



**TITULO: MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN EL ACUIFERO DORILA-GENERAL PICO Y EN AGUA DE LLUVIA DE LA ZONA URBANA DE GENERAL PICO LA PAMPA. PERIODO 2013-2014**

INTEGRANTES	FIRMA
ORIANI, DELIA SUSANA	
TORTONE, CLAUDIA ANDREA	
STASKEVICH, ANA SANDRA	
GINO, LILIA MABEL	
BUEY, VALERIA	
ORIANI, ALEJANDRA SOLEDAD	
GIMENEZ, MARISA ETEL	



Número de Proyecto: .....

Año: .....

(No llenar)

## UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

### Facultad de Ciencias Veterinarias

#### **1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO**

**TÍTULO del PROYECTO :** MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN EL ACUIFERO DORILA-GENERAL PICO Y EN AGUA DE LLUVIA DE LA ZONA URBANA DE GENERAL PICO LA PAMPA. PERIODO 2013-2014

#### **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**

Apellido y Nombre	Título Académico	Categ. Invest.	Responsabilidad (1)	Cátedra O Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
Oriani Delia Susana	Ms.Ciencias Agrarias	II	Director	Microbiología especial. UNLPam	Prof. Adjunto Exc	20
Tortone Claudia A	Microbiol	V	Co-Director	Microbiología Especial UNLPam	Auxiliar de 1ra Semiex	10
Staskevich Ana S	Méd. Vet	IV	Inv.	Microbiología Especial UNLPam	JTP Exc	10
Gino Lilia Mabel	Méd. Vet.	V	Inv.	Parasitología	JTP Semi Exc	2
Valeria Buey	Méd. Vet.	V	Inv.	Microbiología Especial UNLPam	Auxiliar de 1ra Simple	10
Oriani Alejandra Soledad	Bioquímica	SC	Inv.	Microbiología General. UNS	Auxiliar de 1ra Simple	4
Gimenez, Marisa Etel	Médico Veterinario	SC	Inv.	Microbiología Especial UNLPam	Auxiliar de 1ra Simple	2

(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.

--	--	--

**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: 4 años**

**3.1. FECHA de INICIO: 01/1/2013 FINALIZACIÓN: 30-12-16**

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

Es reconocido que las micobacterias ambientales (MA) son organismos ubicuos, encontrándose 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, ocasionando micobacteriosis en individuos que padecen enfermedades crónicas o con trastornos del sistema inmunológico. Trabajos de investigación realizados en muestras de agua de la ciudad de General Pico (2010-2012) permitieron demostrar que en el 43,4% del total de las muestras analizadas presentaron MA, mientras que en las aguas cloradas de red se recuperaron micobacterias en el 37,5% de las mismas. Con este proyecto se pretende: determinar la presencia de MA en el acuífero Dorila – General Pico y en muestras de agua de lluvia. Por otro lado es necesario comprender la permanencia de las MA en los sistemas de distribución de agua red para ello a cada cepa aislada se le determinara la capacidad para formar biofilm.

**4.1 Palabras claves: (de 4 a 6)**

**Ecología micobacteriana/acuífero/agua de lluvia/biofilm**

**4.2 Abstract en Inglés: (Máximo 200 palabras) Res.N° 097-CS-12.**

It is recognized that environmental mycobacteria (MA) are ubiquitous organisms, found in dust, soil and water. They are transmitted by inhalation, ingestion and inoculation. There is no evidence of direct transmission between individuals. Some species are opportunistic pathogens, causing mycobacteriosis in individuals with chronic diseases or immune system disorders. Research conducted on water samples from the city of General Pico (2010-2012) allowed to show that in 43.4% of the samples analyzed had MA, while in chlorinated water network a 37.5% of mycobacteria were recovered. This project aims to: determine the presence of MA in the aquifer Dorila - General Pico and rainwater samples. Moreover it is necessary to understand the permanence of the MA in water distribution systems network thereof, for each isolation of mycobacterium strain it will be determine the ability to form biofilm.

**4.3. Key words: (de 4 a 6)**

## **Mycobacterial ecology/ aquifer/ rainwater/ biofilm**

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

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

El género *Mycobacterium* contiene aproximadamente 131 especies incluyendo especies patógenas y saprófitas (16), las especies patógenas *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae* han acompañado a la humanidad a través de la historia, evidencia de esto, son los hallazgos de lesiones óseas de restos humanos del período neolítico, como así también las pinturas de las momias egipcias que ponen de manifiesto la formación clásica de la giba en la enfermedad de Pott. La tuberculosis (Peste blanca) afectó entonces, con mayor incidencia a aquellos sectores más desprotegidos, más humildes, que convivían con animales y pocas prácticas de higiene(29).

En la actualidad no solo *M. tuberculosis* es el responsable de la morbi-mortalidad, sino que se suman otras micobacterias, conocidas como micobacterias no tuberculosas (MNT o simplemente micobacterias ambientales (MA). Día a día se publican registros de individuos con micobacteriosis, predominando los aislamientos en pacientes que padecen fibrosis quística, cáncer, diabetes, enfermedades autoinmunes o tratamientos inmunosupresores. (12) (26).

Las últimas publicaciones nos demuestran que las MNT no respetan nivel intelectual ni social, ni inmunológico, ya que se han reportado infecciones por micobacterias ambientales como resultado de procedimientos quirúrgicos o estéticos (mesoterapia, cirugías, tatuajes, entre otros) sin una aparente causa predisponente. El tratamiento para este tipo de infecciones varía entre especies, por ello, es de vital importancia la correcta identificación de las micobacterias. Así mismo, la identificación de cada especie genera información que facilita el estudio epidemiológico de estas infecciones (6)(7)(14)(15)(17).

La mayoría de las micobacterias con excepción de las especies patógenas responsables de la lepra y la tuberculosis se han recuperado de variados hábitats suelo, agua, aire, polvo. Para entender la dinámica de la distribución de las micobacterias es necesario establecer qué tipos de ambientes contribuyen a su multiplicación y o a la propagación de las micobacterias.(1)

La característica estructural más importante de las micobacterias es el alto contenido de lípidos en su pared. Los lípidos son los responsables de la patogenicidad y del lento tiempo de generación que presentan tanto en el organismo que infectan como in vitro. Esta hidrofobicidad le permite a las MA en el medio ambiente atraer nutrientes y pequeños compuestos orgánicos, adherirse a superficies, pudiendo ser considerados los pioneros en la formación de biofilm. Es reconocido además que las bacterias hidrofóbicas en los medios acuosos tienden a desarrollarse en la interfase y esta característica les permite ser aerosolizadas más rápidamente, siendo los aerosoles el mejor mecanismo de "delivery" para que las micobacterias accedan al pulmón. La hidrofobicidad le otorga además resistencia a los biocidas entre ellos al cloro constituyéndose así el agua de red en un problema para la salud pública. (10)(12).

Se ha establecido que las micobacterias colonizan ciertos nichos que le proveen las condiciones adecuadas para su multiplicación tanto sea limitando o excluyendo a otros microorganismos que resultan competitivos para las micobacterias debido a que estas presentar un tiempo de generación prolongado (Tg) respecto a otros microorganismos como son las enterobacterias (Tg de *E. coli* es de 20 min versus 4,6 h para *M. fortuitum*. .

Es reconocido también que ejemplares de otros reinos como los musgos, que proveen humedad y pH bajo, ciertos hongos como *Penicillium* que inhiben microbiota bacteriana o protozoarios (amebas que albergan micobacterias) favorecen la persistencia (21).

Además de los factores bióticos que describimos también ciertos factores abióticos influyen en el mantenimiento de las micobacterias en el medio ambiente. El conjunto de condiciones físicas y químicas en una zona determinada, constituyen habitats propicios que albergan condiciones favorables para la multiplicación y la longevidad de las micobacterias. Respecto a la temperatura, son todos mesófilos aunque existen algunas especies que logran sobrevivir a temperaturas superiores de 37°C tales como *M. avium* sub especie *paratuberculosis*, resiste 72°C por 15 segundos, *M. avium*, *M. scrofulaceum* *M. kansasii* y *M. xenopi* se los aísla de sistema de agua caliente (52-57 °C) (28) .

