociedad Argentina de Pediatría. Mar del Plata, 24 al 27 de septiembre de 2013

Patrón clínico epidemiológico del Virus Sincicial Respiratorio en niños internados en un hospital pediátrico durante los años 2000-2012 en Argentina.

Juarez, MV, Lucion, MF;; Bakir,J; Romanin, V; Umido,V; Barrero P, Mistchenko,A., Gentile,A.

Trabajo presentado como Póster en el 35° Congreso Argentino de Pediatría. Sociedad Argentina de Pediatría. Mar del Plata, 24 al 27 de septiembre de 2013.

A propósito de un caso: isquemia bitalamica secundaria a encefalitis por virus de Saint Louis.

Carballo C, Cabana M. Ledezma F, Pascual C, Cazes C, Mistchenko A. Lopez
Trabajo presentado como Póster en el 35° Congreso Argentino de Pediatría. Sociedad Argentina de Pediatría. Mar del Plata, 24 al 27 de septiembre de 2013.

Factores de riesgo de infección por virus influenza en niños internados en un hospital pediátrico durante los años 2000-2012 en Argentina.

Gentile A, Lucion MF, Juarez MV, Bakir,J; Romanin, V; Umido,V; Barrero P, Mistchenko,A.,
Trabajo presentado como póster en el 15° Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica. San Pablo, Brasil. Del 26 al 29 de junio de 2013

Patrón clínico epidemiológico del Virus Sincicial Respiratorio en niños internados en un hospital pediátrico durante los años 2000-2012 en Argentina.

Gentile A, Juarez MV, Lucion MF, Bakir,J; Romanin, V; Umido,V; Barrero P, Viegas M, Mistchenko,A.

Trabajo presentado como Presentación oral en el 15° Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica. San Pablo, Brasil. Del 26 al 29 de junio de 2013

Epidermólisis Ampollar Distrófica (EAD): primer análisis genético del gen COL7A1 en nueve familias, en un Hospital Público.

Vivoda J, Sanchez M, Valero L, Angeletti A, Manzur G, Suarez E, Máximo I, Máximo JA, Natale MN, Valinotto LE, Mistchenko A.

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

Infección Respiratoria Aguda: Los virus como principales protagonistas

Temas de Infectología Pediátrica (TIPs) Módulo 5 y 6

Sociedad Argentina de Pediatría

(TIPs es un programa de actualización con modalidad de Educación a Distancia.

Destinado a médicos pediatras que atienden niños, niñas y adolescentes, basado en temas de infectología pediátrica).

10.2 DIVULGACIÓN

Programa televisivo, Conducción Adrián Paenza, Científicos Industria Argentina.

La genética del virus, TV Pública, Argentina, 2013.

<http://www.tvpublica.com.ar/articulo-a/la-genetica-del-virus/>

11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.

Ana Julia Velez Rueda, Licenciada en Bioquímica, UNLP. Beca de Estudio para Graduados Universitarios, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

Epidemiología molecular de Metaneumovirus y Virus sincicial respiratorio.

Abril 2012- finalizó en Abril 2013.

Directora: AS Mistchenko

Laura E Valinotto. Licenciada en Biotecnología, Universidad Nacional de Rosario.

Beca postdoctoral – CONICET

Proyecto de investigación: Búsqueda e identificación de virus asociados a infecciones respiratorias agudas de etiología desconocida en la población pediátrica mediante técnicas moleculares de amplificación independiente de la secuencia (SISPA) y Next Generation Sequencing (NGS).

Directora: AS Mistchenko

Estefania Titarelli. Licenciada en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

Beca Doctoral CONICET (desde Abril 2012).

Título: Estudio genético de los virus Dengue circulantes en los últimos años en Argentina. Laboratorio de Virología del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez.

Director: Paola Barrero. Co-director: Alicia Susana Mistchenko.

Debido al lamentable fallecimiento de la Dra Barrero se pidió a CONICET que la dirección quede a mi nombre

Mariana Viegas, Investigadora asistente CONICET (Resolución N° 1913/10).

Proyecto de investigación: Estudio de la evolución de los antígenos neutralizantes del VSRh en pacientes con infección respiratoria prolongada y su relación con la respuesta inmune.

Directora: Alicia S. Mischtenko.

12. DIRECCION DE TESIS.

Laura Elena Valinotto, Licenciada en Biotecnología, Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado de la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica
Tema: Análisis de la diversidad biológica de la proteína hexón de adenovirus humanos
Defendida: Junio 2012. Calificación Sobresaliente.

