

60 AÑOS AAM
40 AÑOS RAM

N°1
VOL 41
2009

REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

PUBLICACIÓN
DE LA
ASOCIACIÓN ARGENTINA
DE
MICROBIOLOGÍA



MEDICA^mTEC

calidad que garantiza el buen diagnóstico

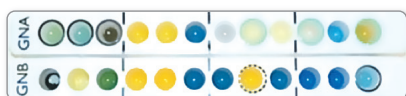


Sistemas para Identificación Bacteriana

La línea MICROGEN-ID de productos para identificación, brindan seguridad y rapidez en los laboratorios clínicos, alimentarios, farmacéuticos y ambientales, de forma muy sencilla. Se trata de sustratos especialmente seleccionados para lograr una correcta identificación de microorganismos.



MICROGEN ID-GN A Para 20 test (MID-64) y 160 test (MID-641)
MICROGEN ID-GN B Para 24 test (MID-65)



Sistema combinado para Enterobacterias. La utilización de ambos (A+B) permite identificar bacilos gram negativos no fastidiosos y oxidasa positiva.

MICROGEN ID-STREP Para 20 test (MID-62)



Sistema de 12 pruebas para la identificación en 24 Hs. de Streptococcus, Enterococos y especies relacionadas.

MICROGEN ID-STAPH Para 20 test (MID-69)



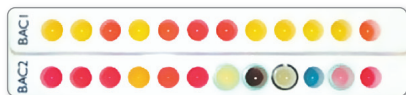
12 pruebas para una correcta identificación en 24 Hs. de Staphylococcus y microorganismos relacionados.

MICROGEN ID-LISTERIA Para 20 test (MID-67)



Sistema de identificación completo. No require materiales adicionales. AOAC aprobado. Conforme todos los estándares internacionales. Incluye la prueba de hemólisis.

MICROGEN ID-BACILLUS Para 20 test (MID-66)



24 sustratos para una identificación completa de Bacillus spp.

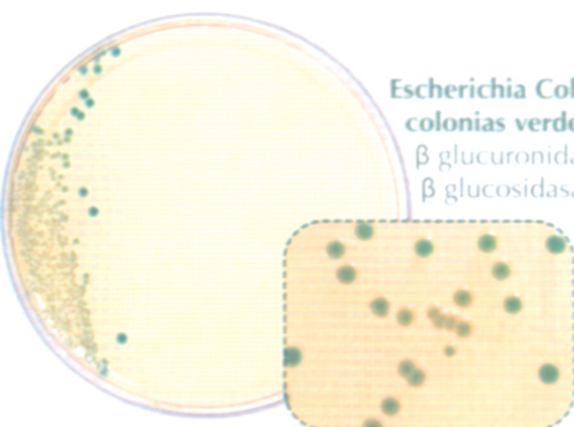


**MICROGEN ID
SOFTWARE disponible.**



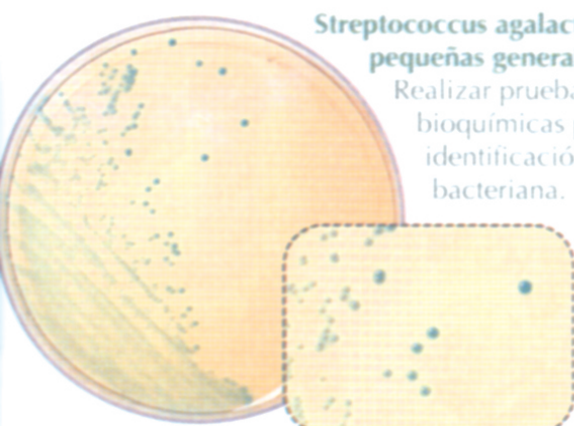
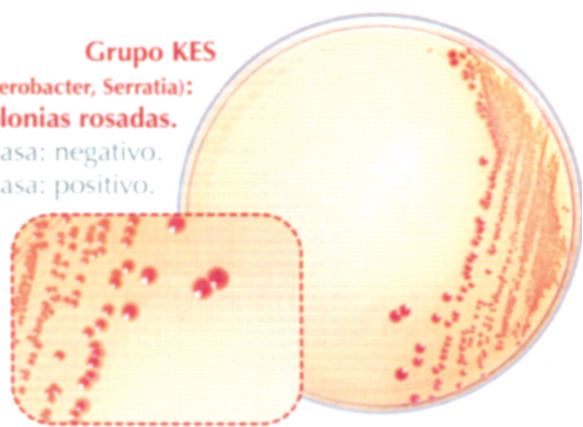
Medio de cultivo cromogénico que permite el aislamiento, recuento de colonias, identificación presuntiva y detección simultánea de cultivos mixtos en muestras del tracto urinario.

