

# CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

## Informe Científico<sup>1</sup>

**PERIODO<sup>2</sup>: 2014-2016**

### 1. DATOS PERSONALES

*APELLIDO: MISTCHENKO*

*NOMBRES: ALICIA SUSANA*

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad: REMEDIOS DE ESCALADA CP: 1826 Tel:*

*Dirección electrónica: amistchenko@buenosaires.gob.ar*

### 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: 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, Hospital de Niños "R. Gutiérrez"*

*Facultad:*

*Departamento:*

*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

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

<sup>2</sup> 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. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Anualmente, aproximadamente en el 50% de las muestras de secreciones respiratorias de niños admitidos por infección respiratoria aguda baja no es posible detectar, por los métodos clásicos de inmunofluorescencia, ninguno de los virus asociados a las mismas. Las técnicas moleculares más conocidas, como la PCR, permitieron incrementar la tasa de recuperación en aproximadamente un 40% adicional. Sin embargo, frecuentemente se detecta la aparición de brotes epidémicos de virus para los cuales no tenemos inmunidad previa. Las características relevantes de un método que combina alto rendimiento y versatilidad, como es el caso de la tecnología de secuenciación masiva de ácidos nucleicos (NGS), abrieron nuevas perspectivas en investigación básica y consecuentemente en la aplicación para la detección de virus principalmente en brotes epidémicos. El objetivo del presente plan es desarrollar, optimizar e implementar nuevas técnicas de identificación viral para la detección de virus asociados a infección respiratoria aguda baja en niños.

## 7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Durante el período 2014-2015 se desarrollaron las siguientes líneas de trabajo, todas ellas con fuerte inserción en las problemáticas de Salud de la Región Metropolitana de Buenos Aires.

### ***Estudios genéticos, filogenéticos y evolutivos de los miembros de la familia Paramyxoviridae: Virus Respiratorio Sincicial (hRSV) y Parainfluenza virus 3 (PIV3)***

Con el objetivo de conocer los patrones de dispersión viral del hRSV-A se analizaron las secuencias de la glicoproteína G de éstos, en muestras de secreciones respiratorias de niños internados en hospitales de Buenos Aires con infección respiratoria aguda baja. El estudio abarcó un período de 16 años consecutivos (1999 a 2014). Los resultados se publicaron en *Infection, Genetics & Evolution*, May 2016.

También se estudiaron las características genéticas del gen de la hemaglutinina del hPIV3, durante un período de tres años consecutivos, lo que permitió conocer los linajes circulantes en Buenos Aires. Los resultados fueron publicados en *Infection, Genetic & Evolution* 2016 Apr; 39:85-91.

Ambos trabajos fueron llevados adelante por la Dra Mariana Viegas (Investigadora CONICET bajo mi dirección) y la Biotecnóloga Stephanie Goya (Becaria de CONICET) quien realiza también su doctorado en nuestro laboratorio, y de quién soy co directora.

### ***Patrón clínico epidemiológico y factores de riesgo de infección por hRSV***

Con el objetivo de detectar predictores independientes de la infección respiratoria aguda baja por hRSV se analizaron distintas variables clínicas, comorbilidades y complicaciones sobre 12.555 niños hospitalizados por ésta causa entre el año 2000 y 2013. Los resultados fueron publicados en *Arch Argent Pediatr*. 2014 Oct;112(5):397-404.

### ***Epidemiología de Bordetella pertussis en niños hospitalizados***

Coqueluche continúa siendo la primera causa de morbimortalidad por infección respiratoria aguda en niños menores de 1 año. Se evaluaron predictores de morbimortalidad y la correlación del diagnóstico de laboratorio. Los resultados se muestran en *Arch Argent Pediatr*. 2014 Feb;112(1):26-32.

### ***Análisis evolutivo y filogeográfico del virus Dengue en Buenos Aires: 1999-2010***

Se estudiaron 27 genomas completos de Virus Dengue serotipo1 (DENV-1) aislados de pacientes que adquirieron la enfermedad durante el brote del 2009, primer brote de dengue documentado Buenos Aires. El análisis permitió mostrar transmisión local, y

detectar posibles ingresos del virus a nuestro país. También se buscó establecer la frecuencia de casos secundarios de dengue. Los resultados han sido publicados en *PLoS One*. 2014 Oct 24;9(10):e1111017 y en *Trop Med Int Health*. 2016 Jan;21(1):28-32. En ambos estudios participó la Lic en Biología Estefanía Tittarelli (becaria doctoral bajo mi dirección) y la Dra Laura Valinotto (investigadora CONICET, bajo mi dirección).

#### **Análisis de genotipos de Rotavirus del grupo A en Buenos Aires**

Se analizaron los genotipos de Rotavirus A entre los años 2008 y 2011 por secuenciación de los genes VP4 y VP7, debido a que la introducción de la vacuna en la región podría inducir presión de selección y la aparición de otros genotipos. El estudio se realizó en colaboración con investigadores de la Universidad de Quilmes y están publicados en *Journal of Clinical Virology* 60, May 82-289, 2014.

#### **Evaluación de la persistencia de anticuerpos anti Hepatitis A tras dos dosis de vacuna**

El objetivo fue evaluar la persistencia de los anticuerpos anti hepatitis A con un estudio serológico longitudinal sobre individuos vacunados hasta 30 años antes. Los resultados están publicados en *Pediatric Infectious Diseases Journal*,34,417-425, 2015

### **8. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO. 8.1 PUBLICACIONES.**

#### **Sixteen years of evolution of human respiratory syncytial virus subgroup A in Buenos Aires, Argentina: GA2 the prevalent genotype through the years.**

Viegas M<sup>1</sup>, Goya S<sup>2</sup>, Mistchenko AS<sup>3</sup>. *Infect Genet Evol*. 2016 May 3. S1567-1348(16)30168-X.

#### **Abstract**

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the main viral cause of acute lower respiratory tract infections (LRTI) in children worldwide. In recent years, several preclinical trials with vaccine candidates have been reported. It is in this sense that molecular epidemiological studies become important. Understanding viral dispersion patterns before and after the implementation of a vaccine can provide insight into the effectiveness of the control strategies. In this work we analyzed the molecular epidemiology of HRSV-A over a period of sixteen years (1999-2014) in Buenos Aires. By bioinformatic tools we analyzed 169 sequences of the G glycoprotein gene from hospitalized pediatric patients with LRTI. We found that GA2 was the most prevalent genotype (73.35%). GA5 genotype co-circulated in our region until 2009 when it was no longer detected, except in 2011. The recently globally emerging ON1 lineage with a 72-nt duplication increased its frequency to become the only lineage detected in Buenos Aires in 2014. By discrete phylogeographic analysis of global ON1 strains we could determine that Panama could be the location of the MRCA dated June 20, 2010; and this lineage could be introduced in Argentina from Spain in April 2011. This analysis also showed temporary and geographical clustering of ON1 strains observed as phylogenetic clades with strains exclusively associated from a single country, nevertheless among our 44 ON1 strains from three outbreaks (2012-2014) we could also detect posterior reintroductions and circulation from United States, Cuba, South Korea, and Spain. The continuous phylogeographic analysis of one sublineage of Argentine ON1 strains allowed us to establish that there could be a local clustering of some strains even in neighborhoods. This work shows the potential of this type of bioinformatic tools in the context of a future vaccine surveillance network to trace the spread of new genetic lineages in human populations.

Grado de participación: Diseño, Factibilidad

***Phylogenetic and molecular analyses of human parainfluenza type 3 virus in Buenos Aires, Argentina, between 2009 and 2013: The emergence of new genetic lineages.*** Goya S<sup>1</sup>, Mistchenko AS<sup>2</sup>, Viegas M<sup>3</sup>. *Infect Genet Evol.* 2016 Apr; 39:85-91.

Abstract

Despite that human parainfluenza type 3 viruses (HPIV3) are one of the leading causes of acute lower respiratory tract infections in children under five, there is no licensed vaccine and there is limited current information on the molecular characteristics of regional and global circulating strains. The aim of this study was to describe the molecular characterization of HPIV3 circulating in Buenos Aires. We performed a genetic and phylogenetic analysis of the HN glycoprotein gene. Between 2009 and 2013, 124 HPIV3-positive samples taken from hospitalized pediatric patients were analyzed. Four new genetic lineages were described. Among them, C1c and C3d lineages showed local circulation patterns, whereas C3e and C3f comprised sequences from very distant countries. Despite the diversity of the described genotypes, C3a and C3d predominated over the others, the latter was present during the first years of the study and it was progressively replaced by C3a. Molecular analyses showed 28 non-synonymous substitutions; of these, 13 were located in potentially predicted B-cell epitopes. Taken together, the emergence of genetic lineages and the information of the molecular characteristics of HN protein may contribute to the general knowledge of HPIV3 molecular epidemiology for future vaccine development and antiviral therapies.

Grado de participación: Diseño, Factibilidad

***Secondary dengue virus infections during the 2009 outbreak in Buenos Aires.***

Tittarelli E<sup>1,2</sup>, Barrero PR<sup>1,2</sup>, Mistchenko AS<sup>1,3</sup>, Valinotto LE<sup>1,2</sup>. *Trop Med Int Health.* 2016 Jan;21(1):28-32.

Abstract

**OBJECTIVES:** To evaluate the occurrence of secondary dengue virus (DENV) infections during the 2009 outbreak in a non-endemic area. Viral loads were evaluated in serum from acute-phase patients, comparing primary and secondary infection.

**METHODS:** Serum samples from patients with clinical diagnosis of suspected dengue were referred to the Virology Laboratory at 'Ricardo Gutiérrez' Children's Hospital. Dengue-positive samples were classified as primary or secondary DENV infections through serological methods (anti-DENV IgM and IgG). Viral loads were measured by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in samples obtained in the first 5 days of infection. Statistical analyses were performed to evaluate factors that might correlate with differences in the viral load of primary or secondary infection.

**RESULTS:** A total of 229 DENV cases were confirmed; among them, 22.7% were secondary infections. No significant differences were found between the viral load of primary and secondary infections.

**CONCLUSION:** We detected a high percentage of secondary DENV infections in a non-endemic area; this finding might correspond to socio-demographic characteristics of the group under study or indicate a previous cryptic DENV circulation causing inapparent infections.

Grado de participación: Diseño, Muestreo, Análisis, Factibilidad

***Dengue virus 1 in Buenos Aires from 1999 to 2010: towards local spread.***

Tittarelli E<sup>1</sup>, Mistchenko AS<sup>2</sup>, Barrero PR<sup>1</sup>. *PLoS One.* 2014 Oct 24;9(10):e111017.

Abstract

Dengue virus (DENV) is a public health problem representing the most important arthropod-borne viral disease in humans. In Argentina, Northern provinces have reported autochthonous cases since 1997, though these outbreaks have originated in bordering

countries, where co-circulation of more than one serotype has been reported. In the last decade, imported dengue cases have been reported in Buenos Aires, the urban area of Argentina with the highest population density. In 2009, a dengue outbreak affected Buenos Aires and, for the first time, local transmission was detected. All cases of this outbreak were caused by DENV-1. In this report, we present the full-length sequences of 27 DENV-1 isolates, corresponding to imported cases of 1999-2000, as well as local and imported cases of the 2009 and 2010 outbreaks. We analyzed their phylogenetic and phylodynamic relationships and their global and local spread. Additionally, we characterized their genomic and phenotypic features. All cases belonged to DENV-1 genotype V. The most recent ancestor for this genotype was dated ~1934, whereas that for the 2009 outbreak was dated ~2007. The mean rates of nucleotide substitution were  $4.98E-4$  and  $8.53E-4$  subs./site/yr, respectively. We inferred an introduction from Paraguay in 1999-2000 and mainly from Venezuela during 2009-2010. Overall, the number of synonymous substitutions per synonymous site significantly exceeded the number of non-synonymous substitutions per site and 12 positively selected sites were detected. These analyses could contribute to a better understanding regarding spread and evolution of this pathogen in the Southern Cone of South America.

Grado de participación: Diseño, Muestreo, Análisis, Factibilidad

***Respiratory syncytial virus: clinical and epidemiological pattern in pediatric patients admitted to a children's hospital between 2000 and 2013.***

*Lucion MF<sup>1</sup>, Juarez M del V<sup>1</sup>, Viegas M<sup>1</sup>, Castellano V<sup>1</sup>, Romanin VS<sup>1</sup>, Grobaporto M<sup>1</sup>, Bakir J<sup>1</sup>, Mistchenko AS<sup>2</sup>, Gentile A<sup>1</sup>. Arch Argent Pediatr. 2014 Oct;112(5):397-404.*

**Abstract**

**INTRODUCTION:** Respiratory syncytial virus (RSV) is the major causative organism associated with acute lower respiratory tract infections in children. The objective of this study was to describe the clinical and epidemiological pattern of RSV and identify risk factors for RSV infection.

