

Código: PVT-CAYT-02-2023

“DESARROLLO DE UNA VACUNA  
MARCADORA INACTIVADA PARA LA  
PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE  
AUJESZKY EN PORCINOS”

Director: PALACIOS, Carlos Adolfo

Integrantes: RAIBENBERG, Fernando Claudio; BUCCI, Paula  
Lorena; PERALTA, Andrea Veronica; GARANZINI, Debora  
Patricia; CARBALLEDA, Alfredo Juan Manuel; RIZZI, Lucia

Año: 2024

## **Informe Final de Proyectos de Vinculación Tecnológica**

**Universidad Nacional de Moreno**

## Contenido

Identificación del proyecto .....	3
PARTE I - Informe de resultados para el repositorio digital institucional de acceso abierto de la UNM – Ley N° 26.899 .....	5
1. Antecedentes y objetivos.....	5
2. Demandante y sector productivo .....	6
3. Actividades realizadas .....	6
4. Resultados y productos .....	8
5. Impacto.....	8

## Identificación del proyecto

Código:	PVT-CAYT-02-2023
Tipo de proyecto <sup>1</sup> :	Proyectos de Vinculación y Transferencia
Nombre completo del proyecto:	Desarrollo de una vacuna marcadora inactivada para la prevención de la Enfermedad de Aujeszky en porcinos - FITBA-A-54.
Director/a:	Carlos Adolfo Palacios
Lineamiento prioritario <sup>2</sup>	Investigación e Innovación en Biotecnología
Sub-línea prioritaria	Biología molecular y celular
Organismo financiador:	Min. Producción PBA
Convocatoria:	FITBA (Fondo de Innovación Tecnológica de Buenos Aires)
Contraparte:	Vetanco S.A.
Fecha de inicio:	22/02/2023
Fecha de finalización:	21/02/2024
Unidad de localización: Departamento/centro/ Programa	DCAYT

<sup>1</sup> Tipos de Actividades de Vinculación y Transferencia Tecnológica (AVTT):

PVT: Proyectos de Vinculación y Transferencia

SAT: Servicios a terceros

SE: Servicios Estandarizados

<sup>2</sup> Según LINEAMIENTOS ESTRATÉGICOS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DESARROLLO TECNOLÓGICO

2022-2027 (Aprobado por Resolución UNM-CS N° 848/21)

[http://www.unm.edu.ar/files/Lineamientos\\_Estrategicos\\_de\\_Investigacion\\_Cientifica\\_y\\_Desarrollo\\_Tecnologico\\_UNM\\_2022\\_2027\\_Oct\\_2021.pdf](http://www.unm.edu.ar/files/Lineamientos_Estrategicos_de_Investigacion_Cientifica_y_Desarrollo_Tecnologico_UNM_2022_2027_Oct_2021.pdf)

<p>Resumen: <i>máx. 300 palabras</i></p>	<p>El presente proyecto ha tenido como objetivo, en primer lugar, generar bancos celulares caracterizados para el presente desarrollo y posterior producción y control de procesos, particularmente células MDBK y PK-15; y, en segundo lugar, generar y caracterizar un banco de virus SuVH-1 cepa Shope.</p> <p>Como resultado, se generaron 3 bancos: 1 Banco de MDBK (100 viales de 2 ml), 1 Banco de PK-15 (100 viales de 2 ml) y 1 Banco de Virus SuHV-1 (64 viales de 5 ml). Este material representa la base de una nueva vacuna de alto impacto en la industria de producción porcina en nuestro país.</p> <p>Los tres bancos finales (bancos celulares y el banco viral), se realizaron con la calidad suficiente para permitir realizar el desarrollo e investigación de vacunas o biológicos destinados al control de diferentes enfermedades virales para porcinos, tales como el virus SuHV-1. Y también permite el uso de la plataforma para el desarrollo de biológicos para bovinos, en relación con la línea celular MDBK.</p> <p>La cantidad de viales generados en el presente proyecto permitirá tener material disponible por, al menos, los próximos 10 años. Pudiendo ser utilizado este material para diferentes investigaciones destinadas al control de enfermedades virales de porcinos, y potencialmente también bovinos.</p>
<p>Palabras claves (no menos de 3):</p>	<p>Vacuna. Enfermedad de Aujeszky en porcinos.</p>