La detección de la actividad enzimática bacteriana, junto con la morfología de la colonia, permite reconocer presuntivamente a:



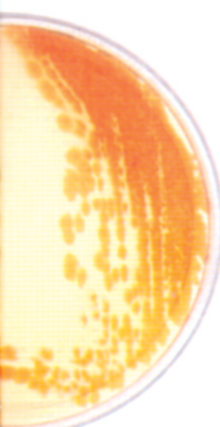
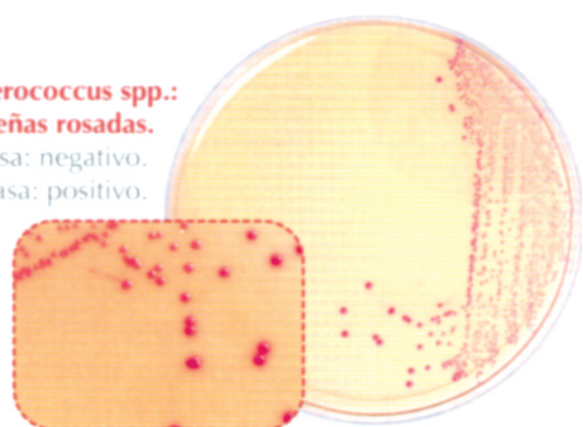
Escherichia Coli:
colonias verdes.
 β glucuronidasa: positivo.
 β glucosidasa: negativo.

Grupo KES
(Klebsiella, Enterobacter, Serratia):
colonias rosadas.
 β glucuronidasa: negativo.
 β glucosidasa: positivo.



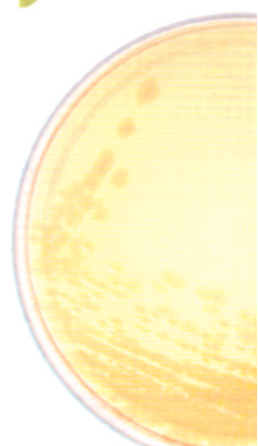
Streptococcus agalactiae: colonias
pequeñas generalmente verdosas.
Realizar pruebas
bioquímicas para
identificación
bacteriana.

Enterococcus spp.:
colonias pequeñas rosadas.
 β glucuronidasa: negativo.
 β glucosidasa: positivo.



Proteus-Morganella-Providencia:
colonias amarronadas.
 β glucuronidasa: negativo.
 β glucosidasa: negativo.
Tryptófano deaminasa: positivo.
Indol positivo: Proteus vulgaris,
Morganella, Providencia.
Indol negativo: Proteus mirabilis.

Staphylococcus aureus:
colonias blancas-amarillentas.
Realizar pruebas bioquímicas
para identificación bacteriana.



Candida spp: colonias blancas.
Realizar pruebas para identificación.

Pseudomonas aeruginosa:
colonias blancas o pigmentadas.
Realizar pruebas bioquímicas
para identificación bacteriana.

Producto Autorizado por la ANMAT PM-1292-1
Presentación 6 x 50 ml. Código: B04-215-84
Presentación 12 x 100 ml. B04-215-92



Britania®

Laboratorios Britania s.a.

Los Patos 2175 - Ciudad Autónoma de Bs. As. - C1283ABI - Argentina

Líneas Rotativas: 54-11-4306-0041 / Fax: 0-800-333-4366

web: www.britanialab.com / email: britania@britanialab.com

COPAN VENTURI TRANSYSTEM

Recolección, transporte
y conservación
de muestras biológicas

TUBO

- Polipropileno irrompible
- Diseño exclusivo "Venturi"
- Fondo redondeado y diámetro adecuado para colocar en gradillas
- Tapa de seguridad coloreada para facilitar su identificación
- Columna de 5 mL de agar

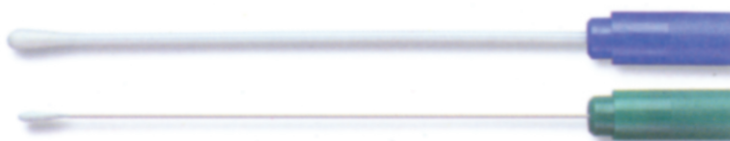
ENVASE

- Producto esterilizado por radiación gamma
- Película plástica con sello de seguridad que cambia de color al abrirse



HISOPOS

- Extralargo: 13,5 cm
- Varillas de plástico y aluminio flexible
- Punta de Rayón suave tamaño estándar y miniatura



