



Número de Proyecto: .....

Año: .....

(No llenar)

## UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

### Facultad de Ciencias Veterinarias

#### 1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1 **TÍTULO del PROYECTO :** Micobacterias ambientales en distintas fuentes de agua.

1.2. **TIPO de INVESTIGACIÓN:** Básica - Aplicada - Desarrollo Experimental

**BÁSICA:** Consiste en trabajos experimentales o teóricos que se emprenden principalmente para obtener nuevos conocimientos acerca de los fundamentos de fenómenos y hechos observables, sin prever en darles ninguna aplicación o utilización determinada o específica.

**APLICADA:** Consiste también en trabajos originales realizados para adquirir nuevos conocimientos, pero fundamentalmente dirigidos hacia un objetivo práctico específico.

**DESARROLLO EXPERIMENTAL:** Consiste en trabajos sistemáticos basados en los conocimientos existentes, derivados de la investigación y/o la experiencia práctica, dirigidos a la producción de nuevos materiales, productos y dispositivos; al establecimiento de nuevos procesos, sistemas y servicios, o a la mejora substancial de los ya existentes, es decir, producir una tecnología.

1.3. **CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL:** (Ver Códigos en Planilla Adjunta) .....

1.4. **CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES:** (Ver Códigos en Planilla Adjunta) .....

#### 2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. **AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS :** Departamento de Epizootiología y Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias.

2.2. **OTRAS INSTITUCIONES:** UNS

2.3. **EQUIPO de TRABAJO:** (En el caso de tratarse de un Plan de Tesis Doctoral o Tesis de Maestría, complete solamente el cuadro 2.3.5.)

2.3.1. **INTEGRANTES ( Se adjunta planilla con la firma de los integrantes)**

Apellido y Nombre	Título Académico	Categ. Invest.	Responsabilidad (1)	Cátedra O Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem	Firma
Oriani , Delia Susana	Ms.Ciencias Agrarias	II	Director	Microbiología Especial y virología. UNLPam	Prof. Adjunto Exclusivo	20	
Baldini Mónica	Dr. Biología	III	Co Director	Microbiología General. Higiene y Sanidad UNS	Jefe Trabajos prácticos	10	
Oriani Alejandra Soledad	Bioquímica	SC	Investigador	Microbiología General. Higiene y Sanidad UNS	Auxiliar de 1ra Simple	4	
Gino Lilia Mabel	Médico Veterinario	V	Investigador	Parasitología y enfermedades parasitarias	JTP Semi	2	

Tortone Claudia A	Microbiologa	SC	Investigador	Microbiología Especial y virología. UNLPam	Auxiliar de 1ra Semiexclusiva	10	
Valeria Buey	Médico Veterinario	SC	Investigador	Microbiología Especial y virología. UNLPam	Auxiliar de 1ra Simple	10	
Staskevich Ana S	Médico Veterinario	IV	Investigador	Microbiología Especial y virología. UNLPam	JTP Exclusiva	10	

(1) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

### 2.3.1. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

### 2.3.2. TESISISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

### 2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
Pinon Javier	Estudiante	2 h

### 2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
	Director Co-Director Tesista		

## 3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: 2 años y 4 meses.

3.1. FECHA de INICIO: (01/11/2009 FINALIZACIÓN: 31/03/2012

#### **4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)**

Las micobacterias no tuberculosas (MNT), micobacterias atípicas, mycobacteria other than tuberculosis (MOTT), o simplemente micobacterias ambientales (MA) se encuentran en el polvo, suelo y agua se transmiten por inhalación, ingestión e inoculación. No existe evidencia de transmisión directa entre individuos algunas especies son patógenos oportunistas, mientras que otras contribuyen a la biorremediación ambiental. Las afecciones que producen se conocen como micobacteriosis y estas han cobrado importancia en individuos que padecen enfermedades crónicas o presentan trastornos de inmunodeficiencia (HIV). Los objetivos de este proyecto son: a) determinar la presencia de micobacterias ambientales en muestras de aguas cloradas de red de la ciudad de General Pico La Pampa y de aquellos humedales de la zona de influencia; b) Establecer si existe resistencia de micobacterias a la cloración del agua.

c) Establecer relaciones entre los distintos parámetros físico- químicos, el número de bacterias aerobias totales y la presencia de micobacterias.