Estefania Titarelli. Licenciada en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

Trabajo de Título: Estudio genético de los virus Dengue circulantes en los últimos años en Argentina.

Director: Paola Barrero. Co-director: Alicia Susana Mistchenko.

Debido al lamentable fallecimiento de la Dra Barrero se pidió a la Universidad de Buenos Aires que la dirección quede a mi nombre

13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS

I Reunión anual de Referentes en Enfermedades Transmisibles por Vectores

15-17 de Mayo, Ascochinga, Córdoba

Participé como Referente Provincial

II Reunión anual de Referentes en Enfermedades Transmisibles por Vectores

21-23 de Mayo, Tanti, Córdoba

Participé como Referente Provincial

15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica – ANPCYT. PICT 1624-2007

Tema: "Nuevos virus, nuevos métodos" (otorgado 2009-2011 monto=\$196664). Finalizó 2012.

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica – ANPCYT. PICT 2010-2244

Tema: "Monitoreo y evaluación de la resistencia a los inhibidores de la neuraminidasa en virus influenza estacional y pandémico" (otorgado 2010-2012 monto=\$216500).

CONICET PIP 112-201101-00562: "Estudio de la evolución de los genes de las proteínas antigénicas del Virus Sincicial Respiratorio humano en pacientes pediátricos con infección respiratoria prolongada o re-infección y su relación con la respuesta inmune." (Otorgado 2012-2014 monto=\$90000).

18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.

Participación del Sistema de Evaluación de Proyectos Científicos y Tecnológicos del FONCyT (SEPCyT)

21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

El plan de trabajo continúa los mismos lineamientos del período anterior y contempla varios aspectos, enmarcados en las actividades de distintos miembros del equipo de trabajo; en cada uno se menciona la relación con el sistema de salud:

i) El objetivo de implementación de métodos moleculares para la detección de virus respiratorios utilizando sistemas homogéneos, cerrados cuali-cuantitativos y no

contaminantes se abordará con la participación de varias personas, desarrollando cada una aspectos parciales del objetivo en estudio. Los rinovirus son uno de los más frecuentes virus asociados a infección respiratoria aguda y su impacto en nuestra población no ha sido demasiado explorado. La optimización de los métodos de detección, análisis y caracterización (por secuenciación) de los serotipos prevalentes será desarrollada en el trabajo de la Maestría en Biología Molecular (UBA) de la bioquímica María de los Ángeles Marques, quien pertenece a nuestro grupo de trabajo desde hace seis años y ha explorado el tema adecuadamente, como se muestra en varias comunicaciones presentadas en sociedades científicas y un premio de la Academia Nacional de Medicina. El abordaje de la participación de otros picornavirus, como son los parechovirus se está desarrollando con la participación de la bioquímica María Cristina Álvarez López como trabajo de su Maestría en Biología Molecular (UBA), quien ha centrado sus estudios en la detección y caracterización molecular de los mismos.

ii) El objetivo de identificar, utilizando herramientas de epidemiología molecular, virus y genotipos predominantes en los brotes epidémicos y la cocirculación de más de una cepa del mismo agente se desarrollará como parte de la beca postdoctoral de la Dra Laura E Valinotto, la cual está dirigida adicionalmente, al desarrollo de nuevos métodos de detección *at random* de virus asociados a infección respiratoria, no detectables por los métodos convencionales que se utilizan en la actualidad (como la inmunofluorescencia o la PCR). El objetivo específico es explorar y poner a punto técnicas de identificación de virus conocidos o desconocidos para muestras de pacientes con enfermedad severa y diagnóstico virológico negativo.