MEDIO DE TRANSPORTE



REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGIA

PUBLICACION DE LA ASOCIACION ARGENTINA DE MICROBIOLOGIA

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

DIRECTORA

Silvia Carla Predari

SECRETARIA DE REDACCIÓN

Marta Mollerach

COMITÉ EDITOR

Alicia I. Arechavala

Daniel Grasso

Gerardo A. Leotta

Claudia I. Menghi

Elsa C. Mercado

Héctor R. Morbidoni

Vilma Savy

ASESORES CIENTÍFICOS

C. Bantar
J.C. Basílico
M.I. Berría
H.M. Bianchini
N. Binsztein
M.M. Bracco
R.A. Cacchione
R. Campos
G. Carballal

J.J. Cazzulo
C. Coto
M. D'Aquino
R. de Torres
J.E. González
S. González Ayala
A.H. Frade
N. Leardini
H. Lopardo

W.P. Mac Cormack
D. Masih
E. Massouh
M.A.M. de Asconegui
R. Negroni
F. Nicola
T. Orduna
J.L. Parada
A.P. de Ruiz Holgado

H.R. Rodríguez
A. Schudel
L. Scolaro
R. Soloaga
D. Sordelli
H. Terzolo
G. Vaamonde
M. Weissenbacher

ASESORES EN EL EXTERIOR

J. Arbiza (Uruguay)
E. García López (España)
M. Gottschalk (Canadá)
R. Guerrero (España)

M.J. Mendes Giannini (Brasil)
M. Philipp (EE.UU)
J. Pontón (España)
F. Queiroz Telles (Brasil)
A. Restrepo (Colombia)

G. San Blas (Venezuela)
G. Schmunis (EE.UU)
A. Steinbüchel (Alemania)
M. Tolmasky (EE.UU)
J. Vila Estape (España)

Secretaría: Deán Funes 472, C1214AAD Buenos Aires; Tel/FAX: 54-11-4932-8858, 54-11-4932-8948; E-mail: info@aam.org.ar, <http://www.aam.org.ar>

SUSCRIPCIÓN (cuatro números anuales)

Socios AAM	\$ 100
Argentina no socios	\$ 200
América Latina	US\$ 100
Otros países	US\$ 150

Los pagos pueden hacerse por giros a la orden de Asociación Argentina de Microbiología.

Personería Jurídica 000908.

Registro Nacional de la Propiedad Intelectual N° 269649.

I.S.S.N. 0325-7541

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

XII CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA

24 al 27 de octubre de 2010
Palais Rouge

Jerónimo Salguero 1433/49 (C1177AFA)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Presidente: *Ricardo Negroni*

Vicepresidentes: *Isabel Bogado*
Jorge Reinheimer
Marta Tokumoto

Secretarías Generales: *Alicia Arechavala*
María Alejandra Picconi

Prosecretaria: *Cristina Iovannitti*

Tesorera: *Adriana De Paulis*
Protesorera: *Paula Gagetti*

Secretaría de Relaciones Institucionales: *Daniela Centrón*

Secretaría Técnica: *Adriana Súcar*
Comisión Técnica: *Manuel Gómez Carrillo, Cecilia Quiroga y*
Soledad Ramírez

Secretarios Científicos: *Liliana Guelfand*
Horacio Salomón

Comisión Científica: *Carlos Vay*

Representantes de las Divisiones en el Comité Científico y Comité Organizador

División Agrícola y Ambiental: *Inés García y Susana Vázquez*
División DAMYC: *Virginia Fernández Pinto y Guillermo Guirín*
División SADEBAC: *Mirta Litterio y Magdalena Pennini*
División SAV: *Viviana Mbayed y Victoria Preciado*

Vocales: *Marina Bottiglieri* (Filial Córdoba)
Perla Hermida Lucena (Filial Rosario)
Luis Merino (Filial NEA)
Ana París de Baeza (Filial Sur)
Francisco Salamone (Filial Santa Fe)
Alejandro Sturniolo (Filial Cuyo)
Aída Suárez (Filial NOA)

Para más información y/o sugerencias puede contactarnos a
info@aam.org.ar

REVISTA ARGENTINA DE
MICROBIOLOGÍA

VOLUMEN 41 Nº 1 • ENERO-MARZO DE 2009

ÍNDICE

EDITORIAL

Círculo vicioso vs. círculo virtuoso: como mantener a la RAM en el SCIE

H.R. Morbidoni

1

MICROBIOLOGÍA BÁSICA

Caracterización del gen de la citotoxina vacuolizante de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes residentes en Tolima, Colombia

A.M. López, M.P. Delgado, C. Jaramillo, A. Amézquita, G. Parra, M.M. Echeverry

4

Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-01, no-0139 asociados a diarrea