## PARTE I - Informe de resultados para el repositorio digital institucional de acceso abierto de la UNM – Ley N° 26.899

### 1. Antecedentes y objetivos

- Realizar una presentación general del estudio (tema/problema) y una justificación de su relevancia (motivos para estudiarlo, aportes potenciales).
- Describir, si corresponde, los métodos, técnicas, instrumentos y materiales utilizados
- Indicar objetivo general y específicos de la investigación

El virus de pseudorabia (PRV), es un virus ADN doble cadena perteneciente a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, género Varicellovirus. Es un virus neurotrópico que puede establecer infecciones latentes en células del tejido nervioso, pero ocasiona encefalitis en animales jóvenes y en varios otros huéspedes. Algunas de las vacunas utilizadas a nivel global se basan en la cepa Bartha-K61, la cual es deficiente en las regiones que codifican para la glicoproteína E (gE), US9 y parcialmente glicoproteína I y US2, presentando adicionalmente mutaciones en las secuencias codificantes para gC, gM y UL21. Particularmente, la delección de gE en las vacunas basadas en esta cepa viral, permitió el uso de sistemas de serología que diferencien animales infectados de los vacunados al carecer los animales vacunados de respuesta de anticuerpos contra dicha glicoproteína. En la estrategia planteada en el presente proyecto, se realizó la modificación racional del genoma viral de la cepa Shope de PRV, que presenta la ventaja de tener la información del genoma completo en esa región pudiendo realizar la edición del genoma para eliminar de manera completa la región de gE, en combinación con la delección de la región codificante para gl, o el gen de la Timidina quinasa viral (TK), pudiendo tener más posibilidades de generar una cepa para el desarrollo de vacunas marcadoras. Una vez realizados los bancos celulares de las células MDBK y PK-15, se utilizaron como sustrato para la generación del virus modificado genéticamente en diferentes puntos del genoma, como se mencionó anteriormente. Para realizar estas modificaciones se emplearon dos estrategias principalmente, a) por medio del uso del sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 (del inglés Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9), y b) por medio de recombinación homóloga tradicional. Para la primera estrategia, se han diseñado los plásmidos de transferencia y las moléculas que generaron los ARNs que sirvieron de guías para realizar la edición génica y obtener los virus modificados. En ambas estrategias se planteó el uso de genes reporteros para facilitar la búsqueda de los clones recombinantes, tales como la proteína verde fluorescente (eGFP) o la enzima luciferasa. Con las mencionadas estrategias, se

logra la obtención del virus recombinante adecuado y la caracterización molecular para la generación del banco viral.

**Objetivos:**

1. Generar bancos celulares caracterizados para el presente desarrollo y posterior producción y control de procesos, particularmente células MDBK y PK-15.
2. Generar y caracterizar un banco de virus SuVH-1 cepa Shope.

**Metodología:**

En una primera etapa se realizaron las compras relacionadas a la generación de los bancos celulares y reactivos necesarios para el proyecto. También se analizaron y caracterizaron los bancos celulares generados hacia el final de la etapa. Adicionalmente se realizó la síntesis de las moléculas necesarias para la etapa posterior.

En una segunda etapa, se analizó y caracterizó el banco de virus SuHV-1 cepa Shope generado. Utilizando células del banco de células parcialmente caracterizado se procedió a realizar un banco de virus SuHV-1 cepa Shope, constituyendo así la base para la posterior obtención de la vacuna marcadora de nueva generación contra el virus de Aujeszky.

## ***2. Demandante y sector productivo***

*- Describir a la organización adoptante y/o demandante y al sector productivo que forma parte*

---

La empresa demandante fue Vetanco S.A, un laboratorio veterinario internacional que desarrolla, elabora y comercializa productos innovadores para la salud y la producción animal.