La mayoría de los virus conocidos fueron identificados realizando experimentos en animales o cultivo celular. Sin embargo, existen virus que no han podido ser replicados *in vitro*, por lo que se asume que puede existir una gran cantidad de virus humanos no identificados que pueden ser la causa de numerosas enfermedades agudas y crónicas. Gracias a la aplicación de nuevas técnicas moleculares, en los últimos años se han caracterizado nuevos virus como agentes etiológicos de IRA. La técnica que ha dado los mejores resultados se conoce como "*sequence independent single primer amplification*" (SISPA) y sus variaciones; mediante la misma se han identificado los bocavirus, poliomavirus WU y poliomavirus KI en aspirados nasofaríngeos. La técnica se basa en la ligación dirigida de un adaptador asimétrico a moléculas de ADN de extremos romos. Utilizando la secuencia del adaptador, el cual incluye sitios de restricción, el ADN/cADN es amplificado, digerido, clonado y posteriormente secuenciado y analizado. A través de los años, diferentes autores han realizado modificaciones al método, incluyendo PCR en transcripción reversa (RT-PCR) con *primers* formados en un extremo por un hexámero al azar y en el otro por una región de secuencia fija, la cual será utilizada en amplificaciones posteriores. Modificaciones a SISPA han dado como resultado un nuevo método, denominado *Virus-Discovery-cDNA-AFLP* (VIDISCA). Los principios de ambas técnicas son los mismos, pero VIDISCA utiliza *primers* de amplificación diferentes para cada extremo, ya que el ácido nucleico es digerido con dos enzimas de restricción y ligado a dos adaptadores, uno para cada extremo.

Las tecnologías más recientes, como las de secuenciación de *next-generation* (NGS) permiten obtener millones de secuencias a la vez. En el caso de no encontrar secuencias virales en los clones secuenciados, VIDISCA puede adaptarse fácilmente para NGS, aumentando enormemente la sensibilidad del método, pudiendo detectarse una secuencia viral entre 10.000 secuencias provenientes de genomas bacterianos o celulares.

iii) El objetivo referente a caracterizar la estacionalidad, favoreciendo la adecuación de la respuesta del sistema sanitario a las necesidades de la atención médica, se realizará con la participación de dos personas del grupo que estudian y analizan las características genéticas y epidemiológicas del Virus Sincicial Respiratorio, principal agente etiológico de la infección respiratoria aguda, principalmente en menores de 2 años. Con el tema "Estudio de

la evolución de los genes de las proteínas antigénicas del Virus Sincicial Respiratorio humano en pacientes pediátricos con infección respiratoria prolongada o re-infección y su relación con la respuesta inmune", se intentará definir o comprender el mecanismo por el cual el Virus Sincicial Respiratorio genera variabilidad genética entre los sucesivos brotes anuales y cómo interactúa con el sistema inmune del huésped. Se propone estudiar la dinámica evolutiva de la población viral intrapaciente en una serie temporal que contemple infecciones con excreción viral prolongada o re-infecciones en el mismo brote epidémico por medio del análisis de los genes de las proteínas de superficie G, F y SH. También nos proponemos analizar el impacto de las nuevas variantes genéticas en la circulación global durante el mismo período epidémico y el próximo siguiente, así como analizar si la variabilidad genética hallada se encuentra en regiones inmunogénicas.

iv) Monitoreo y evaluación de la resistencia a los inhibidores de la neuraminidasa en virus influenza estacional y pandémico.

El proyecto actual propone sumar a la vigilancia virológica de influenza el monitoreo continuo de sensibilidad a inhibidores de la neuraminidasa, lo que permite beneficiar al paciente evitando una medicación innecesaria (que sólo podría aportar toxicidad si el virus fuera resistente), detectar precozmente la aparición de cepas resistentes y notificar a las autoridades de salud cualquier cambio en el comportamiento del virus frente a las herramientas actualmente en uso terapéutico. Para esto se usará una PCR que detecta la mutación puntual H275Y del gen de la neuraminidasa tipo 1 (N1). Se medirá la carga viral con controles sintéticos a partir de ARN de influenza A clonado (RiboscribeT7).

A posteriori se buscarán (por pirosecuenciación de diferentes regiones de la neuraminidasa) las mutaciones más esporádicas que confieren resistencia a oseltamivir: (N1) V116, I117, Q136K, K150, D151/E/G/N, D199, I223, R292K, N294S, D354G y en (N2) R292K, E119V, N294S, y las que dan resistencia a zanamivir D151G, Q136K. Para la medición de la actividad de la neuraminidasa se utilizará un ensayo de quimioluminiscencia a partir de virus amplificados en cultivo. Se definirán como resistentes aquellos virus que presenten una IC50 > 100nM. Finalmente, serán secuenciados los genes de la neuraminidasa y hemaglutinina para estudios filogenéticos.

Este algoritmo se aplicará en muestras de los programas de vigilancia anual de virus respiratorios. En los pacientes positivos para influenza A H1N1pdm se repetirá el muestreo al 3º y 5º día después de iniciado el tratamiento. En los inmunocomprometidos, se obtendrán muestras adicionales semanales hasta la eliminación del virus. La implementación de estas acciones permitirá detectar variaciones en el nivel de resistencia en los virus circulantes, generando una información de importancia en las políticas de salud de nuestro país.