S. González Fraga, A. Villagra de Trejo, M. Pichel, S. Figueroa, G. Merletti, M.I. Caffer, M. Cecilia de Castillo, N. Binsztein

11

MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Diagnóstico molecular de histoplasmosis humana en muestras de sangre entera

A.I. Toranzo, I.N. Tiraboschi, N. Fernández, B. Ibarra-Camou, M.C. Rivas, W. Lee, G. Davel, C.E. Canteros

20

IMÁGENES MICROBIOLÓGICAS

Esporotricosis en un gato doméstico

R. Iachini

27

***Toxocara canis* bajo la lupa**

M.V. Bojanich

28

AGENTES ANTIMICROBIANOS

***Prevalencia de los genes *mef* y *ermB* en aislamientos invasores de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la eritromicina recuperados de pacientes pediátricos en Argentina**

A. Corso, D. Faccone, C. Galiá, P. Galletti, M. Rodríguez, J. Pace, M. Regueira, Grupo de Trabajo Argentino SIREVA

29

Uso de linezolid para el tratamiento de recién nacidos con infecciones por *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina.

G. Berberian, G. Castro, S. Fistolera, M. Travaglianti, H. Lopardo, A. Mastroianni, M.T. Rosanova

34

***Alteraciones de crecimiento y ramificación en *Neurospora crassa* provocadas por concentraciones sub-inhibitorias de agentes antimicóticos**

R.C. Pereira, S. Said

39

ARTÍCULOS ESPECIALES

***Micobacteriófagos como herramientas versátiles para la manipulación genética y el desarrollo de métodos simples para el diagnóstico de enfermedades micobacterianas**

E.J. Stella, A.I. de la Iglesia, H.R. Morbidoni

45

* En inglés

REVISTA ARGENTINA DE
MICROBIOLOGIA

VOLUMEN 41 Nº 1 • ENERO-MARCH DE 2009

INDEX

EDITORIAL

Vicious circle vs. virtuous circle: how to keep RAM in SCIE

H.R. Morbidoni

1

GENERAL MICROBIOLOGY

Characterization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in gastric biopsy specimens from patients living in Tolima, Colombia

A.M. López, M.P. Delgado, C. Jaramillo, A. Amézquita, G. Parra, M.M. Echeverry

4

Characterization of *Vibrio cholerae* no-01, no-0139 associated with diarrhea

S. González Fraga, A. Villagra de Trejo, M. Pichel, S. Figueroa, G. Merletti, M.I. Caffer, M. Cecilia de Castillo, N. Binsztein

11

CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES

Molecular diagnosis of human histoplasmosis in whole blood samples

A.I. Toranzo, I.N. Tiraboschi, N. Fernández, B. Ibarra-Camou, M.C. Rivas, W. Lee, G. Davel, C.E. Canteros

20

MICROBIOLOGICAL IMAGES

Esporotricosis in a domestic cat

R. Iachini

27

***Toxocara canis* under the microscope**

M.V. Bojanich

28

ANTIMICROBIAL AGENTS

***Prevalence of *mef* and *ermB* genes in invasive pediatric erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentina**

A. Corso, D. Faccone, C. Galiá, P. Galletti, M. Rodríguez, J. Pace, M. Regueira, Argentinean SIREVA Working Group

29

Linezolid for the treatment of newborns infected with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*

G. Berberian, G. Castro, S. Fistolera, M. Travaglianti, H. Lopardo, A. Mastroianni, M.T. Rosanova

34

***Alterations on growth and branching of *Neurospora crassa* caused by sub-inhibitory concentrations of antifungal agents**

R.C. Pereira, S. Said

39

SPECIAL ARTICLES

***Mycobacteriophages as versatile tools for genetic manipulation of mycobacteria and development of simple methods for diagnosis of mycobacterial diseases.**

E.J. Stella, A.I. de la Iglesia, H.R. Morbidoni

45

Círculo vicioso vs. círculo virtuoso: cómo mantener a la RAM en el SCIE

*It is one of the most beautiful compensations of life,
that no man can sincerely try to help another without helping himself.*

Ralph Waldo Emerson

There are no such things as applied sciences, only applications of science.

Louis Pasteur

Recientemente, con motivo de una nueva convocatoria anual para la financiación de proyectos de Ciencia y Tecnología por parte de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, se difundió electrónicamente un texto referido a la actividad curricular requerida para la acreditación de dichos proyectos. El texto, que aparece en la página web de FONCyT (3), indica cuántos trabajos científicos debe tener publicados el solicitante en los cinco años previos al momento de la convocatoria a subsidios. De esa manera se intenta que las solicitudes de fondos estatales sean presentadas por investigadores con la capacidad técnica y la formación necesaria para llevar adelante el proyecto, lo cual es absolutamente lógico. Así se estableció que en el caso de las solicitudes para las áreas temáticas del Sistema de Evaluación de Proyectos Científicos y Tecnológicos (SEPCYT/FONCyT), en el ítem correspondiente a "Ciencias Biológicas, de células y de moléculas", las publicaciones deben estar realizadas en revistas indexadas en el ISI, y para las áreas temáticas correspondientes a "Ciencias Clínicas y de Salud Pública" y "Ciencias Médicas", los artículos deben aparecer en revistas de circulación internacional con referato.