#### **5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES**

##### **5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA.**

El género *Mycobacterium* contiene aproximadamente 100 especies incluyendo especies patógenas y saprofitas, estas pueden ordenarse en tres grupos sobre la base de su significancia clínica y sin valor taxonomico. El primer grupo comprende especies patógenas obligadas para humanos y animales (Complejo tuberculosis : *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. pinnipedii*) y coplejo Lepra *M. lepare* y *M. lepraemurium* . Estas especies generalmente no se encuentran en el ambiente. El segundo grupo comprende micobacterias potencialmente patógenas para humanos y animales, se aíslan tanto de ambientes terrestres como acuáticos pudiendo, bajo ciertas circunstancias causar enfermedades en individuos que padecen enfermedades crónicas o trastornos en el sistema inmune, ejemplo de estos son: el complejo *Mycobacterium avium* (MAC) y complejo MAIS (*M. avium-intracellulare-scrofulaceum*). El tercer grupo comprende especies saprofitas que no son patógenas o lo son esporádicamente. Estas especies son importantes en el desarrollo de la agricultura, ya sea, interviniendo en la degradación de hidrocarburos, tal es el caso de *M. flavum* , *M. vaccae*, en la fijación libre de nitrógeno y en la solubilización del fosfato de calcio . Las micobacterias ambientales son altamente resistentes a condiciones adversas tales como la desecación y además presentan resistencia natural a los antibióticos. Siendo este último punto de sumo interés en relación a la endemia del SIDA, debido a que se ha incrementado el número de manifestaciones atípicas de tuberculosis, ocasionadas principalmente por *M. avium* y *M. intracellulare*.

Las especies del segundo y tercer grupo se las denomina comúnmente como micobacterias no tuberculosas (MNT), micobacterias atípicas, mycobacteria other than tuberculosis (MOTT) , o simplemente micobacterias ambientales (MA) cabe destacar que no presentan huésped animal primario, se encuentran en el polvo, suelo y agua y se transmiten por inhalación, ingestión e inoculación. No existe evidencia de transmisión directa entre individuo, las afecciones que producen se conocen como micobacteriosis. Las especies no comprendidas en el complejo tuberculosis y lepra fueron agrupadas por Runyon (1959) teniendo en cuenta caracteres sencillos de observar tales como la velocidad de crecimiento y la capacidad de generar pigmento (cromogenicidad). Esa primera clasificación, aunque superada con profundidad y detalle, tiene gran utilidad como guía, en especial para el bacteriólogo clínico y el médico. Consta de cuatro grupos El primer grupo comprende a las especies Fotocromógenas de Crecimiento lento. El segundo grupo comprende especies escotocromógenas de crecimiento lento, el tercer grupo agrupa a aquellas especies no pigmentadas de crecimiento lento y el cuarto grupo incluye a especies pigmentadas y no pigmentadas de crecimiento rápido.

Uno de los hábitats de las MA es el suelo, la bibliografía cita que los suelos ácidos como lo son los de Finlandia presentan un número promedio de MNT de  $1,3 \times 10^5$  micobacterias  $g^{-1}$  de suelo seco, mientras que suelos de sudeste de los Estados Unidos de Norteamérica, presentan entre 40 y 350 ufc  $g^{-1}$  de suelo y nuestros estudios en suelos de la provincia de La Pampa arrojaron un promedio de 763 ufc  $g^{-1}$  de suelo. Es posible que el pH ácido de los suelos estudiados en Finlandia facilite el crecimiento y supervivencia de las MNT tal como fue demostrado por Brooks et al. (1984) en USA. Los investigadores documentaron, también, en los suelos ácidos de Finlandia la existencia de un rango de bacterias aerobias hetrotróficas (BAH) que osciló entre  $1,6 \times 10^6$  y  $4,1 \times 10^7$  bacterias  $g^{-1}$  de suelo, resultados que fueron inferiores al recuento medio obtenido ( $1,15 \times 10^9$  BAH  $g^{-1}$  de suelo) con las 40 muestras de suelos investigadas en la Provincia de La Pampa, que presentaron rango de pH entre 6,5 y 9,5.