Para abordar los objetivos planteados más arriba se estudiarán muestras de aspirado nasofaríngeo de niños hospitalizados con infección respiratoria aguda baja, en el marco del programa de vigilancia de la infección respiratoria aguda. Se mantendrá un registro de datos clínicos, epidemiológicos y la información vinculada al tratamiento antiviral, dosis y días de tratamiento de cada paciente.

Obtención de ácidos nucleicos virales: Se realizará a partir de 200 uL de ANF, en equipo robotizado EZ1 Virus Mini Kit v2.0 usando el BioRobot EZ1o en columnas comerciales QIAamp RNA minikit. (Qiagen, Valencia, CA, USA), el volumen final de elución será de 60 uL.

Detección de virus respiratorios por PCR en tiempo real.

Monitoreo de resistencia a oseltamivir (mutación H274Y) por PCR en tiempo real: Se realiza utilizando una sonda que permite distinguir virus con citosina (sensible) de timina (resistente) en esa posición.

Pirosecuenciación: A diferencia de la secuenciación tradicional (Sanger), la pirosecuenciación permite detectar dentro de una muestra la presencia de cuasiespecies y cuantificar porcentualmente cada una de ellas. Ventajas adicionales son la rapidez del método, la capacidad de análisis de gran cantidad de muestras en simultáneo y la precisión

del método aun teniendo como material de partida muestras con baja carga viral. Existen protocolos específicos para cada uno de los virus abordados en el plan.

Secuenciación convencional: En secuenciador ABI 3500.

Ensayo de resistencia a inhibidores de neuraminidasa: Este ensayo mide la actividad enzimática de la neuraminidasa viral en cada muestra enfrentada a diferentes concentraciones de inhibidor de neuraminidasa. Diluciones de ANF o cultivos en huevos embrionados son incubados con diluciones del inhibidor. Posteriormente se agrega el sustrato quimioluminiscente, un derivado del ácido siálico, y se mide la intensidad de la luz emitida utilizando un luminómetro (facilitado por Centro de Diagnóstico Molecular S.A.). Valores superiores a 100 nM serán considerados resistentes al inhibidor.

v) Implementación de nuevas metodologías moleculares de detección viral para la distinción de factores confusores en la vigilancia de dengue

El término arbovirus designa un conjunto de familias virales que comparten la propiedad de ser transmitidas por vectores, principalmente mosquitos y causar un síndrome febril inespecífico, con una alta proporción de casos asintomáticos. Si bien tres familias virales flaviviridae, bunyaviridae y togaviridae se incluyen en la definición de arbovirus, la primera contiene el virus dengue (DENV)

Arbovirus dentro de la misma familia *Flaviviridae*, como el virus de la encefalitis de St Louis (SLVE), virus de la fiebre amarilla (FA), virus West Nile (WNV) o de otras familias virales como el Chikungunya, Oropuche, Rocio, Mayaro, causan síndromes febriles que pueden solapar y, actuando como confusores, dificultar el diagnóstico de un brote de dengue y que deberán diferenciarse en un futuro, en la medida que progresen satisfactoriamente los ensayos de la vacuna de dengue (actualmente hay 7 en desarrollo).

El desarrollo y la aplicación de nuevas tecnologías como NGS al estudio de brotes de enfermedad febril indiferenciada podrían dar como resultado la identificación de virus que no han sido sospechados y cuya detección no está incluida en la batería de estudios de laboratorio. Por otro lado, la aplicación de nuevas tecnologías permitiría también detectar la circulación de nuevas variantes virales que no sean captadas por los métodos convencionales (debido a mutaciones o recombinaciones). Las mismas son también capaces de detectar el cambio repentino/eventual de hospedador en familias de virus que circulan en animales y permiten estudiar la diversidad de familias de virus que aún no han sido exploradas in extenso.

El objetivo es identificar virus mediante la combinación de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real (qPCR), amplificación independiente de la secuencia (SISPA), sus variantes, y NGS en síndrome febril indiferenciado negativo para virus dengue. Se estudiarán muestras de pacientes con síndrome febril en fase aguda

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
 - a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
 - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:

- a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: ininvest@cic.gba.gob.ar (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
- b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

C. Sistema SIBIPA:

- a. Se deberá peticionar el informe en la modalidad on line, desde el sitio web de la CIC, sistema SIBIPA (ver instructivo).

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.