Si consideramos que las áreas mencionadas son las que habitualmente se seleccionan para presentar proyectos sobre temas de índole microbiológica, vemos que sigue siendo esencial contar con una revista nacional que esté indexada, para que los miembros del sistema de Ciencia y Técnica del país puedan elegirla como destino de sus publicaciones sin riesgo de ver menguar, por ello, sus calificaciones al solicitar subsidios.

Paradójicamente, el esfuerzo realizado durante los últimos años por un grupo de miembros de la AAM se tradujo en dos logros sustanciales: en primer lugar, la Revista Argentina de Microbiología fue aceptada en el portal SciELO (*Scientific Electronic Library On Line*) a partir de 2004, y más recientemente, en marzo de 2008, fue incluida en el *Science Citation Index Expanded* (SCIE). Esto permite que los contenidos de la RAM estén disponibles en todo el mundo y que los trabajos científicos llevados a cabo por los microbiólogos de nuestro país adquieran gran difusión, lo que aumenta las posibilidades de colaboraciones al detallar problemáticas locales, al brindar nuestros datos estadísticos sobre temas de relevancia, como la evolución local de la resistencia a drogas en microorganismos y otros. Estos hechos no han sido fortuitos, no han respondido al azar; nadie nos ha "regalado" estas posibilidades, sino que son fruto de la pasión y la persistencia de los miembros de la AAM.

Ahora bien, en el marco de una tarea institucional que permita que esta revista se mantenga dentro del SCIE, debemos aumentar nuestro compromiso mediante la publicación de un número adecuado de trabajos científicos del mejor nivel que podamos producir, ya sea de aspectos básicos o aplicados de la

microbiología. En este sentido, es desesperanzador ver la división de la microbiología nacional: por un lado, los profesionales cuya actividad se centra principalmente en la labor de investigación “básica”, agrupados en su mayoría en SAMIGE (Sociedad Argentina de Microbiología General); por el otro, aquellos cuyo trabajo diario es el ejercicio profesional microbiológico (microbiología clínica, de alimentos, medicamentos y cosméticos, veterinaria, agrícola y ambiental), agrupados en la Asociación Argentina de Microbiología. Hay muchos ejemplos –y muy buenos– de unos y otros, que no hacen distinciones entre microbiología “básica” y “aplicada” y que producen trabajos importantes. Es innegable la importancia que la microbiología clínica y la industrial tienen a la hora de proporcionar resultados que den respuesta a diversas problemáticas locales. Sin embargo, aun entre estos casos, es poco frecuente el envío de los trabajos originales para su publicación en la RAM, ya que los autores prefieren el envío al exterior. Esto nos deja en una situación por demás incómoda, ya que nos resulta difícil mantener un ritmo sostenido de publicaciones de buena calidad. Me permito citar parte del artículo editorial de la revista Medicina (Buenos Aires) escrito por los Dres. Dosne Pasqualini y Kotsias con motivo de cumplirse, en ese momento, los 60 años de la revista (2):

Tener 60 años de publicación ininterrumpida es un logro poco común entre nosotros y se lo debemos a un conjunto de factores que incluyen, la iniciativa de los fundadores, la motivación y dedicación de los Miembros del Comité de Redacción y principalmente el aporte de nuestros autores quienes a lo largo de todos estos años nos han confiado sus manuscritos. Entre muchos trabajos importantes, se seleccionaron algunos que marcaron un hito en el desarrollo de la biomedicina argentina. Esperamos que en el futuro podamos aumentar nuestro factor de impacto editando cada vez más y mejores trabajos para llegar eventualmente a reflejar el auténtico nivel científico del país.

Sería loable que podamos repetir el concepto en pocos años, cuando hablemos de nuestra propia revista.

Hay que puntualizar muy especialmente que el CONICET creó en 2001 el Núcleo Básico de Revistas Nacionales Científicas, lo que brindó un apoyo económico para que las revistas nacionales pudieran cumplir con los requisitos de calidad y frecuencia de emisión que permitieran su ingreso al sistema; la RAM fue una de las primeras cinco incorporadas. En notas editoriales previas, nuestros colegas ya destacaron la importancia del hecho y señalaron que se necesitaban de parte del Estado medidas complementarias para el mantenimiento de estos logros (1, 4).

