

SUPLEMENTO 1
VOL 45
2013

REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

PUBLICACIÓN
DE LA
ASOCIACIÓN ARGENTINA
DE
MICROBIOLOGÍA

REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

Publicación de la Asociación Argentina de Microbiología

Aparece en Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Veterinary Bulletin, Index Veterinario, EMBASE (Excerpta Medica), Medline (Index Medicus), Tropical Diseases Bulletin, Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud (LLACS), Periódica, LATINDEX, PubMed, SciELO, Science Citation Index Expanded y Redalyc.

DIRECTORA

Silvia Carla Predari
*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari.
Universidad de Buenos Aires*

SECRETARIO DE REDACCIÓN

José A. Di Conza
*Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional del Litoral*

COMITÉ EDITOR

Susana Carnovale
Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires

Mauricio G. Carobene
*Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas*

Inés E. García de Salamone
Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires

Ana M. Jar
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires

Lina A. Lett
*Facultad de Agronomía. Universidad Nacional del Centro
de la Provincia de Buenos Aires*

Claudia I. Menghi
*Hospital de Clínicas. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
Universidad de Buenos Aires*

Beatriz N. Passerini de Rossi
Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires

Cecilia Quiroga
*Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica.
Universidad de Buenos Aires.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas*

ASESORES EN LA ARGENTINA

C. Bantar	N. Leardini
J.C. Basílico	H. Lopardo
M.I. Berría	W.P. Mac Cormack
H.M. Bianchini	D. Masih
N. Binsztein	M. Mollerach
R. Campos	R. Negroni
G. Carballal	F. Nicola
A. Cataldi	T. Orduna
J.J. Cazzulo	R. Raya
S.R. Costamagna	V. Ritacco
C. Coto	H.R. Rodríguez
M. D'Aquino	A. Schudel
R. de Torres	L. Scolaro
A.H. Frade	F. Sesma
A. Gentile	R. Soloaga
A. Giri	H. Terzolo
J.E. González	G. Vaamonde
S. González Ayala	

ASESORES EN EL EXTERIOR

A. Amoroso (Bélgica)	M. Philipp (EE.UU.)
J. Arbiza (Uruguay)	F. Queiroz Telles (Brasil)
J.A. Ayala (España)	A. Restrepo (Colombia)
P. Feng (EE.UU.)	G. San Blas (Venezuela)
E. García López (España)	G. Schmunis (EE.UU.)
M. Gottschalk (Canadá)	A. Steinbüchel (Alemania)
R. Guerrero (España)	M. Tolmasky (EE.UU.)
M.J. Mendes Giannini (Brasil)	J. Vila Estapé (España)



© Asociación Argentina de Microbiología (2013)

Secretaría: Deán Funes 472, C1214AAD Buenos Aires;

Tel./Fax: (54-11) 4932-8858 y (54-11) 4932-8948;

E-mail: info@aam.org.ar; http://www.aam.org.ar

Suscripción anual a la versión impresa (4 números anuales)

Socios AAM	\$ 200
Argentina no socios	\$ 400
América Latina	U\$S 150
Otros países	U\$S 300

Personería Jurídica 000908

Registro Nacional de la Propiedad Intelectual N°. 269649

ISSN: 0325-7541

Correo Argentino	Suc. 4-B	Franqueo Pagado Concesión N° 4195
		Tarifa Reducida Concesión N° 628

XIII Congreso Argentino de Microbiología

II Congreso Microbiología Agrícola y Ambiental

23 al 26 de septiembre de 2013
Centro de Convenciones Palais Rouge

Jerónimo Salguero 1433/49
Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

pas bacterianas y 24 cepas de *Aspergillus fumigatus* para los estudios con los antimicrobianos. Se estudió la CIM para un total de 10 desinfectantes comerciales de composición química diferente para las bacterias y para los hongos. Además, para el caso de estos últimos se investigó la CIM para dos productos antifúngicos a base de enilconazol. La CIM se estudió en caldo y agar Mueller-Hinton (MH) en bacterias y hongos, respectivamente, considerándose como la menor concentración de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación. Las concentraciones del desinfectante utilizadas fueron: 8%; 4%; 2%; 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,06%, 0,03% y 0%. Por otro lado, la sensibilidad de los antibióticos fue estudiada en agar MH. Las bacterias fueron tipificadas por pruebas bioquímicas, siendo compatibles con *E. coli*, *Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus* spp. Los hongos pertenecientes a *Aspergillus fumigatus* fueron tipificados por características macro y microscópicas y utilizando claves taxonómicas. La CIM estuvo entre 0,03% a >8%, dependiendo de las cepas bacterianas o fúngicas y del desinfectante utilizado. En el caso de los hongos, la CIM fue menor en los dos productos antifúngicos en comparación con la producida por los desinfectantes. Por otro lado, los 4 antibióticos inhibieron a la mayoría de las bacterias ensayadas. Los datos obtenidos permiten poder realizar una elección adecuada del desinfectante a emplear en la planta de incubación del estudio, no existiendo resistencia bacteriana importante a los antibióticos utilizados en el primer día de vida del pollito BB.

P-209

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENAS AISLADAS DE POSIBLES FUENTES DE INFECCIÓN PARA EL HOMBRE

X Blanco Crivelli, P Llorente, A Bentancor

Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Argentina.

Escherichia coli enteropatógeno (EPEC) es un microorganismo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que produce diarrea en varias especies animales y es señalada como la principal causa de diarrea infantil en países no industrializados.

En el marco de un estudio que evalúa el rol de los roedores sinantrópicos como reservorios de bacterias diarregénicas, se obtuvieron 6 aislamientos de cepas EPEC provenientes de ejemplares del género *Rattus* capturados en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de los aislamientos de EPEC provenientes de roedores sinantrópicos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

La metodología utilizada se basó en las recomendaciones del *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI) mediante la realización de pruebas de difusión en Agar Müeller Hinton. Se emplearon monodiscos (Oxoid) y tabletas (Rosco). El panel de antibióticos ensayados incluyó: amoxicilina-clavulánico (AMC) 30µg, imipenem (IMP) 10µg, ceftazidima (CAZ) 30µg, cefotaxima (CTX) 30µg, aztreonam (AZT) 30µg, estreptomycin (S) 10µg, gentamicina (CN) 10µg, amikacina (AK) 30µg, ácido nalidíxico (NA) 30µg, ciprofloxacina (CIPR) 5µg, cloranfenicol (C) 30µg, nitrofurantoína (NI) 300µg y tetraciclina (TE) 30µg. Cada cepa fue clasificada como sensible, con sensibilidad disminuida o resistente en función de los halos obtenidos (CLSI M100 S21, 2011). Asimismo las cepas fueron evaluadas en su habilidad para producir beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), mediante pruebas de rastrillaje frente a CAZ, CTX y AZT. Se consideraron sospechosos diámetros ≤ 22 mm para CAZ y ≤ 27 mm para CTX, que fueron confirmados por incremento de 5mm o más en los halos al realizar la comparación entre estas cefalosporinas solas y con inhibidor de beta-lactamasas.

El 100% de las cepas estudiadas fue sensible al panel de antibióticos utilizados observándose resistencia a la TE sólo en 1/6 (16.7%) de las cepas bajo estudio. No se observó la presencia de BLEE.

Basados en los resultados de susceptibilidad obtenidos, se concluye que los aislamientos no han sufrido presión antibiótica que favorezca la selección de fenotipos resistentes, esperable en cepas "wild type" de origen animal. Se destaca que los miembros del género *Rattus* spp, que comparten espacios

con el hombre, presentan en su microbiota cepas EPEC "wild type", lo cual señalaría su posible rol como portadores naturales de este patotipo.

P-210

Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, LAMP, para la detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, como nueva técnica diagnóstica.

R Moyano¹, L Peralta², F Alvarado Pinedo², G Travería², M Romano¹

¹ Instituto de Biotecnología; CICVyA-INTA. Hurlingham., Argentina. ² Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias. FCV. UNLP. Chascomús, Argentina.

Introducción: La paratuberculosis (PTB) es una enteritis crónica que afecta a los ruminantes, la cual causa importantes pérdidas económicas. Además, la enfermedad preocupa por la posible vinculación del agente etiológico, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) en el proceso inflamatorio del intestino humano conocido como enfermedad de Crohn. Para la detección temprana de PTB es importante desarrollar y mejorar los métodos de diagnóstico. Recientemente se introdujo en el diagnóstico de varias enfermedades, una técnica llamada LAMP, que es una amplificación isotérmica. Solo una publicación hace referencia a la aplicación de LAMP para detectar MAP (Enosawa, 2003).

LAMP utiliza múltiples iniciadores y condiciones isotérmicas (60-65 °C) para la amplificación de la secuencia blanco, no requiere termociclador para garantizar los ciclos. El proceso es altamente específico y de una sensibilidad comparable al de la PCR. La observación del producto de amplificación puede hacerse visualmente por turbidez o por cambios de color agregando ciertos reactivos (BrEt, Sybr Green).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar esta técnica para la detección de MAP.

Materiales y Métodos: Para realizar esta técnica se comenzó con el diseño de primers on-line (Primerexplorer V3-V4) teniendo como referencia el elemento de inserción de MAP IS900 (GenBank: X16293.1).

Una vez diseñado los primers se procedió a realizar la técnica de LAMP, con Sybr Green como colorante, para distintas muestras de ADN extraído de cultivos, tanto de MAP, como de otras micobacterias, y también de muestras de materia fecal, obtenidas de animales con PTB. Los productos amplificados fueron también corridos en un gel de agarosa.

Resultados y conclusiones: Pudimos observar que al realizar la reacción de LAMP para PTB con una curva de diluciones de ADN, se observó una resolución en la técnica colorimétrica hasta concentraciones de 0,5 ng de ADN. Y pudimos observar amplificación detectable por electroforesis hasta concentraciones de 0,0025 ng.

Al evaluar la reacción para distintas micobacterias, se evaluaron 8 especies diferentes de micobacterias, sin obtener resultados positivos que crucen con la reacción específica con MAP. Dando una especificidad del 100%.

Al evaluar la reacción en muestras de ADN provenientes de materia fecal de animales con PTB, se realizaron 15 extracciones de distintos animales de las cuales resultaron positivas 9.

Por lo cual se puede concluir que LAMP es una técnica sensible y específica para detectar animales con PTB, y permite la discriminación visual de resultados sin equipos especializados. LAMP es aplicable en las condiciones de campo, tiene bajo costo y facilidad de aplicación, ya que puede utilizarse sobre muestra de materia fecal.

En los casos de bajas concentración de ADN es aconsejable sembrar en geles de agarosas el producto de amplificación, dado que la observación de la turbidez es menos sensible que la visualización de los productos en dichos geles.

P-211

VARIABILIDAD EN REGIONES FLANQUEANTES A GENES DE VEROTOXINAS

A Krüger^{1,2}, CV Granobles Velandia^{1,2}, PMA Lucchesi^{1,2}

¹ Lab. Inmunoquímica y Biotecnología, FCV-CIVETAN, UNCPBA, Argentina. ² CONICET, Argentina.

Introducción: *Escherichia coli* verotoxigénico es un patógeno zoonótico emergente, que causa diarrea y enfermedades severas en seres humanos, como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, el cual en nuestro país alcanza la mayor incidencia a nivel mundial. Las verotoxinas son el principal factor de virulencia de esta bacteria y presentan distintos subtipos. Se encuentran codificadas en fagos temperados (profagos) insertos en el cromosoma de VTEC. Estos fagos juegan un rol fundamental en la patogénesis de VTEC. Los genes *vt* están dentro de la región tardía de estos fagos y, en consecuencia, la síntesis de verotoxina se encuentra regulada por los genes que se inducen durante el ciclo lítico de los mismos. Se ha postulado que la secuencia del gen *q* del fago podría jugar un rol en esta regulación.