**POPULATION AND METHODS:** Prospective, cohort study on patients hospitalized due to acute lower respiratory tract infection at Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez between March and November throughout the 2000-2013 period. The virological diagnosis of RSV, adenovirus, influenza and parainfluenza was performed by indirect immunofluorescence using nasopharyngeal aspirates.

**RESULTS:** A total of 12,555 children were included, 38.2% (4798) had virus rescued from samples. RSV accounted for 81.8% of cases (3924/4798) with no significant annual variations (71.2- 88.1) and with an epidemic seasonal pattern (May through July); RSV was followed by influenza (7.6%), parainfluenza (5.9%), and adenovirus (4.7%). The median age of patients with RSV rescue (3924) was 7 months old (0- 214 months old), while 74.2% were younger than 1 year old, 43.1% were younger than 6 months old, 56.5% were males and the most common clinical presentation was bronchiolitis (60.7%). Comorbidities were observed in 41.6% of cases. The most common comorbidities were chronic respiratory disease (74%), congenital heart disease (14%), and chronic neurological disease (10.2%). Complications occurred in 25% of cases. The case fatality rate was 1.9% (74/3888). Independent predictors of RSV infection were age <3 months old (OR: 2.8 [2.14-3.67],  $p < 0.01$ ), clinical presentation of bronchiolitis (OR: 1.54 [1.32-1.79],  $p < 0.01$ ), and hypoxemia at the time of admission (OR: 1.84 [1.42-2.37],  $p < 0.01$ ).

**CONCLUSIONS:** RSV infection displayed a seasonal pattern and was associated with infants younger than 3 months old with bronchiolitis and hypoxemia at the time of admission.

Grado de participación: Diseño, Muestreo, Factibilidad

**Modeling the long-term persistence of hepatitis A antibody after a two dose vaccination schedule in Argentinean children.** Eduardo L López, MD,\* María Marta Contrini, MD,\* Alicia Mistchenko, MD,\* Alexia Kieffer, MPH,† Rebecca F Baggaley, PhD,§ Gian Luca DiTanna, PhD,§ Kamal Desai, PhD,§ Anvar Rasuli, MD,† Judith Armoni, MD‡. *Pediatric Infectious Diseases Journal*,34,417-425, 2015

**Abstract**

Background: Long-term seroprotection data are essential for decision-making on the need and timing of vaccine boosters. Based on data from longitudinal serological studies, modeling can provide estimates on long-term antibody persistence and inform such decision-making.

Methods: We examined long-term anti-hepatitis A virus (anti-HAV) antibody persistence in Argentinean children  $\leq 15$  years after the initial study where they completed a two-dose course of inactivated hepatitis A vaccine (Avaxim® 80U Pediatric, Sanofi Pasteur, Lyon, France). Blood serum samples were taken at baseline, 2 weeks (post first dose), 6 months (pre-booster), 6.5 months (post-booster), 10 years and 14-15 years after first vaccine dose. We fitted eight statistical model types, predominantly mixed effects models, to anti-HAV persistence data, to identify the most appropriate and best fitting models for our dataset and to predict individuals' anti-HAV levels and seroprotection rates up to 30 years post vaccination.

Results: Fifty-four children (mean age at enrolment 30.4 months) were enrolled up to 15 years post first vaccine dose. There were three distinct periods of antibody concentration: rapid rise up to peak concentration post-booster, rapid decay from post-booster to 10 years, followed by slower decay. A three-segmented linear mixed effects model was the most appropriate for the dataset, predicting that 88% of individuals anti-HAV seronegative prior to vaccination would remain seroprotected at 30 years post vaccination. The model predicted lifelong seroprotection for vaccinees seropositive prior to vaccination.

Conclusion: This study demonstrates that Avaxim® 80U Pediatric confers to most vaccinees a high level of seroprotection against hepatitis A infection for at least 30 years.

**Infeción sintomática por citomegalovirus a través de la lactancia materna en un niño de 45 días.** Dra. Nora Sordelli<sup>a</sup>, Dra. Elizabeth Sapia<sup>a</sup>, Dra. Micaela Delgado<sup>a</sup>, Dra. Alicia Mistchenko<sup>a</sup> y Dra. Mónica Dastugue<sup>a</sup> *Arch Argent Pediatr* 2015;113(3):e145-e148 /e145

**RESUMEN**

La infección posnatal o adquirida por citomegalovirus en el recién nacido se transmite por secreciones cervicales maternas en el parto, lactancia materna o transfusión de hemoderivados. La leche materna es la principal fuente de infección. Las manifestaciones clínicas dependen de la edad gestacional y el peso de nacimiento. Son más vulnerables los nacidos prematuros y de bajo peso. La infección posnatal, generalmente, es asintomática y suele resolverse de manera espontánea sin necesidad de tratamiento antiviral; el riesgo de secuelas a largo plazo es menor que en la infección congénita. Describimos el caso de un niño de 45 días de vida, nacido de término con peso adecuado para su edad gestacional, con un cuadro clínico muy poco frecuente caracterizado por plaquetopenia grave, secundario a una infección posnatal por citomegalovirus. Detallamos su forma de presentación, evolución clínica, diagnóstico y la terapéutica empleada.

Grado de participación: Diseño, Análisis, 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 60, May 82-289, 2014.*

***Abstract***

**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: Análisis, Factibilidad.

***Epidemiology of Bordetella pertussis in a children's hospital.***

*Gentile A<sup>1</sup>, Romanin VS<sup>1</sup>, Juárez M del V<sup>1</sup>, Lución MF<sup>1</sup>, Marques M de L<sup>2</sup>, Mistchenko AS<sup>2</sup>. Arch Argent Pediatr. 2014 Feb;112(1):26-32..9o*

***Abstract***

**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/mm<sup>3</sup> (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/mm<sup>3</sup> 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: Diseño, Muestreo, Factibilidad

## **8.5 COMUNICACIONES.**

### ***Influenza virus (IF): clinical epidemiological pattern and associated infection factors in hospitalized children. 15 years' experience***

*Subject Categories: V1. Studies of the epidemiology of viral infections*

*Angela Gentile, MD1, Maria Florencia Lucion, MD2, Maria Del Valle Juarez, MD2, Ana Clara Martinez, MD2, Viviana Romanin, MD2, Julia Bakir, MD1, Mariana Viegas, Biochemistry3 and Alicia Mistchenko, MD3, (1)"R. Gutierrez" Children Hospital, Buenos Aires, Argentina, (2)Epidemiology, "R. Gutierrez" Children Hospital, Buenos Aires, Argentina, (3)Virology, "R. Gutierrez" Children Hospital, Buenos Aires, Argentina. IDWeek 2015, San Diego, USA.*

#### ***Abstract***

**Background:** IF is an important agent that causes Acute Lower Respiratory Tract Infection (ALRI) in children, hospitalization and morbimortality in pediatrics population. The objectives of this study were: a) to describe the clinical and epidemiological pattern and infection factors associated to IF infection b) to compare cases features with IFA and IFB.

**Methods:** Prospective, cross sectional study of patients admitted for ALRI, 2000-2014. Virological diagnosis of respiratory virus: RSV, adenovirus (AV), influenza (IF) and parainfluenza (PIV) was made by fluorescent antibody assay of nasopharyngeal aspirates or real time-PCR (IF).

**Results:** from a total of 13.309 patients included, 38.6%(5118) had positive samples; IF represented 7.3% (377/5118) of them, 91%(343) IF A and 9%(34) IF B, it shows a seasonal epidemic pattern (May- July) and agrees with the months of lowest average temperature. The median of age of IF cases was 12 months (interquartile range: 6-21 months), 56.5% were males; the most frequent clinical feature was consolidated pneumonia; 49.6% recorded previous admissions for respiratory causes, 9.5% recorded previous admissions for respiratory causes. Comorbidity was found in 60.6%, Complications were detected in 27.2% of cases and 8.1% (30/370) had nosocomial infections. Lethality was 2.1% (8/370). The age  $\geq 6$  months OR 1.83(1.37-2.43)  $p=0.000$ , chronic neurological disease OR 1.53 (1.00-2.32)  $p=0.04$ , recorded previous admissions for respiratory causes OR 1.82 (1.22-2.70)  $p=0.003$ , previous admissions for respiratory causes OR1.56 (1.19-2.03)  $p=0.001$ , pneumonia as clinical presentation OR1.47 (1.17-1.82)  $p=0.001$ , immunosuppression OR 1.91 (1.09-3.34)  $p=0.023$  and y cystic fibrosis OR 5.2 (1.45-18.57)  $p=0.011$  were the independent predictors for IF infection. No significant association was found when comparing cases of IF A and IFB infection.

**Conclusion:** IF infection showed an epidemic seasonal pattern (May- July) and was more associated to age  $\geq 6$  months, pneumonia, previous admissions for respiratory causes and certain comorbidities.

### ***Respiratory Syncytial Virus. Clinical Epidemiological Pattern and lethality associated factors in Children Admitted in a Pediatric Hospital: 15 years'***



**experience.** Angela Gentile, MD, Maria Florencia Lucion, MD, Maria Del Valle Juarez, MD, Ana Clara Martinez, MD, Viviana Romanin, MD, Julia Bakir, MD, Mariana Viegas, Biochemistry and Alicia Mistchenko, MD. IDWeek 2015, San Diego, USA.

Session: Poster Abstract Session: Respiratory Viruses. Thursday, October 8, 2015

**Abstract**

Background: Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the main agent that causes Acute Lower Respiratory Tract Infection (ALRI) in children. Objective: to describe the clinical and epidemiological pattern and the lethality factors associated to RSV infection.

Methods: Prospective, cross sectional study of patients admitted for ALRI at "R.Gutiérrez" Children Hospital, 2000-2014. Virological diagnosis of respiratory virus: RSV, adenovirus (AV), influenza (IF) and parainfluenza (PIV) was made by fluorescent antibody assay of nasopharyngeal aspirates or real time-PCR (IF).

Results: from a total of 13.309 patients included, 38.6%(5118) had positive samples; RSV was predominant all through the study period 81% (4146/5118) without significant annual variations (71-88). It shows a seasonal epidemic pattern (median of epidemiological weeks of viral activity onset and offset:19-35) and agrees with the lowest average temperature months. RSV was followed by IF: 7.4%, PIF:6% and AV:4.5%.

From 5118 RSV cases the median of age was 7 months (0-216 months), 74%<1 year, 43%<6 months, 20%<3 months; 56.5% males; most frequent clinical feature was bronchiolitis 60.6%; 27% recorded previous admissions for respiratory causes. Comorbidity was found in 41.5% (1717/4146) being the most frequent: recurrent obstructive bronchitis (74%) and congenital heart disease (14%). Complications were detected in 25% of cases, 6.5% had nosocomial infections. Lethality was 1.9 % (78/4108).

From 78 RSV fatal cases the median of age of was 5 months (0-180 months), 27%<3months; most frequent clinical feature was pneumonia 53%. Comorbidity was found in 65.4% (51/78) being the most frequent: recurrent obstructive bronchitis 50.9% (26/51) and congenital heart disease 33%(17/51). Moderate to severe malnourishment OR 2.28 (1.19-4.36) p<0.01, congenital cardiopathy 3.53 (1.95-6.39) p<0.01 and the presence of chronic neurological disease OR 3.25 (1.65-6.39) p<0.01 were the independent predictors for VSR lethality.

Conclusion: RSV showed an epidemic pattern (May-July) and affected mostly young children. RSV lethality was more associated with malnourishment, congenital cardiopathy and the presence of chronic neurological disease.

**Análisis de coalescencia de los virus dengue 3 detectados en Buenos Aires en 2007.** Tittarelli E., Barrero P.R., Viegas M. y Mistchenko A.S.

XI Congreso Argentino de Virología, II Congreso Latinoamericano de Virología, IV Simposio de Virología Clínica y II Simposio de Virología Veterinaria "Dr. José L. La Torre". Sociedad Argentina de Virología, Asociación Argentina de Microbiología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 23-26 de junio de 2015. Presentación en formato poster.

**Resumen**

El virus del dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae* y se clasifica en cuatro serotipos (DENV1-4) sub-divididos en genotipos, los cuales no presentan inmunidad cruzada. Posee un genoma RNA simple cadena de polaridad positiva que codifica para tres proteínas estructurales (cápside, membrana y envoltura) y siete proteínas no estructurales. El DENV es el agente causal de la enfermedad del dengue, un grave problema de salud pública dado que su incidencia se encuentra en abrupto crecimiento a nivel mundial. En la Argentina, la mayoría de los brotes tuvieron su origen en países vecinos. En la Ciudad de Buenos Aires, se reportaron casos importados de DENV1, DENV2 y DENV3, y por primera vez en el 2009 se reportaron casos de transmisión local de DENV1. Puntualmente, durante el 2007, 35 casos de DENV3 fueron confirmados en

el Laboratorio de Virología del Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez". Si bien los pacientes residían en la Ciudad de Buenos Aires, declararon historia de viaje reciente a Brasil o Paraguay. En este trabajo, se realizará un análisis filogenético y de coalescencia de las secuencias de DENV3 del año 2007 obtenidas en nuestro laboratorio y su relación con secuencias de DENV3 del resto del mundo disponibles en bases de datos. Se obtuvo la secuencia que codifica para las proteínas estructurales (2413 nt.) de 13 DENV3 aislados en nuestro laboratorio. Las mismas se genotipificaron mediante métodos Bayesianos, utilizando el gen de la envoltura (nt. 935-2413). Se realizaron análisis de coalescencia mediante el paquete BEAST, utilizando la secuencia que codifica para todas las proteínas estructurales (nt. 95-2413). En cada caso, se evaluó el modelo evolutivo apropiado mediante jModelTest. Filogenéticamente, detectamos que todas las muestras analizadas corresponden al genotipo III de DENV3. A partir del análisis de coalescencia del genotipo, el ancestro común más reciente dataría aproximadamente en 1973 (95%HPD 1968-1978). La tasa media de sustitución de nucleótidos sería de  $9,93E-4$  sustituciones/sitio/año (95%HPD  $8,21E-4$  a  $1,2E-3$ ). Evaluando la reconstrucción demográfica, el tamaño poblacional resultó constante desde el origen hasta 1997 donde se observó un abrupto crecimiento poblacional que duró hasta aproximadamente el año 2006, probablemente relacionado con la re-emergencia de DENV3 genotipo III en América Latina reportado previamente. A partir del análisis del árbol de máxima credibilidad de los clados, se observó que el ancestro común a todas nuestras secuencias dataría en 1996. Además, las secuencias obtenidas en nuestro laboratorio se agruparon en dos clados separados, uno asociado con secuencias reportadas de Paraguay-2007 y el otro con secuencias de Brasil-2007. Esta observación se encontró en concordancia con el origen de viaje declarado de los pacientes. Este estudio, junto con análisis filogeográficos, contribuirá al conocimiento de las características evolutivas y de dispersión del DENV3 genotipo III a nivel global.

#### **Infecciones secundarias por virus dengue en Buenos Aires durante el año 2009.**

Tittarelli E., Barrero P.R., Alvarez López M.C., Mistchenko A.S. y Valinotto L.E. XI Congreso Argentino de Virología, II Congreso Latinoamericano de Virología, IV Simposio de Virología Clínica y II Simposio de Virología Veterinaria "Dr. José L. La Torre". Sociedad Argentina de Virología, Asociación Argentina de Microbiología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 23-26 de junio de 2015. Presentación en formato poster.

#### **Resumen**

**Introducción:** El dengue es un grave problema de salud pública dado que su incidencia se encuentra en abrupto crecimiento a nivel mundial. En el Área Metropolitana de Buenos Aires, el mayor número de casos de dengue se reportó en el año 2009 cuando la transmisión local se detectó por primera vez. El virus del dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae* y se clasifica en cuatro serotipos (DENV1-4) sub-divididos en genotipos, los cuales no confieren inmunidad cruzada. Según se cree, la inmunidad contra un serotipo incrementa el riesgo de una enfermedad más severa en caso de infectarse con otro serotipo. Puede ocurrir que las infecciones por DENV no sean diagnosticadas dado que pueden no presentar sintomatología suficiente para ser detectadas o ser confundidas con otras enfermedades con sintomatología similares. La existencia de casos no diagnosticados da como resultado la detección de infecciones secundarias en una mayor frecuencia a la esperada.

**Objetivos:** Comprobar la existencia de infecciones secundarias por virus del dengue (DENV) durante el 2009 en un área no endémica. A su vez, evaluar las cargas virales en pacientes en fase aguda con infección primaria y secundaria por DENV.

**Implementación de técnicas moleculares para la ampliación del diagnóstico de infecciones respiratorias agudas bajas en pacientes pediátricos.** Valinotto LE, Tittarelli E, Goya S, Natale MI, Lusso SB, Marques MA, Cipelli J, Barrero PR, Viegas M, Mistchenko AS. XI Congreso Argentino de Virología, II Congreso Latinoamericano de Virología, IV Simposio de Virología Clínica y II Simposio de Virología Veterinaria "Dr. José L. La Torre". Sociedad Argentina de Virología, Asociación Argentina de Microbiología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 23-26 de junio de 2015. Presentación en formato poster.

#### Resumen

Actualmente la inmunofluorescencia (IF) permite determinar la etiología viral del 40% de las infecciones respiratorias agudas bajas (IRAB). El análisis del impacto de los virus respiratorios en su conjunto requiere incorporar métodos moleculares, tales como PCR en tiempo real (qPCR), que posibilitan aumentar el número de agentes detectados así como hallar virus en bajo número de copias y en infecciones múltiples. Los objetivos fueron ampliar la detección de virus asociados a IRAB en niños utilizando protocolos de detección por qPCR; evaluar sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de qPCR frente IF y definir un algoritmo de progresión de complejidad de los métodos de diagnóstico convencionales y moleculares para la detección de virus respiratorios. Se analizaron aspirados nasofaríngeos (ANF) de niños hospitalizados en instituciones de CABA por IRAB durante un período de 30 meses corridos. Se utilizó la técnica de IF para detectar virus sincicial respiratorio (RSV); adenovirus (AdV); parainfluenza (PIV) 1, 2 y 3; influenza (INF) A y B, y protocolos de qPCR para detectar y cuantificar RSV, AdV, PIV1, PIV2, PIV3; INFA H1N1 y H3N2, INFB, rinovirus y enterovirus (PER); bocavirus (BoV) y coronavirus (CoV). Se construyeron controles sintéticos con los que se realizaron curvas de calibración para evaluar la eficiencia y la sensibilidad en valores absolutos y relativos al número de células presentes en la muestra. Con los protocolos de qPCR seleccionados se estudiaron 200 muestras al azar entre la población de aproximadamente 12000 ANF analizados por IF en el período de estudio. El número de casos detectados por qPCR para cada virus fue considerablemente mayor que la detección por IF. Se determinó la sensibilidad de IF para la detección de RSV, INFB, INFA H3N2 y AdV, siendo mayor a: 5, 15, 3 y 20 copias/célula, respectivamente. Para el caso de PIV3 e INFA H1N1 no se encontró relación entre la carga viral y la capacidad de detección por IF. Además, por qPCR se detectaron ácidos nucleicos (AN) de MPV; PER; BoV y CoV (en 8, 51, 37 y 2 muestras respectivamente). Esto incrementó el porcentaje de positividad del 66% al 90% de las muestras analizadas, permitiendo otorgar un diagnóstico virológico a un mayor número de pacientes. Adicionalmente, en el 53% de las muestras analizadas se detectaron AN de múltiples virus (hasta 6 en la misma muestra). Este estudio permitió correlacionar carga viral con la capacidad de detección por IF, ampliar el número de virus detectados y detectar coinfecciones. A partir de este proyecto se puso en marcha la detección molecular de rutina tanto cualitativa de virus respiratorios en nuestro laboratorio ya que permitió definir un algoritmo para el diagnóstico de virus respiratorios. Además, el uso rutinario de qPCR proveerá la información necesaria que permitirá asociar el número de copias detectado con la enfermedad, portación, excreción y transmisión viral

**Epidemiología molecular del virus parainfluenza humano tipo 3 en un periodo de 5 años (2009-2013) en Buenos Aires, Argentina.** S. Goya, A. S. Mistchenko y M. Viegas. XI Congreso Argentino de Virología y II Congreso Latinoamericano de Virología. Presentación en formato poster e Virología. 23-26 de junio de 2015, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

#### Resumen

El virus parainfluenza humano tipo 3 (HPIV3) pertenece al género *Respirovirus*, familia *Paramixoviridae*. Es la segunda causa de infecciones respiratorias agudas bajas, como

bronquiolitis y neumonía, en los pacientes menores de 2 años en nuestro país, siendo superado solo por el virus sincicial respiratorio. Tiene un genoma ARN de polaridad negativa que codifica para 6 proteínas estructurales, entre ellas la glicoproteína Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN). La HN es la proteína que presenta la mayor variabilidad de secuencia en el virus y por eso es la escogida para la caracterización molecular de los HPIV3. Recientemente dos autores fueron los que, en base a la variabilidad del gen de la HN y utilizando el cálculo de distancias genéticas, clasificaron al virus en clusters, subclusters y linajes genéticos. En este trabajo se analizaron las muestras de pacientes de 0 a 5 años de edad, hospitalizados con diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda que habían sido positivas por inmunofluorescencia para el HPIV3 correspondientes al periodo 2009-2013. Se secuenció el extremo carboxilo terminal del gen de la HN en 89 muestras con un tamaño de fragmento analizado de 858 nt (que corresponde a la región de mayor variabilidad del gen). El análisis filogenético por inferencia bayesiana mostró que todas las cepas analizadas se clasificaron dentro del cluster C, y dentro de éste en los subclusters C1, C3 y C5; de los cuales el C3 resultó ser el predominante durante todo el período analizado. Se definieron nuevos linajes genéticos de circulación local dentro del subcluster C3. Se observó que no existe un patrón de circulación definido para este virus ya que existe cocirculación de subclusters y de linajes a nivel regional, circulación paralela de linajes en regiones distantes del mundo y circulación actual de linajes detectados hace 10 años en nuestra región y en el mundo. Se realizó un análisis de variabilidad y predicción de epitopes con recursos bioinformáticos y se encontraron mutaciones no sinónimas que se ubicaron dentro de probables epitopes B lineales. Las mismas se ubicaron en el modelo molecular realizado a partir de secuencias obtenidas en nuestro laboratorio y junto con evaluaciones pertinentes se confirmó que se ubicarían en la superficie de la proteína, expuestas hacia el exterior del virus, y susceptibles de ser reconocidas por el sistema inmune, por lo cual podrían ser un posible mecanismo de evasión del virus. Todas estas mutaciones no sinónimas que formarían parte de epitopes B lineales ocurren en secuencias que clasificaron dentro de los nuevos linajes locales descritos en este trabajo. Por lo tanto, la información que proporciona este trabajo a nivel local, junto con análisis de otras partes del mundo, permitirá evaluar si la composición de la vacuna a virus vivos y atenuados que se encuentra actualmente en ensayos de fase clínica I será efectiva para proteger a los pacientes pediátricos contra los virus que circulan en nuestra región.

**Análisis de la variación de las poblaciones del virus sincicial respiratorio (HRSV) en pacientes que sufrieron infección respiratoria prolongada o reinfección utilizando nuevas tecnologías**, M. Viegas, S. Goya y A. S. Mistchenko. XI Congreso Argentino de Virología y II Congreso Latinoamericano de Presentación en formato poster e Virología. 23-26 de junio de 2015, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Resumen

El HRSV es una de las principales causas de infección respiratoria aguda baja (IRAB) severa en niños en todo el mundo. La población susceptible son los menores de cinco años, siendo los bebés menores de seis meses los que sufren infecciones más severas. Una de las características distintivas del HRSV es que se producen reinfecciones durante toda la vida. En ese sentido, numerosos estudios sobre aislamientos clínicos han demostrado una gran variación genética y antigénica, la cual surgiría como respuesta a la presión de selección inmune. El objetivo de este trabajo fue estudiar las características genéticas de las poblaciones virales que infectaron a pacientes hospitalizados por IRAB prolongada o reinfección entre los brotes epidémicos 2011 a 2013. Se analizó el gen de G, glicoproteína más variable, en muestras consecutivas de aspirados nasofaríngeos, mediante el clonado y secuenciación por Sanger (CSS), y por secuenciación con equipos de nueva generación (NGS). Además, se analizó el impacto

en la población general de nuevas variantes genéticas detectadas. A partir de los sets de datos obtenidos por NGS y por CSS se reconstruyeron los haplotipos virales por alineamiento con cepas de referencia utilizando QuRe, Vphaser y PredictHaplo. Para analizar la dinámica de las poblaciones virales encontradas dentro y entre muestras y para determinar asociaciones con cepas que circularon local y globalmente se realizaron análisis filogenéticos por inferencia bayesiana (MrBayes) y se calcularon las distancias genéticas (dist.) de las poblaciones (MEGA v6). La profundidad para los diferentes set de datos obtenidos por NGS fue entre 8000X y 25000X, mientras que por CSS fue 30X, mostrando la potencialidad de la tecnología de NGS para este tipo de análisis. Entre los pacientes analizados, dos presentaban una fuerte inmunosupresión. Como consecuencia, los haplotipos virales encontrados en la primera y en la segunda muestra y la secuencia directa obtenida de cada muestra se asociaron en el mismo clado genético. La distancia máxima entre las variantes fue baja (0.38%), sugiriendo una infección prolongada. De los pacientes inmunocompetentes, uno albergaba en su primer muestra un solo haplotipo asociado con una cepa con duplicación de 72-nt que emergió en 2011. Nueve días después, albergaba dos haplotipos semejantes al primero y 50 días después de la primer muestra, presentaba al menos 4 tipos de haplotipos algunos asociados con el de la primera muestra y otros con cepas que circularon localmente en ese momento, sugiriendo infección prolongada y reinfección. El valor de distancia máxima fue de 3.96%. Otro paciente, sufrió su primer IRAB en diciembre del 2011 y su segunda en el brote de 2012. Los haplotipos virales encontrados entre ambas muestras fueron completamente diferentes, sugiriendo reinfección. Estos resultados muestran que diferentes condiciones inmunes de los pacientes podrían ser utilizados por el virus para generar reservorios y así explorar toda su plasticidad genética

***Modeling the long-term persistence of hepatitis a antibody after a two-dose vaccination schedule in argentinean children.*** E. L. López, M. M. Contrini, A. Mistchenko, A. Kieffer, R. Baggaley, G. L. DiTanna, K. Desai, A. Rasuli, J. Armoni; *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sept 5-9, 2014, Washington, DC. USA*

***Abstract***

Background: Hepatitis A virus (HAV) infection is a vaccine preventable viral hepatitis. Post-vaccination long-term seroprotection data are essential for decision-making on the need and timing of vaccine boosters.

Objective: To estimate long-term anti-HAV antibody (Ab) persistence based on data from a longitudinal serological study 14 y after completion of primary immunization

Methods: Serum anti-HAV Ab levels after 2 doses of inactivated HAV vaccine (Avaxim® 80U Pediatric, Sanofi Pasteur) were measured by VIDAS Anti-HAV Total (seropositivity threshold/mL).

Serum samples were taken from Argentinean children (CH) at baseline, 2 wks (post-dose 1), 6 ms (pre-booster), 6.5 ms (post-booster), 10 yrs and 14-15 yrs after first vaccine dose. Eight statistical model types were fit to our dataset to identify the most appropriate model to predict anti-HAV levels and long-term seroprotection rates.

Results: Between Dec'2010 - Feb'2012, 33 CH were followed up at 14 -15 yrs post-primary HAV vaccination. Additional 21 CH of the cohort were followed up at 10 yrs (Nov'2007). Of these 54 children with long-term follow-up; age at first dose 30.4 (±12.5)ms.

Anti-HAV Ab concentrations at each time point revealed three different periods a rapid rise from baseline up to the period post vaccine booster administration (GMC 5920 mIU/mL, 95%CI 4758-7364, all subjects seronegative at enrollment); relatively rapid decay post peak to 10 yrs follow up (GMC 261 mIU/mL, 95%CI 199-341), followed by a slower decay between 10 and 14-15 yrs follow up period (to GMC 253 mIU/mL, 95%CI 181-353). The most suitable model, based on statistical criteria and biological plausibility

regarding patterns of Ab decay over time, was a three-segmented linear mixed effects model. The model predicted that the seroprotection rate would remain high (88%) for at least 30 yrs after vaccination

Conclusions: This study is one of the longest duration follow-up of HAV vaccination in CH. It demonstrates that Avaxim® Pediatric confers to the vast majority of vaccinees a high level of seroprotection against HAV which lasts for at least 30 years

## 9. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

**9.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.** *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

**9.2 PATENTES O EQUIVALENTES.** *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

**9.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO.** *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

**9.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES** *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*

En el año 2010 hemos comenzado a realizar los primeros estudios de diagnóstico molecular en pacientes con presunción diagnóstica de epidermólisis ampollar. Iniciamos la formación de un centro integrado por el Consultorio de Genodermatosis del Servicio de Dermatología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez y el Laboratorio de Virología del mismo hospital. Esto llevó a la creación y oficialización de un centro dedicado a estas patologías genéticas y que llamamos **CEDIGEA (Centro de Investigación de Genodermatosis y Epidermólisis Ampollar)**. Es un centro de investigación y desarrollo de alto nivel científico, que tiene por finalidad la planificación, promoción, realización y difusión de actividades de asistencia e investigación en ciencias de la salud, orientado a la asistencia especializada, docencia e investigación en el campo de las genodermatosis y epidermólisis ampollar. Se creó en el ámbito de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (UBA) mediante el aporte de conocimientos derivados de las investigaciones realizadas y las actividades de formación y capacitación permanente en el centro.

La Dirección de CEDIGEA está a cargo de la médica Graciela Beatriz Manzur – MN 63.141. La misma es médica egresada de la Universidad de Buenos Aires (UBA) especializada en Pediatría, Neonatología y Dermatología Pediátrica (UBA) y docente en la Unidad Académica I del Hospital de niños "Dr. Ricardo Gutiérrez".

La Subdirección de CEDIGEA está a cargo de la Dra. Alicia S. Mistchenko, médica egresada de la UBA y jefa del Laboratorio de Virología e Investigadora de la CIC. Los estudios moleculares se realizan en el área de Secuenciación Molecular del Laboratorio de Virología del Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez"

Equipo de trabajo:

Sector diagnóstico molecular:

Dra. Mónica Natale - Bioquímica - Cargo asistencial Facultad de Medicina - UBA

Dra. Laura Valinotto - Lic. en Biotecnología - Investigadora CONICET

Dra. Silvana Lusso - Bioquímica - Cargo asistencial Facultad de Medicina - UBA

Equipo profesional multidisciplinario:

Dermatólogos - oftalmólogos – neurólogos – genetistas - cardiólogos – nutricionistas - kinesiólogos – psicólogos y traumatólogos.

CEDIGEA cuenta con el personal administrativo y de servicio suficiente para el desarrollo de las funciones a su cargo.

**9.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.**

**10. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.** Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.

**11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**

**11.1 DOCENCIA**

Jurado de Tesis para optar al título académico de Doctor de la Universidad de Buenos Aires (Res N° 5449/08 del 22/10/2015) de

Licenciado en Genética MARIANO MIGUEL SEDE

Director de Tesis: Dr Jorge Quarleri

Director asociado: Dr Horacio Salomón

“Dinámica de la resistencia genotípica del virus de hepatitis C en pacientes coinfectados con HIV bajo tratamiento antiviral”

Calificación: Sobresaliente

Jurado de Tesis para optar al título académico de Doctor de la Universidad de Buenos Aires (Mayo de 2014) en el área de Inmunología de

Bioquímica ANA CLARA MONSALVO,

Director de Tesis: Fernando Polak

“Versatilidad de la respuesta inmune a virus respiratorios VRS y H1N1; ¿Anticuerpos protectores o patogénicos?”

Calificación: Distinguida

**11.2 DIVULGACIÓN**

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

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

Investigadora asistente 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.

Directora: Alicia Susana Mistchenko.

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

Proyecto de investigación: Búsqueda, Identificación y Caracterización Molecular de virus asociados a Infección respiratoria aguda baja en pacientes pediátricos on infección

Directora: Alicia S. Miscthenko.

- 13. DIRECCION DE TESIS.** *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

**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.

Directora: Alicia Susana Mistchenko.

- 14. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

**IV Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas**, Buenos Aires 27 y 28 de Marzo de 2014. Coordinadora de la sesión: "Infecciones por virus respiratorios: evidencias en su diagnóstico y tratamiento"

- 15. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

- 16. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

*Institución otorgante: FONDO PARA LA INVESTIGACION CIENT Y TECNOLOGICA (FONCYT); AGENCIA NACIONAL DE PROMOCION CIENT Y TECNOLOGICA; MINISTERIO DE CIENCIA, TEC. E INNOVACION PRODUCTIVA*

*Título: 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)*

*Monto: 482.795,00*

*Fecha desde: 06/2015*

*hasta: 06/2018*

*Descripción: Anualmente, en aproximadamente el 50% de las muestras de secreciones respiratorias de niños admitidos por infección respiratoria aguda baja en el Hospital de Niños R. Gutiérrez no es posible detectar, por los métodos clásicos de inmunofluorescencia, ninguno de los virus asociado a las mismas (Viegas et al, 2004). Las técnicas moleculares más conocidas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a punto final o en tiempo real han permitido incrementar la tasa de recuperación viral en aproximadamente un 40% adicional (Sadeghi et al, 2011). Sin embargo, algunas modificaciones del medio en que habitamos (cambio climático, aumento de la densidad poblacional en las grandes urbes, incremento en las migraciones) probablemente*



intervengan en la aparición cada vez más frecuente de brotes epidémicos de virus para los cuales no tenemos inmunidad previa. También nos enfrentamos a la amenaza de la llegada de enfermos de regiones donde circulan virus que producen enfermedades de inusitada severidad, como en el caso del nuevo coronavirus MERS (Memish et al, 2014). Los recientes avances en la tecnología de secuenciación de ácidos nucleicos abrieron nuevas perspectivas en investigación básica y consecuentemente en la aplicación para el diagnóstico en pacientes. Las características relevantes de un método que combina alto rendimiento y versatilidad de uso ha modificado la orientación de las tecnologías vigentes en la actualidad para la detección de virus principalmente en brotes epidémicos. El objetivo del presente proyecto es desarrollar, optimizar e implementar nuevas técnicas de identificación viral para la detección de virus asociados a infección respiratoria aguda baja en niños

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).

17. **OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.** *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*
  
18. **DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**
  
19. **ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.** *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado..*  
Participo del Sistema de Evaluación de Proyectos Científicos y Tecnológicos del FONCyT (SEPCyT)
  
20. **TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.** *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*
  
21. **OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.** *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*
  
22. **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:

***Aplicación de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva para el estudio de las infecciones respiratorias agudas en niños***

Las infecciones respiratorias agudas bajas (IRAB) constituyen la segunda causa de mortalidad en niños menores de cinco años en Argentina. Entre los agentes etiológicos más frecuentemente detectados en IRAB se encuentran el adenovirus, virus influenza, enterovirus, rinovirus, coronavirus, virus sincicial respiratorio, virus de parainfluenza y

metaneumovirus. En particular, los últimos tres pertenecen a la Familia Paramyxoviridae y en conjunto contribuyen anualmente con aproximadamente el 80-90% de los casos de IRAB en niños. Los virus respiratorios producen la saturación de los sistemas de salud en el periodo invernal, sin embargo para la mayoría de ellos no existen agentes antivirales efectivos, ni vacunas aprobadas. En este sentido, la detección temprana de un agente viral, así como la caracterización del agente que está produciendo la IRAB mediante el uso de técnicas de biología molecular y secuenciación convencional puede ser muy útil, porque puede reducir el uso innecesario de antibióticos, disminuir la transmisión intrahospitalaria, especialmente en niños de mayor riesgo de morbimortalidad como los prematuros, cardiópatas y los trasplantados y a su vez aporta datos al conocimiento de las características genéticas de los virus que circulan y que permitirán diseñar herramientas de control y prevención. Por otro lado, el uso combinado de nuevas tecnologías como las de NGS permite: detectar nuevos virus, detectar la circulación de variantes virales que no son reconocidas por los métodos convencionales por alteraciones en la secuencia, detectar la aparición de virus emergentes, profundizar en el conocimiento de la diversidad de virus presentes en el aparato respiratorio que podrían formar parte de la flora normal del mismo, y que aún no han sido exploradas in extenso. A su vez, la secuenciación masiva permite generar conocimientos sobre la genómica de los virus a partir de muestras clínicas a gran escala, lo cual abre un campo de investigación amplio y reduce sustancialmente el tiempo de trabajo. Este proyecto cuenta con la participación de la Dra Mariana Viegas (Investigadora) y la Lic en Biotecnología Stephanie Goya (Becaria doctoral) e intenta, a través de técnicas convencionales como lo son la amplificación por RT-PCR y secuenciación por Sanger y técnicas innovadoras como lo son el NGS y phage display y a través de la aplicación de numerosas herramientas bioinformáticas buscar, identificar y caracterizar a nivel genómico a los virus productores de IRAB en pacientes pediátricos, como así comprender los mecanismos por los cuales se generan nuevas variantes de estos mismos.

#### ***Aplicación de tecnologías de secuenciación at random para la detección de virus en secreciones respiratorias de niños con infección respiratoria aguda***

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 del tema de trabajo de la Investigadora Asistente 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. 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.

### **Análisis de variabilidad genética de Virus Sincicial Respiratorio**

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.

### **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.

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:
- Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 22).
  - 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 .....".
  - Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: [ininvest@cic.gba.gob.ar](mailto:ininvest@cic.gba.gob.ar) (puntos 1 al 22), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
  - 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:
- 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.