Crear que las revistas científicas de los Estados Unidos podrían mantener su prestigio si los investigadores americanos decidieran publicar sólo en revistas europeas por razones de conveniencia (en términos de impacto en sus antecedentes académicos), o que las revistas europeas podrían mantener sus índices de impacto si los investigadores europeos decidieran vaciar de contenido sus revistas de microbiología editadas “en ese continente” para publicar solamente en revistas estadounidenses, en las cuales el nivel es quizás sostenidamente más elevado, es ser inocentes. Sin embargo, esas alternativas planteadas no han sucedido hasta el momento y es difícil que ocurran; lo que sí ocurre es que cualquier revista estadounidense o europea recibe artículos de grupos de los EE. UU. o de Europa por igual, así como de grupos de cualquier otro país. Habría que tener la objetividad de analizar la historia de cada una de esas asociaciones y ver que son centenarias, y que contaron con el apoyo de los microbiólogos de cada lugar, quienes decidieron sobreponerse a cualquier disputa interna para la consolidación de sus asociaciones. Deberíamos suponer, entonces, que su nivel no es sólo consecuencia de los fondos de los que disponen, sino también de la convicción de estar trabajando en conjunto en pos de un bien común, aceptando las diferencias y conjurándolas para alcanzar un objetivo que debería ser loable.

En este mismo sentido, al considerar a la revista de la AAM para la publicación de trabajos científicos es importante recordar que el propósito de la publicación es la difusión del conocimiento; por ello, el primer juez de un artículo debe ser su propio autor. En sintonía con esto, es necesario contar también

con la buena disposición de colegas microbiólogos para efectuar las tareas de revisión de los manuscritos, las que deben ser llevadas a cabo a conciencia. Tanto el Comité Editor como los evaluadores realizan un gran esfuerzo y muchas veces sustraen tiempo de su vida privada para garantizar una revista publicada en forma periódica y sostenida. Esto significa que todos deberíamos hacer nuestro aporte para producir artículos de suficiente nivel académico y calidad editorial, lo cual lleva tiempo y requiere del deseo de hacerlo.

Es vital para el futuro de nuestra microbiología que construyamos hoy una realidad con bases sólidas y consensuadas. Es muy poco alentador ver que, por un lado, se logra incluir a la RAM en el SCIE, y por el otro se privilegia la publicación en revistas extranjeras y que la misma microbiología en nuestro país se fractura en dos sociedades distintas. Seguimos debatiéndonos entre el círculo vicioso y el círculo virtuoso: sin manuscritos de calidad en número suficiente, es difícil mantener una revista indexada y mucho más pretender que tenga un factor de impacto considerable. Por el contrario, la publicación de trabajos de temática amplia, ya sea sobre aspectos básicos o aplicados, redundará en mostrar nuestro nivel académico en el exterior y, eventualmente, ello tendrá un efecto positivo en el factor de impacto.

En este primer editorial del año, sería deseable que hagamos una reflexión profunda y que decidamos mantener y hacer crecer a la RAM como alternativa para la publicación de trabajos de un nivel científico adecuado; de ese modo colaboraremos en mantenerla en el lugar al que tanto le ha costado llegar. No podemos ni debemos permitir que las diferencias que puedan existir entre los distintos grupos de la Argentina que trabajan en temas de microbiología terminen por destruir lo que nos hemos esforzado –y mucho– en construir. Así honraremos el esfuerzo y compromiso de los que nos precedieron, y daremos el ejemplo a los que nos sigan en el camino de continuar desarrollando la microbiología en nuestro país.

HÉCTOR RICARDO MORBIDONI

*Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas.
Universidad Nacional de Rosario. Argentina.*

E-mail: morbiatny@yahoo.com

1. Cataldi A. Las RCN van al SciELO. *Rev Argent Microbiol* 2006; 38: 117-8.
2. Dosne Pasqualini C, Kotsias BA. Pasado y presente de Medicina (Buenos Aires). *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 1-7.
3. FONCyT: criterios de acreditación curricular. Disponible en: <http://www.agencia.gov.ar/spip.php?article261>. Consultado el 22/12/2008.
4. Predari SC. La RAM voló desde el SciELO al SCIE en su 40° aniversario. *Rev Argent Microbiol* 2008; 40: 79-80.

Caracterización del gen de la citotoxina vacuolizante de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes residentes en Tolima, Colombia

A. M. LÓPEZ¹, M. P. DELGADO^{1*}, C. JARAMILLO¹, A. AMÉZQUITA¹, G. PARRA², M. M. ECHEVERRY²

¹Universidad de los Andes, Carrera 1 N° 18-10 (Of 210) Bogotá, Colombia;

²Universidad del Tolima, B. Santa Helena A.A. 546 - Ibagué, Colombia.