## ***3. Actividades realizadas***

*- Indicar las actividades realizadas en relación a los objetivos del proyecto:*

---

Las actividades desarrolladas en la primera etapa fueron:

- Se preparó y controló esterilidad de medio de cultivo DMEM, para realizar los cultivos celulares necesarios para el banco de células de MDBK y PK15.
- Se adquirieron viales controlados de las células MDBK y PK-15, a partir del Banco Argentino de Células, ABAC.
- Se inició y finalizó el cultivo de células MDBK en frascos de cantidad suficiente para constituir el banco celular de 100 crioviales (2 mL), que se ha almacenado en termo de

criopreservación en atmósfera de nitrógeno líquido, donde se monitorea la temperatura de manera continua.

- Se inició y finalizó el cultivo de células PK-15 en frascos de cantidad suficiente para constituir el banco celular de 100 crioviales (2 mL), que se ha almacenado en termo de criopreservación en atmósfera de nitrógeno líquido, donde se monitorea la temperatura de manera continua.
- Como parte de los controles de los bancos, se utilizaron oligonucleótidos iniciadores para la amplificación y secuenciación parcial de los genes GADP y NAD1. Tanto para las células PK-15 de origen porcino, como para las correspondientes a las células MDBK de origen bovino.
- Adicionalmente, se evaluó el número y estructura cromosómica de las células de cada banco generado.

Por último, las actividades desarrolladas en la segunda etapa fueron:

- Se descongelaron células MDBK, a partir del banco celular generado, para realizar la titulación y amplificación del virus SuHV-1, a partir de su tubo original. Este dato de titulación se utilizó para la infección y establecimiento del banco viral.
- Con el virus ya titulado, se procedió a realizar la infección controlada de frascos de cultivo de células MDBK suficientes para realizar un banco de SuHV-1 de 64 viales (5 mL), a partir del cual se realizó el control de esterilidad y titulación.
- En esta etapa, se utilizaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de regiones del genoma del virus SuHV-1, seguida de secuenciación y caracterización viral molecular luego de los pasajes aplicados hasta alcanzar el banco viral.
- Con estos ensayos se realiza el control de la identidad del virus SuHV-1 Shope, utilizando ADN viral extraído de la suspensión viral utilizada para conformar el banco de SuHV-1 cepa Shope.

#### **4. Resultados y productos**

- Breve descripción de los conocimientos, tecnologías y/o bienes transferidos al sector asociado
- Informar si se han generado nuevas patentes o licencias

La obtención de un banco de virus SuHV-1 y de las respectivas células donde dicho virus replica, constituyen la base a partir de la cual realizar la etapa de desarrollo de virus recombinantes tanto para vacunas marcadoras inactivadas o atenuadas, para su uso en sanidad de porcinos en Argentina.

Como resultado, se generaron 3 bancos: 1 Banco de MDBK (100 viales de 2 ml), 1 Banco de PK-15 (100 viales de 2 ml) y 1 Banco de Virus SuHV-1 (64 viales de 5 ml). Este material representa la base de una nueva vacuna de alto impacto en la industria de producción porcina en nuestro país.

Los tres bancos finales (bancos celulares y el banco viral), se realizaron con la calidad suficiente para permitir realizar el desarrollo e investigación de vacunas o biológicos destinados al control de diferentes enfermedades virales para porcinos, tales como el virus SuHV-1. Y también permite el uso de la plataforma para el desarrollo de biológicos para bovinos, en relación con la línea celular MDBK.

La cantidad de viales generados en el presente proyecto permitirá tener material disponible por, al menos, los próximos 10 años. Pudiendo ser utilizado este material para diferentes investigaciones destinadas al control de enfermedades virales de porcinos, y potencialmente también bovinos.

#### **5. Impacto**

- Describir el impacto del proyecto en relación a la problemática planteada

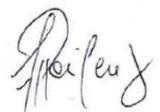
Las tareas realizadas en el presente proyecto, implica la generación de los materiales básicos para iniciar la plataforma de generación de vacunas para porcinos basadas en virus modificados genéticamente con el fin de obtener vacunas marcadoras contra la infección de herpesvirus tipo 1 específico de dicha especie de animal de producción.

**Fecha:** 15 / 03 / 2024

**Firma Responsable del Área de la UNM donde radica el Proyecto:**



Dr. Carlos Palacios  
Director de Proyecto FITBA A54  
Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnología  
Universidad Nacional de Moreno



Mg. Fernando C. Raibenberg  
Coordinador – Vicedecano  
Licenciatura en Biotecnología  
Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnología