

A photograph of a petri dish containing a bacterial culture on a dark, agar-based medium. The culture shows several distinct, radiating streaks of growth, with numerous small, dark, circular colonies scattered across the surface. The petri dish is held by a person wearing blue nitrile gloves. The background is a metallic, reflective surface.

**Colecciones microbianas vinculadas a sanidad animal  
en la Red de Recursos genéticos (REDGEN) de  
Argentina.**

**Compiladores:**

**Veronica Neder**

**Romanella Marcelino**

**Alejandro Peticari**

Año 2024

## Índice

### Prologo

Mapa 3

Colección EEA Anguil 5

Colección EEA Balcarce, Lab. de Bacteriología 21

Colección EEA Balcarce, Lab. de Toxicología 32

Colección EEA Balcarce, Lab. de Virología 38

Colección EEA Bariloche 54

Colección EEA Concepción del Uruguay 63

Colección EEA Corrientes 70

Colección EEA Rafaela 82

Colección Instituto de Patobiología, Hurlingham 94

Colección Instituto de Virología, Hurlingham 102

Transporte de cultivos microbianos 107

El Protocolo de Nagoya y sus implicancias en los RR. GG. vinculados a Sanidad Animal.  
Construcción de Acuerdos de Transferencia de Materiales Conservados en los RR. GG.  
Microbianos..... 115.

## Prólogo

La Red de Recursos Genéticos (REDGEN) fue creada a fines de 2014 por decisión institucional con la finalidad de converger en un solo ámbito todas las capacidades de conservación de los recursos genéticos (RR. GG.) del INTA, para normalizar protocolos, evitando la pérdida de materiales y adecuar lo conservado a la normativa vigente. Como así también colaborar desde el INTA en un marco que conduzca a un Sistema Nacional de Preservación de Recursos Genéticos. Si bien en el instituto se dispone de un alto porcentaje de los recursos genéticos vinculados a la Alimentación y la Agricultura, hay otras instituciones nacionales que los preservan. Además, otra actividad vinculada a la REDGEN es participar como referentes o colaborar, según el caso y pertinencia, en los foros nacionales e internacionales donde este tema sea relevante dada la adhesión de Argentina al Convenio de la Diversidad Biológica (CBD), al Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (TIRFAA) y al Protocolo de Nagoya. En esa decisión de 2014 se creó una red general de RR. GG. con tres subredes: Fitogenéticos, Zoogenéticos y Microbianos con sus respectivos coordinadores. En 2018, culminan los proyectos y programas nacionales y a fines de 2019 se crea el Programa Nacional de Recursos Genéticos y Mejoramiento, y dentro de él una red con un solo coordinador que engloba cuatro subredes: Fitogenéticos, Zoogenéticos, Microbianos y Forestales. Dentro de lo específico de la Red de Recursos Genéticos Microbianos, por cuestiones de afinidad, se lo separó en tres grupos temáticos de referencia Sanidad Vegetal, Agroindustria y Sanidad Animal. En el último, se encuadran más del 50 % de los RR. GG. Microbianos conservados en el INTA. El objetivo del presente trabajo es mostrar las colecciones de cultivos microbianos presentes en sanidad animal.

Los conceptos aquí vertidos quedan bajo la responsabilidad de los autores.



Mapa de EEA y centros que conforman la RED GEN Microbianos.

Colección EEA Anguil

Responsable/Curadora: Lic. en Ciencias Biológicas, Valeria Natalia Baldone; *e-mail*: baldone.valeria@inta.gob.ar

Colaboradores: Dra. Lumila Ivana Fuchs, Dra. María del Carmen Rojas, Dr. Ariel Omar Miranda y MV MSc Luis Rhades.

### **PALABRAS CLAVE**

La Pampa, bovinos, bacterias, *Trichomonas* sp., material genético

### **UBICACIÓN**

La colección se encuentra en el Laboratorio de Sanidad Animal, perteneciente al Grupo de Producción, Mejoramiento y Sanidad Animal de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA Anguil “Ing. Agr. Guillermo Covas” (Figuras 1 y 2). Se encuentra ubicado en la ruta 5, km 580 en la localidad de Anguil, provincia de La Pampa.

El Laboratorio de Sanidad Animal cuenta con una trayectoria de más de dos décadas trabajando en enfermedades que afectan la reproducción, puntualmente en lo que se refiere a enfermedades venéreas, metabólicas y carenciales. Desde sus comienzos, utilizando técnicas tradicionales de diagnóstico, hasta la actualidad con el desarrollo de técnicas moleculares. Esto le ha permitido ser parte fundamental en la toma de decisiones sobre políticas sanitarias y productivas, hoy no solo llevadas a cabo en el ámbito provincial, sino también transferidas como modelo para otras provincias.



Figura 1: Estación Experimental Agropecuaria Anguil (La Pampa)



Figura 2: Equipo de trabajo del Laboratorio de Sanidad Animal

## COLECCIÓN

La colección de la EEA Anguil está constituida por cepas y material genético para la producción, la investigación y el desarrollo de vacunas, así como material de referencia para el control de calidad de técnicas de diagnóstico y evaluación de medios de cultivo.

Nuestra colección cuenta con diferentes géneros y especies bacterianas y protozoarios. Patógenos de enfermedades venéreas y enfermedades infecciosas en su mayoría de bovinos, también encontramos *Brucella ovis* pertenecientes a ovinos y *Brucella suis* obtenida

de la liebre europea (*Lepus europaeus*) y ovinos sumando un total de 442 ítems, provenientes tanto de la región pampeana como de otras zonas de Argentina.

En el siguiente cuadro se pueden observar los diferentes ítems conservados, la forma de preservación, el origen y los usos de los mismos (Tabla 1).

Tabla 1: Descripción de los ítems del Laboratorio de Sanidad Animal

Item	Cant.	Tipo	Hospedador	Cons.	Origen	Usos
<i>C. fetus fetus</i>	5	Bacteria ADN	Bovino	N 2 Líquido -20 °C	Casos de diagnóstico Tesis de doctorado Ensayos experimentales	Servicios a terceros Inmunógenos vacunales Control de medios de cultivo Técnicas de diagnóstico
<i>C. fetus venerealis</i>	10	Bacteria ADN	Bovino	N 2 Líquido -20 °C	Casos de diagnóstico Tesis de doctorado Ensayos experimentales	Servicios a terceros Inmunógenos vacunales Control de medios de cultivo Técnicas de diagnóstico Estudio de la variabilidad
<i>C. fetus venerealis</i> biovar <i>intermedius</i>	40	Bacteria ADN	Bovino	N2 Líquido -20 °C	Casos de diagnóstico Tesis de doctorado Ensayos experimentales	Servicios a terceros Inmunógenos vacunales Control de medios de cultivo Técnicas de diagnóstico Estudio de la variabilidad
<i>C. sputorum</i>	3	Bacteria ADN	Bovino	N 2 Líquido -20 °C	Tesis de doctorado	Control de medios de cultivo Técnicas de diagnóstico
<i>C. hyointestinalis</i>	2	Bacteria	Bovino		Trabajos de investigación	Control de medios de cultivo

		ADN			Convenios	Técnicas de diagnóstico
<i>Acanthamoeba</i> sp	6	Bacteria ADN	Vida libre Humanos	N2 Líquido -20 °C	Tesis de doctorado	Servicios a terceros Técnicas de diagnóstico
<i>A. jacobasi</i>	1	Bacteria ADN	Bovino	N 2 Líquido -20 °C	Tesis de doctorado	Servicios a terceros Técnicas de diagnóstico
<i>Neochlamydia</i> sp	1	ADN	Dentro de Achanthamoeba	N2 Líquido -20 °C	Trabajos de investigación	Investigación
<i>B. abortus</i>	8	Bacteria	Bovino	N2 líquido	Casos de diagnóstico	Servicios a terceros Técnicas de diagnóstico
<i>B. ovis</i>	3	Bacteria	Ovino	N2 líquido	Casos de diagnóstico	Servicios a terceros Técnicas de diagnóstico
<i>B. suis</i> biotipo 1	5	Bacteria	Liebre europea	N2 líquido	Casos de diagnóstico Tesis de doctorado Tesina de grado	Control de medios de cultivo Servicios a terceros Técnicas de diagnóstico
<i>E. coli</i> O157:H7	73	Bacteria ADN	Bovino	N 2 Líquido -20°C	Tesis de maestria	Control de medios de cultivo Investigación Técnicas de diagnóstico
<i>T. foetus</i>	260	Protozoo ADN	Bovino	N2 líquido	Casos de diagnóstico Pceev	Servicios a terceros Inmunógenos vacunales Control de medios de cultivo Técnicas de diagnóstico Resistencia a antibióticos Estudio de la variabilidad
trichomónidos	17	Protozoo	Bovino	N 2 líquido	De otro laboratorio	Resistencia a antibióticos



		ADN		-20 °C		Estudio de la variabilidad
<i>Leptospira</i> sp	1	ADN	Bovino	-20 °C	De otro laboratorio	Técnicas de diagnóstico
<i>N. caninum</i>	1	ADN	Bovino	-20 °C	De otro laboratorio	Técnicas de diagnóstico
<i>L. monocytigenes</i>	1	ADN	Bovino	-20 °C	De otro laboratorio	Técnicas de diagnóstico
<i>M. bovis</i>	1	ADN	Bovino	-20 °C	De otro laboratorio	Técnicas de diagnóstico
<i>U. diversum</i>	1	ADN	Bovino	-20 °C	De otro laboratorio	Técnicas de diagnóstico
<i>Pi3</i>	1	ADN	Bovino	-20 °C	De otro laboratorio	Técnicas de diagnóstico
<i>VSRB</i>	1	ADN	Bovino	-20 °C	De otro laboratorio	Técnicas de diagnóstico
<i>DVB</i>	1	ADN	Bovino	-20 °C	De otro laboratorio	Técnicas de diagnóstico
<i>IBR</i>	1	ADN	Bovino	-20 °C	De otro laboratorio	Técnicas de diagnóstico
<i>M. haemolytica</i>	1	ADN	Bovino	-20 °C	De otro laboratorio	Técnicas de diagnóstico
<i>P. multocida</i>	1	ADN	Bovino	-20 °C	De otro laboratorio	Técnicas de diagnóstico
<i>M. hypneumoniae</i>	1	ADN	Bovino	-20 °C	De otro laboratorio	Técnicas de diagnóstico

**Cant.:** cantidad, **Cons.:** conservación, **C:** *Campylobacter*, **A. jacobasi:** *Acanthamoeba jacobasi*, **B:** *Brucella*, **E:** *Escherichia*, **T:** *Tritrichomonas*, **N:** *Neospora*, **L:** *Listeria*, **M bovis:** *Mycoplasma bovis*, **U:** *Ureaplasma*, **M. haemolitica:** *Manhemia haemolytica*, **P:** *Pasteurella*, **M. hypneumoniae:** *Mycoplasma hypneumoniae*, **PCEEV:** Programa de Control y Erradicación de Enfermedades Venéreas.

### CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

La caracterización fenotípica se realiza mediante métodos convencionales en tubos y placas. Como medio no selectivo para el aislamiento de bacterias se utiliza agar sangre base, agar nutritivo y caldo nutritivo. Para seleccionar el crecimiento de una especie o grupo determinado se utilizan medios como agar Shepler, agar Skirrow, agar MacConkey con sorbitol, agar Brucella, agar no nutritivo con solución de Page, entre otros, incubándolos en sus atmósferas correspondientes (Figura 3).

Para determinar especies de trichomónidos se realiza un examen directo en cultivo, utilizando el caldo infusión de hígado (Figuras 4 y 5).



Figura 3: Cultivo de *Campylobacter fetus* en placa de agar Skirrow

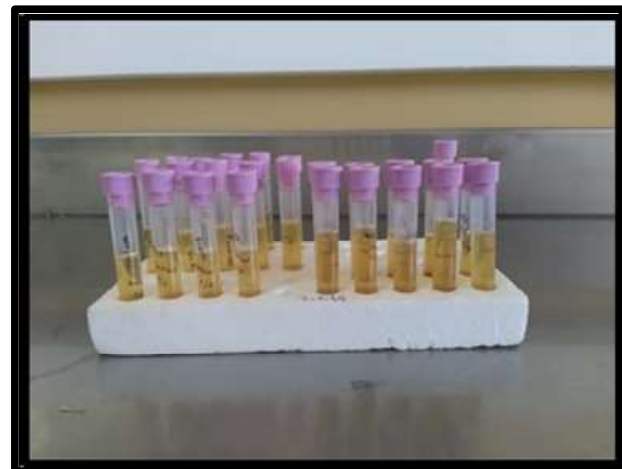
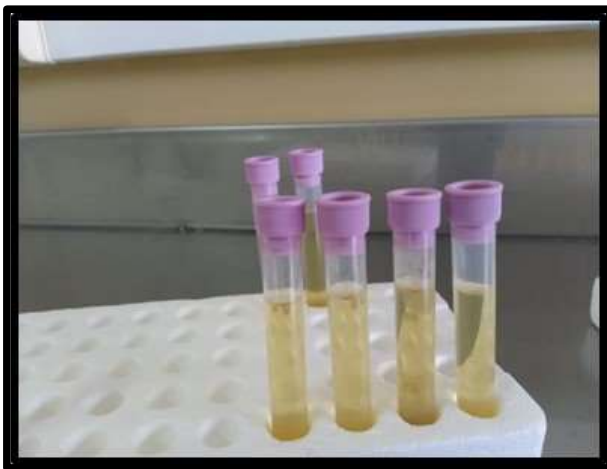


Figura 4 y 5: Examen directo en cultivo de *T. foetus*, utilizando el caldo infusión de hígado.

### **MORFOLOGÍA CELULAR**

La morfología y motilidad celular se estudia mediante observaciones directas al microscopio de contraste de fases (1000x, Olympus) (Figura 6). Las muestras se preparan a partir de un cultivo de 24 a 48 hs de incubación. Además, se utiliza tinción de Gram, prueba de la catalasa y oxidasa, y crecimiento en placa de tioglicolato con distintos porcentajes de glicina (0,6 %, 1 %, 1,1 %, 1,3 %, 1,5 % y 1,9 %) en bacterias (Figuras 7, 8 y 9) y tinción 15 para la coloración de flagelos en trichomónidos (Figuras 10 y 11).

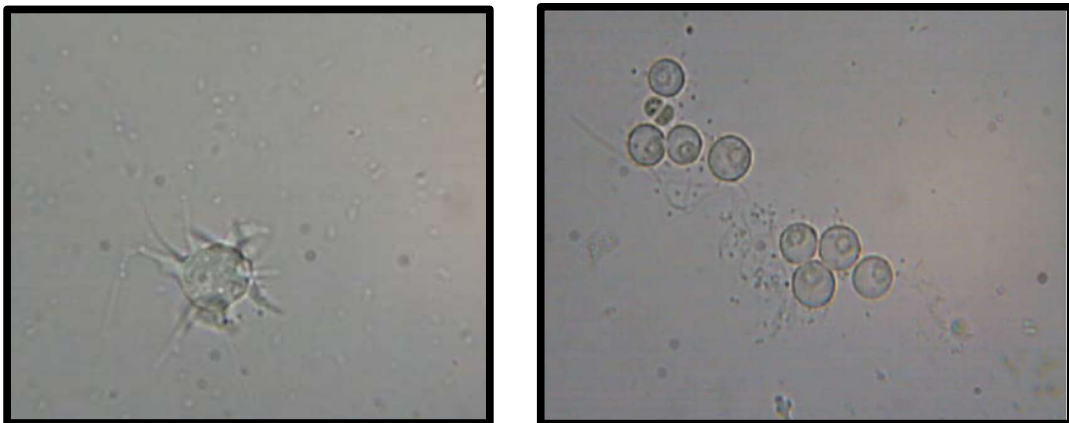


Figura 6: trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba*



Figura 7:  
al  
de C.  
de Gram

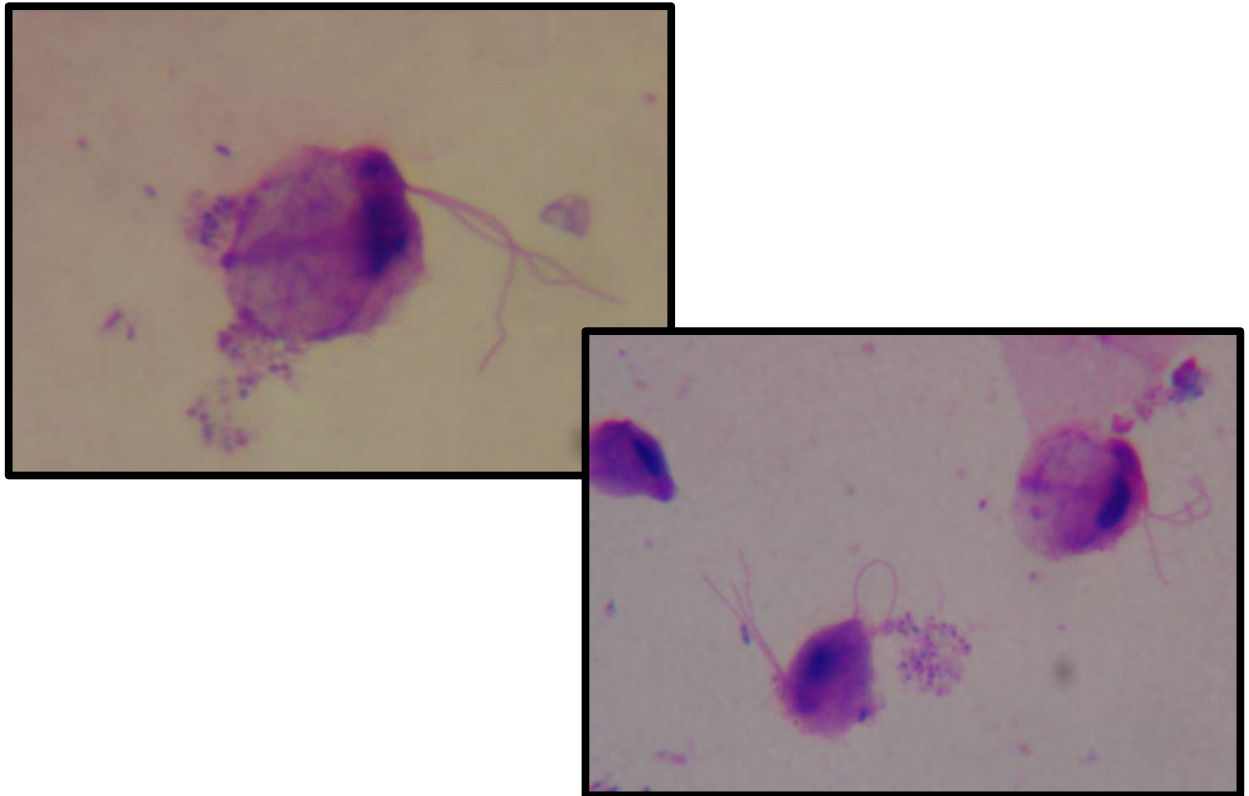


Observación  
microscopio  
*fetus*  
Coloración

Figura 8: Resultados positivos a la prueba de catalasa con formación de burbujas



Figura 9: Prueba de la oxidasa mostrando un resultado negativo y uno positivo con la formación de color



Figuras 10 y 11: Tinción 15 para la coloración de flagelos en trichomónidos

### **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

La caracterización molecular se realiza mediante la técnica de PCR convencional y PCR *real time* para la distinción de familias, especies, subespecies y biovariedad (Figuras 12, 13 y 14). En algunos casos, la extracción de ADN se realiza mediante la utilización de kits de extracción y, en otros, por el método de ebullición y centrifugación.

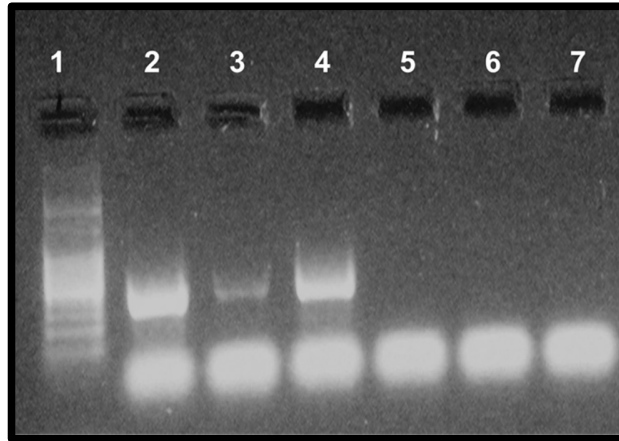


Figura 12: Confirmación de la identificación morfológica de *Acanthamoeba* sp. mediante PCR. Línea 1: Escalera de 100 pb.; línea 2: control positivo; líneas 3 y 4: muestras positivas; líneas 5 y 6: muestras negativas; línea 7: control negativo

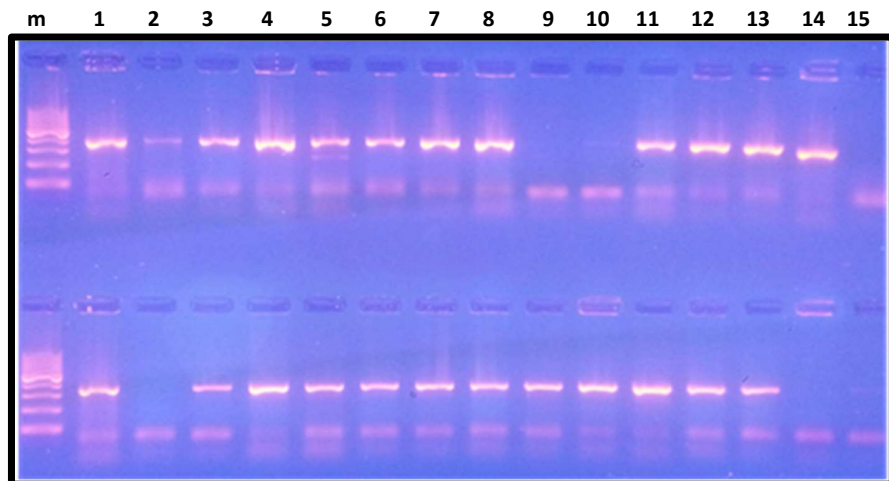


Figura 13: Confirmación de la identificación morfológica de *Trichomonas* sp. mediante PCR. Líneas m: Escalera de 100 pb.; línea 1 hasta 12: muestras analizadas; línea 13: control positivo para *Tritrichomonas foetus*; línea 14: control positivo para *Tetra-trichomonas*; línea 15: control negativo

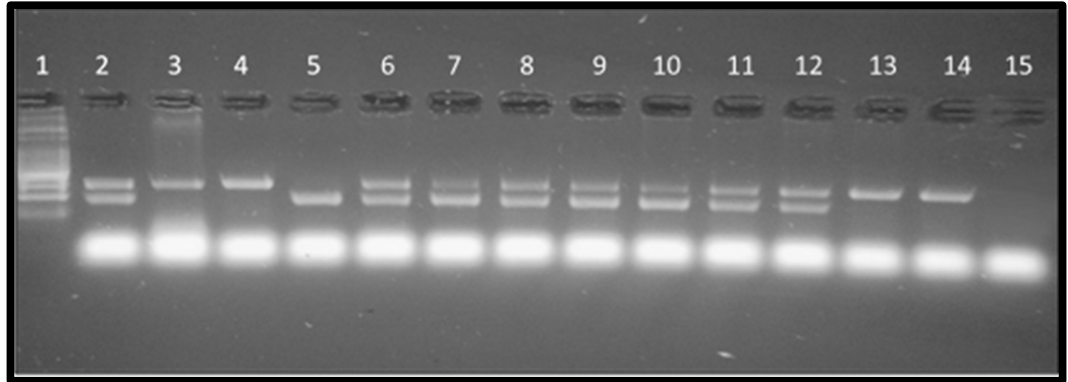


Figura 14: Confirmación de subespecies de *Campylobacter fetus*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: control *C. fetus venerealis*, línea 3: control *C. fetus fetus*; línea 4 hasta 14: ADN amplificado de los aislamientos; línea 15: control negativo; línea 5: aislamiento determinado como *C. sputorum*.

## CONSERVACIÓN

### BACTERIAS

El congelado de los aislamientos se realiza mediante la técnica de Cryoinstant, utilizando crioviales de 2 ml con faldón, conteniendo cada uno 25 crioperlas de vidrio tratadas con crioprotectores que actúan como conservantes (Figura 15). Para ello se extrae una ansada de cultivo fresco de una placa del cultivo correspondiente y se la deposita en el medio conservante del criovial (Figura 16). El criovial se agita utilizando un *vortex* durante aproximadamente 10 segundos para que las bacterias impregnen las crioperlas. Se deja reposar el vial durante 10 minutos y luego se retira el remanente de medio conservante mediante una pipeta Pasteur estéril. Finalmente, se sumerge el criovial en la fase acuosa del nitrógeno líquido (-196 °C)

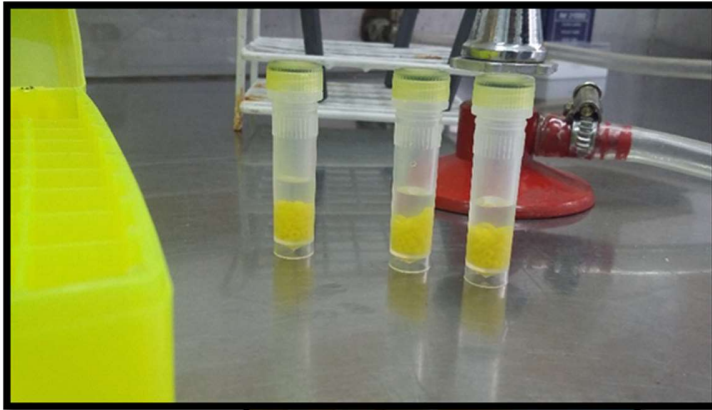


Fig. 15: Crioviales  
cada uno

de 2 ml conteniendo 25 crioperlas

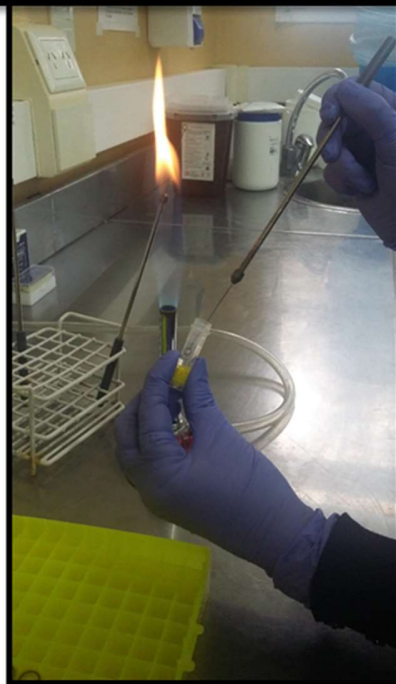


Fig. 16: Agregado de una ansada de la cepa en medio conservante del criovial.

## PROTOZOOS

Los trichomónidos se conservan en el mismo medio utilizado para su cultivo caldo infusión de hígado con el agregado de 10 % de dimetilsulfóxido en crioviales y en pajuelas de inseminación (Figura 17).





Figura 17: Conservación de trichomónidos en nitrógeno líquido

El laboratorio de la EEA Anguil cuenta con cuatro termos de nitrógeno líquido (-196 °C) que permiten preservar de manera adecuada y por varios años los diferentes ítems de nuestro interés (Figura 18).



Figura 18: Termos de nitrógeno del laboratorio de Sanidad Animal (EEA Anguil)

ADN

El ADN se deposita y se conserva por un período de unos 10 años a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en agua destilada en las instalaciones de la sala de *freezers* del Laboratorio de Sanidad Animal (Figura 19). Esto garantiza que la conservación se realice en condiciones óptimas para posibles análisis posteriores.



Figura 19: Sala de *freezers* destinada a la conservación del material genético.

El Laboratorio de Sanidad Animal de la EEA Anguil de la provincia de La Pampa se encuentra totalmente equipado para asegurar el resguardo en las condiciones necesarias de los diferentes microorganismos que aquí se estudian e investigan, así como también su material genético. Todo esto nos permite tener al alcance dichos ítems para futuros estudios, análisis y proyectos de investigación, además de contar con un importante *stock* de estos.

## **CONSIDERACIONES FINALES**

Las colecciones de microorganismos son fuentes de recursos genéticos cuyo propósito es la preservación de la diversidad biológica, garantizando su disponibilidad para diferentes actividades de investigación. Son recursos valiosos que tienen como objetivo preservar, identificar, catalogar y distribuir las cepas depositadas en ellas para su uso en control de

calidad, apoyo a la investigación científica, estudios epidemiológicos, así como para el desarrollo de vacunas.

El Laboratorio de Sanidad Animal de la EEA Anguil cuenta con una importante cantidad de microorganismo vivos, como así también de material genético, que nos provee de la materia prima necesaria para el diagnóstico e investigación de enfermedades de importancia veterinaria para nuestra región y alrededores. Se pretende continuar ampliando y enriqueciendo dicha colección.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abril, C., Vilei, E. M., Brodard, I., Burnens, A., Frey, J. y Miserez, R. (2007). Discovery of insertion element IS<sub>Cfe1</sub>: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 993–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01787.x>
- Baldone, V. N., Fort, M. C. y Urquiza, L. F. (2014). Caracterización bioquímica y molecular de cepas de *Campylobacter fetus* aisladas de toros infectados naturalmente, provincia de La Pampa, Argentina. *Avances en investigación en Salud Pública Veterinaria en la provincia de La Pampa*, 97, 7-11.
- Campero, C. M. (1985). Medios de transporte para *Tritrichomonas foetus*. *Revista de Medicina Veterinaria*, 66, 200-209.
- Campero, C. M., Catena, M. C. y Medina, D. (1986). Caldo infusión hígado para el cultivo de *Tritrichomonas foetus*. *Veterinaria Argentina*, 3, 80-81.
- Felleisen, R. S. (1997). Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology*, 115, 111-119. <https://doi.org/10.1017/s0031182097001212>
- Felleisen, R. S. (1998). Comparative genetic analysis of tritrichomonadid protozoa by the random amplified polymorphic DNA technique. *Parasitology*, 84, 153-156. <https://doi.org/10.1007/s004360050374>

- Rhades, L. C., Larzábal, M., Bentancor, A., García, J. S. Y., Babinec, F. J., Cataldi, A., Amigo, N., Baldone, V. N., Urquiza, L., Delicia, P. J. y Fort, M. C. (2019). A one-year longitudinal study of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 fecal shedding in a beef cattle herd. *Research in Veterinary Science*, 127, 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.10.001>
- Rojas, M. D. C., Rodríguez Fermepín, M., Gracia Martínez, F. y Costamagna, S. R. (2017). Presencia de *Acanthamoeba* spp. en agua para consumo ganadero en la provincia de La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.12.003>
- Rojas, M. D. C., Fort, M., Bettermann, S., Entrocassi, C., Costamagna, S. R., Sachse, K. y Rodríguez Fermepín, M. (2018). Detección de *Chlamydia abortus* en pérdidas reproductivas de bovinos en la provincia de La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(3), 269-274. <https://10.1016/j.ram.2017.10.002>

Colección EEA Balcarce, Lab. de Bacteriología

Responsable/Curadora: Lic. Valeria Salazar. e-mail: salazar.valeria@inta.gob.ar

### **PALABRAS CLAVE**

Bacterias patógenas, conservación, salud animal, zoonosis.

### **UBICACIÓN**

La colección se encuentra ubicada en el Laboratorio de Bacteriología del Grupo de Salud Animal (GSA) dentro del Área de Investigación en Producción Animal de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA Balcarce, provincia de Buenos Aires (Figuras 1 y 2).

La EEA desarrolla actividades sobre un área del territorio bonaerense que cubre 10 partidos del sudeste y centro de la provincia de Buenos Aires, con una superficie total de 4.247.000 de hectáreas, predominando el sistema mixto agrícola-ganadero, con producción de cereales, oleaginosas, hortalizas (especialmente papa), bovinos (carne y leche) y ovinos.

Su propósito es impulsar, vigorizar y coordinar el desarrollo de la investigación básica y aplicada, la experimentación adaptativa, la extensión y transferencia de tecnología agropecuaria.



Figura 1. Vista aérea de la EEA INTA Balcarce.

Las actividades de investigación y experimentación desarrolladas focalizan diferentes líneas de trabajo en las áreas de Agronomía, Producción Animal, Economía y Sociología Rural, Extensión y Transferencia de Tecnología.

Asimismo, esta unidad del INTA junto con la Facultad de Ciencias Agrarias (dependiente de la Universidad Nacional de Mar del Plata) conforman un modelo de complementación institucional dedicado a la investigación, educación, extensión y capacitación, denominado Unidad Integrada Balcarce. En este marco se desarrollan cursos de perfeccionamiento y actualización (para personal profesional o técnico) y programas de posgrado, con maestrías, especializaciones, doctorado en Ciencias Agrarias y el programa de Residencia Interna en Salud Animal, además de otras actividades de investigación y extensión. Recientemente se ha aprobado la Unidad de Doble Dependencia (UDD) en Balcarce, entre el INTA y el CONICET, y se ha consolidado sobre una matriz preexistente de investigación, desarrollo y transferencia para conformar grupos científico-técnicos que jerarquizan y expanden sus actividades de manera complementaria para darle relevancia al sistema productivo de la zona.

El Laboratorio de Bacteriología del Grupo de Sanidad Animal forma parte del Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) que funciona desde hace más de 40 años. El personal cuenta con amplia experiencia en trabajos de investigación, ensayos a campo y de laboratorio en temas relacionados con las principales enfermedades bacterianas que son parte importante y actualizada de la problemática en sanidad animal de la región.



Figura 2. Equipo de trabajo del área de Producción Animal.

## COLECCIÓN

El cepario está conformado exclusivamente por bacterias. Actualmente se encuentran conservados más de 2000 especímenes bacterianos de diversos géneros y especies, en su mayoría relacionados a problemáticas de sanidad animal. Las cepas provienen, por un lado, de diferentes trabajos de investigación que se han ido desarrollando en el marco de proyectos del INTA y ExtraINTA, a través de convenios con empresas y, por otro lado, de casos que ingresan al Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado del GSA.

Dentro de los géneros conservados se encuentran: *Actinobacillus*, *Actinomyces*, *Aeromona*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Dermatophilus*, *Enterobacter*, *Erysipelothrix*, *Escherichia*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Mannheimia*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Ornitobacterium*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Propionibacterium*, *Riemerella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Trueperella* y *Yersinia* (Tabla 1).

Familia	Género
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomices</i>
	<i>Trueperella</i>

<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>
<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Bordetella</i>
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Brucellaceae</i>	<i>Brucella</i>
<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Dermatophilaceae</i>	<i>Dermatophilus</i>
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>
	<i>Enterobacter</i>
	<i>Escherichia</i>
	<i>Klebsiella</i>
	<i>Proteus</i>
	<i>Providencia</i>
	<i>Salmonella</i>
	<i>Serratia</i>
	<i>Shigella</i>
	<i>Yersinia</i>
<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Erisipelothrix</i>
<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Ornitobacterium</i>
	<i>Riemerella</i>
<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>Listeriaceae</i>	<i>Listeria</i>
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Neisseriaceae</i>	<i>Neiseria</i>
<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Actinobacillus</i>
	<i>Haempophilus</i>



	<i>Histophilus</i>
	<i>Pasteurella</i>
	<i>Mannheimia</i>
<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>

Tabla 1. Familias y géneros de bacterias conservadas en el cepario del Laboratorio de Bacteriología del Grupo de Sanidad Animal, EEA INTA Balcarce.

En la mayoría de los casos, los aislamientos provienen de bovinos de distintas razas y sistemas de producción, seguido de diferentes especies de aves domésticas y ovinos. El resto corresponde a otras especies como la caprina, porcina, equina y especies no tradicionales. Los aislamientos se realizan a partir de muestras de diferentes órganos, huesos y fluidos (leche, semen, mucus cérvico-vaginal, etc.). También se realizan aislamientos bacterianos a partir de alimentos destinados a animales (ensilados, sustitutos, etc.), agua y efluentes (Figura 3).

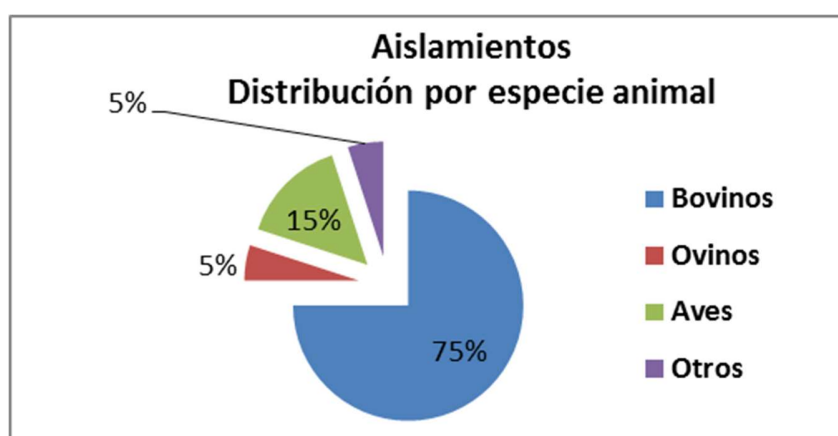


Figura 3. Distribución de los aislamientos bacterianos según especie animal. Laboratorio de Bacteriología, Grupo Sanidad Animal, EEA INTA Balcarce.

El Laboratorio de Bacteriología además cuenta con un banco de cepas de referencia internacional que se utilizan como controles para realizar ensayos de validación de métodos

de diagnóstico o evaluación de vacunas. No obstante, y a pesar de la importancia de contar con estas cepas, en el laboratorio se pone énfasis en la conformación de una colección de microorganismos autóctonos que reflejen la diversidad de los recursos genéticos microbianos de la región.

Cabe destacar que algunos de los géneros conservados constituyen subcolecciones de gran importancia. Un ejemplo de ello es la colección del género *Campylobacter*, iniciada en 1989 y con alrededor de 600 aislamientos, de los cuales más de la mitad pertenecen a la especie *Campylobacter fetus*.

Los aislamientos provienen en su mayoría de muestras de mucus cérvico-vaginal, raspaje prepucial (Figura 4), pulmón e hígado de feto, líquido abomaso y placenta de bovinos, pero también integran la colección cepas provenientes de campilobacteriosis en ovinos. Por otro lado, una menor cantidad de cepas provienen derivadas de laboratorios de diagnóstico y de frigoríficos de la provincia de Buenos Aires.

En cuanto a su origen geográfico, las cepas del género *Campylobacter* fueron aisladas de diferentes casos de diagnóstico de animales en Argentina. La mayoría proviene de la provincia de Buenos Aires y existen algunos aislamientos de Córdoba, La Pampa y San Luis.



Figura 4. (a) Toma de muestra de raspaje prepucial.  
(b) Identificación de *Campylobacter fetus venerealis* mediante inmunofluorescencia directa.

Otra de las colecciones de importancia en el laboratorio es la del género *Mycobacterium*. Actualmente se conservan alrededor de 560 aislamientos de este, los cuales provienen de casos de diagnóstico, principalmente de bovinos, y en menor medida de otras especies animales como cabras y ciervos. Las especies más importantes son *M. avium* subsp.

*paratuberculosis* (MAP) y *M. bovis*. Al mismo tiempo, el laboratorio cuenta con aislamientos de micobacterias ambientales como *M. fortuitum* (Figura 5), *M. phlei* y *M. porcinum*, y otras aisladas de suelos, órganos bovinos y efluentes.



Figura 5. Colonias de *Mycobacterium fortuitum* en medio de cultivo Herrold.

MAP es el agente etiológico de la paratuberculosis o enfermedad de Johne, una enfermedad de curso crónico que afecta a los rumiantes, tanto silvestres como domésticos, principalmente bovinos, ovinos y caprinos, produciendo lesiones granulomatosas en el intestino y nódulos linfáticos. Esta enfermedad causa importantes pérdidas económicas directas por disminución de la producción de carne o de leche y ha sido señalada como etiología de la enfermedad de Crohn en humanos conformando un posible rol zoonótico.

El 75 % de los aislamientos de MAP provienen de muestras de bovinos, en su mayoría de materia fecal. También se conservan aislamientos provenientes de órganos y leche bovina cruda, así como también de leche pasteurizada comercial. La conservación se inició en el año 1987, registrándose hasta el momento alrededor de 350 aislamientos, conservados en nitrógeno líquido y caracterizados por cultivo, pruebas bioquímicas, y en la mayoría de los casos confirmados por pruebas moleculares como PCR-*IS900*. Una gran proporción de los aislamientos se encuentran genotipificados mediante RFLP y MLVA, mientras que alrededor de 50 aislamientos de MAP ya están secuenciados en su totalidad.

*M. bovis* (Figura 6) es el agente causal de la tuberculosis en bovinos y otros animales silvestres y domésticos y, aunque con menor prevalencia, en el hombre. Constituye, por lo tanto, una seria problemática ya que no solo genera pérdidas económicas en el sector ganadero, sino que, además, al tratarse de una zoonosis, representa un problema de salud pública.

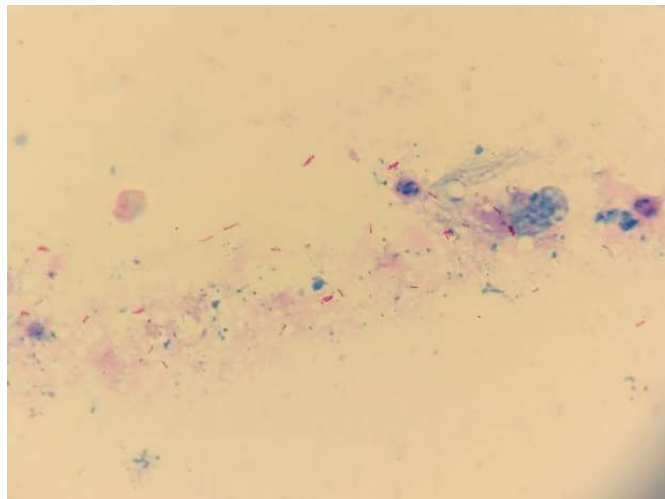


Figura 6. Identificación de *Mycobacterium bovis* mediante coloración de Ziehl Neelsen.

La colección de *M. bovis* está conformada por alrededor de 190 aislamientos conservados en nitrógeno líquido y en freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Prácticamente en su totalidad provienen de muestras de órganos y leche de bovinos, a través de casos que ingresan al laboratorio como parte del SDVE y de trabajos de investigación. Dichos aislamientos se encuentran caracterizados mediante cultivo (crecimiento en distintos medios, diferentes temperaturas y producción de pigmentos); pruebas bioquímicas como la prueba de catalasa, ureasa, reducción de nitratos, entre otras; y confirmación por PCR IS6110. Muchas de las cepas también se encuentran genotipificadas por *Spoligotyping*.

### **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR**

La identificación primaria de las bacterias se realiza mediante aislamiento en medios de cultivo (Figura 7), realización de pruebas bioquímicas y técnicas de coloraciones tradicionales y específicas siguiendo protocolos estandarizados, de acuerdo con el

microorganismo del cual se sospecha que pudiera haber sido el agente etiológico de la enfermedad o que hubiere provocado la muerte del o los animales. Adicionalmente, sobre algunos géneros bacterianos también se realizan pruebas de identificación molecular como la PCR, qPCR y técnicas de genotipificación como MLVA, *Spoligotyping*, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), secuenciación corta y secuenciación completa.

Comprobar la autenticidad de la cepa bacteriana es una de las condiciones indispensables para garantizar la correcta conservación. Por lo tanto, es fundamental la complementación de los métodos convencionales con las técnicas moleculares y de genotipificación, tanto en la etapa de aislamiento y conservación como así también su implementación como método de rutina dentro del cepario, para la autenticación de las cepas.

De muchos de estos aislamientos se requiere posteriormente la caracterización del perfil de resistencia o sensibilidad a los antibióticos (por difusión en disco o concentración mínima inhibitoria) u otras tipificaciones moleculares como son la presencia o ausencia de factores de virulencia.



Figura 7. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

## CONSERVACIÓN

La conservación de cepas a largo plazo, dentro del Laboratorio de Bacteriología, se realiza a través de dos métodos: la congelación en nitrógeno líquido (Figura 8) y/o la liofilización. Para la conservación a mediano y corto plazo se utiliza la congelación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Figura 8. Termo de nitrógeno líquido.

Para la conservación de las cepas bacterianas se utilizan diferentes medios protectores que varían en su composición de acuerdo con la técnica utilizada. En el caso de la criopreservación, ya sea en *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  o en nitrógeno líquido, se utiliza un medio que contiene glicerina y suero equino como principales componentes. Mientras que para la conservación de cepas bacterianas mediante liofilización se utiliza un medio protector compuesto de sacarosa, peptona de caseína y glutamato de sodio.

### **CONSIDERACIONES FINALES**

Los diferentes trabajos de investigación del INTA, Extra INTA y el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado del GSA, en conjunto con la decisión de conformar una colección sostenible en el tiempo, ha permitido contar con una gran cantidad de aislamientos de géneros bacterianos de importancia veterinaria. Esto ha permitido realizar estudios de relevancia epidemiológica e identificar la distribución de los microorganismos y la evolución de las enfermedades infecciosas (muchas de ellas zoonóticas) en especies como bovinos, ovinos, diferentes tipos de aves y otras de importancia económica para la región.

### **BIBLIOGRAFÍA**

García, J. A., Farace, P. D., Gioffre, A. K., Romeo, F., Verna, A., Mendez, M. A., Morsella, C., Aller, J. F., Signorini, M. y Paolicchi, F. A. (2023). Bovine campylobacteriosis in heifer: pathogenesis study and insights in the conventional and molecular diagnosis in an

experimental bovine model and field cases. *Veterinary Research Communications*, 1-12.  
<https://doi.org/10.1007/s11259-023-10193-z>

Yumi Ikuta, C., [Rodrigues](#) Ambrosio, S., Souza Filho, A. F., Hildebrand Grisi-Filho, J. H., Heinemann, M. B., Soares Ferreira Neto, J. y Amaku, M. (2016). Cryopreservation of *Mycobacterium bovis* isolates. *Semina: Ciências Agrárias*, 37, 3701-3707.

[Sunarno](#), Nursofiah, S., Hartoyo, Y., Amalia, N., Febrianti, T., Febriyana, D., Saraswati, R. D., Puspadari, N., Sariadji, K., Khariri, Rukminiati, Y., Muna, F., Susanti, I. y Multihartina, P. (2021). Long-term Storage of Bacterial Isolates by Using Tryptic Soy Broth with 15% Glycerol in The Deep Freezer (-70 to-80 °C). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 913, 1-5. <https://doi:10.1088/1755-1315/913/1/012070>

Smith, D. y Ryan, M. J. (2008). The impact of OECD best practice on the validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *Cryo Letters*, 29(1), 63-72.

Wolkers, W. F. y Oldenhof, H. (Eds.). (2015). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Humana Press.

Colección EEA Balcarce, Lab. de Toxicología

Responsable/Curador: Lic. Juan Ignacio Poo. e-mail: poo.juan@inta.gov.ar

Colaboradora: Dra. Claudia Carla Castellari

## **PALABRAS CLAVE**

*Stenocarpella maydis*, diplodiosis, micotoxinas, maíz

## **UBICACIÓN**

La colección se encuentra compartida entre el Laboratorio de Toxicología y Bioquímica Veterinaria, del Grupo de Sanidad Animal de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Balcarce y el Laboratorio de Microbiología de Suelos y Alimentos, del grupo de Micología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNMdP. Ambos laboratorios pertenecen a la Unidad Integrada Balcarce (Figura 1). La colección está a cargo del Lic. Juan Ignacio Poo y la Dra. Ing. Agr. Claudia Carla Castellari.



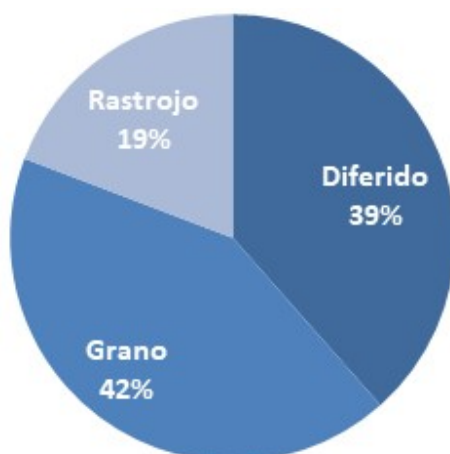
Figura 1: Ingreso a la Unidad Integrada Balcarce. Ruta 226, km 73.5

El origen de este cepario se centró en las demandas del medio (productores y veterinarios) para resolver la creciente aparición de casos de diplodiosis, una neuromicotoxicosis producida por el maíz infectado con *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton (syns. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc. And *D. zae* (Schwein.) Lév.). Este hongo tiene la capacidad de producir micotoxinas como diplodiatoxina, dipmatol, chatoglobosinas y diplomina (Masango et al., 2015) considerándose estas como micotoxinas emergentes.

## **COLECCIÓN**

El cepario cuenta con 26 aislados de *S. maydis* procedentes de maíces utilizados para el consumo animal. En la Figura 2, se muestra el porcentaje del tipo de muestra que se utilizó para realizar los aislamientos, esto concuerda en cómo se suministraba el alimento: rastrojo de maíz, maíz diferido y grano de maíz.

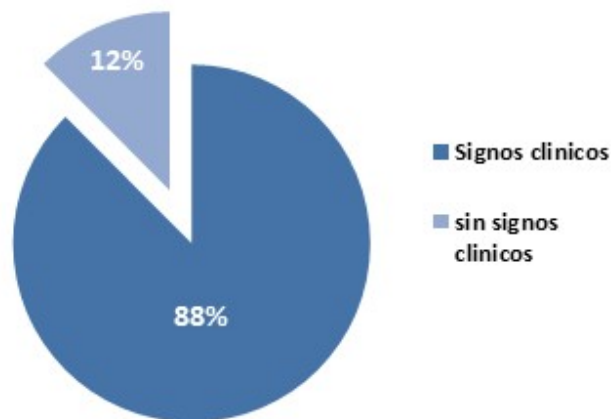




**Fig. 2:** Porcentaje de muestras utilizadas para realizar los aislamientos

La relevancia de estas cepas radica en que son únicas a nivel nacional. La **diploidiosis** es una enfermedad cada vez más frecuente en la zona de influencia de la Unidad Integrada Balcarce, debido a que, en su mayoría, las muestras ingresadas son provenientes de casos clínicos atendidos por el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado del Grupo de Sanidad Animal de la EEA del INTA Balcarce. Los aislamientos están asociados a casos clínicos (Figura 3) y en su mayoría provienen del sudeste de la provincia de Buenos Aires (88,4 %) y un 12,6% de la provincia de Salta (localidad de Mosconi).

Con estas cepas aisladas se busca, además del diagnóstico que se realiza, comenzar a responder algunas preguntas sobre la ecología y toxicidad de este patógeno. Dentro de las actividades planeadas se encuentra el abordaje de los aspectos de la ecología de *S. maydis*, relacionados con los factores ambientales, los factores intrínsecos (ligados al cultivo) y los factores implícitos (en relación con las interacciones entre *S. maydis* y otras especies micotoxigénicas y nomicotoxigénicas), asociados al maíz en el cultivo, rastrojo y almacenamiento en sistemas convencionales y silos bolsa. La información obtenida formará parte de la evidencia que permitirá relacionar y explicar los inconvenientes observados en los animales que consumen granos, rastrojos y reservas de este cultivo. A su vez, se analizará la capacidad de la generación de micotoxinas para determinar cuáles producen y su toxicidad en los bovinos. Otro punto importante del trabajo es generar un método de diagnóstico rápido y eficiente para la detección de *S. maydis* en el maíz que nos permita tomar decisiones a campo. Esto se basa en el análisis molecular de las cepas utilizando técnicas de PCR. Se va a analizar la filogenética de las cepas aisladas y ver si se puede hacer una correlación entre su origen, su toxicidad, su ecología y las micotoxinas que producen. Todo esto se llevará a cabo por medio de proyectos del INTA, de la UNMdP y de subsidios provinciales y nacionales.



**Figura 3:** Porcentaje de aislamientos que produjeron signos clínicos en los animales

En la Tabla 1 se muestra la identificación en el cepario, el tipo de muestra de la que se obtuvieron los aislamientos, la localidad de origen y la signología clínica observada.

Tabla 1: Identificación del cepario

Identificación	Muestra de maíz	Localidad	Signos clínicos
CSM2-A	Grano	Lezama	Incoordinación tren posterior, caída y muerte
CSM2-B			
CSM2-C			
CSM7-A	Diferido	Las Flores	Debilidad al nacer, no podían pararse. Posterior muerte.
CSM7-B			
CSM7-C			
CSM12-1B	Grano	Mosconi	Sin datos
CSM12-2A			
CSM12-2B			
CSM12-2C			
CSM12-2 D			
CSM12-2E			
CSM12-2H			
CSM13-A	Diferido	Rauch	Signología nerviosa, caídas y muerte
CSM13-B			
CSM13-C			

CSM13-D			
CSM13-E			
CSM13-F			
CSM14-A	Diferido	Urdampilleta	Debilidad al nacer y posterior muerte
CSM14-B			
CSM14-C			
CSM14-D			
CSM23-A	Diferido	Balcarce	Signología nerviosa
CSM23-B			
CSM23-C			

El cepario se encuentra en el Laboratorio de Microbiología de Suelos y Alimentos, ubicado en el Área de Agronomía de la Unidad Integrada Balcarce (Figura 4).



**Figura 4:** Instalaciones del laboratorio. A. Mesada de trabajo; B. Sala de pesada; C. Sala de flujo laminar

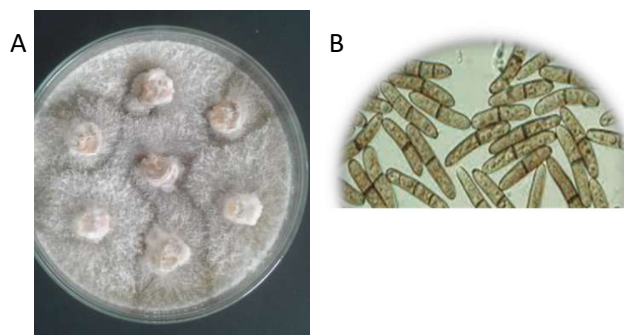
### CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR

Para la realización de los cultivos monospóricos del hongo *Stenocarpella maydis* se parte de distintos tipos de muestras de maíz como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5:** Muestras de maíz (mazorcas y rastrojos), matrices muestreadas.

Se toman al azar ocho piezas de muestras de maíz (granos, tallos y hojas), se desinfectan las superficies y se colocan en agar papa dextrosa (PDA) (Britania®) al 2 % con cloranfenicol (Sigma®) al 0,01 % (Pitt y Hocking, 2009). Se realizan cinco repeticiones de cada uno. Las placas se incuban a 25 °C durante al menos cinco días y se visualiza a simple vista el crecimiento del micelio y las estructuras de reproducción asexual (picnidios) (Figura 6 A). Para confirmar el cultivo de *S. maydis*, se realizan preparaciones semipermanentes a partir de los picnidios separados bajo una lupa. Estas preparaciones se observan posteriormente al microscopio (450x) para determinar la presencia de conidios. Los conidios en *S. maydis* son rectos, curvos o irregulares, 1 (0-2) septados, de paredes lisas y de color marrón pálido con extremos redondeados o truncados. La dimensión de los conidios es 5-8 x 15-34 μm (EPPO A2 / 68) (Figura 6B).



**Figura 6:** A: Cultivo monospórico de *Stenocarpella maydis*. B: Imagen de microscopio (450x) de esporas de *S. maydis*.

Para la identificación molecular de *Stenocarpella maydis* se realiza la técnica de PCR. Además, se utilizan los primers descritos por Romero y Wise (2015). La amplificación del ADN para cada muestra se realiza en un volumen final de 10 μl (10 μM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq ADN polimerasa, 40 ng de ADN y tampón 1xPCR). Para la identificación de *S. maydis*, se utilizan los cebadores específicos FS<sub>may</sub> (CCTGCTATGCATAGGTCG) y RS<sub>may</sub> (CACCAGGCCGTTAAGCCTTA). Para la amplificación, el termociclador se programa con el siguiente esquema: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos; 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 57 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 minutos.



Colección EEA Balcarce, Lab. de Virología

Responsable/Curadora: Dra. Andrea [Verna](#). e-mail: [verna.andrea@inta.gov.ar](mailto:verna.andrea@inta.gov.ar)

Colaboradores: Dres Odeon, Perez, Louge Uriarte, González Altamiranda, Spetter, Moore, Hecker, Campero. Técnicos: Leunda y Pereyra.

### **PALABRAS CLAVE**

Líneas celulares, cultivos primarios, cepas, biotipos, conservación

### **UBICACIÓN**

La colección de diferentes líneas celulares, cepas de referencia y cepas de casos de aislamiento de patógenos de origen infeccioso se encuentra en el Laboratorio de Virología Veterinaria del Grupo de Salud Animal de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Balcarce (UEDD IPADS INTA-CONICET), ruta nacional 226, km 73.5 (Figura 1). El Laboratorio de Virología Veterinaria se dedica a la investigación y al diagnóstico de infecciones virales. También asesora a laboratorios veterinarios y a veterinarios, suministra materiales de referencia y proporciona educación y formación (nacional e internacional).



Figura 1: Vista del edificio de Producción Animal donde se encuentra el Laboratorio de Virología.

## COLECCIÓN

La colección cuenta con diferentes líneas celulares inmortalizadas que han sido adquiridas en el Argentinean Cell Bank (ABAC) (Tabla 1). También se conservan cultivos celulares primarios de endometrio, oviducto y células de la granulosa de origen bovino.

El laboratorio también ha adquirido cepas de referencias (Tabla 2) que se usan principalmente para el desarrollo de pruebas diagnósticas (seroneutralización, PCR) y en proyectos de investigación *in vivo* que consistan en infecciones experimentales. Se han desarrollado, a partir de cultivos primarios de células obtenidas de úteros y ovarios bovinos, modelos para estudios *in vitro* de los mecanismos moleculares en ciertas cepas virales aisladas de casos clínicos.

Las muestras ingresadas al laboratorio están asociadas a casos clínicos atendidos por el Servicio de Diagnostico Veterinario Especializado del Grupo de Salud Animal de la EEA del INTA Balcarce para el aislamiento virológico y la identificación de posibles agentes infecciosos. Estos aislamientos son provenientes, en su mayoría de la provincia de Buenos Aires, pero también se cuentan con muchas cepas de otras provincias de Argentina. La relevancia de contar con cepas de campo radica en crear plataformas diagnosticas más sensibles y rápidas, como también ampliar los conocimientos sobre la patogénesis de los casos presentados. En la Figura 2 se observa el efecto citopático de los virus aislados a partir de casos clínicos. La conservación del material biológico se inició a principios de los años 90 bajo la responsabilidad del Dr. Odeón Anselmo. Actualmente, se cuenta con más de 200 cepas aisladas de casos clínicos. Estos aislamientos provienen de diversos tejidos y fluidos como, por ejemplo, bazo, pulmón, sistema nervioso central, linfocitos, suero, intestino, linfonódulos, mucus cérvico vaginal, entre otros (Tabla 3).

Tabla 1. Líneas celulares inmortalizadas provenientes del ABAC

Línea celular	Organismo/Especie	Tejido	Tipo celular
MDBK	Bovino	Riñón	Epitelial
VERO	Primate	Riñón	Epitelial

BHK-21	Hámster	Riñón	Epitelial
Hela	Humano	Céorvix	Epitelial
MA104	Mono Rhesus	Riñón	Epitelial
RD420	Bovino	Testículo	Epitelial
SH-SY5Y	Humano	Sistema nervioso	Neuronal
Botur	Bovino	Turbinata	Epitelial
criobb-B	Bovino	Recombinante	Epitelial
NCL-1	Bovine	Útero	Endometrio
PKZ	Porcino	Riñón	Epitelial
CHO-K1	Hámster chino	Ovario	Epitelial
BT	Bovino	Cornete nasal	Epitelial
EBTr	Bovino	Tráquea de embrión	Fibroblasto
Hep	Humano	Epidermis	Epitelial

Tabla 2: Cepas de referencia

	<b>Origen</b>	<b>Identificación</b>	
VS 145 NADL	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Genotipo I	Cp. Dr. Odeón A.
VS 144 Singer	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Genotipo I	Cp. Dr. Odeón A.
VS 3 Singer	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Genotipo I	Cp. Dr. Odeón A.
VS 25 Singer	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Genotipo I	Cp. Dr. Odeón A.
VS 181 Thompson	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Genotipo I	Cp. Dr. Odeón A.



VS 87 Thompson	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Cp. Genotipo I	Dr. Odeón A.
VS 125 NY-1	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Ncp. Genotipo I	Dr. Odeón A.
VS 232 SD-1	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Ncp. Genotipo I	Dr. Odeón A.
VS 241 SD-1	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Ncp. Genotipo I	Dr. Odeón A.
VS 115 Thompson	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Ncp. Genotipo I	Dr. Odeón A.
VS 86 Thompson	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Ncp. Genotipo I	Dr. Odeón A.
VS 92 Thompson	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Ncp. Genotipo I	Dr. Odeón A.
VS 95 Thompson	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Ncp. Genotipo I	Dr. Odeón A.
VS 253 USDA	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Cp. Genotipo II	Dr. Odeón A.
VS 231 890	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Ncp. Genotipo II	Dr. Odeón A.
VS 191 NY-93	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Ncp. Genotipo II	Dr. Odeón A.
VS 185 CD-87	University of Nebraska, Lincoln. EE. UU.	vDVB biotipo Ncp. Genotipo II	Dr. Odeón A.
IB 95/16 SN IBR LA38. BoAHv1	Argentina	Herpesvirus bovino 1	Dr. Odeón A.
Nc1	EE. UU.	<i>Neospora caninum</i>	UNLP, Dra. Venturini
Nc6	Argentina	<i>Neospora caninum</i>	UNLP, Dra. Venturini
Nc-LP1	Argentina	<i>Neospora caninum</i>	UNLP, Dra. Campero
Nc-LP2	Argentina	<i>Neospora caninum</i>	UNLP, Dra. Campero
Nc Liverpool	EE. UU.	<i>Neospora caninum</i>	Dr. Peter Bradley
DN599 like group	EE. UU.	Herpesvirus bovino 4	INTA Castelar

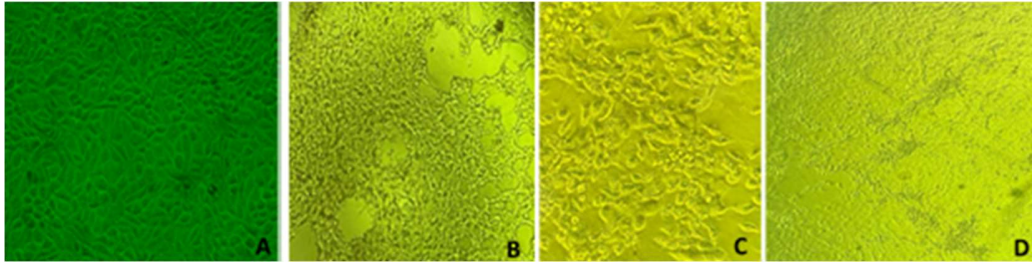


Figura 2. Efecto citopático de aislamientos de casos clínicos en la línea celular MDBK; A: Línea celular MDBK; B: Herpesvirus bovino 1; C: Herpesvirus bovino 4; D: Virus de la diarrea viral bovina.

Tabla 3. Identificación de cepas aisladas a partir de casos clínicos.

<b>Cepas</b>	<b>Muestras</b>	<b>Virus/Biotipos</b>	<b>Genotipo</b>
07-435	MCV	BoGHv4	Genotipo 3 argentino
07-568	MCV	BoGHv4	Genotipo 2 americano
07-759	MCV	BoGHv4	Genotipo 2 americano
08-362	MCV	BoGHv4	Genotipo 2 americano
08-404	MCV	BoGHv4	Genotipo 2 americano
08-467	MCV	BoGHv4	Genotipo 2 americano
08-330	MCV	BoGHv4	Genotipo 2

			americano
08-476	MCV	BoGHv4	Genotipo 2 americano
08-433	MCV	BoGHv4	Genotipo 2 americano
08-263	MCV	BoGHv4	Genotipo 2 americano
08-415	MCV	BoGHv4	Genotipo 2 americano
08-209	MCV	BoGHv4	Genotipo 2 americano
09-508	MCV	BoGHv4	Genotipo 1 Movar
09-227	MCV	BoGHv4	Genotipo 3 argentino
09-465	MCV	BoGHv4	Genotipo 2 americano
10-154	MCV	BoGHv4	Genotipo 2 americano
09-464	Animal PI	vDVB NCP	1b
09-366	Reproductivo	vDVB CP	1b
09-342	Reproductivo	vDVB CP	1b

08-707	Respiratorio	vDVB NCP	1b
09-792	Enfermedad de las mucosas	vDVB NCP	1b
09-055	Entérico	vDVB CP	1b
09-134	Respiratorio	vDVB NCP	1b
09-165	Enfermedad de las mucosas	vDVB CP	1b
09-295	Entérico	vDVB CP	1b
08-724	Reproductivo	vDVB NCP	1b
08-105	Entérico	vDVB NCP	1b
08-146	Dermatitis	vDVB NCP	1b
08-346	No registrado	vDVB NCP	1b
98-204	Reproductivo	vDVB NCP	1b
98-124	Entérico	vDVB NCP	2b
10-636	Reproductivo	vDVB NCP	2b
10-812	<i>Mucosal disease</i>	vDVB CP	1i
13-558	<i>Mucosal disease</i>	vDVB NCP/CP	1a
00-693	<i>Mucosal disease</i>	vDVB CP	1b
14-663	<i>Mucosal disease</i>	vDVB NCP/CP	2b
98-096	Reproductivo	vDVB NCP	1b
98-530	Reproductivo	vDVB NCP	2b
99-535	Reproductivo	vDVB NCP	1b
04-558	Reproductivo	vDVB NCP	1a

04-567	Reproductivo	vDVB NCP	1b
04-619	Reproductivo	vDVB NCP	1b
04-725	Reproductivo	vDVB NCP	2b
04-749	Reproductivo	vDVB NCP	1b
05-1151	Reproductivo	vDVB NCP	1b
07-509	Reproductivo	vDVB NCP	1b
08-538	Reproductivo	vDVB NCP	1a
08-546	Reproductivo	vDVB NCP	1a
09-617	Reproductivo	vDVB NCP	1b
09-688	Reproductivo	vDVB NCP	1b
10-405	Reproductivo	vDVB no registrado	1b
10-430	Reproductivo	vDVB NCP	1b
10-698	Reproductivo	vDVB NCP	1b
11-652	Reproductivo	vDVB NCP	1a
12-141	Reproductivo	vDVB no registrado	1b
13-464	Reproductivo	vDVB NCP/CP	1a
14-287	Reproductivo	vDVB no registrado	1b
15-512	Reproductivo	NCP	1b
15-580	Reproductivo	No registrado	1b
16-302	Reproductivo	No registrado	1b
16-478	Reproductivo	vDVB NCP	1b

17-361	Reproductivo	vDVB NCP	1b
18-417	Reproductivo	vDVB NCP	1a
18-437	Reproductivo	vDVB NCP	1a
95-393	Enfermedad de las mucosas	vDVB CP	1b
98-922	Enfermedad de las mucosas	vDVB CP	2b
99-134	Enfermedad de las mucosas	vDVB CP	1b
03-417	Enfermedad de las mucosas	vDVB CP	1a
04-089	Enfermedad de las mucosas	vDVB CP	1b
10-049	Enfermedad de las mucosas	vDVB CP	1b
10-647	Enfermedad de las mucosas	vDVB NCP	1b
10-676	Enfermedad de las mucosas	vDVB CP	1b
11-699	Enfermedad de las mucosas	vDVB CP	1b
13-041	Entérico	vDVB no registrado	1a
13-076	Entérico	vDVB no registrado	1a
13-102	Dermatitis	vDVB NCP	2b
13-194	No registrado	vDVB no registrado	1a
13-252	Entérico	vDVB no registrado	1b
13-413	Nervioso	vDVB CP	1b
13-438	Enfermedad de las mucosas	vDVB NCP/CP	1a
13-583	Enfermedad de las mucosas	vDVB no registrado	1b
13-736	Enfermedad de las mucosas	NCP/CP	1a

14-060	Enfermedad de las mucosas	NCP/CP	1b
14-438	Reproductivo	vDVB no registrado	1a
15-317	Entérico	vDVB no registrado	1b
16-019	Nervioso	vDVB NCP	1b
16-154	Respiratorio	vDVB NCP	1b
16-230	Respiratorio	vDVB NCP	1b
16-677	Entérico	vDVB NCP	1b
PI413	Animal PI	vDVB NCP	1b
PI San Gabriel	Animal PI	vDVB NCP	1b
17-079	No registrado	vDVB NCP	1a
17-178	No registrado	vDVB NCP	1b
18-470	Enfermedad de las mucosas	NCP/CP	1a
19-063	Reproductivo	vDVB no registrado	1b
10-636 spleen/lung	Reproductivo	vDVB NCP	1b
PI440	Animal PI	vDVB NCP	1a
13-434	Reproductivo	vDVB no registrado	1b

Referencias: MCV: mucus cérvico vaginal; vDVB: virus de la diarrea viral bovina; BoGHv4: gammaherpesvirus bovino 4; Animal PI: Animal persistentemente infectado.

## CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR

Las identidades de las cepas de campo presentes en el Laboratorio de Virología Veterinaria se verifican mediante pruebas con anticuerpos específicos (inmunofluorescencia directa e indirecta) y pruebas moleculares (PCR) (Figura 3).

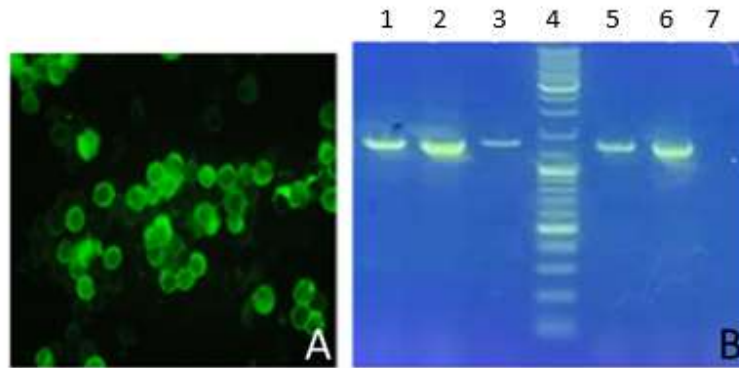


Figura 3: A: Inmunofluorescencia directa positiva. B: Gel de agarosa con productos de PCR (bandas de 1350 pb) correspondientes a la amplificación gen IE2 BoGHv4. Calle 1: SNC, 2: Bazo. 3: Pulmón, 4: marcador de peso molecular, 4 y 5: controles positivos y 6: control negativo.

### CONSERVACIÓN

Las diferentes líneas celulares inmortalizadas y los cultivos celulares primarios son conservados a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  en termos de nitrógeno líquido (Figura 4). Las líneas celulares se cultivan en un medio mínimo esencial con sales de Earle (MEM-E, Gibco; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.) con un 10 % de suero fetal bovino (FBS, Bioser, Buenos Aires, Argentina), que se suplementa con una solución de antibióticos y antimicóticos (Gibco, Langley, OK, EE. UU.), que incluye 100 U de penicilina G, 100  $\mu\text{g}$  de sulfato de estreptomina y 0.025  $\mu\text{g}$  de anfotericina B por ml. Por último, las células se mantienen en una estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con un 5 % de  $\text{CO}_2$ . El Laboratorio de Virología cuenta con dos termos de nitrógeno líquido para la conservación de todos los recursos biológicos.





Figura 4: Conservación de líneas celulares, cepas de referencias y cepas de casos clínicos en nitrógeno líquido.

Las cepas de referencias (Tabla 2) se conservan a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  en termos de nitrógeno líquido y una réplica en *freezers* de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , contando actualmente con tres *freezers* (Figura 5).



Figura 5: Conservación y disposición de guardado de una réplica de líneas celulares y cepas en  $-80^{\circ}\text{C}$

El método para conservar un material activo biológicamente comprende en homogeneizar las células infectadas con virus y/o línea celular con un medio compuesto por suero fetal bovino más DMSO (relación 9.1). Este último evita que se formen cristales y astillas de hielo que rompan o dañen las células. El descenso de la temperatura debe ser gradual. Para ello se colocan los crioviales en un contenedor de Plumavit o en un *cooler* con solución de isopropanol (Figura 6).



Figura 6: Contenedor con solución de isopropanol para el descenso gradual de la temperatura antes de la conservación del material biológico a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido.

### **CONSIDERACIONES FINALES**

Gracias a los proyectos financiados por el INTA y el Ministerio de Ciencia y Tecnología, el Laboratorio de Virología Veterinaria tiene margen para la innovación y la investigación. Asimismo, se utilizan técnicas moleculares, inmunológicas y biotecnológicas, lo que ha permitido contar con un banco de cepas clasificadas y secuenciadas (regiones parciales como genomas completos).

### **BIBLIOGRAFÍA**

Odeón, A. C., Leunda, M. R., Faverín, C., Boynak, N., Vena, M. M. y Zabal, O. (2009). In vitro amplification of BVDV field strains isolated in Argentina: effect of cell line and culture conditions. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(2), 79-85.

Moor, D. P., Echaide, I., Verna, A. E., Leunda M. R., Cano, A., Pereyra, S., Zamorano, P. I y Odeón, A. C. (2010). Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. *Veterinary Parasitology*, 175(3-4), 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.020>

Verna, A. E., Manrique, J. M., Pérez, S. E., Leunda, M. R., Pereyra, S. B., Jones, L. R y Odeón, A. C. (2012). Genomic analysis of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) from Argentina: high genetic variability and novel phylogenetic groups. *Veterinary Microbiology*, 160(1-2), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.039>

Campero, L. M., Venturini, M. C., Moore, D. P., Massola, L., Lagomarsino, H., García, B., Bacigalupe, D., Rambeaud, M., Pardini, L., Leunda, M. R., Schares, G. y Campero, C. M. (2015). Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina. *Experimental Parasitology*, 155, 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.009>

Verna, A. E., Pérez, S. E., Manrique, J. M., Leunda, M. R., Odeón, A. C. y Jones, L. R. (2016) Comparative study on the in vitro replication and genomic variability of Argentinean field isolates of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4). *Virus Genes*, 52(3), 372-378. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1312-3>

Campero, L. M., Gual, I., Dellarupe, A., Schares, G., Moré, G., Moore, D. P., Venturini, M. C. (2020). Isolation of *Neospora caninum* from a beef cattle fetus from Argentina: Immunopathological and molecular studies. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100438>

Morán, P., Manrique, J., Pérez, S. E., Romeo, F., Odeón, A. C., Jones, L. R. y Verna, A. E. (2020). Analysis of the anti-apoptotic v-Bcl2 and v-Flip genes and effect on in vitro programmed cell death of Argentinean isolates of bovine gammaherpesvirus 4 (BoHV-4). *Microbial Pathogenesis*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020>

Spetter, M. J., Louge Uriarte, E. L., Verna, A. E., Odeón, A. C. y González Altamiranda, E. A. (2020). Temporal and geographic dynamics of bovine viral diarrhea virus in American countries. *Research in Veterinary Science*, 153, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.10.020>.

Pérez, S. E., Manrique, J., Morán, P., Romeo, F., Angelini, H., Leunda, M. R., Pereyra, S., Spetter, M., González Altamiranda, E. A., Odeón, A. C., Jones, L. R. y Verna, A. E. (2020).

Genetic characterization of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) isolates from Argentine cattle suggests a complex evolutionary scenario. *Molecular Biology Reports*, 47(6), 4905-4909. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05449-9>.

Spetter, M. J., Louge Uriarte, E. L., Verna, A. E., Leunda, M. R., Pereyra, S. B., Odeón, A. C. y González Altamiranda, E. A. (2021). Genomic diversity and phylodynamic of bovine viral diarrhea virus in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 96. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105089>

Colección EEA Bariloche

Responsable/Curadora: MSc. Lic. Romanela Marcellino. e-mail:  
marcellino.romanela@inta.gob.ar

### **PALABRAS CLAVE**

Patagonia, pequeños rumiantes, *Brucella*, *Clostridium*, *Corynebacterium*

### **UBICACIÓN**

La colección se encuentra en el Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Bariloche (IFAB) que funciona en la EEA Bariloche “Dr. Grenville Morris” ubicada en la calle Modesta Victoria 4450 de la ciudad de San Carlos de Bariloche, provincia de Río Negro (Figura 1). En la estructura de la EEA se encuentra dentro del área de Producción Animal.



Figura 1: Vista exterior del IFAB, EEA INTA Bariloche

### **COLECCIÓN**

La colección de la EEA Bariloche está constituida por cepas de bacterias patógenas para los animales de producción. Estas cepas provienen en mayor medida de pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) ya que en el área de influencia de la EEA Bariloche se encuentran sistemas de producción extensivos orientados especialmente a la ganadería ovina y caprina y, en menor medida, la bovina en las provincias de Río Negro y Neuquén. En menor escala, las cepas conservadas provienen de bovinos y equinos. En el último año se han incorporado a la colección aislamientos provenientes de producciones piscícolas (truchas) y apícolas.

Las cepas conservadas provienen en la mayoría de los casos del servicio de diagnóstico que brinda el Grupo de Salud Animal a partir del trabajo en conjunto de los clientes (veterinarios que solicitan el servicio), los veterinarios del GSA y el personal del Laboratorio de Bacteriología. En menor medida, proceden de proyectos de investigación o de ensayos de tesinas de grado y posgrado o son cepas vacunales de referencia. Las cepas conservadas producen diferentes enfermedades infecciosas siendo los principales géneros aislados *Clostridium* (enterotoxemia, gangrena gaseosa), *Brucella* (brucelosis) y *Corynebacterium* (pseudotuberculosis, lana sisal). También se conservan 12 cepas de referencia ATCC de diferentes géneros y cepas vacunales del género *Brucella* (Tabla 1).

Ítem	Cantidad	Hospedador
<i>Brucella ovis</i>	114	Ovino
<i>Brucella abortus</i>	4	Bovino
<i>Brucella melitensis</i>	3	Caprino
<i>Trueperella pyogenes</i>	18	Ovino/caprino
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	195	Ovino/caprino/camélido (llama)
<i>Corynebacterium bovis</i>	116	Ovino
<i>Clostridium perfringens</i>	124	Ovino/bovino/salmónido/insecto
<i>Clostridium haemolyticum</i>	7	Ovino/bovino
<i>Clostridium sordelli</i>	8	Bovino
<i>Clostridium septicum</i>	8	Bovino

Tabla 1: principales especies conservadas y los hospedadores de donde fueron aisladas

Las cepas conservadas son utilizadas para el desarrollo de vacunas y los kits de diagnóstico, y están a disposición para realizar trabajos de investigación y tesinas. También son solicitadas por otras instituciones para ser utilizadas como cepas de referencia para sus ensayos, evaluación de medios de cultivo y actividades de rutina (Figura 2).

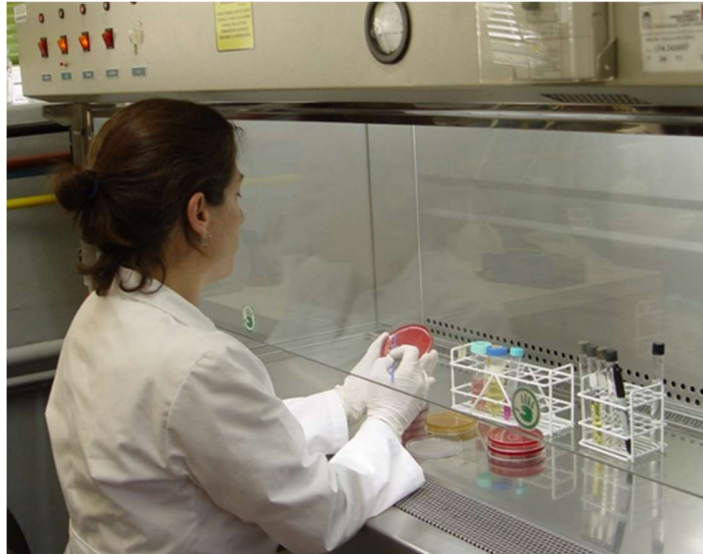


Figura 2: Aislamiento y siembra de pruebas bioquímicas en la cabina de seguridad biológica

En menor número, se conservan otros aislamientos que afectan ovinos y caprinos obtenidos del servicio de diagnóstico como *Dermatophilus congolensis*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella ovis*, *Campylobacter fetus*, *Actinobacillus seminis*, *Escherichia coli*, *Mannheimia haemolytica* y *Streptococcus pyogenes*.

### **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA**

En función de la anamnesis del caso, las muestras se siembran en placas con medios de cultivos no selectivos como agar sangre Columbia, agar BHI, agar nutritivo, etc. (Figura 3). En el caso de algunas especies o grupos particulares, se utilizan para el primo aislamiento medios selectivos como agar Skirrow, agar Thayer Martin, agar MacConkey, entre otros, que al contener antibióticos, colorantes o sales inhiben el desarrollo de contaminantes o grupos específicos de bacterias (Figura 4).





Figura 3: Aislamientos de *Trueperella pyogenes* y *Clostridium perfringens* en agar sangre Columbia



Figura 4: Aislamientos de *Campylobacter fetus* en agar Skirrow y *Klebsiella* sp. en agar MacConkey

En el caso de los anaerobios como *Clostridium* o microaerofílicos como *Campylobacter*, primero se siembran las muestras en tubos con medios de enriquecimiento reducidos en oxígeno como caldo Tarozzi o con el agregado de antibióticos como el agar Brucella semisólido y luego se pasan a placas de agar sólido (Figura 5). Luego de la siembra inicial, se incuban las placas o los tubos en la atmósfera correspondiente según el o los patógenos sospechosos (aerobiosis, 10-20 % CO<sub>2</sub>, microaerofilia o anaerobiosis) en estufas de cultivo a 37°C. Para generar las diferentes atmósferas se utilizan jarras de anaerobiosis y tubos con diferentes gases (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>) (Figura 5).



Figura 5: tubos con agar Brucella semisólido para el aislamiento de *Campylobacter fetus* y jarra de anaerobiosis para el aislamiento de bacterias que requieren atmósferas especiales

Luego del periodo de incubación (18 h a 7-10 días, dependiendo de la bacteria) se seleccionan las colonias sospechosas y, una vez obtenido el cultivo en pureza, se realizan las pruebas bioquímicas tradicionales necesarias para su identificación (Figura 6).

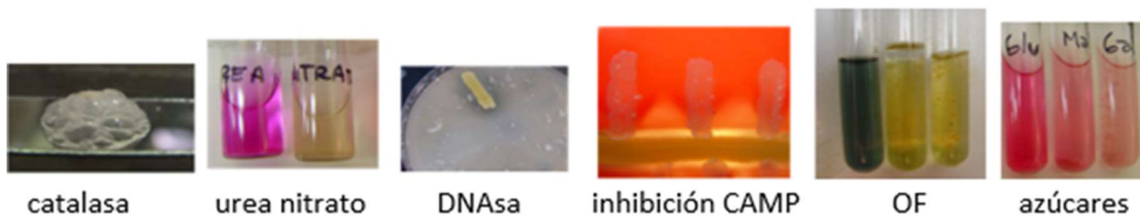


Figura 6: Set de pruebas bioquímicas para identificar a *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Desde el momento en que se comienza a procesar una muestra en el Laboratorio de Bacteriología tanto las características macroscópicas como microscópicas de las bacterias brindan información fundamental que permiten seguir un caso de diagnóstico. El aspecto de las colonias sobre el agar sólido o el efecto que ejercen sobre él como, por ejemplo, los diferentes tipos de hemólisis son características propias de las diferentes especies. Esta información va acompañada con lo que se observa en un preparado teñido con la técnica de Gram en el microscopio óptico (Figuras 7 y 8).

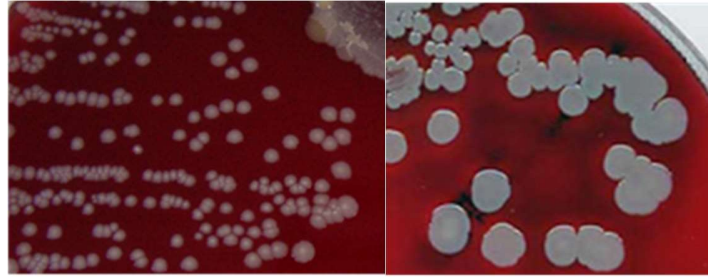


Figura 7: Aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y *Staphylococcus aureus* en agar sangre Columbia listos para ser cosechados y conservados en nitrógeno líquido

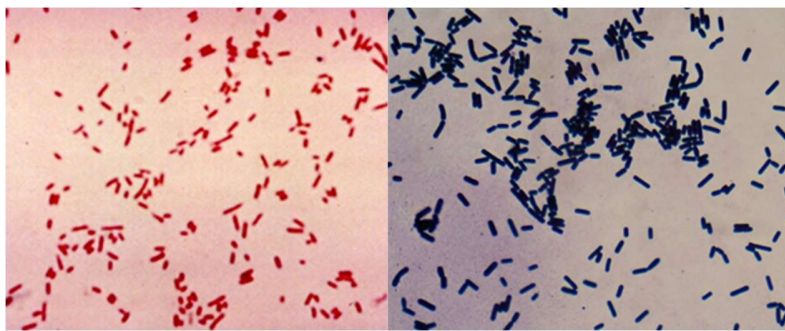


Figura 8: Tinción de Gram y observación al microscopio óptico de *Escherichia coli* (bacilo gramnegativo) y *Clostridium perfringens* (bacilo grampositivo)

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

En algunos casos se realiza la caracterización molecular mediante la técnica de PCR convencional. La extracción de ADN se realiza mediante la utilización de kits de extracción comerciales o por el uso de la resina Chelex. En nuestro caso, se realizan técnicas de PCR multiplex determinando al mismo tiempo diferentes genes que codifican a diferentes productos como toxinas en el caso de *C. perfringens* y enzimas en el caso de *C. pseudotuberculosis* (Figuras 9 y 10).

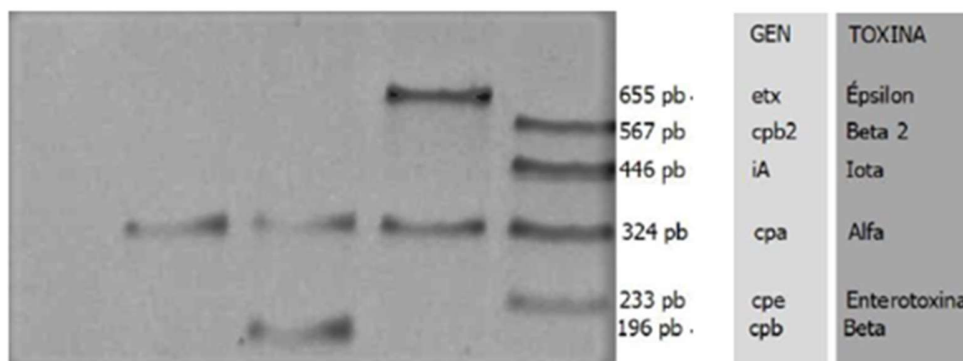


Figura 9: PCR múltiple para la detección de los genes que producen las toxinas que determinan los diferentes toxinotipos de *Clostridium perfringens*

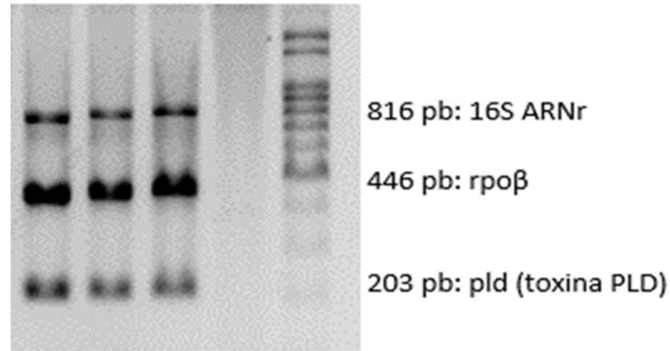


Figura 10: PCR múltiple para la detección de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

## CONSERVACIÓN

Las cepas se conservan por el método de criopreservación en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  en pequeños tubos rotulados de 1 a 2 ml de capacidad, denominados crioviales. Dentro de estos se coloca un medio de conservación que contiene una parte de un caldo nutritivo y una parte de glicerol, ambos componentes permiten el mantenimiento y sobrevivencia de las cepas a esas temperaturas (Figura 11).



Figura 11: Diferentes tipos de crioviales utilizados para conservar los aislamientos bacterianos

Una vez que se ha logrado el cultivo en pureza, se toma una porción con un ansa y se deposita dentro del criovial agitando suavemente para que el material se desprenda del

ansa. Los crioviales se colocan en cánulas portacrioviales y estas se colocan dentro de los canastillos de los termos de nitrógeno (Figura 12).

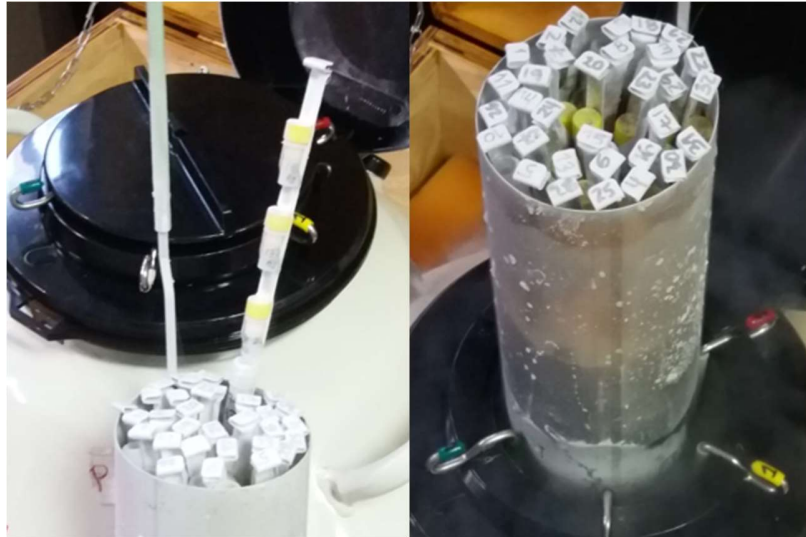


Figura 12: Detalle de los termos de nitrógeno líquido. Se observan los canisters con cánulas portacrioviales.

### **CONSIDERACIONES FINALES**

El conocimiento actualizado y el resguardo de los patógenos que afectan los niveles productivos de los campos en las diferentes regiones son dos puntos estratégicos para el país ya que, ante un problema sanitario, nos da la posibilidad de responder de una manera más rápida y acertada. Tener la soberanía de ese saber es imprescindible, no solo por las cuestiones económicas y productivas, sino también por lo relacionado con la salud humana y ambiental bajo el lema de “una salud”. Contar con el conocimiento de las características de los patógenos que van evolucionando y cambiando a través del tiempo nos permite estar mejor preparados a la hora de desarrollar vacunas, desarrollar técnicas de diagnóstico rápidas o la aplicación de antibióticos eficientes, entre otras actividades relacionadas con la salud animal, humana y ambiental.

### **BIBLIOGRAFÍA**

Barrow, G. I. y Feltham, R. K. A. (Eds.). (1993). *Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria*. (3rd ed., pp. 199-241). Cambridge University Press.

Garmory, H. S., Chanter, N., French, N. P., Bueschel, D., Songer J. G. y Titball, R. W. (2000). Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiology and Infection*, 124(1), 61-67. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268899003295>.

MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Editorial Médica Panamericana.

Meer, R. R. y Songer, J. G. (1997). Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *American Journal of Veterinary Research*, 58(7), 702-705.

Pacheco, L. G. C., Pena, R. R., Castro, T. L. P., Dorella, F. A., Bahia, R. C., Carminati, R., Frota, M. N. L., Oliveira, S. C., Meyer, R., Alves, F. S. F., Miyoshi, A. y Azevedo, V. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal Medical Microbiology*, 56 480-486. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46997-0>

Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schrenckenberger, P. C. y Woods, G. L. (2007). *Koneman. Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas en color*. Editorial Médica Panamericana. (pp. 1094-1097).

Colección EEA Concepción del Uruguay

Responsable/Curador: Dr. Mario Alberto Soria. e-mail: soria.mario@inta.gob.ar.

Colaboradores: Dante Bueno (INTA-EEA Concepción del Uruguay) y Magalí Hoffmann (CONICET).

### **PALABRAS CLAVE**

Avicultura, bacterias, hongos, *Salmonella*

### **UBICACIÓN**

La colección se encuentra en la Unidad de Investigación Avícola (UIA) del Departamento Avicultura de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Concepción del Uruguay (Figura 1) ubicada en la ruta provincial 39, km 143,5 de la ciudad de Concepción del Uruguay, Entre Ríos. La colección de recursos genéticos se inició en el año 2005 en el Laboratorio de Bacteriología y Micología, con la finalidad de conservar cepas de importancia en la avicultura.



Figura 1: Unidad de Investigación Avícola, INTA EEA Concepción del Uruguay, Entre Ríos

### **COLECCIÓN**

Nuestra colección se caracteriza por la conservación tanto de bacterias como de hongos de importancia en avicultura. Contamos con un total de 2837 aislamientos conservados, de los

cuales 2.698 corresponden a cepas bacterianas y 139 a cepas de hongos. Las bacterias están representadas principalmente por aislamientos de *Salmonella* spp. Además, *Avibacterium* sp., *Pasteurella* spp., *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *Yersinia* spp., *Enterobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. En cuanto a los aislamientos de *Salmonella*, en nuestro cepario tenemos 54 serovariedades diferentes. Todas fueron aisladas de alimentos para aves, órganos y tejidos de aves (hígado, bazo, folículos, cloaca y médula ósea). Con respecto a las cepas fúngicas conservadas, las mismas pertenecen al género *Aspergillus* sp.

## CONSERVACIÓN

En nuestro laboratorio, la conservación de las cepas bacterianas consta de dos métodos:

1. **Conservación a mediano plazo (Figura 2):** en este método las cepas bacterianas se conservan en agar nutritivo a una temperatura de 4 °C. Es la manera más simple para mantener la viabilidad de los microorganismos durante un corto plazo. Se recomienda asegurar un cierre hermético de los tubos sellando la tapa con Parafilm. El almacenamiento se realiza en la heladera, en un lugar alejado de la luz, entre 4 °C y 8 °C, para disminuir los procesos metabólicos y asegurar la viabilidad por periodos más prolongados (ANLIS Malbrán, 2018).

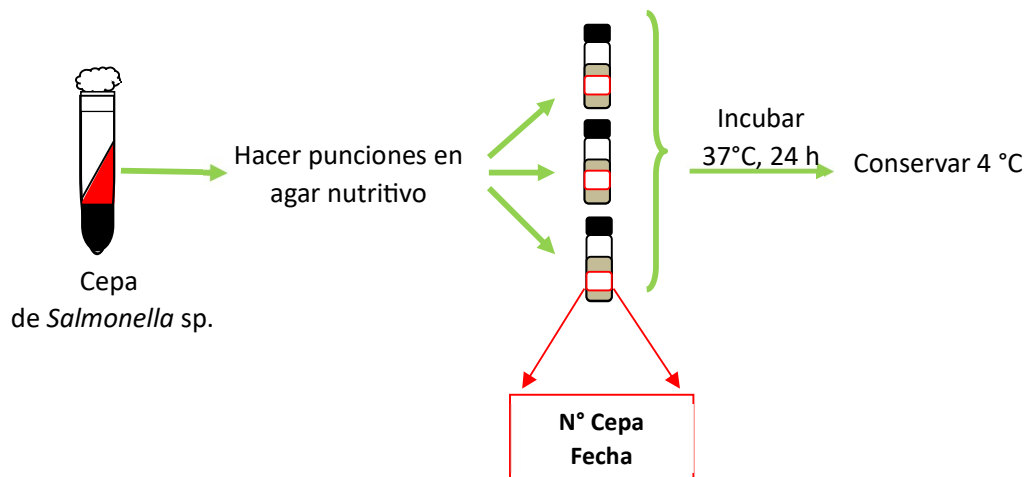
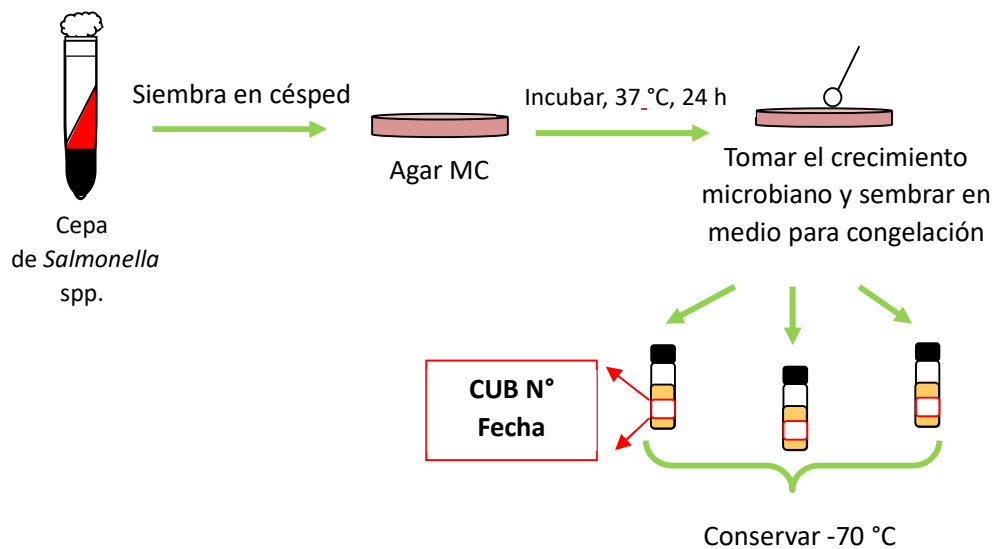


Figura 2. Flujograma de conservación de cepas a mediano plazo

2. **Conservación a largo plazo (Figura 3):** las cepas bacterianas se conservan en medio para congelación a una temperatura de -70 °C. Estos métodos garantizan al máximo la

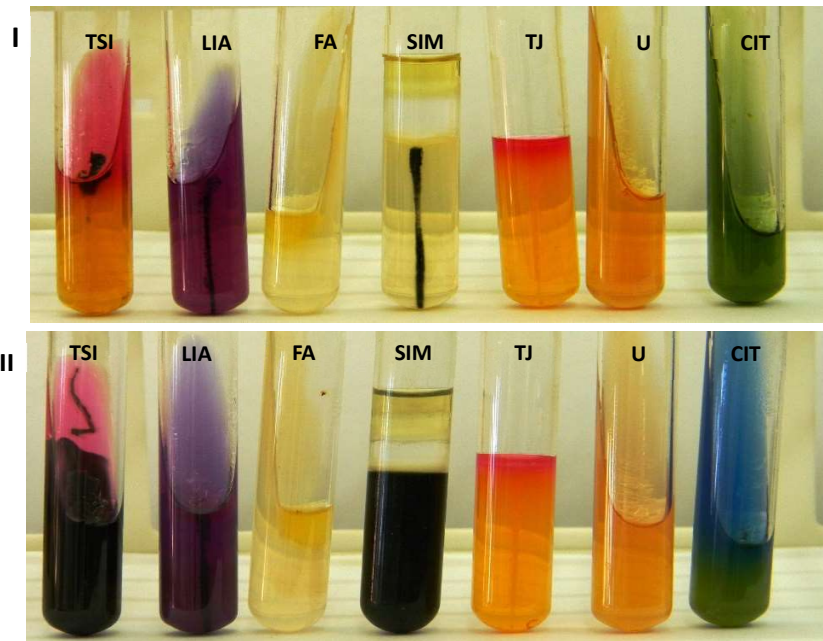


estabilidad genética, al evitar la aparición de generaciones sucesivas y por tanto son los más utilizados en microorganismos (Arencibia et al., 2008). En nuestro laboratorio, la cepa a conservar se siembra en césped en dos placas de agar MacConkey (MC). Se incuban a 37 °C, 24 h. A su término, se toma con un ansa del agar MC, arrastrándola por el medio hasta lograr formar una “pelota” de la cepa a guardar. Luego se transfiere al vial con el medio de cultivo para congelación, se sella con Parafilm y se rotula el tubo con el código CUB de nuestro laboratorio que significa Concepción del Uruguay Bacteriología. Los viales luego son colocados en cajas para ultrafreezer y conservados a -20 °C y -70 °C.



**Figura 3.** Flujograma de conservación de cepas a largo plazo.

En relación con las bacterias, todas se identifican con pruebas bioquímicas, en algunos casos se confirma por biología molecular. En cuanto a la identificación de *Salmonella* spp. (Figura 4) es de gran ayuda la utilización del agar hierro tres azúcares junto con el agar lisina hierro (Waltman y Gast, 2008). También se utilizan otras pruebas bioquímicas como agar citrato de Simmons, agar urea, ONPG, rojo de metilo, Voges-Proskauer, agar tartrato de Jordan, medio Sulfuro-Indol-Movilidad y agar fenilalanina.



**Figura 4.** Pruebas bioquímicas para *Salmonella* spp. I: *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum. II: *Salmonella* ser. Enteritidis. **TSI:** agar hierro tres azúcares. **LIA:** agar lisina hierro. **FA:** agar fenilalanina. **SIM:** medio Sulfuro-Indol-Movilidad. **TJ:** agar tartrato de Jordans. **U:** agar urea. **CIT:** agar citrato de Simmons

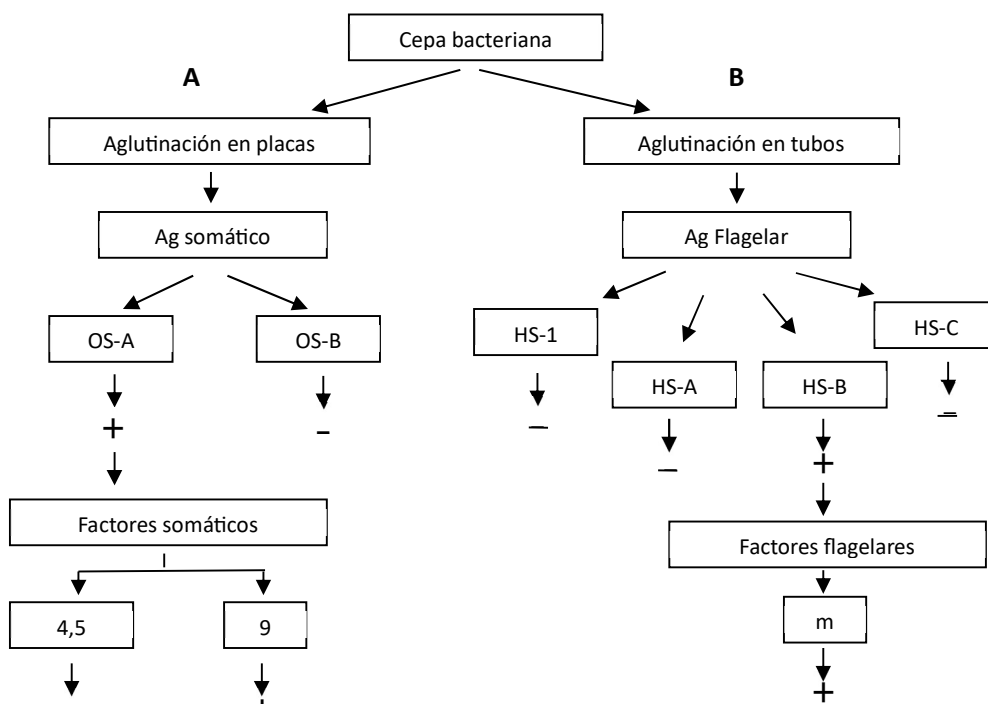
Por otro lado, además de la identificación antes mencionada, realizamos la serotipificación de *Salmonella* spp. tipo móviles. Las serovariedades de *S. enterica* se basan en las diferencias antigénicas del lipopolisacárido O (LPS, antígeno somático O), y en la fase 1 y 2 del antígeno flagelar H (H1 y H2). Con base en el antígeno flagelar, *Salmonella* puede ser bifásica (expresa H1 y H2) o monofásica (expresa el antígeno H1). Por convención, los antígenos identificados en una determinada cepa se presentan en una fórmula antigénica, en la cual el nombre del serotipo es seguido por los antígenos somáticos O, separados por dos puntos de los flagelares (Wattiau, 2011).

La serotipificación (Figura 5) se realiza mediante diferentes pasos que se detallan a continuación:

1. Serotipificación somática. A partir del cultivo en agar tripteína de soja se verifica que las cepas se encuentren en forma lisa suspendiendo las bacterias en solución salina al 0,85 % (sin autoaglutinación). Posteriormente, se colocan sobre una placa de vidrio junto con 20

μl de los antisueros polivalentes somáticos A y B, se mezcla cuidadosamente con palillo durante 2 minutos para observar la presencia o ausencia de aglutinación bajo luz oblicuamente dirigida. En las cepas lisas que mostraron aglutinación positiva para con alguno de los polivalentes somáticos se continúa su tipificación con los factores somáticos.

2. Serotipificación flagelar. La serotipificación flagelar se realiza a partir de un cultivo en caldo flagelar (CF), al cual se le agrega 5 ml de solución fisiológica formolada al 1 %, y se incuba 1 h a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). En cuatro tubos de ensayo se colocan 25 μl de los antisueros flagelares polivalentes HS-A, HS-B, HS-C y HS-1 y luego se agrega 1 ml del caldo formolado, se incuba durante 1 h a 50 °C en baño de agua. A su término, se observa la presencia o ausencia de flóculos bajo luz oblicua. En los aislamientos que son positivos a uno o más sueros polivalentes H (expresión de una o dos fases) se continúa la serotipificación con los factores del antígeno flagelar correspondiente.



**Figura 5.** Flujoograma para la serotipificación de *Salmonella* ser. Enteritidis. A: Flujoograma de la aglutinación somática. B: Flujoograma de la aglutinación flagelar. Ag: Antígeno. OS-A: Antisuero somático A. OS-B: Antisuero somático B. HS: Antisuero flagelar

3. Inversión de fase (Figura 6): En aquellos aislamientos que solo muestran aglutinación positiva a solo un polivalente flagelar (AgH), y por los resultados de la aglutinación frente al AgO, se considera que se trata de una serovariedad difásica. Se evalúa mediante el método de inversión de fase para evidenciar la fase que no fue expresada. Para ello, el AgH ya expresado se enmascara en tubo de agar movilidad de Craigie el cual posee una varilla de vidrio hueca. En primer lugar, se funde el agar movilidad y se le agrega el antisuero flagelar expresado. Una vez que ha solidificado el medio, se siembra la cepa por dentro de la varilla de vidrio por punción y se incuba a 37 °C durante 24 h o hasta que se observe el crecimiento de la cepa en la parte externa del medio. Posteriormente, se transfiere el crecimiento de la parte externa de la varilla de vidrio a un tubo conteniendo CF para la identificación de la fase flagelar no expresada como lo explicado en el punto anterior. De esta manera las células que poseían la fase ya identificada quedan inmobilizadas por el suero flagelar empleado, mientras que las que tenían la fase no expresada conservan su movilidad.

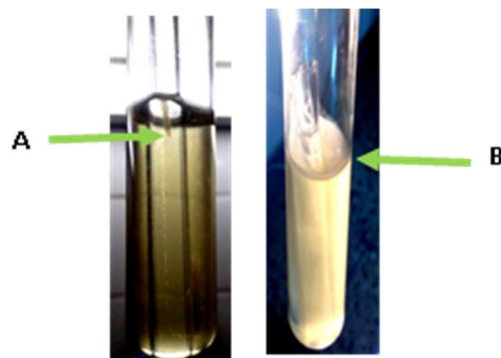


Figura 6: Inversión de fase en agar movilidad de Craigie. A: -siembra de la cepa de *Salmonella* sp. B: Crecimiento de la cepa de *Salmonella* sp. Por fuera de la varilla de vidrio hueco.

En relación con los aislamientos de *Salmonella* spp. conservados en nuestro cepario son principalmente regionales. La mayoría de ellos provienen de diferentes tesis (de grado y postgrado) como así también de muestras de servicio, entre ellas las incluidas en el Plan Nacional de Sanidad Avícola. El principal uso de estas cepas conservadas es para uso en investigación. Entre los temas de la misma están el estudio de la resistencia a antimicrobianos y los mecanismos involucrados.

## CONSIDERACIONES FINALES

La Unidad de Investigación Avícola, como centro de investigación, necesita contar con cultivos confiables para las investigaciones desarrolladas. Por ello, existe un fuerte deseo de conservación a largo plazo de los recursos genéticos para su uso tanto en el presente como en el futuro, ya que con ellos se preserva parte de la biodiversidad y permiten afrontar desafíos en la sanidad animal, como así también desarrollar y transferir tecnología. En este contexto, el cepario del Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Concepción del Uruguay juega un papel crucial en el mantenimiento, conservación y utilización de microorganismos de importancia avícola tanto a nivel regional como nacional.

## BIBLIOGRAFÍA

Arencibia, D., Gámez, R. y Rosario, L. (2008). *Métodos generales de conservación de microorganismos. I Taller Científico de los Laboratorios LIORAD, VI Taller de Colecciones de Cultivos Microbianos y otros Materiales Biológicos*. Finlay Ediciones.

*Manual de Preservación*. (2018). Colección de Cultivos del Servicio Bacteriología Especial, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. <http://www.anlis.gov.ar/?p=2945>.

Waltman, D.W. y Gast, R.K. (2008). *Salmonellosis. A Laboratory Manual for the isolation and identification of Avian Pathogens*. 5th. American Association of Avian Pathologists eds.

Wattiau, P., Boland, C. y Bertrand, S. (2011). Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica Subtyping: Gold Standards and Alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7877-7885. <https://doi.org/10.1128%2FAEM.05527-11>

Colección EEA Corrientes

Responsables/Curadores: Dra. Carla Pertile. e-mail: pertile.carla@inta.gov.ar

Méd. Vet. Néstor Fabián Sarmiento. e-mail: sarmiento.nestor@inta.gov.ar

## **PALABRAS CLAVE**

Hemoparásitos, Babesiosis, Anaplasmosis, *Trypanosomosis*.

## **UBICACIÓN**

La Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA Mercedes, ubicada en la ciudad de Mercedes, Corrientes, y perteneciente al Centro Regional Corrientes (Figura 1), cuenta con el área de Sanidad Animal donde se encuentra un sector denominado “Colección de Hemoparásitos”.



**Figura 1** EEA INTA Mercedes, Corrientes

Existen diversas patologías provocadas por hemoparásitos que afectan a los animales domésticos y son de gran importancia para la producción pecuaria. La principal causa de mortalidad en bovinos adultos en la región se debe a la babesiosis y anaplasmosis bovina, conocidas comúnmente como “complejo tristeza bovina”.

## **COLECCIÓN**

Esta colección se originó en el año 1982 con la finalidad de preservar las cepas originales, patógenas y atenuadas de hemoparásitos para ser utilizadas con diferentes fines de investigación y diagnóstico.

Actualmente, forma parte de la Red de Recursos Genéticos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (REDGEN INTA). Esta Red tiene como objetivo general propiciar la conservación y valorización de los recursos genéticos, además de consolidar una red de bancos de microorganismos, células y ADN.

## **DEFINICIONES**

**Aislamiento:** grupo de hemoparásitos obtenidos de un bovino infectado naturalmente en un determinado momento.

**Cepa:** hemoparásitos mantenidos mediante pasajes en cultivo (*in vitro*) o a través de pasajes en bovinos (*in vivo*).

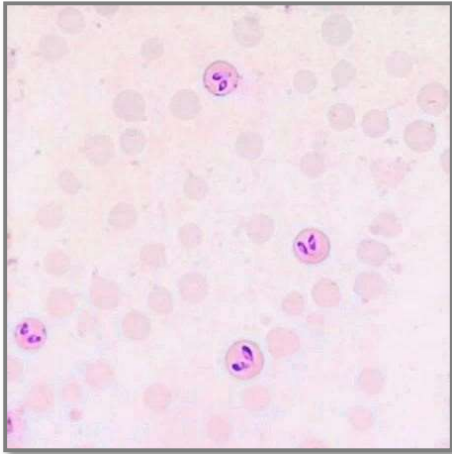
**Pasaje o amplificación:** inoculación de hemoparásitos a un ternero esplenectomizado, monitoreado diariamente hasta detectar una parasitemia adecuada en extendidos finos. Se procede a extraer sangre del animal siguiendo el protocolo establecido para almacenarla (método *in vivo*). Los pasajes se pueden realizar por método *in vitro* mediante cultivos celulares.

## **AGENTES ETIOLÓGICOS**

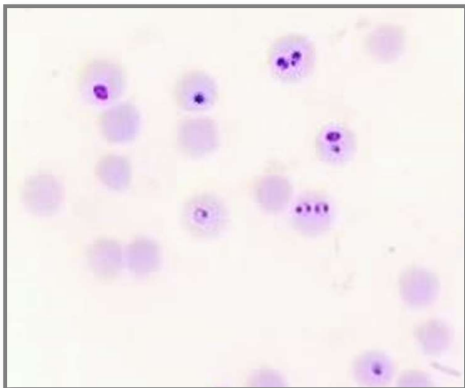
### **Babesia sp.**

En Argentina, los agentes etiológicos de la babesiosis bovina son *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* (Figuras 2 y 3). Ambos agentes generan enfermedades notablemente diferentes en el ganado bovino, aunque estos parásitos están relacionados filogenéticamente (Vanzini, 1994; Guglielmone 1995; Brown y Palmer, 1999). Los dos se transmiten mediante la garrapata común del bovino *Rhipicephalus microplus*, donde cumplen parte de su ciclo biológico (Guglielmone, 1992; Morel et al., 2019).

Los animales infectados con babesiosis pueden presentar síntomas clínicos como debilidad, fiebre, anemia, ictericia, hemoglobinuria, aborto y muerte. Además, en infecciones por *B. bovis*, pueden presentarse síntomas neurológicos (babesiosis nerviosa). (Bock et al., 2004).



**Figura 2:** *Babesia bigemina* en el interior de eritrocitos. Extendido de sangre periférica de bovino. Tinción Giemsa. 100 X.



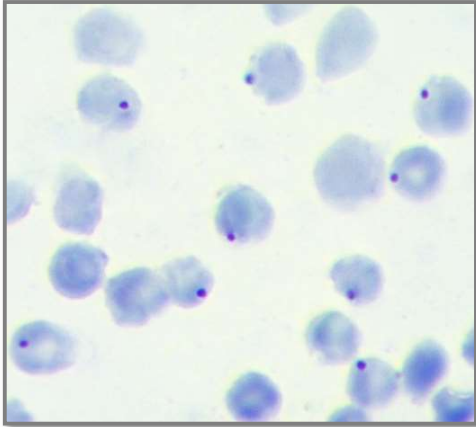
**Figura 3:** *Babesia bovis* parasitando eritrocitos. Extendido de sangre periférica de bovino. Tinción Giemsa. 100 X.

### **Anaplasma spp.:**

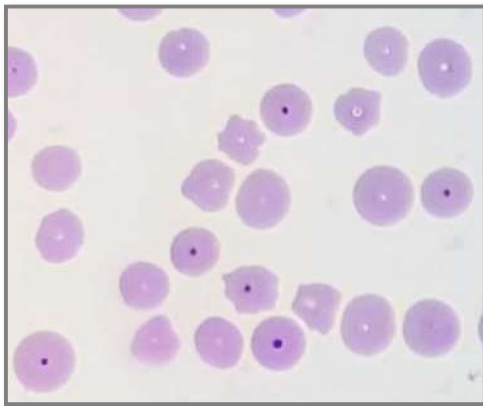
*Anaplasma marginale* es una bacteria gramnegativa que infecta los eritrocitos bovinos (Figura 4), provocando una enfermedad denominada anaplasmosis bovina, caracterizada por cuadros graves de anemia, ictericia, fiebre, pérdida de peso, abortos, letargia y muerte. La transmisión se realiza a través de insectos hematófagos, por vía iatrogénica y por *R. microplus* (Aubry y Geale, 2011).



*Anaplasma centrale* (Figura 5) es una subespecie no patógena ya que no genera sintomatología clínica en los bovinos. Debido a esta característica se utiliza como vacuna viva contra la anaplasmosis causada por *A. marginale*.



**Figura 4:** *Anaplasma marginale* infectando eritrocitos. Extendido de sangre periférica de bovino. Tinción Giemsa. 100 X.



**Figura 5:** *Anaplasma centrale*. Extendido fino de sangre periférica bovina, tinción Giemsa, 100 X.

### **Trypanosomas spp.:**

Los tripanosomas son hemoparásitos flagelados que producen una enfermedad caracterizada por fiebre, anemia, reducción en la producción, pérdida de peso, abortos y, ocasionalmente, la muerte. *Trypanosoma evasi* afecta a los equinos, provocando la enfermedad comúnmente conocida como “mal de caderas” (Figura 6). Se transmiten de forma mecánica por insectos hematófagos y por el murciélago *Desmodus rotundus*,

además es posible la transmisión vertical, oral e iatrogénica (Pertile et al., 2021). *Trypanosoma vivax* es responsable de la tripanosomosis en bovinos. (Figura 7). Infecta un amplio rango de animales domésticos y silvestres, y causa importantes pérdidas económicas en el ganado de áreas tropicales. Los signos clínicos incluyen fiebre, anemia, inapetencia, reducción en la producción de leche, pérdida de peso, abortos y, ocasionalmente, la muerte, aunque algunos animales infectados pueden cursar como asintomáticos (Cadioli et al., 2012).



**Figura 6:** *Trypanosoma vivax* (frotis de sangre capilar bovina. Tinción Giemsa, 100 X)



**Figura 7:** *Trypanosoma evansi*. (extendido fino de sangre capilar de equino, tinción Giemsa, 100X)

## CONSERVACIÓN

El material por conservar se obtiene a partir de la de extracción de sangre del animal enfermo en condiciones asépticas (Figura 8). Luego se estima la parasitemia de extendido fino de la sangre yugular. La sangre extraída se centrifuga para sedimentar el paquete celular y se realizan lavados con *buffer* fosfato salino (PBS) logrando una correcta purificación de eritrocitos (Figura 9).

Las células infectadas con hemoparásitos conservan su viabilidad al agregarse dimetilsulfóxido (DMSO) con PBS o bien polivinilpirrolidona (PVP) (Figuras 10 y 11). Se distribuyen en crioviales de diferentes volúmenes correctamente identificados y se pre-congelan a  $-70^{\circ}\text{C}$  en la capa gaseosa del nitrógeno líquido durante 30 minutos. Finalmente, los viales se mantienen en nitrógeno líquido a una temperatura de  $-195^{\circ}\text{C}$  (Figuras 12 y 13).



**Figura 8:** la sangre con hemoparásitos es colectada del animal en recipientes con anticoagulante (citrato de sodio).



**Figura 9:** acondicionamiento de la sangre extraída para conservarlas (purificación de eritrocitos)



**Figuras 10 y 11:** adición del crioprotector a la sangre. Este procedimiento se realiza en frío y debe ser breve (3 - 5 minutos)



**Figura 12 y 13:** viales identificados y acondicionados para la conservación en termos con nitrógeno líquido.

Cada aislamiento se identifica con un nombre basado en una nomenclatura establecida para cada género, especie y lugar de origen. Para ello se recompila información como los datos del establecimiento donde ocurrió el brote, la ubicación geográfica, la mortalidad y la morbilidad. Además, datos específicos del animal que dio origen a la muestra, como temperatura corporal, parasitemia, hematocrito, especie, sexo, raza y edad.

Actualmente, se mantienen crioconservados en nitrógeno líquido 957 viales que contienen hemoparásitos patógenos y atenuados, teniendo en cuenta las cepas originales y sus respectivas amplificaciones (Figuras 14 y 15).

### **CEPAS PATÓGENAS**

Las cepas patógenas son aquellas que contienen organismos vivos, obtenidos a partir de un caso clínico, que al ser inoculados en un animal susceptible son capaces de reproducir una infección y generar síntomas. Son utilizadas para ensayos con fines de investigación, tales como desafíos en animales inmunizados, control y eficacia de drogas.

Con respecto a especies del género *Babesia*, el laboratorio cuenta con once cepas de *Babesia bovis* originadas de brotes de establecimientos de Corrientes y otras provincias. Con respecto a especies del género *Babesia*, el laboratorio cuenta con dieciocho cepas de *Babesia bovis* originadas de brotes de establecimientos de Corrientes y otras provincias. Además, siete cepas de *Babesia bigemina*. En cuanto a *Anaplasma marginale* existen veintiocho cepas de diferentes orígenes. La última incorporación a la colección de cepas, es de *Trypanosoma evansi*.

En cuanto a *Anaplasma marginale*, existen 23 cepas de diferentes orígenes, la más antigua es del año 1992.



**Figura 14:** termos de nitrógeno líquido que contienen las cepas patógenas.

### **CEPAS ATENUADAS**

Son hemoparásitos que fueron atenuados en su patogenicidad mediante protocolos basados en pasajes sucesivos en terneros esplenectomizados. Corresponden a cepas de *Babesia bovis* (Bbo R1A y Bbo M1A) y de *Babesia bigemina* (Bbi M1A y Bbi S1A). Estas cepas son utilizadas para la elaboración de hemovacuna y ensayos experimentales. La atenuación ha sido importante en el desarrollo de vacunas eficaces contra la babesiosis. Estos pasajes también pueden dar lugar a la selección de fenotipos adicionales, como la incapacidad de transmisión por garrapatas (Berens et al., 2007).

La pérdida de factores de virulencia de *Babesia* spp. podría reflejarse en la ausencia de síntomas de la enfermedad en el ganado vacuno inoculado con la cepa atenuada, a pesar de la presencia de infección en las células huésped (Sachman-Ruiz et al., 2021). Además, se conserva *Anaplasma centrale* que forma parte de las vacunas elaboradas por el INTA.



Figura 15. Termos de nitrógeno líquido que contienen cepas atenuadas de *B. bovis B. bigemina* y *A. centrale*.

## **BANCO DE ADN DE HEMOPARÁSITOS**

Además del mantenimiento de hemoparásitos vivos, se almacena en frío, a  $-80^{\circ}\text{C}$  ADN (ácido desoxirribonucleico) extraído de las cepas del banco y de muestras remitidas al laboratorio de diagnóstico. Este material genético se utiliza para ensayos de análisis de biología molecular. El laboratorio cuenta con colecciones de ADN de *Babesia* sp, *Anaplasma* sp. y *Trypanosoma* sp.

## **CONSIDERACIONES FINALES**

### **Importancia de un banco de recursos genéticos**

Parte de las enfermedades hemoparasitarias, como la babesiosis y tripanosomosis, son causadas por especies de protozoos, parásitos eucariontes que tienen ciclos complejos. Son transmitidos por vectores y comparten muchas rutas metabólicas con sus huéspedes, lo que genera una dificultad en su tratamiento terapéutico y de control (Eichenberger et al., 2017). Si bien se ha logrado un progreso importante en la comprensión de la biología básica y las interacciones huésped-parásito de estos agentes, aun es necesario seguir investigando para lograr un control efectivo de estas etiologías para mejorar la salud animal y humana (Suárez et al., 2019).

Es por esto que conservar el material biológico de los hemoparásitos es esencial para su utilización en investigación.

El material biológico conservado está disponible para su utilización en investigación para las instituciones que lo soliciten. Los recursos genéticos de microorganismos son parte de nuestro patrimonio nacional. Es importante su conservación y gestión, con ellos se preserva parte de la biodiversidad y permiten afrontar desafíos en la sanidad animal, como también desarrollar y transferir tecnología.

## BIBLIOGRAFÍA

Aubry, P. y Geale, D. W. (2011). A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary Emerging Diseases*, 58(1), 1-30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>

Berens, S. J., Brayton, K. A. y McElwain, T. F. (2007). Coinfection with antigenically and genetically distinct virulent strains of Babesia Bovis is maintained through all phases of the parasite life cycle. *Infection and Immunity*, 75(12), 5769-5776. <https://doi.org/10.1128/IAI.00802-07>

Bock, R.E. & Jackson, L. & vos, A.J. & Jorgensen, W.K.. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*. 129 Suppl. S247-69. 10.1017/S0031182004005190.

Brown, W. C., y Palmer, G. H. (1999). Designing blood-stage vaccines against Babesia bovis and B. bigemina. *Parasitology Today*, 15(7), 275-281. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01471-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01471-4)

Cadioli, F. A., Bernabé, P. A., Machado, R. Z., Teixeira, M. C. A., André, M. R., Sampaio, P. H., Fidelis Junior, O. L., Teixeira, M. M. G. y Marqués, L. C. (2012). First report of Trypanosoma vivax outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(2), 118-124. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200009>

Eichenberger, R. M., Ramakrishnan, C., Russo, G., Deplazes, P. y Hehl, A. B. (2017). Genome-Wide Analysis of Gene Expression and Protein Secretion of Babesia Canis during Virulent Infection Identifies Potential Pathogenicity Factors. *Scientific Reports*, 7 (1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03445-x>.



Guglielmono, A. A. (1992). The Level of Infestation with the Vector of Cattle Babesiosis in Argentina. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 87, 133-137. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000700020>.

Guglielmono, A. A. (1995). Epidemiology of Babesiosis and Anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, 57(1-3), 109-119. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)03115-D](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)03115-D)

Morel, N., Mastropaolo, M., Torioni, S. M., Signorini, M., & Mangold, A. J. (2019). Risks of cattle babesiosis (*Babesia bovis*) outbreaks in a semi-arid region of Argentina

Pertile, C. N., Dubois, F., Medina, A. S. y Sarmiento, N. F. (2021). Mortality of equines for *Trypanosoma evansi* in Argentina. Parasitological and molecular diagnostic. *Revista Veterinaria*, 32. <https://doi.org/10.30972/vet.3215648>

Sachman-Ruiz, B., Lozano, L., Lira, J. J., Martínez, G., Rojas, C., Álvarez, J. A., y Figueroa, J. V. (2021). A Comparative Genomic Study of Attenuated and Virulent Strains of *Babesia Bigemina*. *Pathogens*, 10-(3), 318. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030318>.

Suárez, C. E., Alzan, H. F., Silva, M. G., Rathinasamy, V., Poole, W. A. y Cooke, B. (2019). Unravelling the Cellular and Molecular Pathogenesis of Bovine Babesiosis: Is the Sky the Limit?. *International Journal for Parasitology*, 49(2), 183-197. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.002>

Vanzini, V., Ramírez, L., Draghi de Benitez, G., Pereira de Cantero, M., y Ramírez J. (1992). Producción continua y mejoramiento de vacunas contra anaplasmosis y babesiosis bovina. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_produccion\\_continua\\_y\\_mejoramiento\\_de\\_vacuna\\_contra\\_anaplasmosis\\_y\\_babesiosis\\_bovina\\_0.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_produccion_continua_y_mejoramiento_de_vacuna_contra_anaplasmosis_y_babesiosis_bovina_0.pdf).

Colección EEA Rafaela

Responsable/curadora: Lic. MSc. Verónica Neder. E-mail: neder.veronica@inta.gob.ar

## **PALABRAS CLAVE**

Bovinos, *Staphylococcus aureus*, micoplasmas, ADN

## **UBICACIÓN**

La colección se encuentra en la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Rafaela, ubicada en la ruta nacional 34, km 227 de la ciudad de Rafaela, provincia de Santa Fe (Figura 1). La estructura de la EEA se encuentra dentro del Área de Producción Animal.



Figura 1: Edificio de la EEA Rafaela

## **COLECCIÓN**

Los microorganismos representan un papel esencial para el desarrollo de la medicina, la industria, la agricultura y la biotecnología por lo que a escala de laboratorio es fundamental tener procesos de conservación de estos, que deben garantizar que los microorganismos se

mantengan sin alteración en sus características típicas (fenotípicas y genotípicas) y sean viables durante largos periodos de tiempo.

Los microorganismos son seres vivos diminutos que individualmente son demasiado pequeños como para verlos a simple vista. En este grupo se incluyen las bacterias, hongos (levaduras y hongos filamentosos), virus, protozoos y algas microscópicas.

Por lo general, estos pequeños organismos se asocian con infecciones, enfermedades, o deterioro de alimentos. Existen diversas patologías producidas por las bacterias que afectan al ganado bovino, una de las enfermedades multifactoriales causadas por microorganismos es la mastitis, que principalmente daña el tejido mamario y altera la cantidad y calidad de leche producida.

El Laboratorio de Microbiología, perteneciente al Área de Producción Animal de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, dispone de un cepario mayoritariamente de bacterias provenientes de diversas matrices como, por ejemplo, de leche, órganos de bovinos, agua y materia fecal obtenidos del servicio de diagnóstico del laboratorio. Esta colección se originó en el año 1990 con el fin de preservar las cepas patógenas de bovinos para ser utilizados con diferentes fines en investigación, diagnóstico, producción de vacunas, servicios a terceros y resistencia a antibióticos.

El cepario cuenta con aproximadamente 810 especímenes caracterizados mediante pruebas bioquímicas, observación morfológica y algunos por técnicas moleculares como PCR.

Actualmente, el laboratorio forma parte de la Red de Recursos Genéticos Microbianos de INTA cuya finalidad es impulsar la conservación y valorización de un banco de microorganismos para mantener la biodiversidad.

## **GÉNEROS BACTERIANOS DE IMPORTANCIA CONSERVADOS**

### ***Staphylococcus spp.***

Uno de los agentes etiológicos de la mastitis bovina en Argentina es el *Staphylococcus aureus*, que se presenta en forma de cocos, grampositivos, catalasa y coagulasa positivos, que se dividen en más de un plano para formar racimos tridimensionales de células. Son

aerobios facultativos, sal tolerantes, resistentes a la lisozima y sensibles a la lisostafina. La identificación se hace con base en pruebas bioquímicas, coloración de Gram y morfología macroscópica de la colonia.

Los estafilococos son comensales de las superficies corporales de los animales de sangre caliente. Las enfermedades que causan incluyen infecciones agudas, septicemia y toxemias agudas, como por ejemplo la intoxicación alimentaria estafilocócica.

*S. aureus* produce una gama especialmente amplia de sustancias (agresinas y exotoxinas) implicadas en la patogenia. Varían desde componentes de la pared celular, como ácidos teicoicos, hasta una amplia gama de exoenzimas que incluyen la estafiloquinasa, hialuronidasas, fosfatasas, coagulasas, catalasas, proteasas, nucleasas, lipasas, leucocidinas y hemolisinas, y, por último, pero de ningún modo menos importantes, las enterotoxinas que causan intoxicación alimentaria. El modo de acción de la toxina no ha sido esclarecido en su totalidad, pero se cree que tanto los vómitos como la respuesta diarreica son el resultado de la estimulación de neurorreceptores locales existentes en el tracto intestinal y de la transmisión de los estímulos al centro del vómito del cerebro a través del vago y de otras partes del sistema nervioso simpático.

### ***Streptococcus spp.***

En este género encontramos tres especies que producen mastitis en el ganado bovino, *S. agalactiae* (Figura 2), *S. uberis* y *S. dysgalactiae*. Son cocos grampositivos agrupados en cadenas, facultativos anaerobios y catalasa negativos, con producción de hemolisis, hidrólisis de la esculina, *camp test* y crecimiento en medio con CINA al 6.5 %, estas serían las pruebas bioquímicas para la primer identificación.



Figura 2: Colonias de *Streptococcus agalactiae* en agar sangre.

## Enterobacterias

Dentro de este género tenemos *E. coli* y *Salmonella*.

*Escherichia coli*: Son bacilos cortos gramnegativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, catalasa positivos, oxidasa negativos y anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar y algunas son anaerogénicas. Típicamente, la especie es rojo metilo positivo, y Voges-Proskauer negativo. No crece en el medio de citrato de Simmons y la producción de indol es positiva en la mayoría de las cepas. Se pueden diferenciar serológicamente unas de otras con base en los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). Pertenece a la microbiota normal del tracto intestinal de animales.

Existen cepas patógenas tales como la *E. coli* enteropatógena (EPEC) que causa una lesión característica, que implica la destrucción de las microvellosidades sin que exista otro indicio de invasión de los tejidos. También tenemos las *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), dentro de ellas está la cepa *E. coli* O157:H7 que es el serotipo más frecuente dentro de las EHEC.

*Salmonella*: Son bacilos cortos, gramnegativos no formadores de endosporas, anaerobios facultativos, estrechamente relacionados morfológica y fisiológicamente con los otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenecen. Son móviles debido a sus flagelos peritricos, utilizan el citrato como única fuente de carbono, pero no utilizan lactosa ni sacarosa, decarboxilan lisina y pueden producir sulfuro de hidrógeno. Son catalasa positivos, oxidasa negativo, reducen el nitrato a nitrito, entre otros caracteres. La reacción

al rojo de metilo es positiva, la prueba de Voges-Proskauer es negativa y la del indol es negativa. La fenilalanina no es desaminada, la urea no es hidrolizada, la gelatina no es licuada rápidamente en los medios nutritivos y no son producidas ni DNasa ni lipasa. El contenido de G + C del DNA es de 50-53 % moles. Las salmonelas pueden albergar fagos atenuados o plásmidos que codifican los caracteres metabólicos que se utilizan en la identificación (por ejemplo, la producción de H<sub>2</sub>S, las fermentaciones de la lactosa o de la sacarosa).

Las serovariedades adaptadas a determinados hospedadores han causado abortos y enfermedades septicémicas agudas, pero otros tipos causaron diarrea. Los portadores asintomáticos excretan *salmonellas* por las heces. Las salmonelas suelen estar localizadas en el tracto alimentario, pero se pueden encontrar en los ganglios linfáticos (especialmente en los mesentéricos), en el hígado, en la vesícula biliar, en los riñones, en el bazo y en el ovario. Las salmonellas zoonóticas, tal como *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, invaden la luz del intestino delgado, donde se multiplican. Después, atraviesan el íleon y en menor grado el colon, donde se produce una reacción inflamatoria. Los folículos linfáticos pueden aumentar el tamaño y se pueden ulcerar. Los ganglios mesentéricos con frecuencia se inflaman. A veces, las salmonelas atraviesan las barreras mucosa y linfática, llegan a la corriente sanguínea y originan abscesos en varios tejidos.

### ***Mycoplasma spp.***

Son los organismos más pequeños de vida libre que se autorreplican, no tienen pared celular y tienen limitada capacidad metabólica. La carencia de pared celular determina que sean resistentes a los antimicrobianos que interactúan con la pared bacteriana, como betalactámicos. Los micoplasmas pueden causar en bovinos mastitis, enfermedad respiratoria, otitis, artritis, trastornos reproductivos, meningitis y conjuntivitis.

Existen más de once especies de los micoplasmas que se han aislado de bovinos. En nuestro cepario preservamos cuatro especies aisladas de bovino, especialmente de vacas y terneros; *M. bovis*, *M. canadense*, *M. californicum* y *M. leachii*. La identificación de este género se

basa principalmente en la observación microscópica de la colonia en lupa estereoscópica (Figura 3) y confirmación por PCR (Figura 4).

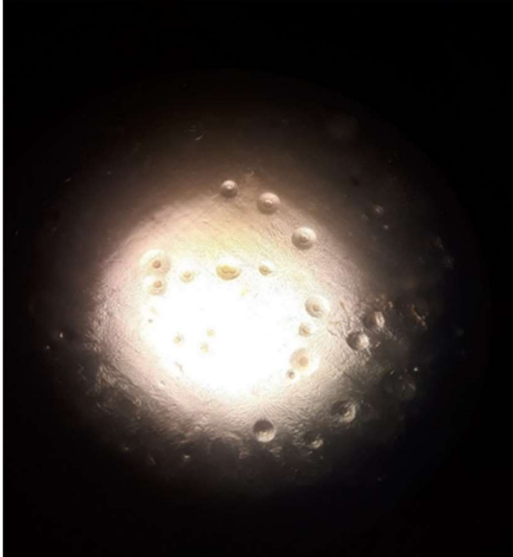


Figura 3: Colonia de *Mycoplasma* spp vista en 4X.

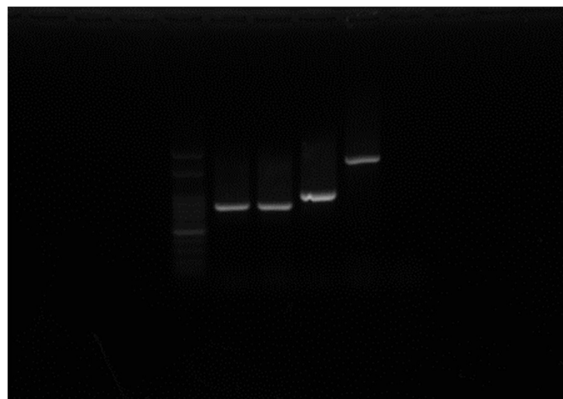


Figura 4: PCR genérica para *Mycoplasma*

### ***Bacillus* spp.**

Es una bacteria grampositiva y aeróbica que se encuentra comúnmente en el suelo. Estos organismos son esporulados y, por lo tanto, pueden tolerar condiciones ambientales muy adversas. *Bacillus cereus* puede causar mastitis aguda, a veces gangrenosa. Se identifica mediante observación macroscópica y microscópica de la colonia, características morfológicas y sensibilidad a penicilina.

## Hongos y Levaduras

Las levaduras están clasificadas dentro del reino *Fungi imperfecti*. Son organismos eucariotas, unicelulares, redondos u ovalados. Durante la reproducción asexual generan brotes o células hijas (blastoconidias). En algunos casos, estas blastoconidias pueden tomar forma lineal, elongada, sin separación evidente para formar pseudohifas. Algunas levaduras como *Candida* pueden producir verdaderas hifas septadas en tejidos animales o en la profundidad de medios agarizados. Las levaduras se observan microscópicamente como elementos grampositivos redondeados a ovals, con brotes, con un tamaño aproximado de 5 a 8  $\mu\text{m}$ .

## CONSERVACIÓN

Para conservar las cepas, el material se obtiene del crecimiento confluyente de las colonias de bacterias, hongos o levaduras en el medio del cultivo requerido para su óptimo crecimiento.

El cultivo fresco se guarda en crioviales que contiene caldo BHI (caldo cerebro corazón) más un crioprotector, en este caso, utilizamos glicerol al 15 % (Figura 5). Se rotula y se guarda en cajas (Figura 6) en el *freezer* de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en el *ultrafreezer* de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 7) y en el termo de nitrógeno líquido (Figura 8). En la Tabla 1, se muestra el detalle de todos los especímenes conservados y en la Tabla 2, el porcentaje de aislamientos por bacterias.





Figura 5: Conservación de cepas

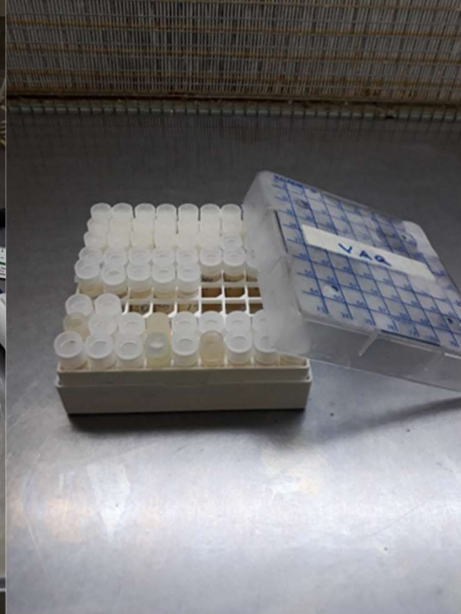


Figura 6: cajas de guardado de viales en freezer



Figura 7: Ultrafreezer -80 °C



Figura 8: Termo de nitrógeno líquido

### **BANCO DE ADN DE BACTERIAS**

Además del mantenimiento del cepario bacteriano, se almacena en frío, a -20 °C el ADN (ácido desoxirribonucleico) extraído de las cepas del banco y de muestras remitidas al

laboratorio de diagnóstico. Este material genético se utiliza para ensayos de análisis de biología molecular. El laboratorio cuenta con colecciones de ADN de *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp. y *E. coli* spp. El ADN se conserva en Eppendorf con agua bidestilada.

<b>Especímenes</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Tipo</b>	<b>Hospedador</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	312	Bacteria	Bovino
<i>Streptococcus agalactiae</i>	68	Bacteria	Bovino (vaca)
<i>Strep. dysgalactiae</i>	17	Bacteria	Bovino (vaca)
<i>Strep. uberis</i>	62	Bacteria	Bovino
<i>Streptococcus mitis</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Streptococcus grupo G</i>	2	Bacteria	Bovino
<i>Salmonella</i> spp.	35	Bacteria	Bovino (ternero, vaca)
<i>Shigella sonnie</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>E. coli</i> spp.	137	Bacteria	Bovino (ternero, vaca)
<i>Mycoplasma bovis</i>	4	Bacteria - ADN	Bovino
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	2	Bacteria - ADN	Gallina
<i>Mycoplasma canadense</i>	1	Bacteria - ADN	Bovino
<i>Mycoplasma californicum</i>	6	Bacteria - ADN	Bovino
<i>Mycoplasma leachi</i>	31	Bacteria - ADN	Bovino
<i>Mycoplasma</i> spp.	45	Bacteria - ADN	Bovino
<i>St aureus P8</i>	1	Bacteria - ADN	Bovino
<i>St. aureus P5</i>	1	Bacteria - ADN	Bovino
<i>St aureus productora biofilm</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>St. aureus productor enterotoxina</i>	11	Bacteria	Bovino
<i>Stap. epidermidis</i>	1	Bacteria	Bovino

<i>Stap. intermedius</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Staph. hyicus</i>	10	Bacteria	Bovino
<i>Staph. xylosus</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Staph. haemolyticus</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Staph simulans</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Staph. saprolitycus</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Brucella spp.</i>	3	Bacteria	Bovino
<i>Brucella abortus</i>	1	Bacteria	Bovino, cabra, búfala
<i>Brucella canis</i>	1	Bacteria	Perro
<i>Brucella suis</i>	3	Bacteria	Porcino
<i>Brucella melitensis</i>	5	Bacteria	Cabra, búfala
<i>Bacillus cereus</i>	7	Bacteria	Bovino
<i>Bacillus subtilis</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Bacillus anthracis</i>	13	Bacteria	Bovino
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	1	Bacteria	ATCC
<i>Pseudomona spp.</i>	1	Bacteria	Bovino - Agua
<i>Klebsiella pneumoni</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Yersinia spp.</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Serratia spp.</i>	2	Bacteria	Bovino
<i>Pasteurella spp.</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Nocardia spp.</i>	8	Bacteria	Bovino
<i>Prototheca spp.</i>	5	Bacteria	Bovino
<i>Trueperella pyogenes</i>	2	Bacteria	Bovino
<i>Corynebacterium spp.</i>	3	Bacteria	Bovino
<i>Corynebacterum bovis</i>	2	Bacteria	Bovino

<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Enterotoccus faecalis</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Streptococcus faecium</i>	1	Bacteria	Bovino
<i>Sarcina</i>	4	Bacteria	Bovino
<i>Moraxella</i> spp.	1	Bacteria	Bovino
<i>Levaduras</i> spp.	1	Bacteria	Bovino
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	30	Bacteria	Suero de quesería
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1	Bacteria	Suero de quesería

Tabla 1: Resumen Banco de cepas RR. GG. Rafaela

<i>St aureus</i>	37 %
<i>St agalactiae</i>	10 %
<i>St uberis</i>	8 %
<i>E. coli</i>	17 %
<i>Mycoplasma</i>	12 %

Tabla 2: Porcentaje de aislamientos por bacterias. Total: 855

## CONSIDERACIONES FINALES

Las colecciones de cultivo bacterianas son depósitos *ex situ* de microorganismos que presentan características nuevas o de importancia potencial para la salud, la industria o el agro, asegurando su preservación, mantenimiento y disponibilidad. Se fomenta aumentar continuamente la colección aceptando el depósito de bacterias similares a las mantenidas en la colección.

## BIBLIOGRAFÍA

- Neder, V.E., Allasia, M., Amadio, M. y Calvinho, L. F. (2018). First report of *Mycoplasma leachii* isolation associated with disease in dairy calves in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(1), 18-21. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.004>.

- Almeida, R. A. y Calvino, L. F. (2019). *Milk Quality*. Editorial Servet.

- De Paoli, P. (2005). Bio-banking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 897–910.  
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.01.005>

Colección Instituto de Patobiología, Hurlingham

Responsable/Curadora: Dra. Mara Martínez. E-mail: martinez.mara@inta.gob.ar

Colaboradores: Dra. Cristina Sánchez, Dra. Micaela Esteban, Dra. Vanina Sarauil, Dra. Micaela Hamer y Dra. Bibiana Brihuega,.

### **PALABRAS CLAVE**

*Leptospira* spp., conservación, cepas, serovares.

### **UBICACIÓN**

Figura 1: Vista exterior del Instituto de Patobiología – UEDD IPVET INTA-CONICET

La colección de *Leptospira* spp. Se encuentra en el Laboratorio de Leptospirosis del Instituto de Patobiología – UEDD IPVET INTA CONICET, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), del INTA), ubicado en Dr. Nicolás Repetto y De Los Reseros, Hurlingham, provincia de Buenos Aires.

El Laboratorio de Leptospirosis es de referencia de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, exOIE) y se encuentra acreditado bajo la Norma de calidad ISO 17025 desde el año 2009. Además, realiza la técnica referencial internacional de diagnóstico serológico, denominada prueba de microaglutinación (MAT), y participa en interlaboratorios organizados por la International Leptospirosis Society (ILS), con laboratorios de Inglaterra, Países Bajos y Australia. Por otro lado, se dedica a la investigación y al diagnóstico de infecciones leptospirales, como también asesora a laboratorios veterinarios y a veterinarios, suministra materiales de referencia a clientes del país y proporciona educación y formación (nacional e internacional). Gracias a los ingresos de estas actividades y a los proyectos financiados por el INTA y el Ministerio de Ciencia y Tecnología, el laboratorio de leptospirosis

tiene margen para la innovación y la investigación. En el mismo se utilizan técnicas moleculares, inmunológicas y biotecnológicas y se cuenta con un banco de cepas.

## **COLECCIÓN**

Se conservan diferentes cepas obtenidas a partir de la colección del Centro de Referencia de Leptospirosis de Royal Tropical Institute (RTI), Países Bajos (Tabla 1), y de cepas provenientes de aislamientos logrados a partir de casos clínicos de bovinos, porcinos, ovinos, caninos, animales silvestres y medio ambiente de la República Argentina (Tablas 2, 3 y 4). Además, estas cepas aisladas fueron adquiridas mediante servicios de diagnóstico que se brindan a terceros y también mediante trabajos de investigación (tesis de doctorado, maestrías y tesinas de grado).

La identidad de las cepas presentes en el Laboratorio de Leptospirosis se verifica mediante pruebas inmunológicas con antisueros específicos (sueros hiperinmunes de conejo) y pruebas moleculares (PCR).

Las cepas de referencia se usan principalmente para investigación, desarrollo de pruebas diagnósticas (Lepto-ELISA; Lepto-LAMP, Lepto-qPCR, kit colorimétrico) y para servicios a terceros como la ejecución de la técnica referencial diagnóstica de leptospirosis MAT. Las cepas aisladas de la Argentina se usan principalmente para investigación (desarrollo de vacunas).

Tabla 1. Cepas de referencia provenientes del Centro de Referencia de Leptospirosis, Royal Tropical Instituto (RTI), Países Bajos.

Serogrupo	Serovar	Cepa	Origen
Australis	australis	Ballico	RTI
Australis	bratislava	Jez Bratislava	RTI
Autumnalis	autumnalis	Akiyami A	RTI
Ballum	castellonis	Castellon 3	RTI
Bataviae	bataviae	Swart	RTI
Canicola	canicola	Hond Utrecht-IV	RTI
Celledoni	celledoni	Celledoni	RTI
Cynopteri	cynopteri	Cynopteri 3522-C	RTI
Djasiman	djasiman	Djasiman	RTI
Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskua V	RTI
Hebdomadis	hebdomadis	Hebdomadis	RTI
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae	RGA	RTI
Icterohaemorrhagiae	copenhageni	Wijnberg-M20	RTI
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae	Ictero I	RTI
Javanica	javanica	Veldrat 46	RTI
Louisiana	louisiana	LSU 1945	RTI
Mini	mini	Sari	RTI
Manhao	Manhao	Manhao	RTI
Panama	panama	CZ 214-K	RTI
Pomona	pomona	pomona	RTI
Pomona	mozdok	Mozdok 5621	RTI
Pomona	proechimys	LT 796	RTI
Pomona	tropica	CZ 299-U	RTI
Pyrogenes	pyrogenes	Salinem	RTI
Ranarum	ranarum	ICF	RTI
Sarmin	sarmin	sarmin	RTI
Sejroe	wolfii	3705	RTI
Sejroe	hardjo	Hardjoprajitno	RTI
Shermani	shermani	1342K	RTI
Tarassovi	tarassovi	Perepelicin	RTI

Tabla 2. Cepas aisladas a partir de bovinos, caninos, porcinos y ovinos.

Serogrupo	Serovar	Cepa	Origen
<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	Venado Tuerto -2	Bovino INTA
<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	Sarmiento C 401	Canino INTA
<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	Avellaneda C 402	Canino INTA
<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	Susana	Bovino
<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	Dr. Stiebel 9410/1	Canino
<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	Valvidia Chile	Feto bovino
<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	Canino zoonosis	Canino INTA
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Canino-cobayo 028	C. de Mayo
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Porcino Brihuega	Porcino INTA



<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Marcos Juárez b-1	Bovino INTA
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Fulton	Bovino INTA
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Macedo Balcarce	Bovino INTA
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Pujato	Bovino INTA
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Cañuelas 1	Porcino INTA
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	San Alfredo 1	Porcino INTA
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Marcos Paz	Porcino MDA2
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Cañuelas 2	Porcino Cañuelas
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Corrientes 289	Bovino Corrientes
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	San Alfredo 2	Porcino Santa Fe
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Corrientes 266	Bovino Corrientes
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Rojas	Bovino Rojas
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Bayur	Bovino Azul
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Las Heras	Bovino Las Heras
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Draghi 1	Bovino Corrientes
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Draghi 2 92/428	Ovino Corrientes
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Stiebel DVC 14583	Feto bovino
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Dr. O Villa	Canino INTA
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Corrientes 87/146	Corrientes
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	Rufino 96-075	Bovino INTA

Tabla 3. Cepas aisladas a partir de animales silvestres

Especie	Serovar	Cepa	Origen
<i>Leptospira Interrogans</i>	<i>Canicola</i>	Hond Utrecht IV	Comadreja ( <i>Didelphis albiventris</i> )
<i>Leptospira Interrogans</i>	<i>Hardjo</i>	Hardjoprajitno	Armadillo ( <i>Chaetopractus villosus</i> )
<i>Leptospira Interrogans</i>	<i>Copenhageni</i>	M 20	Zorro ( <i>Pseudalopex culpaeus</i> )
<i>Leptospira Interrogans</i>	<i>Pyrogenes</i>		Cuis ( <i>Microcavia australis</i> )

<i>Leptospira Interrogans</i>	<i>Copenhageni</i>	M 20	Cuis ( <i>Microcavia australis</i> )
<i>Leptospira Interrogans</i>	<i>Canicola</i>		Ardilla ( <i>Callosciurus erythraeus</i> )
<i>Leptospira Interrogans</i>	<i>Copenhageni</i>		Ardilla ( <i>Callosciurus erythraeus</i> )
<i>Leptospira Interrogans</i>	<i>Canicola</i>		Zorrino ( <i>Conepatus chinga</i> )
<i>Leptospira Interrogans</i>	<i>Copenhageni</i>	M 20	Roedor ( <i>Rattus norvegicus</i> )
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Castellonis</i>	Castellon 3	Roedor ( <i>Rattus rattus</i> ) Roedor
<i>L. interrogans</i>	<i>Muelleri</i>	RM 2	Roedor ( <i>Rattus norvegicus</i> )
<i>L. borgpetersenii</i>			Jabalí ( <i>Sus scrofa</i> )
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Hardjo Bovis</i>		Guanaco ( <i>Lama guanicoe</i> )

Tabla 4. Cepas aisladas a partir del medio ambiente

Serogrupo		Cepa	Origen
Biflexa		Andamana CH-11	CDC-USA
Biflexa		Seramanga Patoc 1	CDC-USA
Biflexa		Andamana IAL	Brasil
Biflexa		Seramanga Sao Paulo	Babudieri
Biflexa		Tapalqué II	LocascioINTA
Biflexa		Salada	LocascioINTA
Biflexa		Buenos Aires I	Babudieri
Biflexa		Ranchos	C.Areco-INTA
Biflexa		Reconquista-A	Castelar-INTA
Biflexa		Longchamps-III	Longchamps INTA
Biflexa		Matto Grosso	Brasil
Biflexa		Dr.A.Seijo 2243	Agua
Biflexa		Dr.A.Seijo 2360	Agua
Biflexa		Dr.A.Seijo-Pergamino	Agua
Biflexa		Dr. Stanchi Salomon 200	La Plata
Biflexa		Dr. Stanchi Cepa 1	La Plata
Biflexa		Dr. Stanchi Cepa 2	La Plata

## CONSERVACION

Las cepas se conservan en medio semisólido de Fletcher y en medio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) a 29 °C, a 21 °C, a -70 °C y a -196 °C (Figuras 2, 3 y 4).

Los hospedadores principales de leptospira son los bovinos, pequeños rumiantes, perros, cerdos, equinos y animales silvestres.





**Figura 4.** Conservación de *Leptospira* spp. En medio de cultivo semisólido Fletcher.

#### **CONSIDERACIONES FINALES:**

La colección de cepas de leptospira (89 en total) desempeña un papel esencial en el diagnóstico, la investigación, el control y la prevención de la leptospirosis en el ámbito agropecuario y científico. El tener la colección conformada con aislamientos de la zona y de la región, permite el diseño de vacunas y el desarrollo de herramientas diagnósticas adaptadas a las cepas circulantes en nuestro país.

La conservación del presente recurso facilita la comprensión de esta enfermedad y el desarrollo de estrategias efectivas para controlar la misma, lo que es beneficioso tanto para la salud animal como para la humana.

#### **BIBLIOGRAFIA**

Brihuega, B., Loffler, S.G., Samartino, L., Romero, G., Auteri, C., Martínez, M. (2017). First Isolation of *Leptospira borgpetersenii* from Fetuses of Wild Boars (*Sus scrofa*). *Electronic Journal of Biology*, 13(1), 63-66.

Brihuega, B., Pavá, M., Cairo, F., Auteri, C., Funes, D., Romero, G. y Samartino, L. (2007). *Leptospira* patógena en riñón de *Didelphys albiventris* (comadreja). *Revista Argentina de Microbiología*, 39, 19.

Brihuega, B., Cacchione, R., Auteri, C., Samartino, L. (2003). Estudio de Leptospirosis en Ciervos de la Provincia del Neuquén. *Revista Acta Bioquímica Clínica Latino Americana*, 1, 102.

Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 296-326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>

Loffler, S. G., Rago, V., Martínez, M., Uhart, M., Florin-Christensen, M., Romero, G. y Brihuega, B. (2015). Isolation of a seawater tolerant *Leptospira* spp. From a southern right whale (*Eubalaena australis*). *PloS One*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144974>

Martino, P., Sassaroli J., Calvo J., Zapata, J. y Gimeno, E. (2008). A mortality survey of free range nutria (*Myocastor coypus*). *European Journal of Wildlife Research*, 54, 293-297. <https://doi.org/10.1007/s10344-007-0146-7>

Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 297-307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>

Rossetti, C. A., Uhart, M., Romero, G. y Prado, W. (2003). Detection of leptospiral antibodies in caimans from the Argentinean Chaco. *Veterinary Record*, 153(20), 632-633. <https://doi.org/10.1136/vr.153.20.632>

Stanchi, N. O., Grisolia, C. S., Martino, P.E. y Peluso, F. O. (1986). Presence of antileptospira antibodies in ophidian in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 18(3-4), 127-30.

Thibeaux, R., Girault, D., Bierque, E., Soupé-Gilbert, M. E., Rettinger, A., Douyère, A., Meyer, M., Iraola, G., Picardeau, M. y Goarant, C. (2018). Biodiversity of environmental *Leptospira*: Improving identification and revisiting the diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 816. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816>

Colección Instituto de Virología, Hurlingham

Responsable/Curadora: Dra. Andrea Pecora. e-mail: [apecora@diagnogen.com.ar](mailto:apecora@diagnogen.com.ar)

### **PALABRAS CLAVE**

Virus, salud animal, línea celular

### **UBICACIÓN**

La colección se localiza en el Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT) que funciona en el Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del INTA Castelar. Se encuentra ubicado entre las calles Las Cabañas y De Los Reseros de Hurlingham, provincia de Buenos Aires (Figura 1).



Figura 1. Equipo de trabajo del CICVyA

### **COLECCIÓN**

Por un lado, la colección está conformada por diferentes virus de importancia en salud animal cuyos hospedadores son aves, bovinos, ovinos, equinos, porcinos y abejas. Actualmente, el IV cuenta con 34 especies de virus diferentes (ARN y ADN), agrupadas en 16 familias y divididas en cepas de referencia y aislamientos de campo (Tabla 1). Las

demandas de las instituciones tanto públicas como privadas nos llevan a administrar y compartir estos materiales biológicos.

Agente viral	Familia
Virus de la fiebre aftosa inactivado	<i>Picornaviridae</i>
Herpesvirus bovino 1 y 5	<i>Herpesviridae</i>
Herpes mamilitis	<i>Herpesviridae</i>
Enterovirus bovino	<i>Picornaviridae</i>
Rinovirus equino	<i>Picornaviridae</i>
Virus de la rabia (P3)	<i>Rhabdoviridae</i>
Virus de la diarrea viral bovina 1, 2, 3	<i>Flaviviridae</i>
Virus del oeste del Nilo	<i>Flaviviridae</i>
Parainfluenza bovina 3	<i>Paramixoviridae</i>
Adenovirus 1 y 5	<i>Adenoviridae</i>
Virus de la lengua azul	<i>Reoviridae</i>
Rotavirus bovino	<i>Reoviridae</i>
Rotavirus equino	<i>Reoviridae</i>
Virus de la leucosis bovina	<i>Retroviridae</i>
Virus de la leucosis bovina	<i>Retroviridae</i>
Maedi Visna (ovino)	<i>Retroviridae</i>
Caev (caprino)	<i>Retroviridae</i>
Virus sincicial respiratorio bovino	<i>Pneumoviridae</i>
Virus de la arteritis viral equina	<i>Arteriviridae</i>
Virus de la influenza equina	<i>Orthomyxoviridae</i>

Tabla 1: detalle de los agentes virales conservados en el cepario.

Por otro lado, en la colección se conservan numerosas líneas celulares en el sector de Cultivo de Tejidos del IVIT. Estas se utilizan para diversas finalidades, entre ellas para la replicación y conservación de virus, así como para llevar a cabo técnicas diagnósticas como seroneutralizaciones virales, aislamientos virales de casos clínicos, etc. Por otra parte, se brinda el servicio de provisión de líneas celulares a empresas privadas y a otras instituciones de investigación, universidades, etc. Este sector es miembro activo del Asociación Banco

Argentino de Células (ABC) y realiza sobre las colecciones estrictos controles de calidad y de detección de agentes adventicios.

### TÉCNICAS DE AUTENTIFICACIÓN

Las técnicas más utilizadas para autentificar los virus son PCR, secuenciación, filogenia, cultivo celular e inmunofluorescencia. Para controlar las células, se utilizan métodos moleculares y de cultivo de tejidos para análisis de agentes adventicios (Imagen 2 y 3) (Payne, 2017).



Figura 2: Microscopio invertido utilizado para observar cultivos celulares

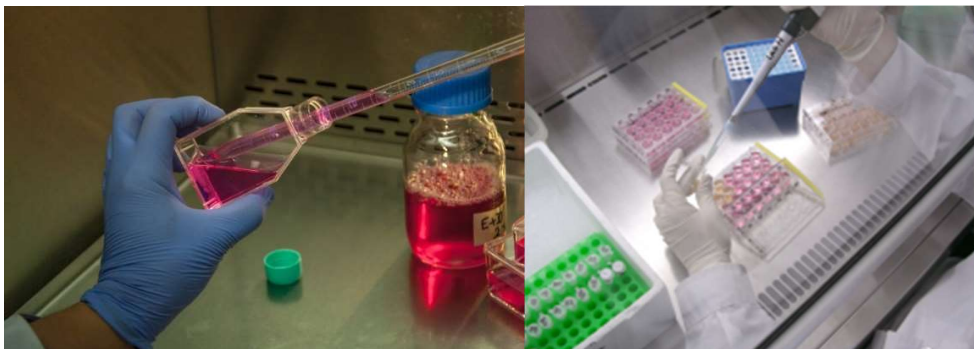


Figura 3: trabajo de replicación de células e infección de cultivos celulares en cabinas de bioseguridad biológica. Izquierda: desprendimiento de células de frasco T25 para sembrar otro frasco de mayor capacidad. Derecha: Infección de cultivo celular MDBK con un inóculo viral.

Todos los agentes conservados en el IVIT fueron y son fruto de compras a organismos de referencia y también de permanentes colaboraciones con universidades e institutos de



investigación de numerosos países. A esto se le suma la variedad de agentes virales que han sido aislados y caracterizados por los integrantes del IVIT a lo largo de 40 años de trabajo, obtenidas a partir de productos biológicos y de muestras de casos clínicos provenientes de todo el país.

Con respecto a las líneas celulares, se obtuvieron a partir de compras a organismos de referencia y también otras líneas se han desarrollado en el IVIT.

Los principales usos de los materiales son los servicios a terceros (instituciones públicas y privadas, nacionales y extranjeras), la utilización en el desarrollo de vacunas y de kits de diagnóstico.

#### **TRANSFERENCIA DE LOS ÍTEMS**

Para la transferencia de agentes virales, trabajamos con registros para los ingresos y egresos de material. Cada evento de transferencia lleva un Acuerdo de Transferencia de Materiales (ATM) con la firma de la directora del instituto, así como el registro en un libro de actas, y se prepara un *datasheet* de cada agente a transferir, donde se detalla la peligrosidad del material, el procedimiento de desinfección y los cuidados recomendados para su uso. El transporte se realiza en triple envase diseñado para material infeccioso (tipo SISTEG), que puede ser provisto por el interesado en la adquisición del material o por el IVIT, según el caso. Poseemos modelos de ATM en español y otro en inglés, revisados por el personal de Vinculación Tecnológica del CICVyA, en donde se detalla el uso del material y la finalidad de uso.

#### **CARACTERÍSTICA PARTICULAR DE LA COLECCIÓN**

En el Laboratorio de Bioseguridad NSB4-OIE, perteneciente al IVIT, es posible conservar agentes virales que requieran mayores cuidados de bioseguridad debido al nivel de riesgo que presentan. Hay pocos laboratorios en el país con este nivel de seguridad, y nos permite conservar agentes zoonóticos y otros ya erradicados, por ejemplo, virus de la influenza

pandémico, Virus del oeste del Nilo, virus de la rabia, Virus de la fiebre aftosa y virus de la lengua azul.

### **CONSERVACIÓN**

La conservación de los diferentes ítems se realiza mediante el uso de termos criogénicos con nitrógeno líquido a -196 °C y *ultrafreezer* de -80 °C.

### **CONSIDERACIONES FINALES**

En el caso particular de los ceparios virales, la infraestructura necesaria para su gestión y mantenimiento es importante, debido a la necesidad de contar con *ultrafreezers*, cabinas de bioseguridad, cultivos celulares, numerosos reactivos, en su mayoría importados, y mano de obra calificada para trabajar con cultivos celulares y stocks virales.

El IVIT ha tomado la decisión de organizar y gestionar el cepario, y mantenerlo en el tiempo, lo cual puede ser un punto crítico en este tipo de actividades institucionales.

El cepario contiene virus animales que son altamente relevantes no solo para salud animal, sino también desde el punto de vista zoonótico. La importancia de conservar estos agentes radica en parte en que pueden llegar a contribuir a una mejor anticipación de la emergencia viral y en la búsqueda de superar posibles crisis sanitarias (Coutard et al., 2020).

### **BIBLIOGRAFÍA**

1- Payne, S. (2017). Methods to Study Viruses. *Viruses*, 37-52. <https://doi.org/10.1016%2FB978-0-12-803109-4.00004-0>

2- Coutard, B., Romette, J. L., Miyauchi, K., Charrel, R., Prat, C. M. A., EVA Zika Workgroup y EVA COVID-19 Workgroup. (2020). The Importance of Biobanking for Response to Pandemics Caused by Emerging Viruses: The European Virus Archive As an Observatory of the Global Response to the Zika Virus and COVID-19 Crisis. *Biopreservation and Biobanking*, 18(6), 561-569. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.011>

**Verónica Neder y Romanela Marcellino**

Las Colecciones de Cultivos Microbianos (CCM) intercambian, importan, exportan y suministran microorganismos a instituciones que necesitan adquirirlos, utilizarlos y mantenerlos de forma viable.

El manejo y transporte inadecuado de diferentes ítems (muestras, cultivos y cepas) significa un riesgo para las personas en contacto con los mismos, para el medio ambiente y para la comunidad en general. El transporte seguro de materiales peligrosos compete a todas las personas involucradas en el proceso: profesionales, personal de laboratorio y personal de empresas de transporte terrestre o aéreo.

Para garantizar la seguridad pública y minimizar los riesgos que presentan los materiales peligrosos se deben establecer regulaciones precisas para el transporte seguro.

Está absolutamente prohibido el envío de materiales infecciosos sin marcas ni identificaciones, el transporte en mano o el uso de valija diplomática. Los envíos efectuados de esta forma representan un riesgo para los transportadores y para el personal del laboratorio que los recibe, ya que muchas veces los paquetes son abiertos por secretaría.

Las reglamentaciones y procedimientos para el envío seguro de sustancias peligrosas son establecidos por el United Nations Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods, integrado por: Internacional Civil Aviation Organization (ICAO), Internacional Air Transport Association (IATA), Department of Transportation (DOT), United States Postal Service (USPS), entre otras organizaciones.

Estas reglamentaciones son adoptadas por las autoridades reguladoras del transporte en todo el mundo. El Comité de Naciones Unidas establece los requerimientos de

empaquetado y etiquetado, y efectúa revisiones periódicas de las definiciones de los distintos tipos de materiales. Actualmente, en las definiciones se incluyen los microorganismos recombinantes, mutantes o híbridos y los priones como agentes infecciosos.

En Argentina, el transporte seguro de muestras ha sido siempre un tema de preocupación. El Ministerio de Salud de la Nación ha publicado resoluciones concordantes con las reglamentaciones y procedimientos establecidos por Naciones Unidas.

Para el transporte de mercancías peligrosas se encuentra en vigencia la Resolución 195/97, referida al transporte de mercancías peligrosas por carretera que incorpora normas técnicas del Decreto 779/95. A su vez, el Instituto Argentino de Normalización ha publicado la Norma IRAM 80058-1 con elementos aclaratorios sobre el tema. Se debe destacar que cada país de Latinoamérica tiene sus propias normas jurídicas que se deben consultar ante la necesidad de envíos de materiales biológicos.

### **Clasificación de los microorganismos por grupo de riesgo**

Los microorganismos infecciosos se ubican en cuatro grupos de riesgo en función de su patogenicidad, forma y facilidad de transmisión, grado de riesgo para las personas y la comunidad, y la reversibilidad de la enfermedad por la disponibilidad de tratamiento.

#### **Grupo de riesgo I (escaso riesgo individual y comunitario)**

Microorganismos con muy poca probabilidad de provocar enfermedades humanas o de importancia veterinaria.

#### **Grupo de riesgo II (riesgo individual moderado, riesgo comunitario limitado)**

Agente patógeno que puede causar enfermedades en humanos y animales, pero tiene pocas probabilidades de ser un riesgo grave para el personal de laboratorio, la comunidad y el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede causar una infección seria, pero se dispone de medidas eficaces de tratamiento y prevención, y el riesgo de propagación es limitado.

**Grupo de riesgo III** (riesgo individual elevado, riesgo comunitario escaso)

Agente patógeno que puede provocar enfermedades graves en humanos y animales, pero que no se propaga de una persona infectada a otra.

**Grupo de riesgo IV** (elevado riesgo individual y comunitario)

Agente patógeno que suele provocar enfermedades graves en las personas y en los animales, que se puede transmitir de un individuo a otro, directa o indirectamente. En general, no se dispone de tratamiento efectivo.

A los efectos del transporte sin riesgo, las expresiones “sustancias infecciosas” y “material infeccioso” se consideran sinónimos y se definen de la siguiente manera, según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

**Sustancias infecciosas:** son todas las sustancias que contienen un microorganismo viable tal que causa o se cree que puede causar enfermedades en humanos y animales. Estos microorganismos pueden ser bacterias, virus, hongos, parásitos o rickettsias.

**Especímenes para diagnóstico:** es cualquier material humano o animal, como excreciones, sangre, suero, plasma, tejidos y fluidos corporales que se ha recogido con fines de diagnóstico, pero no incluye animales vivos infectados.

**Productos biológicos:** son aquellos productos acabados destinados al uso humano o veterinario, elaborados conforme a los requisitos de las autoridades competentes y que se transportan con aprobación de dichas autoridades o los productos acabados que se utilizarán en un desarrollo técnico o una investigación antes de obtener la licencia o que estén destinados al tratamiento experimental de animales. Dentro de esta definición se encuentran los productos no acabados que han sido preparados según los procedimientos establecidos por organismos gubernamentales competentes. Las vacunas que contienen gérmenes vivos destinados al uso humano o animal se consideran productos biológicos y no sustancias infecciosas.

**Transporte**

El transporte de muestras o especímenes para diagnóstico puede ser interno, desde un laboratorio a otro laboratorio, dentro de la misma institución; o externo, de una institución a otra, ya sea por vía terrestre o aérea.

Siempre deben tenerse en cuenta los principios de transporte seguro porque no debe existir ninguna posibilidad de escape del material bajo las circunstancias normales de transporte.

**Transporte dentro de la institución:** cuando se transportan muestras dentro de la institución, los recipientes que las contienen deben ser herméticos y a prueba de fugas de líquido. Pueden ser de plástico o de vidrio debidamente identificados, y sin restos de material biológico en la superficie externa del envase. Toda indicación con el nombre, número de historia clínica, tipo de análisis y/o breve descripción del cuadro clínico no se debe envolver alrededor del tubo, sino que se coloca por separado, preferentemente en bolsas plásticas. Si el recipiente es un tubo, debe tener cierre hermético con tapa a rosca y se tiene que colocar en gradillas de manera que conserven su posición vertical.

Los recipientes con las muestras se colocan en una caja resistente, a prueba de pérdida de líquidos, con una cubierta segura y cierre ajustado. Esta caja debe tener la indicación del material que transporta.

**Transporte de una institución a otra:** cuando se transportan muestras de una institución a otra, sea corta o larga distancia, se deben utilizar los envases que cumplan con las especificaciones 6.2 de Naciones Unidas que es la División en que están incluidas las sustancias infecciosas y las toxinas.

El sistema de transporte utilizado es el de triple envase, que consiste en:

a) Recipiente primario: es un envase resistente al agua con cierre hermético para evitar cualquier derrame o fuga, que contiene la muestra. Este recipiente perfectamente rotulado va envuelto en material absorbente para contener los líquidos en caso de pérdida o rotura. Es fundamental que el exterior no esté contaminado con materiales biológicos (Figura 1).

b) Recipiente secundario: es un envase resistente e impermeable que contiene y protege al recipiente primario. Este embalaje debe ser resistente a roturas o perforaciones que dejen

escapar el contenido al envoltorio externo. Varios recipientes primarios envueltos en forma independiente y protegidos con material absorbente se pueden colocar en un recipiente secundario. Los contenedores primarios y secundarios deben pasar satisfactoriamente la prueba de control que consiste en someterlos a una presión de 95 kPa a temperaturas entre 40 °C a 55 °C (Figura 1).

c) Recipiente terciario o envoltorio externo (Figura 1): el recipiente secundario se coloca en un envoltorio externo que lo protege a él y a su contenido de influencias externas como daño físico y agua mientras está en tránsito.

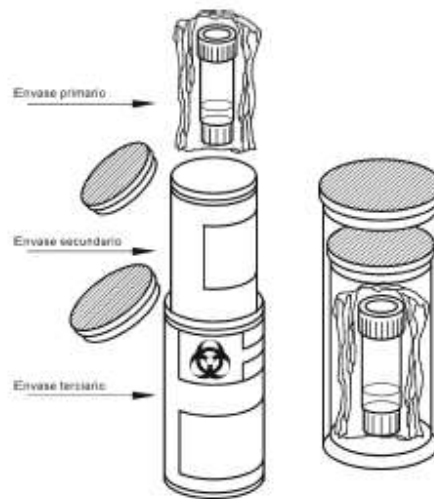


Figura 1: Envases primario, secundario y terciario según la OMS80058. Tomado de la Norma IRAM 80058-1:2003

### **Etiquetado de las encomiendas:**

#### *Sustancia infecciosa*

Se utiliza para sustancias infecciosas y microorganismos modificados genéticamente, que cumplan con la definición establecida por la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA). En algunos países se exige incluir la siguiente declaración: "Si el paquete sufre daños o fugas, notifíquelo inmediatamente a las autoridades de salud pública". (Figura 2).



Figura 2: Etiqueta de peligro para sustancias infecciosas.

### *Misceláneos*

Se usa para microorganismos no infecciosos modificados o no genéticamente y para envíos con hielo común o hielo seco (dióxido de carbono). En casos de envíos con hielo común se debe utilizar un recipiente a prueba de fuga de líquido. El hielo debe colocarse por afuera del recipiente secundario. El envase terciario debe ser uno con características especiales para contener el hielo y evitar que se dañe cuando este se haya derretido. (Figura 3).

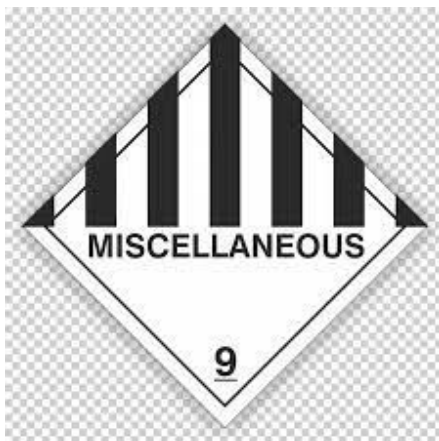


Figura 3: Etiqueta de misceláneos.

### *Orientación del paquete*

Indica la posición correcta de envases con cultivos líquidos de organismos infecciosos y/o modificados genéticamente mediante flechas. (Figura 4).

Debe contener la siguiente información: nombre, dirección y teléfono del remitente y del destinatario.



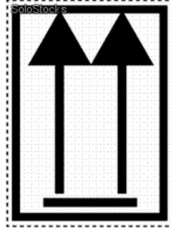


Figura 4: Etiqueta de orientación del paquete.

## CONCLUSIONES

Es fundamental realizar un adecuado de transporte de los materiales, en este caso, microorganismos, a fin de asegurar la trazabilidad, calidad e inocuidad de estos, adecuándolos a las normativas vigentes para cada caso y lugar de transferencia de los materiales biológicos.

## BIBLIOGRAFÍA:

Weng Alemán Z., Davel G. y Oberá Ratón T. (2014). Guía Técnica para la importación, exportación y transporte de cultivos microbianos. Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivo. Recuperado de [http://www.aam.org.ar/src/img\\_up/25112015.3.pdf](http://www.aam.org.ar/src/img_up/25112015.3.pdf).

Mastromónaco, G. M. (2015). Criterios para asegurar la trazabilidad y calidad de los cultivos microbianos de referencia. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de General San Martín. Instituto de la Calidad Industrial] Recuperado de <https://www.unsam.edu.ar/institutos/incalin/repositorio/Maestria/GladysMastromonaco.pdf>.

Mesa Ramírez, D. P. y Bernal, A. A. (2005). Protocolos para la preservación y manejo de las colecciones biológicas. *Boletín Científico - Centro de Museos - Museo de Historia Natural*. Recuperado de [https://issuu.com/jpinto2/docs/2006\\_mesa-bernal\\_protocpreservmanej](https://issuu.com/jpinto2/docs/2006_mesa-bernal_protocpreservmanej).

World data center for microorganisms. [Internet]. [cited 2013 Nov 2]. Available from: <http://www.wfcc.info>.

Rohde, C. y Smith, D. (2013). International Regulations for Packaging and Shipping of Microorganisms. *European Biological Resource Centres Network Information Resource*.

Recuperado de

[https://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/Microbiology/Dateien/EBRCN\\_information\\_transport\\_\\_August\\_2013.pdf](https://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/Microbiology/Dateien/EBRCN_information_transport__August_2013.pdf).

## **El Protocolo de Nagoya y sus implicancias en RRGG vinculados a Sanidad Animal. Construcción de Acuerdos de Transferencia de Materiales Conservados en RRGG Microbianos.**

Alejandro Peticari y Rocío Fernanda Espinosa.

A partir del Convenio de Diversidad Biológica (CDB), durante la cumbre de la Tierra en Río '92 se cristalizaron varios procesos y tensiones que expresaban la preocupación internacional sobre la rápida pérdida de la biodiversidad (Swanson, 1999). El CDB reafirma que los Estados tienen derechos soberanos sobre sus propios recursos biológicos al tiempo que los responsabiliza de la conservación de su biodiversidad y de la utilización sostenible de sus recursos biológicos (Naciones Unidas, 1992).

**El Convenio de las Naciones Unidas sobre Diversidad Biológica reconoce la soberanía de los estados sobre sus recursos naturales Y también sobre sus recursos genéticos, los cuáles hasta entonces los consideraban de libre acceso y patrimonio de la humanidad.**

En el Artículo 2 del Convenio se definen los términos utilizados como por ejemplo:

**Material genético:** Se entiende todo material de origen animal, vegetal o microbiano o de otro tipo que contenga unidades funcionales de la herencia.

**Recursos genéticos:** Se entiende al material genético de valor real o potencial

**Recursos biológicos:** Se entiende los recursos genéticos, los organismos o parte de ellos, las poblaciones, o cualquier tipo del componente biótico de los ecosistemas de valor o utilidad real o potencial para la humanidad.

**País de origen de recursos genéticos:** Se entiende el país que posee esos recursos genéticos en condiciones *in situ*.

**País que aporta recursos genéticos:** Se entiende el país que suministra recursos genéticos obtenidos de fuentes *in situ*, incluidas las poblaciones silvestres o domesticadas, o de fuentes *ex situ* que pueden tener o no su origen en ese país.

Este Convenio es el único instrumento internacional que aborda de manera exhaustiva la diversidad biológica.

**El Convenio de las naciones Unidas sobre Diversidad Biológica se aprueba en 1992 Y Argentina ratifica su texto mediante la ley 24.375 de 1994, que es vigente en 1995**

**El CDB tiene 3 objetivos**

- 1. La conservación de la diversidad biológica**
- 2. El uso sostenible de sus componentes**
- 3. La participación justa y equitativa de los beneficios que se deriven de la utilización de los RRG.**

El Convenio reconoce la soberanía de los estados sobre sus recursos genéticos, lo que conlleva a que el acceso de los mismos queda sometido a regulación nacional. A pesar de ello, el CDB dispone una regulación básica sobre el acceso de los recursos genéticos y la distribución de los beneficios.

Establece un sistema bilateral de acceso y distribución de beneficios que contiene dos instrumentos:

**Consentimiento fundamentado Previo:** Autorización oficial del estado como soberano sobre esos recursos

**Condiciones mutuamente acordadas:** Se trata de un acuerdo logrado entre los proveedores de los RRGG y los usuarios respecto a las condiciones de acceso y utilización de los recursos como así también la participación en los beneficios entre todas las partes.

La Conferencia de las Partes del Convenio con el fin de aplicar efectivamente los artículos 15 (Acceso a los recursos genéticos) y 8 j) (Conocimientos tradicionales) del Convenio así como sus tres objetivos, con un Grupo de trabajo especial de composición abierta sobre acceso y participación de beneficios, luego de seis años de negociaciones adoptó el Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que Deriven de su Utilización al Convenio de la Diversidad Biológica, en la décima reunión de la Conferencia de las partes, celebrada en Nagoya, Japón, el 29 de Octubre de 2010.

El Protocolo tiene como fin impulsar notablemente el tercer objetivo del Convenio, proporciona una base sólida para una mayor certeza y transparencia jurídica tanto para los proveedores como para los usuarios de recursos genéticos. El objetivo complementario es asegurar que la participación en los beneficios también contribuya a el primer y segundo objetivo del CDB: conservación de la biodiversidad y utilización sostenible de sus componentes.

El ámbito de aplicación del Protocolo es sobre los recursos genéticos comprendidos en el ámbito del artículo 15 del Convenio y a los beneficios que se deriven de la utilización de dichos recursos, como así también se aplicará a los conocimientos tradicionales asociados a los recursos genéticos

comprendidos en el ámbito del Convenio y a los beneficios que se deriven de la utilización de dichos conocimientos.

EL Protocolo impulsa que cada parte asuma el cumplimiento de la legislación o los requisitos reglamentarios nacionales de la Parte que proporciona los recursos genéticos, y la obligación de convenir condiciones de cooperación mutuamente acordadas. Las disposiciones del Protocolo tienden a asegurar la participación de los beneficios tanto para la parte que recibe el recurso como para aquella que lo provee.

El Protocolo cuenta con 3 pilares:

-Autorización de acceso, debido a que se reconoce la soberanía de los países sobre sus recursos genéticos, las partes del Protocolo deben otorgar a los usuarios que utilicen recursos genéticos de su territorio una autorización de acceso. El Protocolo incluye también a los conocimientos tradicionales asociados a los Recursos genéticos.

-Distribución de beneficios: los beneficios, ya sean monetarios como no monetarios, que deriven de la utilización de recursos genéticos, así como las aplicaciones y comercialización subsiguientes y en el caso de que los recursos genéticos se encuentren en posesión de comunidades indígenas y locales, se compartirán de manera justa y equitativa entre la parte que recibe el RRGG y la que aporta dichos recursos, esta participación se establecerá en las condiciones mutuamente acordadas.

Las partes deberán establecer las medidas legislativas, administrativas o de política que sean necesarias para el cumplimiento del protocolo.

-Medidas de cumplimientos y puntos de verificación: el Protocolo dispone la obligación de monitorear la utilización de los recursos provenientes de otros países, como así también la de designar al menos un (1) punto de verificación que deberá recolectar o recibir información relativa al consentimiento fundamentado previo, con la fuente del recurso genético, con el establecimiento de condiciones mutuamente acordadas y/o con la utilización de recursos genéticos.

Asimismo, las disposiciones del Protocolo relativas al acceso a los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas y locales cuando dichos conocimientos están relacionados con recursos genéticos fortalecen la capacidad de esas comunidades para beneficiarse del uso de sus conocimientos, innovaciones y prácticas. El Protocolo consta de 36 artículos y un anexo sobre Beneficios monetarios y no monetarios. En particular se destacan El artículo 5 de participación justa y equitativa en los beneficios, el 6 sobre el acceso a los RRGG y el 7 y 12 referidos a los conocimientos tradicionales asociados a RRGG.

La Constitución Nacional otorga el dominio originario de los Recursos Naturales a las Provincias en virtud de lo cual cada una de ellas debe contar con legislación propia sobre acceso y uso de los RRGG. La entonces Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable realizó en 2019 una recopilación de normas relacionadas con los RRGG en las 23 Provincias y la Administración de

Parques Nacionales (SAyDS, 2019)<sup>1</sup>. Se observa que no todas las Provincias regula al respecto, y algunas si lo hacen, cuentan con legislaciones que son deficientes o están desactualizadas al contexto internacional y a la entrada en vigencia del TIRFAA (15/08/2016) y el Protocolo de Nagoya (9/03/2017).

El Protocolo se aplica sobre RRGG o conocimientos tradicionales asociados a recursos genéticos cuando son utilizados de acuerdo a la definición del artículo 2c: “realización de actividades de investigación y desarrollo sobre la composición genética y/o composición bioquímica de los RRGG, incluyendo mediante la aplicación de biotecnología”.

La Resolución 410/19 de la entonces SAyDS, se ocupa de regular el acceso a los Recursos Genéticos (RRGG) para su uso en casos que tengan como objetivo fines comerciales y aquellas investigaciones con fines no comerciales, contiene dos elementos fundamentales a la hora de solicitar el acceso, que son el Consentimiento Fundamentado Previo (CIP) y las Condiciones Mutuamente Acordadas (CMA).

Esta norma estableció pautas mínimas para el cumplimiento del Protocolo de Nagoya en nuestro país.

Por otra parte, excluye expresamente a los recursos genéticos humanos, Recursos genéticos de especies domesticadas o cultivadas, el uso de recursos biológicos que no implique la utilización de sus componentes genéticos y/o bioquímicos (salvo que los recursos biológicos sean objeto de utilización de su composición genética y/o bioquímica) y los recursos Fitogenéticos que sean utilizados para la Alimentación y la Agricultura que se encuentren

---

<sup>1</sup> [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/recopilacion\\_normativa\\_rrgg\\_2019.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/recopilacion_normativa_rrgg_2019.pdf)



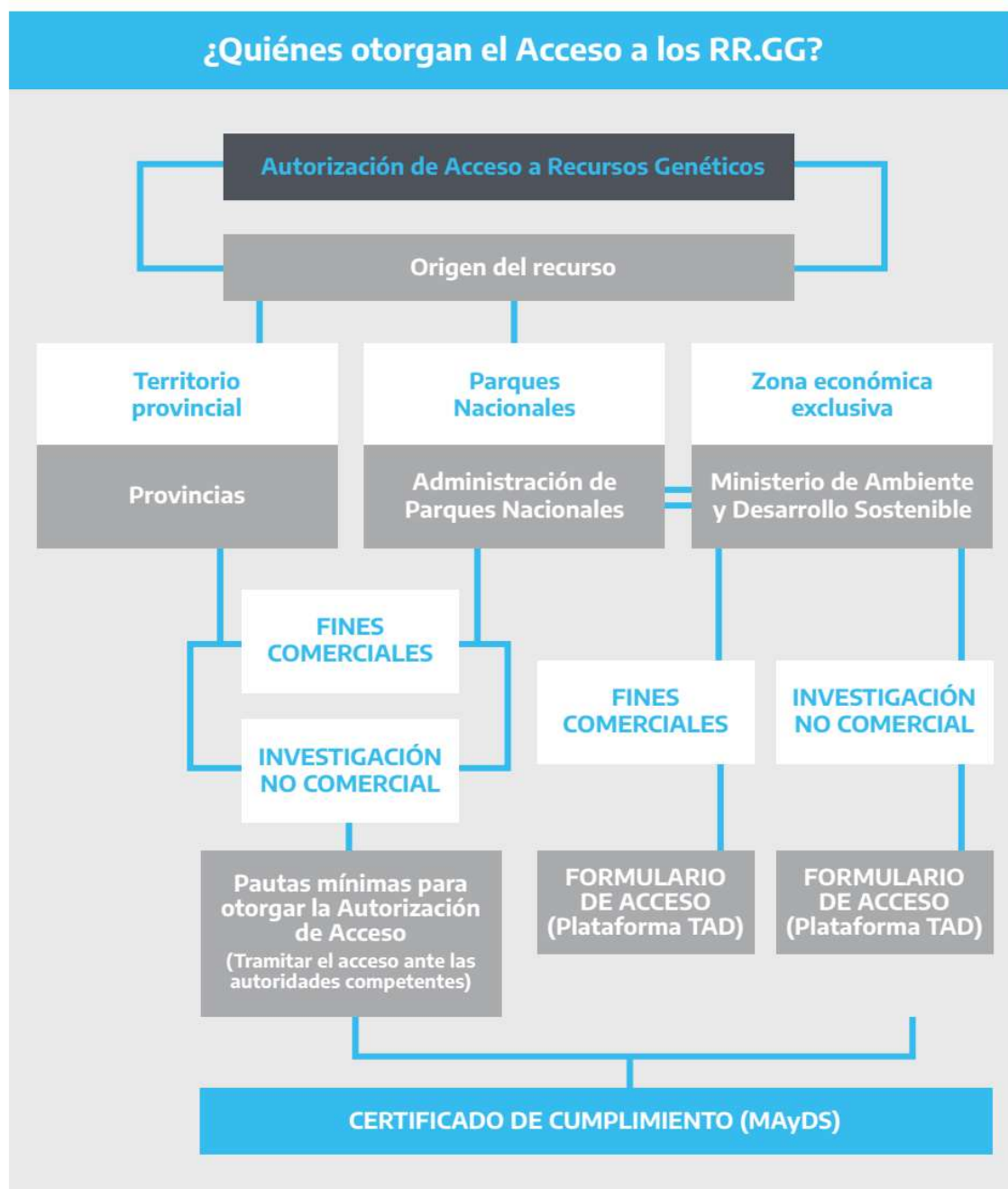
incluidos en el Anexo I del Tratado Internacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (TIRFAA).

(art. 6). En esta Resolución se expresa el dominio originario de los recursos naturales de las provincias (art 124 de la CN) y la relevancia de los pueblos indígenas (artículo 75 inciso 17) como co-gestores de sus recursos y en especial referencia a los Conocimientos Tradicionales.

Las Normas Provinciales y la Res. 410/19 se orientan a regular los permisos de acceso y el uso sustentable de la biodiversidad. En la Guía de trámites a distancia sobre acceso a RRGG bajo el Protocolo de Nagoya y la resolución 410/19 en la figura 1 se describe dónde deben realizarse los trámites de Acceso a RRGG en Argentina.

[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/instructivo\\_tad\\_rrgg\\_links\\_ok\\_1.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/instructivo_tad_rrgg_links_ok_1.pdf)

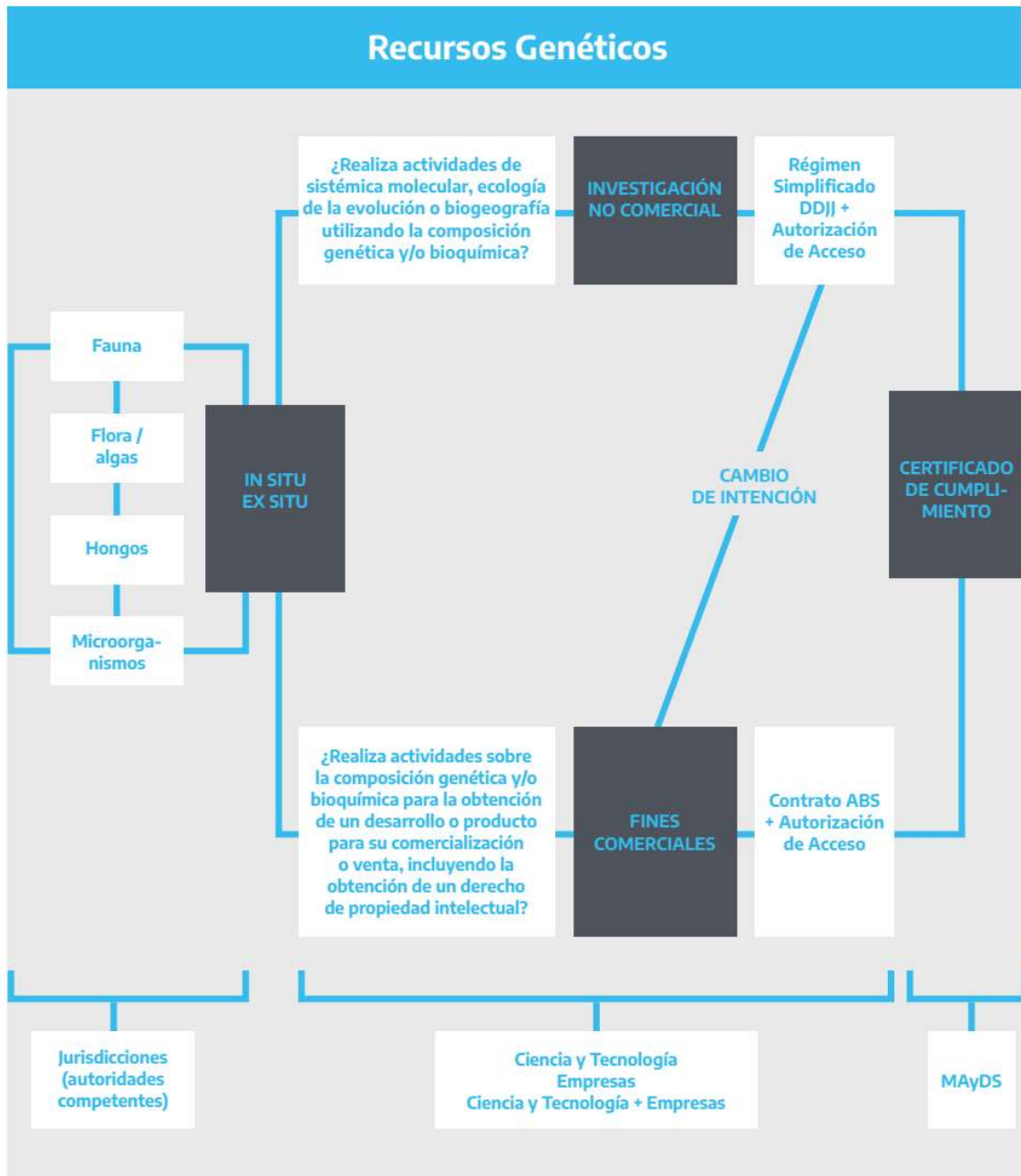
**Figura 1.** Se resume donde deben ser tramitadas las autorizaciones de acceso (+ contrato ABS, si correspondiere), las cuales son requisito para tramitar el certificado de cumplimiento en el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación.



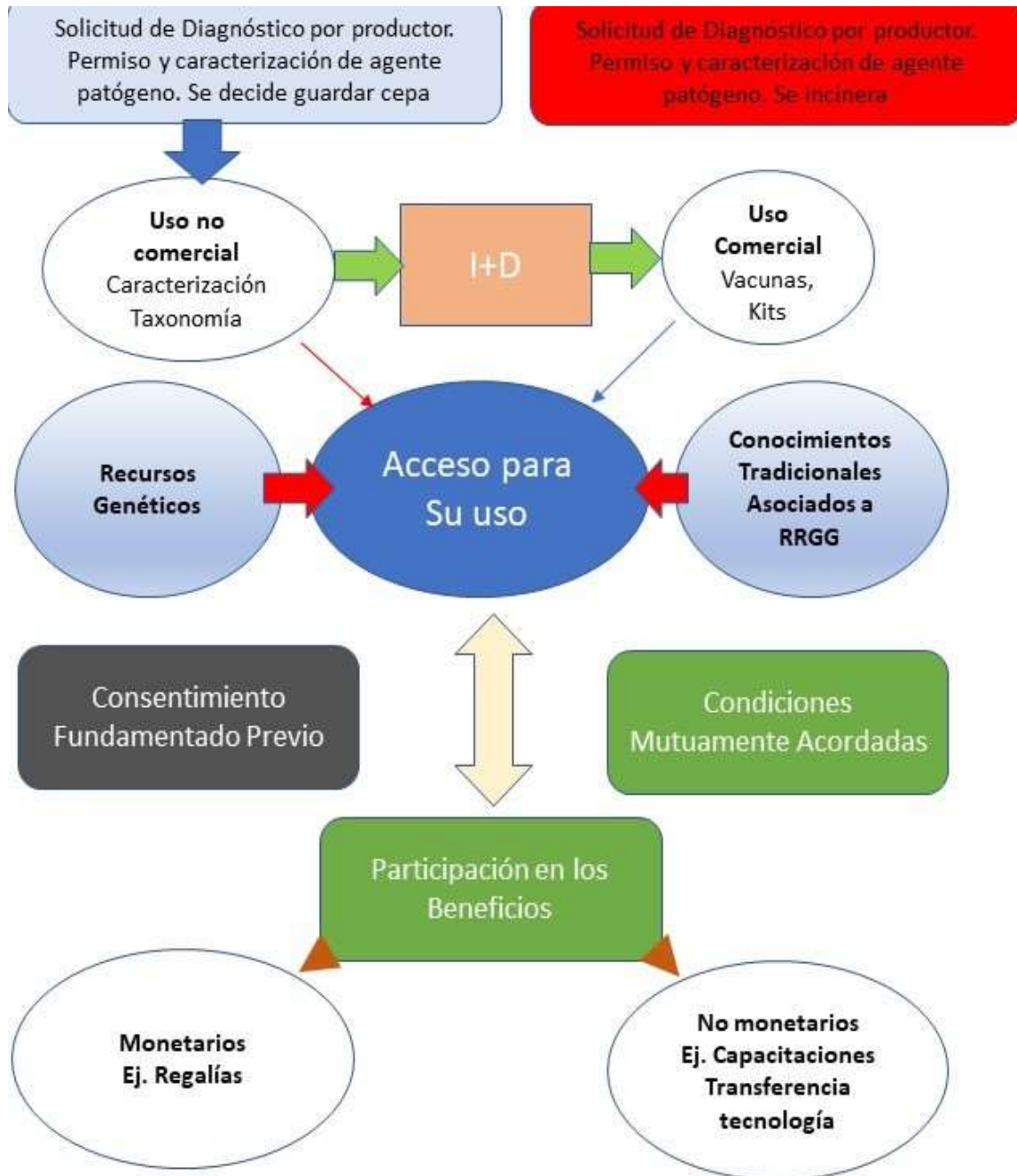
Y en la figura 2 las etapas y actores intervinientes en el acceso para el caso de Argentina.

([https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/instructivo\\_tad\\_rrgg\\_links\\_ok\\_1.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/instructivo_tad_rrgg_links_ok_1.pdf))

**Figura 2.** Se resumen las etapas y actores involucrados en el acceso, utilización y tramitación del certificado de cumplimiento. Además, se diferencia entre investigación no comercial, comercial y situación de cambio de intención.



En el caso particular de los RRGG originados desde el diagnóstico de enfermedades de animales la ruta propuesta de permiso y distribución ABS desde un Laboratorio INTA sería:



## ACUERDO DE TRANSFERENCIA DE MATERIALES O ATM

El acuerdo de transferencia de materiales (ATM) es un contrato entre una parte proveedora de los RR. GG. y una contraparte receptora. Es fundamental para asegurar la legalidad y trazabilidad de la adquisición e intercambios de esos recursos. Haciendo transparente el procedimiento de provisión de recursos.

El desarrollo de un ATM completo debe contar con

1. Proveedor y receptor.

Responsable de la colección y responsable solicitante.

Autoridades y/o responsables legales firmantes avalando el proceso.

2. Objeto del ATM. El proveedor dispone al receptor el material para un propósito único. En el ATM debe quedar bien explicitado cual el uso que se le dará al material entregado, por ejemplo, transferencia de una cepa para evaluar su actividad antifúngica.

3. Descripción del material a transferir. Preferiblemente si es una cepa algún tipo de identificación precisa que la diferencia de cualquier otra, no solo género y especie en Anexo I generalmente.

4. Restricciones de uso. Condiciones de uso del material transferido autorizado y no autorizado.

5. Propiedad intelectual de materiales y derivados.

6. Aspectos legales que hacen a la responsabilidad de terceros.

Derechos y obligaciones del proveedor.

Derechos y obligaciones del receptor.

7. Confidencialidad.

8. Exención de garantías.

9. Indemnizaciones.

10. Terminación anticipada del acuerdo.

11. No cesión de derechos.

12. Informes. Deben ser periódicos con actualización de publicaciones y usos de ese material transferido dentro de los límites acordados.
13. Acuerdo de beneficios si de su utilización lo amerita. Fijando un mecanismo para compartir en forma justa y equitativa los resultados y los beneficios derivados de la utilización comercial y de otra índole de los recursos genéticos con el (los) proveedor(es).
14. Duración y rescisión. Plazos y extensión o renovación.
15. Derecho aplicable y jurisdicción competente (domicilio y controversias).
16. Fecha y firmas: El ATM debe estar firmado por el proveedor, el receptor.  
También deben estar las firmas de los responsables legales del procedimiento (directores de la institución) avalando el proceso.

## **CONCLUSIONES**

El país cuenta con numerosos instrumentos legales, especialmente orientados a regular el Acceso de los RR.GG. (permisos de colecta en cada jurisdicción provincial y Parques Nacionales), que deben ser cumplimentados por todos los actores del proceso de obtención y conservación de los recursos. Es imprescindible llevar adelante políticas públicas integrales para el mantenimiento y conservación de la diversidad genética tanto natural o silvestre como en los agroecosistemas. Los trámites de ATM son indispensables para la legalidad, trazabilidad y transparencia de los RR. GG. provistos desde una colección a un proveedor (investigador, empresa, etc.).

## **BIBLIOGRAFÍA:**

Convenio sobre la Diversidad Biológica, hecho en Río de Janeiro el 5 de junio de 1992. Ratificado por Argentina el 7 de septiembre de 1994. Boletín Oficial de la República Argentina, Ley 24375/1994, de 6 de octubre de 1994. <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>.

Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. (2019). Recopilación de normas sobre permisos de investigación y acceso a los recursos genéticos por jurisdicción. [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/recopilacion\\_normativa\\_rrgg\\_2019.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/recopilacion_normativa_rrgg_2019.pdf).

Silvestri, L. C. (2017). Protocolo de Nagoya: desafíos originados a partir de un texto complejo, ambiguo y controversial. *Anuario Mexicano de Derecho Internacional*, 697-716.  
<http://dx.doi.org/10.22201/ij.24487872e.2017.17.11049>

Swanson, T. (1999). Why Is There a Biodiversity Convention? The International Interest in Centralized Development Planning. *International Affairs (Royal Institute of International Affairs 1944-)*, 75(2), 307–331. <http://www.jstor.org/stable/2623346>