Objetivo: detectar, en cepas VTEC, secuencias características de fagos codificantes de verotoxinas en la región upstream del operón *vt*.

Materiales y Métodos: Se analizó un total de 16 aislamientos: 2 del genotipo vt_{1EDL} , 2 de vt_{2EDL} , 4 de $vt_{2EDL}-vt_{2vha}$ y 4 de vt_{2g} . Como control positivo se utilizó la cepa de referencia *E. coli* EDL933, portadora de los subtipos vt_{1EDL} y vt_{2EDL} . El análisis se realizó por PCR combinando *primers* específicos de vt_1 o vt_2 con *primers* complementarios a secuencias de los fagos H-19B y 933W (Unkmeir y Schmidt, 2000). Se combinó el *primer forward* Q-stx-f (complementario al gen *q*) con un *primer reverse* específico de vt_1 o vt_2 , según el genotipo de cada cepa. En los aislamientos vt_2 -positivos además se combinó un *primer forward* complementario al gen *ninG* con el *primer* específico de vt_2 . Para evaluar compatibilidad del *primer* específico de vt_2 en las cepas que no produjeron amplificación, se realizó una PCR combinándolo con el *primer forward* 177U.

Resultados: en todos los aislamientos de los genotipos vt_{1EDL} , vt_{2EDL} y $vt_{2EDL}-vt_{2vha}$ se obtuvo un amplímero del tamaño esperado al realizar la PCR combinando el *primer* específico del gen *q* y el complementario a vt_1 o vt_2 . Sin embargo, no se obtuvo amplificación para los aislamientos portadores de vt_{2g} , ni cuando se utilizó el *primer* específico del gen *ninG*. La ausencia de amplificación en estos casos no se debió a falta de complementariedad entre el *primer* específico de vt_2 y la secuencia de vt_{2g} , ya que se obtuvo el amplímero esperado cuando se combinó este *primer* con el 177U.

Conclusiones: se comprobó la presencia del gen *q* del fago en la región upstream del operón *vt* en los aislamientos portadores de los genotipos vt_{1EDL} , vt_{2EDL} y $vt_{2EDL}-vt_{2vha}$, y también la del gen *ninG* en los de estos 2 últimos genotipos. Sin embargo, no pudo ser demostrada la presencia de estos genes del fago en la región flanqueante a vt_{2g} , lo cual sugiere diferencias importantes en esta región.

P-212

EXPLORANDO LA CONTRIBUCIÓN DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS CONSERVADAS Y DEL MIOINOSITOL EN LA VIRULENCIA DE *Brucella abortus*

M Trangoni, S Cravero

Instituto de Biotecnología-INTA, Argentina.

Se define como proteínas hipotéticas a aquellas proteínas deducidas de secuencias genómicas que se encuentran pobremente o no caracterizadas experimentalmente y si estas proteínas se encuentran conservadas filogenéticamente se las define como proteínas hipotéticas conservadas (PHC). En bacterias, el mioinositol es un metabolito necesario como precursor para la síntesis de moléculas que pueden poseer un rol en la virulencia.

El género *Brucella* comprende un grupo de bacterias Gram negativas que causan brucelosis, una zoonosis de distribución mundial. A partir del análisis bioinformático de los genomas de *Brucella* spp. se estima que el género posee en promedio un 28% de proteínas anotadas como proteínas hipotéticas. Con respecto a la vía del mioinositol, el análisis *in silico* indica que esta especie posee los genes necesarios para su metabolismo.

Con el objetivo de identificar nuevos genes implicados en la virulencia de *Brucella*, hemos inactivado genes codificantes de PHC y de enzimas participantes en la vía metabólica del mioinositol y las mutantes generadas evaluadas en su virulencia en el modelo murino.

Para facilitar la obtención de las mutantes se adaptó el método de mutagénesis mediante integración disruptiva descripto previamente (Haine y col. 2005. Infect Immun 73: 5578–5586). El método de mutagénesis fue puesto a punto y aplicado a 50 genes codificantes para PHC. Luego, se mutagenizaron los principales genes participantes en la síntesis del mioinositol. Las mutantes obtenidas y la cepa parental *B. abortus* S2308 fueron evaluadas midiendo la colonización esplénica en el modelo de ratones BALB/c (n= 3 animales). El análisis de las unidades formadoras de colonias (UFC) recuperadas en los bazo nos permitió la identificación y preselección de seis genes asociados a la atenuación en la virulencia. En un segundo ensayo en ratones (n= 5 animales) se realizó nuevamente la evaluación de la virulencia de los genes preseleccionados. Mediante ANOVA de una vía seguido del post-test de Dunnett se confirmó el fenotipo atenuado de las mutantes y se seleccionaron dos genes de interés en base a la atenuación generada. Las mutantes en estos genes resultaron protectoras al desafío con *B. abortus* S2308 en el modelo murino.

Para determinar si estos dos genes identificados contribuyen a la virulencia de otras especies zoonóticas de *Brucella*, se inactivaron los genes ortólogos en las cepas *B. suis* 1330 y *B. melitensis* 16M. Las cepas parentales y mutantes obtenidas fueron evaluadas en ratones BALB/c (n= 5 animales) con posterior análisis estadístico. En estas especies, sólo se conservó la atenuación en las mutantes en uno de los genes de interés.

El método de obtención de mutantes aplicado permitió evaluar un gran número de genes. Los genes mutantes en los que presentan un fenotipo de interés podrían en el futuro ser objeto de atención de una comprensión más profunda de los mecanismos patogénicos de *Brucella* spp. y permitirían mejorar el diseño de nuevas vacunas.

P-213

Virus de Fiebre Aftosa A Argentina 2001: Correlación de títulos de anticuerpos neutralizantes con la protección al desafío viral in vivo por medio de la Expectativa Porcentual de Protección. Desarrollo de una curva de correlación de tipo Logit.

C Perez Beascochea, S Galdo Novo, R D'Aloia, J Esteves Madero, E Maradei
Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA, Argentina.

La Fiebre Aftosa (FA) enfermedad viral más contagiosa de los mamíferos, posee un gran potencial para causar graves pérdidas económicas. Los ensayos *in vivo* de descarga viral en la especie susceptible previamente vacunada son considerados la prueba de oro para la evaluación de la capacidad protectora de una determinada cepa vacunal (OIE, 2012). Sin embargo, es una prueba costosa, requiere tiempo, instalaciones apropiadas de Bioseguridad nivel 4 OIE, contraponiéndose además a la tendencia mundial en bienestar animal, por lo que la correlación con pruebas *in vitro* es altamente deseable. Un método de correlación es calculando la expectativa porcentual de protección (EPP) (Alonso y col., 1987), a partir de tablas de correlación que asocian títulos de anticuerpo con protección contra la cepa homóloga a la vacuna (PANAFOSA, 1994; Maradei y col., 2008; OIE, 2012). La valoración de anticuerpos neutralizantes (AcN) es lo que mejor refleja *in vitro* la respuesta inmune que acontece *in vivo* (OIE, 2012; Mattion y col., 2009). Para la cepa viral A Argentina 2001 (A Arg 01) todavía no se ha estimado la correlación entre la prueba de Protección a la Generalización Podal (PGP) y el título de AcN. El objetivo fue desarrollar una curva de correlación entre títulos de AcN en sueros de bovinos vacunados y el resultado del desafío *in vivo* mediante PGP, para poder estimar la EPP para la cepa vacunal A Arg 01.

La Virusneutralización bidimensional (VN Bd) se realizó en microplacas según procedimiento estandarizado en nuestro laboratorio basado en el método descripto por Rweywmamu y col, 1970, utilizando suspensión de células BHK-21, y pasaje en células BHK-21 de la cepa viral A Arg 01. Los 68 sueros analizados obtenidos a 60 días pos vacunación (DPV) correspondieron a bovinos vacunados con vacunas comerciales tetravalentes y desafiados con la cepa A Arg 01 en la prueba de PGP a los 90 DPV, calculándose los títulos de AcN de cada suero correspondiente a 100 DICT 50% de la cepa A Arg 2001.