Muchas micobacterias pueden persistir en los sistemas de distribución de agua potable debido a la capacidad de producir biofilms, estos pueden ser reservorios de patógenos oportunistas, pueden estar compuestos por flora mixta o monobacteriana y de esta forma los microorganismos se torna resistentes a los métodos de decontaminación, así como el accionar de los antibioticos. La formación del biofilm comprende 3 pasos fundamentales: a) la adhesión irreversible al sustrato, b) la formación de microcolonias, 3) formación de la membrana. Las micobacterias carecen de pili, flagelos, fimbrias, slime o cápsula como elementos de adhesión, sin embargo las uniones entre las células se producen a través de interacciones hidrofóbicas entre los glucopeptido-lípidos.

Trabajos realizados en Estados Unidos demuestran que el 38% de las aguas analizadas de los sistemas de distribución de agua potable contenían micobacterias desde 1 a 50 UFC  $L^{-1}$  hasta  $1,4 \times 10^6$  UFC  $L^{-1}$  en los sitios alejados del sistema de tratamiento del agua., en Grecia el 21%, y en Paris el 72%, en Finlandia los recuentos oscilan desde el 35% al 80%. *M.gordonae* es la especie mas frecuentemente aislada de aguas, seguida de *M. kansasii*, *M. fortuitum*, complejo MAC, *M.chelonae*, *M.xenopi*. También se han aislado micobacterias en la superficie del agua de los sistemas de ozonización ambiental.

En general podemos decir que la temperatura del agua puede afectar la diversidad microbiana en ambientes acuáticos, específicamente hablando de las MA hay especies que resisten altas temperaturas como es el *M.avium* sub especie *paratuberculosis* que resiste la pasterización (15 seg. a 72 °C). *M. avium* , *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M.xenopi* se han aislado de sistema de agua en hospitales .

La cloración de agua es el método de desinfección más común en los sistemas de agua potable, las micobacterias por su especial pared pueden resistir a concentraciones de cloro libre de  $0,3 \mu g mL^{-1}$  durante 60 min. Más del 80 % de los cultivos de *M. chelonae*, *M.fortuitum* , *M.gordonae* y *M. scrofulaceum* sobreviven 10 min de exposición a  $0,2 \mu g mL^{-1}$  de cloro libre.

Se han aislado MA en sitios donde el cloro residual era de  $3 mg L^{-1}$ , mientras que otras no sobreviven concentraciones de  $0,5 \mu g mL^{-1}$ , dependiendo entonces de otras variables ambientales

## **5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el (los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)**

MANUAL DE DIAGNOSTICO DE MICOBACTERIAS DE IMPORTANCIA EN MEDICINA VETERINARIA. Comisión Científica De Micobacterias AAVLD Miembro de Sociedad de Medicina Veterinaria y WAVLD .ISBN 987-21667-1-4

**ORIANI, D.S.; SAGARDOY M.A. (2003).** MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA. Un aporte de la Investigación Argentina. Cap.Micobacterias ambientales en suelos de Buenos Aires y La Pampa. ISBN 987-99083-X

**ORIANI, D.; BERNARDELLI, A; SAGARDOY, M.** 1999. Micobacterias no tuberculosas (MNT) en suelos de la Provincia de La Pampa, Argentina. XXVII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Brasilia, 11 al 16 Julio 1999.

**ORIANI, D.S.; SAGARDOY, M.A.** 2000. Micobacterias no tuberculosas (MNT) en suelos de la Provincia de La Pampa, Argentina. XV Congreso Latinoamericano de Microbiología y XXXI Congreso Nacional de Microbiología. Mérida, Yucatán, México. Abril 2000. Revista Latinoamericana de Microbiología. 42: 523.

**ORIANI, D.S.; BLANDO, J.; GARCIA MONTERO, C.; RODRÍGUEZ GOMEZ, J.; SAGARDOY M.A.** 2000. Características de Micobacterias no Tuberculosas aisladas de suelos de la Provincia de La Pampa. XIII Reunión de la AAVLD . Merlo 15 al 17 de noviembre 2000.

**ORIANI, D.S.; BERNARDELLI, A.; SAGARDOY, A.M.** (2002). Patogenicidad de cepas de micobacterias no tuberculosas (MNT) aisladas de suelos pampéanos en modelo animal murino. XIV Reunión Científico Técnica . Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. 13,14 y 15 Nov. 2002.-.- Modalidad Poster. Libro de resúmenes ISSN15148378.

**ORIANI, D.S.; SAGARDOY, M.A.** (2002). Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa province (Argentina). Rev. Arg. Microbiol. 34:132-137.

**ORIANI D.S.; SAGARDOY,M ( 2006).** SUSCEPTIBILIDAD DE MYCOBACTERIUM FORTUITUM, MYCOBACTERIUM PHLEY Y MYCOBACTERIUM KANSASII FRENTE A TRES SOLUCIONES GERMICIDAS.. *Revista Investigaciones Veterinarias*.Vol. 7, N° 1,: 55-62.

**ORIANI, D.S.; SAGARDOY M.A.** (2007). LESIONES EN MUS MUSCULUS INOCOLADOS CON *Mycobacterium kansasii*, Y *M. fortuitum* AISLADOS DE SUELOS PAMPÉANOS (R ARGENTINA)- INVET, 9 (1) 43-51

**ORIANI, D.S.; DUBARRY, J.; ERREA, A.; VERA, O.A.; MARIA, A.E-; CAVAGIÓN , L.J.; STASKEVICH, A.S.; TORTONE, C.; BUEY, V.; DOS SANTOS SISMEIRO, M.I.; MASCARO, E.D.; BERNARDELLI, A.** Asociación Entre El Diagnóstico Por Intradermorreacción, El Bacteriológico Y El Anatomopatológico En Un Rodeo Bovino Con Antecedentes De Tuberculosis. Xvii Reunión Científico Técnica AAVLD Octubre 2008.

**YESICA HUERTA, ALEJANDRA ORIANI Y MÓNICA BALDINI.**

Aislamiento E Identificación De Micobacterias Ambientales En Agua De Red. Estudio Preliminar. III Jornadas De Microbiología Clínica, Industrial Y Ambiental De La Provincia De Buenos Aires. Coronel Suárez, Prov. De Buenos Aires, 8 Al 10 De Octubre De 2009. Departamento De Microbiología, Carrera De Microbiología Clínica E Industrial. Facultad De Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional De La Plata.

**MÓNICA BALDINI-** Búsqueda De Micobacterias No Tuberculosas En Aguas De Red De La Ciudad De Bahía Blanca. Argentina. "I Jornadas Bahienses De Seguridad Alimentaria. Bahía Blanca, 3 y 4 de Noviembre de 2008.

5.3.

**5.4. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:**

- **MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN SUELOS Y SU POSIBLE INTERFERENCIA CON EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS POR INTRADERMORREACCIÓN EN EL GANADO BOVINO.**

Sagardoy, Marcelo. Oriani, Delia Susana.

Fecha de inicio: Octubre 1997- Finalización Diciembre 1999.

Resolución de aprobación: 087-97

- **SEROPREVALENCIA A INFECCIONES CON *Brucella abortus* Y *Mycobacterium bovis* EN RODEOS DE CRIA DEL DEPARTAMENTO MARA-CO LA PAMPA (ARGENTINA)**

**Oriani, D.S.; Alvarez Rubianes, N.**

**Resolución de aprobación:**

Fecha de inicio : 01 / 04 / 1999      Finalización: 31 / 12/ 2000

- **ELABORACIÓN DE SENSITINAS A MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS Y SU APLICACIÓN EN LA CORROBORACIÓN DE REACCIONES PARAESPECÍFICAS CON PPD BOVINA.**

**Oriani, D.S; Sagardoy, M.A.; Bernardelli, A.**

Fecha de Inicio: 01 / 06 / 2003      Finalización: 31 / 12/ 2004

Resolución de aprobación:137-03

- **COMPARACIÓN DE ALGUNOS MÉTODOS TRADICIONALES EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.**

Oriani, S. Dubarry, J. Maria, A.; Vera, O.; Errea, A.; Staskevich, A.; Cavagión, L.

Fecha de inicio:01-01-05 Finalización: 31-12-07

Resolución de aprobación: 180-05

- **Miembro de la Comisión Científica de Micobacterias de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AADVLD). MV. MSc Oriani Delia Susana.**

## **6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO**

### **6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO**

#### **OBJETIVOS**

- 1.- Determinar la presencia de micobacterias ambientales en agua de red y de dos humedales de la zona
- 3.- Establecer si existe resistencia de micobacterias a la cloración del agua.
- 4.- Establecer relaciones entre los distintos parámetros físico- químicos, el número de bacterias aerobias totales y la presencia de micobacterias.

### **RESULTADOS ESPERADOS.**

Conocer si las aguas de red de nuestra ciudad y de los humedales de la zona, albergan especies de micobacterias ambientales que pudiesen poner en riesgo la salud de individuos inmunocomprometidos tanto de la población humana como animal.

Si el aislamiento de micobacterias ambientales es positivo en las muestras de agua de red debería replantearse la metodología actual de análisis de agua que se emplea según el código alimentario argentino el cual no contempla el cultivo de las micobacterias.

### **6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS (Centro Panamericano de Zoonosis, 1980)**

Se recolectaran muestras de agua de red de 8 sitios de la ciudad de General Pico y de los dos humedales de la zona de influencia, durante dos años consecutivos en 2 momentos de tiempo diferentes que coinciden con las 2 estaciones climáticas extremas (invierno y verano) .

Los lugares que se establecieron para el muestreo del agua de red son los siguientes (círculos rojos en el mapa de la ciudad).

Muestra 1: calle 102 N° 1799

Muestra N° 2: calle 40 N° 1866

Muestra N° 3: calle 103 N° 1835

Muestra N° 4: calle 24 N° 666 Norte

Muestra N° 5: calle 115 N° 216

Muestra N° 6: calle 308 N° 1915

Muestra N° 7: calle 302 N° 678

Muestra N° 8: calle 13 N° 2699

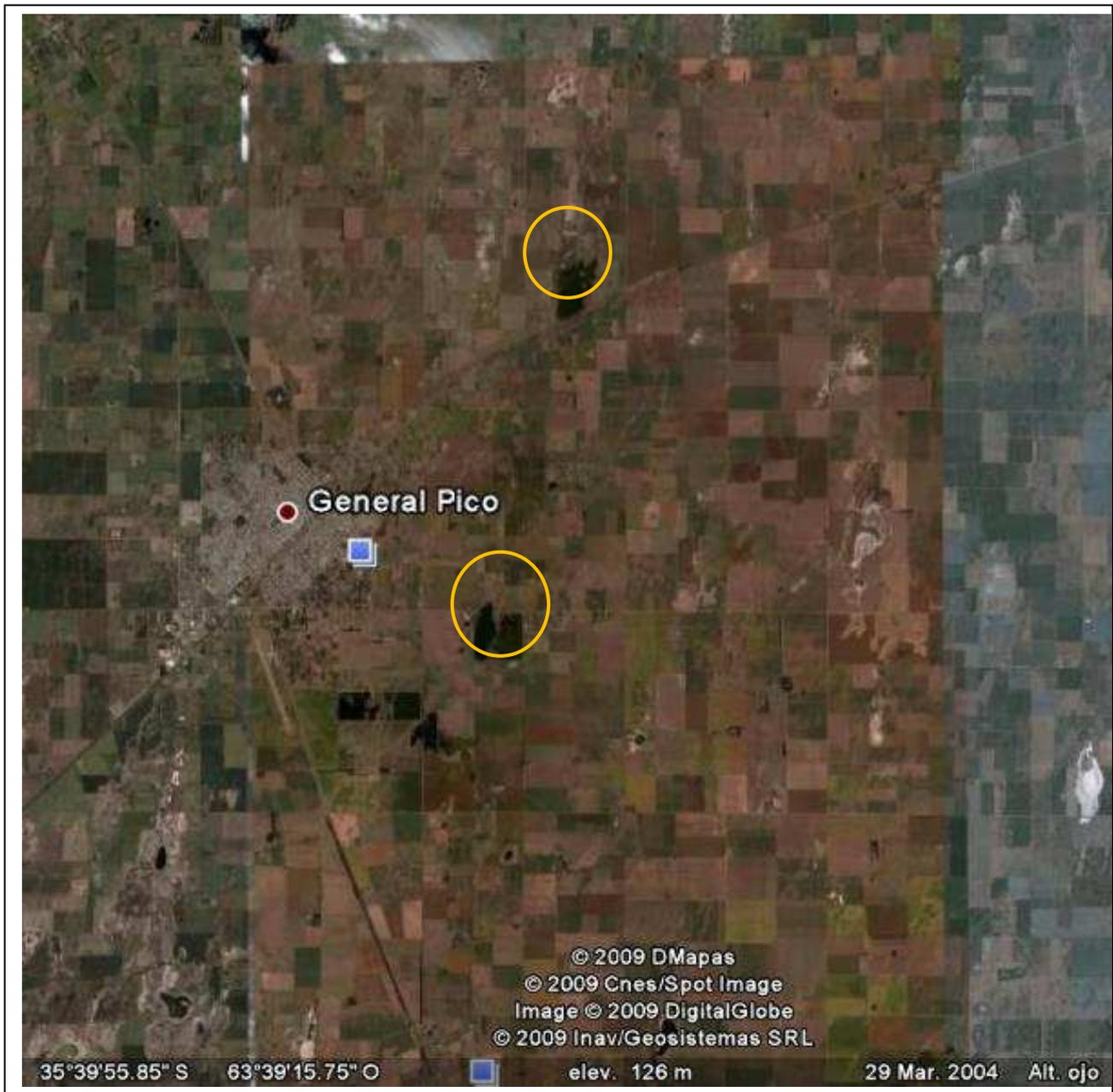
Muestra N° 9: Calle 13 esq. 104 Sitio del tanque elevado APYSU donde se realiza la cloración del agua de red para el centro de la ciudad.

Existen además en la ciudad 4 sitios donde se efectúa la cloración del agua (círculos azules en el mapa de la ciudad) ubicados en calle 7 y 120; calle 300 esq. 2; calle 33 esq. 40; calle 113 entre 28 y 30.



La ubicación del muestreo se efectuó de acuerdo al criterio establecido por la Municipalidad de General Pico y la cooperativa de electricidad y agua potable.

Los dos humedales que se muestrearan son : el ubicado en el Reciclado de Residuos Urbanos (RRU) en el Km 68 de la ruta provincial N° 1 que ocupa una superficie con agua de aproximadamente 36 hectáreas la laguna “La Arocena“ ubicada a 5 Km al sudeste de la ciudad de General Pico, la cual constituye el principal desagüe pluvial de la ciudad y ocupa 40 hectáreas de superficie .



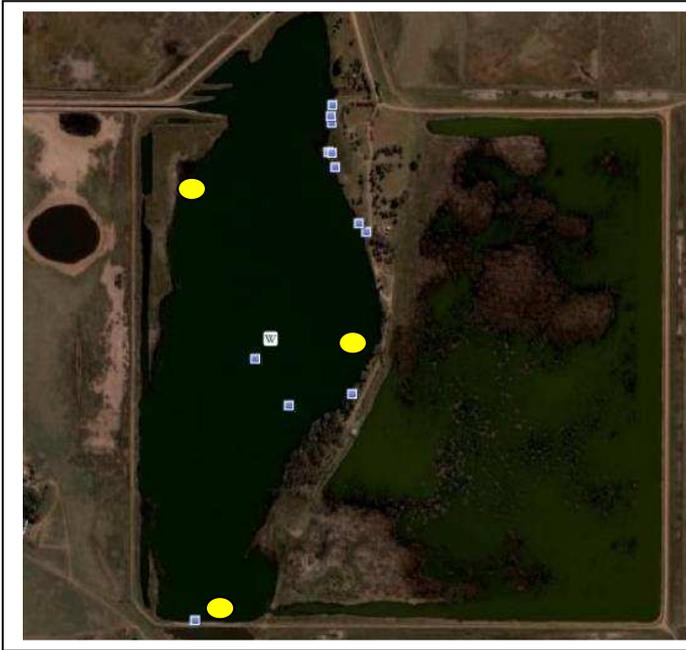


Foto satelital laguna La Arocena donde se detallan los sitios de muestreo.



Foto satelital laguna La Arocena donde se detallan los sitios de muestreo

Cada muestra de agua de red se recolecta en dos recipientes, uno de ellos contiene una concentración final de 18 mg/L de tiosulfato de sodio(  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) cantidad suficiente para neutralizar hasta 5 mg/L de cloro residual.

A cada muestra de agua se le determina el pH y la concentración de cloro libre utilizando el reactivo Aquamerck 1.11160.0001 (Merck).La determinación del pH se realizara utilizando un equipoTermo /pHmetro Modelo TPA-1 (Marca Altronix).

Se determinaran además los siguientes parámetros químicos en las aguas de red.

Parámetro	Metodología
Alcalinidad carbonatos	Test Merck art. 1.11109.0001
Alcalinidad bicarbonatos	Test Merck art. 1.11109.0001
Cloruros	Test Merck art 1.10079.0001
Sulfatos	Test Merck art 1.10019.0001
Dureza total	Test Merck art 1.08039.0001
Nitratos	Test Merck art 1.11170.0001
Nitritos	Test Merck art 1.08025.0001
Calcio	Test Merck art 1.10083.0001
Cloro residual	Test Merck art 1.11160.0001
Amonio	Test Merck art 1.11117.0001
Fluor	Método de Lamar. Zirconilo y Alizarina Roja
Arsénico	Método de Dietil Ditiocarbonato de Plata

En las muestras de agua provenientes de los humedales se determinara: presencia de micobacterias ambientales , número de bacterias totales, pH, temperatura, demanda química de oxígeno (DQO: Hach COD reactor) , demanda biológica de oxígeno (DBO: Hach, Model 205) y oxígeno disuelto (Sper Scientific 850081).

### **Siembra y decontaminación específica para micobacterias.**

#### **Muestras de aguas de humedales:**

La metodología recomendada para el procesamiento de aguas con alta carga de contaminantes se realizara el método de Leite *et al.*(1989): donde se debe filtrar ½ litro de agua por membrana de 0,45 µm, posteriormente se colocan las membranas en 5 mL de caldo cerebro corazón con perlas de vidrio a 37°C por 6 h, agitando constantemente para el desprendimiento bacteriano, transcurrido el mismo se debe decontaminar empleando partes iguales de 4% S<sub>0</sub>4H<sub>2</sub> durante 10 min, neutralizar con OHNa al 30%, centrifugar y el sedimento se resuspende con 2 mL de ADE sembrar en medios apropiados.

**Muestras de aguas de red** : se empleará el Método de Engel ( Kamala *et al.*, 1994)

Se filtran ½ litro mL de agua a través de una membrana de 0,45 o bien 0,22 µm de tamaño de poro. Después de la filtración se coloca el filtro en un recipiente con 5 mL de agua destilada estéril y 2 o 3 perlas de vidrio de 5 mm de diámetro, se coloca en un agitador mecánico durante 1 hora. posteriormente se procede a la descontaminación empleando cantidades iguales de NaOH al 1% y Lauril Sulfato de Sodio al 3% durante 10 min, incubando a 37°C, transcurrido este tiempo se trasvasa el contenido a un tubo cónico, se centrifuga a 3500 rpm 15 min, se tira el sobrenadante y se reemplaza el mismo volumen por ADE, de esta forma lava 3 veces, posteriormente se siembra en los medios apropiados.

Medios de cultivo: se emplearan los medios de Lowenstein Jensen y Stonebrink. Los mismos son elaborados en el laboratorio de Microbiología. Las muestras se siembran y se incuban a 25, 37 y 42 °C , observando el posible desarrollo durante 60 días. Donde se valorara tanto la velocidad de crecimiento así como la cromogenicidad.

A las colonias Acido alcohol resistentes se las tipificara bioquímicamente con las pruebas que se detallan a continuación:

- Producción de pigmentos:
  - Luz
  - Oscuridad
- Temperatura de crecimiento:
  - 35-37°C
  - 45°C
  - 25°C
- Crecimiento en la presencia de:
  - Hidracida del ácido 2-Tiofeno carboxílico ( TCH ) : 2mcg/mL
  - Cloruro de sodio ( NaCl ) : 5%
  - Acido p-nitrobenzoico ( PNB ) : 0.5mg/mL
  - Ácido pícrico 0.2%
  - Hidroxilamina
  - Isoniacida
- Enzimas:
  - Catalasa semi-cuatitativa
  - Nitrato reducción
  - Ureasa
  - Pirazinamidasas : 4 días
  - Fosfatasa ácida
  - Aril sulfatasa : 3 días y 14 días
  - $\beta$ -Galactosidasa
- Otras pruebas:
  - Producción de niacina
  - Toma de hierro
  - Hidrólisis de Tween 80 : 5 días y 10 días
  - Reducción de telurito : 3 días y 9 días

### **6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS**

Microbiología ambiental: Completara los resultados ya obtenidos en la provincia de La Pampa donde se conocen las especies dominantes de micobacterias ambientales en suelos.

Salud Pública: permitirá conocer si las micobacterias ambientales están presentes en las aguas de red cloradas, si los hallazgos son posibles impactará fundamentalmente en la salud humana específicamente en aquellos centros de salud donde se emplea agua de red para muchas actividades que puedan poner en riesgo la salud de los pacientes inmunocomprometidos.

### **6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES**

Mes / año

11/2009	12/2009
Seminario de pruebas bioquímicas Curso de tipificación fenotípica	Puesta a punto de la tipificación bioquímica

1/2010	2/2010	3/2010	4/2010	5/2010	6/2010	7/2010
Preparación material y medios de cultivo (PM.MC)	Recolección de muestras Siembra (RM-S)	Tipificación bioquímica (TP)	(TP)	(TP)	(PM.MC)	(RM-S)

8/2010	9/2010	10/2010	11/2010	12/2010
(TP)	(TP)	(TP)	(TP)	(TP)

1/2011	2/2011	3/2011	4/2011	5/2011	6/2011
Preparación material y medios de cultivo (PM.MC)	Recolección de muestras Siembra (RM-S)	Tipificación bioquímica(TP)	(TP)	(TP)	(PM.MC)

7/2011	8/2011	9/2011	10/2011 al 31/03/2012
Recolección de muestras Siembra (RM-S)	Tipificación bioquímica(TP)	Tipificación bioquímica(TP)	Elaboración y presentación de resultados

## **7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO**

### **7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:**

Bomba de vacío provista por laboratorio de Farmacología de esta institución.

### **7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD**

Shearkers termostático para frascos de 500 mL

Equipo de filtración con monitores

### **7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN**

**La incorporación de dos docentes investigadores de la UNS nos permitirá comenzar los ensayos ya que ellos disponen del equipamiento necesario hasta tanto contemos con los recursos económicos para adquirirlos.**

**7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN:**

Los gastos resultantes de la tipificación bioquímica serán compartidos con el laboratorio de Microbiología de la UNS donde 2 integrantes colaboran con el proyecto.

**7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual) \***

shearkers	\$12500
Equipo de filtración	\$ 7000
Monitores	\$ 500
Bienes de Consumo drogas y reactivos para cultivo y tipificación	\$ 5000
Capacitación	\$ 1000
Total .....	\$ 26000

**\* El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta las normas y criterios que el mismo determine.**

## BIBLIOGRAFÍA

Bernardelli A., Navarro N., Kantor IN de (1983). Especificidad de algunas sensitinas micobacterianas. Rev. Arg. Tub. Enf. Pulm. Sal. Publ. 44:5-10.

Centro Panamericano de Zoonosis (1980). Preparación y Estandarización de tuberculinas PPD. Nota Técnica N°17 Rev 1. Ramos Mejia , Buenos Aires. 44 p.

Cooney R., Kazda J., Quinn J., Cook B., Müller K., Monaghan M. (1997). Environmental mycobacteria in Ireland as a source of non-specific sensitisation to tuberculin. Irish Vet. Times 50:370-373.

Corner L.A. y Pearson C.W. (1978). Pathogenicity for cattle of atypical mycobacteria isolated from feral pigs and cattle and the correlation of lesions with tuberculin sensitivity. Aust. Vet. J. 54:280-286.

Chavez P.R. y Fernandez A. (1976). Sensibilidad inespecífica a la tuberculina mamífera en los bovinos en Cuba. Rev. Cub. Cienc. Vet. 7:75-82.

Chavez P.R. y Guerra A. (1981). Causas de nuevos reactores a la tuberculina mamífera en un área libre de tuberculosis bovina. Rev. Cub. Cienc. Vet. 12:107-112.

Kantor I., Bioch D., Roswurm J.D. (1978). Mycobacteria isolated from nasal secretions of tuberculin test reactor cattle. Am. J. Vet. Res. 39:1233-1234.

Oriani D.S. (2001) Micobacterias no tuberculosas aisladas de suelos de la Provincia de La Pampa, su comportamiento frente a agentes químicos y en modelos animales. Tesis de Magíster en Ciencias Agrarias. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, 162 p.

Oriani, D.S.; Sagardoy, M.A. (2002). Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa province (Argentina). Rev. Arg. Microbiol. 34:132-137.

Oriani, D.S.; Bernardelli, A.; Sagardoy, A.M. (2002). Patogenicidad de cepas de micobacterias no tuberculosas (MNT) aisladas de suelos pampeanos en modelo animal murino. XIV Reunión Científica Técnica . Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. 13,14 y 15 Nov. 2002. Modalidad Poster. Libro de resúmenes.

Weitzul S., Eichhorn P., Pandya A. (2000). Nontuberculous mycobacterial infections of the skin. Dermatol. Clin. 18:359-377.