*Correspondencia. E-mail: mdelgado@uniandes.edu.co

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria que coloniza la mucosa gástrica de los humanos. Este microorganismo produce una citotoxina vacuolizante conocida como VacA y codificada por el gen *vacA*, el que se considera un factor de virulencia importante. Las cepas de *H. pylori* con diferentes alelos de *vacA* exhiben una gran variedad de fenotipos, algunos de los cuales han sido asociados con enfermedades gastroduodenales. El presente estudio pretende aportar datos sobre la prevalencia de *H. pylori* y de los genotipos de *vacA* en pacientes residentes en Tolima (Colombia), así como determinar la relación entre estos datos y el desarrollo de diferentes patologías gastroduodenales. Se incluyeron en este análisis 73 pacientes con diferentes patologías gástricas. Con el ADN total extraído de cada biopsia, se determinó la presencia de la bacteria mediante la amplificación de un fragmento específico del gen 16S ADNr. También se realizó la genotipificación del gen *vacA* por PCR. De las 50 muestras genotipificadas, el 52% mostró el alelo *vacA* s1m1, el 42% el alelo *vacA* s2m2, el 4% el s1m2 y el 2% los alelos s1,s2,m1,m2. Se evidenció una mayor sensibilidad en la detección de *H. pylori* por medio del gen *vacA* que por el gen 16S ADNr. En la población evaluada no se encontró asociación entre el genotipo de *vacA* y la presencia de las distintas patologías incluidas en este estudio.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, *vacA*, detección, Tolima, Colombia

ABSTRACT

Characterization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in gastric biopsy specimens from patients living in Tolima, Colombia. *Helicobacter pylori* successfully colonizes the gastric niche. These bacteria produce a vacuolating cytotoxin known as VacA, which is codified by the *vacA* gene. This protein represents an important virulence factor. *H. pylori* strains have different *vacA* alleles, which show a variety of phenotypes that have been associated with gastrointestinal diseases. The aim of this study was to generate data about the prevalence of *H. pylori* and the *vacA* genotype in Tolima (Colombia) residents, and to evaluate if there exists a relationship between these data and the development of different gastrointestinal pathologies. Seventy three patients with different pathologies were included. The DNA extracted from biopsy specimens was analyzed and the presence of bacteria was determined by amplifying a fragment of the 16 rDNA gene. The *vacA* genotype was also determined by PCR. Fifty-two percent out of the 50 genotyped samples showed *vacA* s1m1 allele, 42% *vacA* s2m2, 4% s1m2, and 2% s1,s2,m1,m2. A higher sensitivity for the detection of *H. pylori* was evidenced by amplifying the *vacA* gene rather than the 16S rDNA gene. No association was found between the *vacA* genotype and the gastrointestinal diseases included in the study.

Key words: *Helicobacter pylori*, *vacA*, detection, Tolima, Colombia

INTRODUCCIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* ocurre en todo el mundo, pero su prevalencia varía en gran medida entre países y entre poblaciones de un mismo país (25, 33). La prevalencia en los adultos de mediana edad es del 80% en los países en vías de desarrollo, mientras que en los países desarrollados es del 20 al 50% (25, 33).

La mayoría de las personas, una vez infectadas, pueden permanecer sin desarrollar ningún tipo de sinto-

matología. No obstante, el curso típico de la enfermedad en pacientes infectados comienza con una gastritis crónica superficial que, eventualmente, progresa a gastritis atrófica. Este progreso parece ser un evento clave en la cascada celular que resulta, finalmente, en el desarrollo de carcinoma gástrico (21, 26).

H. pylori posee la habilidad de producir la citotoxina vacuolizante VacA, que es el factor de virulencia responsable de la formación de vacuolas en las células epiteliales gástricas (2, 6, 12, 15, 16). La proteína VacA,