Respecto a la concentración de O<sub>2</sub>, describimos a la micobacterias como microorganismos aeróbicos cuyas necesidades de O<sub>2</sub> varían entre el 12 y el 21%. En el agua y en los suelos los niveles de O<sub>2</sub> suelen ser inferiores al 6%. Sin embargo es posible recuperar micobacterias de estos ambientes con menor concentración de O<sub>2</sub>, evidencia de ello es que está comprobado que los agentes del complejo tuberculosis pueden resistir episodios de anaerobiosis, adaptándose a la ausencia de O<sub>2</sub> en el centro de la característica lesión tuberculosa (granuloma), permaneciendo latentes o en estado de dormancia (11).

El pH es uno de los factores limitantes en el medio ambiente. Las micobacterias saprofitas pueden desarrollarse en un amplio rango de pH que oscila entre 3 y 10; a medida que estas especies se comportan como patógenos oportunistas u obligados disminuye el rango de pH en el que pueden desarrollarse. Por ej. *M. smegmatis* (pH 3,5 a 9,5); *M. avium* (4 y 7,5); *M. kansasii* (5 y 7,5); *M. tuberculosis* (6 y 6,5) (20) (25).

Entre los posibles habitats estudiados de las micobacterias se encuentra 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<sup>-1</sup> de suelo seco, mientras que suelos de sudeste de los Estados Unidos de Norteamérica, presentan entre 40 y 350 ufc g<sup>-1</sup> de suelo, en los estudios realizados en nuestro país en suelos de la provincia de La Pampa y de la provincia de Misiones, arrojaron un promedio de 763 ufc g<sup>-1</sup> de suelo en los suelos pampeanos que presentaron rango de pH entre 6,5 y 9,5. En estos suelos se recuperaron MA en el 67% de los mismos, mientras que en los suelos lateríticos de la provincia de Misiones la recuperación de MA fue del 87,5 %, presentando estos suelos un rango de pH entre 5,0 y 6,2 (21). Es posible que el pH ácido de los suelos estudiados en Finlandia y Misiones facilite el crecimiento y supervivencia de las MNT tal como fue demostrado por Brooks *et al.*, 1984 en USA (3).

Con respecto al agua como hábitat de las MA, trabajos realizados en Estados Unidos demuestran que el 38% de las muestras de agua analizadas de los sistemas de distribución de agua potable contenían micobacterias desde 1 a 50 UFC L<sup>-1</sup> en los sitios cercanos a la cloración del agua, mientras que en los más alejados la concentración de MA llegaba hasta  $1,4 \times 10^6$  UFC L<sup>-1</sup>. En países como Grecia, Francia y Finlandia se han recuperado MA de los sistemas de agua potable en los siguientes porcentajes 21%, 72% y 35% al 80% respectivamente. En general *M. gordonae* es la especie más frecuentemente aislada de aguas, seguida de *M. kansasii*, *M. fortuitum*, complejo MAC, *M. chelonae*, *M. xenopi* (7).

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  $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  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  $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cloro libre. (8)(10).

En nuestro país se han realizado estudios preliminares en la ciudad de Bahía Blanca, Bs. As., de 32 muestras de agua de red analizadas, se recuperaron MA en el 56,25%, siendo algunas de las especies identificadas *Mycobacterium scrofulaceum*, *M. vaccae*, *M. flavescens*, y *M. gordonae* (19). En la ciudad de General Pico se aislaron MA en el 37,7 % de las 32 muestras de agua de red estudiadas, recuperándose *M. gordonae* en muestras con 0,8 mg/L de cloro residual libre. Los grupos de especies más frecuentemente aislados fueron grupo *M. vaccae*, *M. simiae* (2).

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. En la ciudad de Gral Pico se recuperaron MA en el 63,6% de las muestras de agua red y recreacionales se positivas en época estival y 36,3% en la invernal (23) (24).

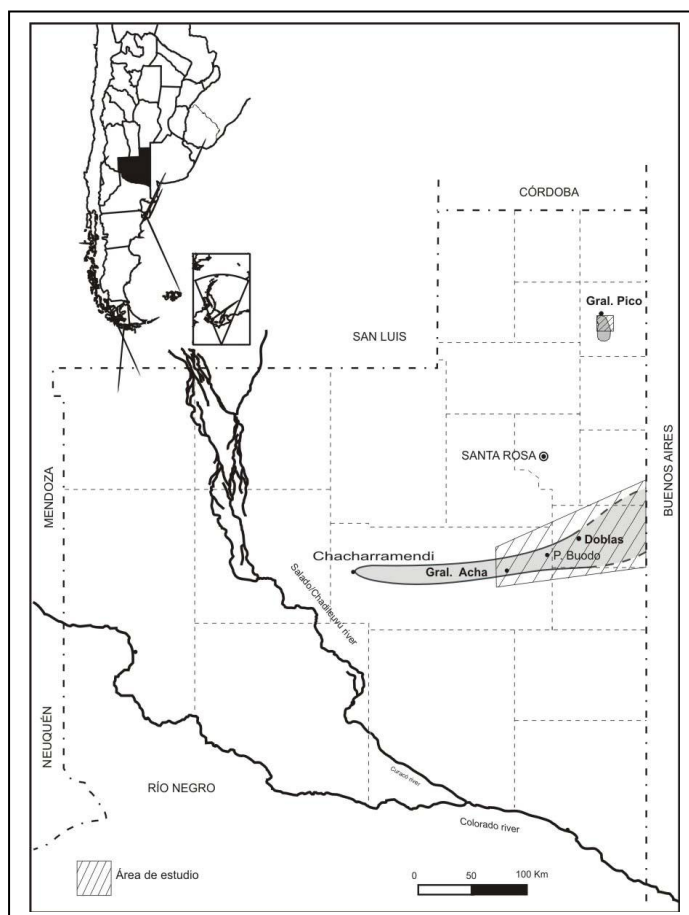
Desde los orígenes de las civilizaciones el abastecimiento de agua determino los asentamientos humanos en todos los territorios, las personas se establecían en orillas de ríos, lagos o lagunas. Para la provincia de La Pampa el agua subterránea es de vital importancia para la población y sus actividades productivas, debido a que carece de cursos de agua superficial en la mayor parte de su territorio. La primera referencia al uso de agua subterránea en el país y en particular al acuífero freático pampeano data de 1788 cuando, por repetidas sequias que produjeron la mortandad de animales, el Cabildo de Buenos Aires obligó a los hacendados a realizar aguadas artificiales. (2)

En la actualidad en nuestra zona de influencia, el acuífero Dorila –General Pico abastece el suministro de agua tanto en la zona urbana como rural. El área del acuífero es de aproximadamente 80 km<sup>2</sup>, con parámetros de buena calidad hasta una profundidad aproximada de 25 metros. Su explotación se realiza mediante 60 pozos de bombeo, que extraen un caudal promedio de 9 m<sup>3</sup> cada uno. El agua captada se transporta, mediante un acueducto principal y ramales secundarios, desde la zona de Dorila hasta una cisterna subterránea de 2000 m<sup>3</sup> de capacidad, ubicada en el predio de APySU (Agua potable y Saneamiento Urbano) situado en calles 13 y 104 de nuestra ciudad.

La calidad de agua bombeada depende de las estaciones del año ya que se determinó que en la estación estival donde el consumo de agua es máximo aumentan las concentraciones de flúor y arsénico. La "recarga" del acuífero se produce cuando una parte de las precipitaciones alcanzan la napa freática, mediante un proceso denominado infiltración. Ésta, consiste en un movimiento predominantemente descendente del agua de lluvia a través de los intersticios, tales como poros y fracturas, hasta llegar al nivel del acuífero.

Otro factor importante en la variación de la composición química y biológica del mismo es la ubicación de las lagunas de oxidación de los efluentes cloacales, especialmente en la época de lluvias donde se produce el desborde de dichas lagunas y la consiguiente recarga del acuífero. Esta situación se contrarresta en parte al estar el acuífero ubicado

debajo de una cobertura arenosa que genera condiciones favorables para la infiltración (22).



**Mapa 1: principales acuíferos de la provincia de La Pampa.**

**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.; BERNARDE.LLI, 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.

**BALDINI, M.; GENTILI, A.; HUERTA, Y.; ORIANI, A.; DEL PUNTA, M.; ORIANI, D.S** (2012)MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN AGUAS DE BEBIDA. ISBN: 978-3-8484-7722-7. 62 pag. Ed. A. E LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG

**ORIANI DS., STASKEVICH, A S; TORTONE, CA; BUEY, V; GINO, L M; ORIANI, A S, GIMENEZ, M.** (2012) **Diversidad de micobacterias Ambientales recuperadas de muestras de agua obtenidas en General Pico, La Pampa.** Jornadas de Ciencia y Técnica 2012. UNLPam General Pico.Libro de resúmenes Proyectar y comunicar: Estrategias para ñla investigación en la UNLPam 1°ed. ISBN: 978-950-863-178-7

**TORTONE C. A, ZUMÁRRAGA M., A. GIOFFRÉ, A., ORIANI D. S (2012) Identificación de micobacterias ambientales provenientes de muestras de agua. XIX REUNIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA AAVLD 7, 8, 9 de noviembre 2012.**

**ORIANI, D.S; STASKEVICH, AS; TORTONE, C.A; BUEYV.G; GIMENEZ' M.E.; GINO, L. (2012). El agua como hábitat de micobacterias ambientales: aislamiento en agua de red y recreacionales. XIX REUNIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA AAVLD 7, 8, 9 de noviembre 2012.**

**ORIANI, D. S.; DUBARRY, J. R. ERREA, A. L. VERA, O. A.; MARIA, A. E. ; CAVAGIÓN, L. J. ; STASKEVICH, A. S. ; TORTONE, C. ; BUEY, V. ; DOS SANTOS SISMEIRO, M. I. ; MASCARO, D.E. ; BERNARDELLI, A. (2011) Asociación entre el diagnóstico de la tuberculosis bovina por intradermorreacción, la anatomopatología, la bacteriología y la posible interferencia con micobacterias ambientales CIENCIA VETERINARIA Vol. 13 N°1 Pag. 42-47 ISSN:15151883**

### **5.3. 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

- **MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN DISTINTAS FUENTES DE AGUA.**

Oriani, S. Baldini,M.; Staskevich, A.; Tortone, C.; Buey, A.; Gino, L.; Oriani, A.

Fecha de inicio:01-11-09 Finalización: 31-12-12

Resolución de aprobación: Res. 223/09 CD

- **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**

Las MA están ampliamente distribuidas en suelos, aguas, alimentos y polvo. Algunas de ellas son consideradas como patógenos emergentes en el hombre y en menor proporción de animales. Trabajos anteriores nos han permitido demostrar la presencia de MA tanto en suelo como las distintas fuentes de aguas. Muchas de las especies aisladas pueden subsistir en los sistemas de distribución de agua potable debido a la capacidad de colonizar la interfase sólido-agua y producir biofilm. Está comprobado la habilidad de las micobacterias para resistir al cloro tanto en estado plactonico como en comunidades como es el caso del biofilm. A partir de estos antecedentes formulamos las siguientes hipótesis

#### **HIPÓTESIS**

**La presencia de las MA en agua de red obedece al ciclo atmosfera-lluvia-infiltración-acuífero.**

**La permanencia de las MA en el sistema de distribución de agua potable obedece a la capacidad que presentan las mismas en formar biofilm.**

#### **OBJETIVOS**

- 1.- Determinar la presencia de micobacterias ambientales en agua del acuífero Dorila- General Pico.
- 2.- Determinar la presencia de micobacterias ambientales en la atmósfera, utilizando agua de lluvia.
- 3.- Establecer la capacidad para formar biofilm en las cepas de MA aisladas.

#### **RESULTADOS ESPERADOS.**

Podremos determinar si el cloro es un factor de presión de selección en la variabilidad de la población micobacteriana al comparar los aislamientos del acuífero y los de agua de red ya determinados en el periodo 2010-2012.

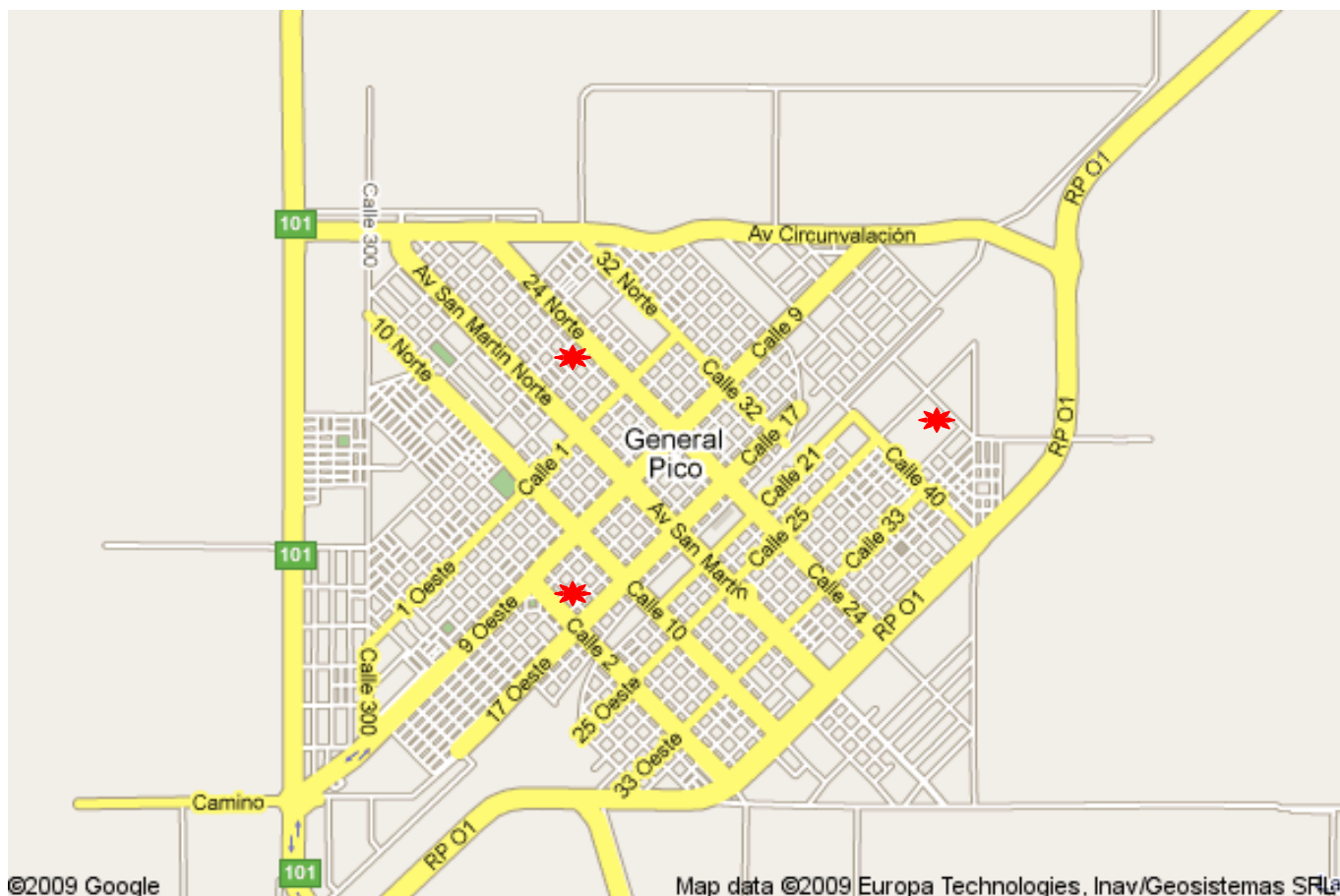
Al comparar los posibles aislamientos de MA entre la atmósfera y el acuífero podremos determinar el porcentaje de la biota micobacteriana atmosférica que se transfiere al acuífero.

## **6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS**

### **Agua de Lluvia:**

El muestreo de agua de lluvia estará condicionado a las condiciones climatológicas estimándose entre uno y dos episodios de lluvia en cada estación del año. Se

recolectaran en tres sitios de la ciudad de General Pico (puntos rojos en el mapa). Las muestras se recolectaran en pluviómetros estériles.



### **Muestreo del acuífero y cisterna de almacenamiento**

Se recogerán dos muestras de agua en cada estación del año de 4 pozos de bobeo y de la cisterna principal.

### **SIEMBRA Y DECONTAMINACIÓN ESPECÍFICA PARA MICOBACTERIAS.**

**Muestras de acuífero y de lluvia** : se empleará el Método de Engel

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, Herrold con micobactina 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 (5)(13)(16)(18).

A las cepas predominates se les probara la capacidad para formar biofilms (4).

### **Evaluación *in vitro* de la capacidad de formar biofilms**

**Técnica en microplacas :** Preparación del inóculo: luego de evaluar su pureza, las cepas seleccionadas se sembrarán en Middlebrook 7H9 y se incubarán durante 7 días a 30 °C. Estos caldos se centrifugarán, se lavarán con buffer salino y se resuspenderán en buffer hasta alcanzar una turbiedad de 0,5 según la escala de McFarland. Se sembrarán 200 µl de esta suspensión en policubetas estériles de PVC de 96 pocillos. Se incubarán a temperatura ambiente por 21 días. Para medir la formación del biofilm se eliminará el sobrenadante de los pocillos y se agregará una solución al 1 % de cristal violeta. Luego de incubar 15 minutos a temperatura ambiente, se enjuagarán vigorosamente cuatro veces con agua y se secarán sobre papel secante. El colorante incorporado al biofilm se disolverá con etanol al 95% Para la cuantificación se utilizará un lector de microplacas. La lectura se realizará a 570 nm.(4)

### **Métodos microscópicos para evaluar la formación de biofilms**

Para el seguimiento de la evolución del biofilm se utilizará microscopía de epifluorescencia y/o Laser confocal. La experiencia se realizará colocando cuadrados de poliestireno (5 x 5 mm) en el fondo de los pocillos de policubetas (6x4 pocillos). Para la preparación del inóculo se seguirá el mismo protocolo descrito anteriormente. En los días 7, 15 y 21, se retirará el medio de incubación y los trozos de poliestireno se teñirán con un fluoróforo para evaluar la viabilidad de las células. Los fragmentos teñidos se analizarán con microscopías de epifluorecencia y Laser confocal de barrido (4)(9)

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

Los resultados obtenidos colaboraran en la comprensión de la ecología micobacteriana.

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

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	2013		2014		2015		2016	
	1º semestre	2º semestre	1º semestre	2º semestre	1º semestre	2º semestre	1º semestre	2º semestre
MUESTREO								
TIPIFICACION								
BIOFILM								
TRATAMIENTO DE RESULTADOS Y PUBLICACION								

## **7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO**

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

El proyecto se desarrollara en el laboratorio de microbiología de la cátedra.

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

Las fotografías electrónicas y el microscopio confocal se utilizará el que se encuentra en las instalaciones de la UNS.

Es necesario adquirir 3 pluviómetros, equipo de filtración, estufa de cultivo y centrifuga.

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

Nuestra institución no cuenta con microscopia confocal ni electrónica, por lo que realizaremos las experiencias en el departamento de biología de la UNS, al cual pertenece uno de los integrantes del proyecto.

### **7.3. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN: SECRETARIA DE CIENCIA Y TECNICA.**

### **7.4. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual)**

\*

	\$
Equipo de filtración	<b>2000</b>
ESTUFA DE CULTIVO	<b>6000</b>
CENTRIFUGA	<b>7000</b>
Bienes de Consumo drogas y reactivos para cultivo y tipificación	<b>7000</b>
Fotografías electrónicas	<b>2000</b>
Total	<b>24000</b>

**7.5\* 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**

1-Atlas, R.M., Bartha, R. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. 4 Ed. Addison Wesley.

2-Atlas ambiental de Bs. As. <http://www.atlasambientalde buenosaires.gov.ar>

- 3-Brooks RW, Parker BC, Gruft H and Falkinham III JO (1984). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130:630-633.
- 4-Carter G, Wu M, Drummond DC, Bermudez LE (2003). Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *J. Med. Microbiol.* 52:747–752.
- 5-Comisión Científica de Micobacterias. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. (2005). Manual de Diagnóstico de Micobacterias de importancia en Medicina Veterinaria 1°Ed. Santa Fe (Argentina)
- 6-Cooksey RC, de Waard JH, Yakrus MA, Rivera I, Chopite M, Toney SR, Morlock GP, Butler WR. (2004). *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(6):2385-2391.
- 7-Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL and Stelma GN Jr. (1999) .Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*; 65:2492–2496.
- 8-Dailloux M., Laurain C., Weber M. y Hartemann P.H. (1999). Water and nontuberculous mycobacteria. *Wat.Res.* 33:2219-2228.
- 9-Esteban J, Martín de Hijas NZ, Kinnari TJ, Ayala G, Fernández Roblas R, Gadea I (2008). Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiol.* 8: 2180-2188.
- 10- Falkinham, JO III, Norton C.D. and Le Chevallier MW.( 2001) Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol*; 67:1225–1231.
- 11-Falkinham, JO,III.; Nichols, G.; Bartram, J.; Dufour, A.; Portaels, F. ( 2004) World Health Organization. Pathogenic *Mycobacterium* in Water. IWA Pub, London, UK
- 12-Falkinham,JO,III. (2009). Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal Appl Microbiol*; 107: 356–367.
- 13- Fernández de Vega F., Moreno J., Martín González J. y Palacios Gutiérrez JJ. (2005). 9ª Micobacterias. en: Cercenado E. y Cantón R. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia>
- 14-García L M, Garzón MC, Orjuela DL, Mejía G, Llerena, C. (2010). Micobacterias no tuberculosas asociadas a procedimientos de mesoterapia en Colombia, 2004-2007. *Infection* 14 (2): 93-96.
- 15-García-Navarro X, Barnadas MA, Dalmau J, Coll P, Gurquí M, Alomar A (2008). *Mycobacterium abscessus* infection secondary to mesotherapy *Clin Exp Dermatol*; 33(5):658-9.
- 16-Goodfellow, M.; Kämpfer, P.; Busse, H.; Trujillo, M.; Suzuki, K.; Ludwig, W.; Whitman, W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition. Volume five. The Actinobacteria . Part A. Magee, J. and Ward, A. . 2012

- 17-Herreros FO, Velho PE, De Moraes AM, Cintra ML. (2009). Cutaneous atypical mycobacteriosis after ultrasound hydrolypoclasia treatment. *Dermatol Surg*; 35(1):158-60.
- 18-Holt J.K., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. y Williams S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*: 597-603.-9<sup>a</sup> ed. International edition. Maryland, USA.
- 19-Huerta Y, Oriani A, Baldini M.( 2009). Aislamiento e identificación de micobacterias ambientales en agua de red. Estudio preliminar. *REIE*; 4: 11-13.
- 20-Kazda JF (1983). The principles of the ecology of mycobacteria. En: *The Biology of Mycobacteria*. C. Ratledge and J. Stanford (Eds.), Academic Press, London, Vol 2:323-341.
- 21-Kazda J, Pavlik I, Falkinham III JO, Hruska K. (2009). *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- 22- Mariño, E.; Schulz, C | *Huellas* n° 12 (2008)
- 23-Oriani, D.S; Tortone A.C.; Buey, V.G.; Staskevich, A.S.; Oriani, A.S.; Baldini, M.D.; Cobo, M.; Gino, L.M. ( 2011). Aislamiento de Micobacterias en humedales de General Pico La Pampa en dos estaciones del año (verano e invierno). XIV Jornadas Argentinas de Microbiología . III Jornadas de Microbiología e Infectología del NEA.
- 24 Oriani, D.S; Staskevich, AS; Tortone, C.A; BueyV.G; Gimenez M.E.; Gino, L. (2012). El agua como hábitat de micobacterias ambientales: aislamiento en agua de red y recreacionales. XIX REUNIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA AAVLD 7, 8, 9 de noviembre 2012.
- 25-Pfyffer G.E.,Brown-Elliott B.A. y Wallace R.J.Jr. (2003). *Mycobacterium: general characteristics, isolation and staining procedures*. En: Murray P., Baron E., Jorgensen J., Pfaller M. and Tenover F.C. (ed.), *Manual of clinical microbiology*. 8<sup>a</sup> ed. ASM Press, Washington, D.C. 532-559
- 26-Primm, T.P., Lucero, C.A., Falkinham III, J.O. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 98–106.
- 27- Tortone A.C.; Oriani, D.S; Buey, V.G.; Staskevich, A.S.; Oriani, A.S.; Baldini, M.D.; Cobo, M.; Gino, L.M. ( 2011).Aislamiento de Micobacterias no tuberculosas en agua de red de General Pico La Pampa.. XIV Jornadas Argentinas de Microbiología . III Jornadas de Microbiología e Infectología del NEA.
- 28-Vaerewijck, M.; Geert Huys, Palomino, J.; Swings, J.; Portaels, F. (2005). Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews* , 29- 911: 934
- 29-Waksman, Selman (1964). *La conquista de la Tuberculosis*. Ed. Sudamericana.