de aproximadamente 95 kDa, es codificada por el gen *vacA* y produce diferentes efectos que pueden contribuir a la persistencia de *H. pylori* en el nicho gástrico. Esta citotoxina forma poros en las membranas de las células epiteliales y permite la salida de aniones y urea; esto es importante pues la hidrólisis de la urea, catalizada por la ureasa de *H. pylori*, protege a la bacteria de la acidez gástrica. Esta proteína también favorece la labilidad de las uniones epiteliales, lo que hace posible el paso de los nutrientes a través de la barrera mucosa en beneficio de la bacteria (6, 10, 24, 33). Asimismo, se ha sugerido que VacA tiene efecto en la supresión de la respuesta inmune específica mediante: i) la inhibición de la maduración de los fagosomas en los macrófagos, ii) la inhibición selectiva de la presentación de los antígenos a las células T, y iii) el bloqueo de la proliferación de dichas células (6, 7, 10, 19, 20, 31, 33, 34), entre otros efectos. Igualmente, se ha visto que induce cambios en el citoesqueleto, apoptosis (6, 10, 13, 20, 33), y supresión de la proliferación y migración de las células epiteliales (6, 10, 20, 33). Las cepas de *H. pylori* con diferentes alelos de *vacA* exhiben una gran variedad de fenotipos, probablemente relacionados con diversas enfermedades gastroduodenales. Este gen tiene dos regiones diferenciadas, una de 0,5 kb que corresponde a la región de una secuencia señal, denominada *vacA s*, y otra región de 0,73 kb que corresponde a la región media, conocida como *vacA m* (6, 10, 33).

La región señal del gen *vacA* codifica para un péptido señal y para el extremo amino de la toxina VacA procesada. Respecto de esta región se conocen dos tipos: *s1* y *s2*. El tipo *s1* es completamente activo, mientras que el tipo *s2* tiene un extremo amino corto que bloquea la formación de vacuolas y disminuye la formación de poros en las membranas eucariotas (6, 10, 12, 17, 18, 33). Las cepas *vacA s2* son raramente aisladas de pacientes con úlceras pépticas o adenocarcinoma gástrico (6, 10, 12, 17, 33).

La región media de *vacA* codifica para parte del dominio de unión de la toxina a la célula. Sobre la base de la secuencia de nucleótidos de esta región, las cepas se clasifican en dos familias de alelos: el alelo tipo *m1* para las cepas de *H. pylori* que tienen actividad citotóxica y el alelo *m2* para las cepas que carecen de ésta (3).

Las formas *s1/m2* interactúan y vacuolizan un rango menor de células e inducen un menor daño que las formas *s1/m1*. Sin embargo, también actúan eficientemente en la formación de poros en las membranas e incrementan la permeabilidad celular (6, 10, 12, 14, 33). En general, se ha visto que las cepas *vacA s1/m1* están asociadas con patologías graves, como el carcinoma gástrico (6, 10, 12, 33). No obstante, los datos son contradictorios, por lo que resulta de gran utilidad realizar estudios que amplíen la información, no sólo a una escala regional, sino también mundial, para tratar de desarrollar sistemas

de reconocimiento de los grupos de alto riesgo dentro de poblaciones con altos índices de infección por *H. pylori*, como la colombiana.

En este estudio se pretende: i) aportar datos sobre la prevalencia de *H. pylori* y sobre el genotipo de *vacA* en un grupo de pacientes con diferentes patologías gástricas; y ii) investigar la relación entre la presencia de la bacteria o el genotipo de *vacA* con las patologías gástricas identificadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

En el estudio se incluyeron 73 pacientes, 44 mujeres y 29 hombres, con una edad promedio de 55 años (rango, 19 a 79 años), que asistieron a la unidad de endoscopia de la Clínica Manuel Elkin Patarroyo del Instituto de Seguros Sociales (ISS) y a un consultorio privado de gastroenterología en Ibagué, Colombia. A todos los individuos participantes, quienes consintieron de forma escrita su participación en este proyecto, se les había indicado la realización de la endoscopia alta como parte del estudio de un cuadro de dispepsia. Las muestras consistieron, en promedio, de tres especímenes de biopsia del tejido gástrico para el análisis histopatológico y de un fragmento de tejido del antro gástrico que fue sometido a los análisis moleculares.

Criterios de exclusión

Se excluyeron los pacientes con cáncer que habían recibido radioterapia o quimioterapia durante los seis meses previos a la toma de la muestra, los pacientes con enfermedades cardiovasculares y respiratorias, y aquellos que recibieron tratamiento con antiácidos doce horas antes del procedimiento, con bloqueadores de la bomba de protones e H_2 quince días antes de la endoscopia o con antibióticos durante los tres meses previos a la toma de muestra.

Coloraciones

La coloración de hematoxilina-eosina fue empleada para la realización del análisis histológico, mientras que la coloración de Giemsa fue utilizada para la detección de *H. pylori* en el tejido.

Extracción del ADN total

La extracción de ADN a partir de un fragmento de tejido del antro gástrico se realizó mediante el equipo comercial AquaPure Genomic DNA (BIORAD®, EE. UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Detección molecular de *H. pylori*

La detección de *H. pylori* se realizó mediante la amplificación de un fragmento del gen 16S ADNr específico de la especie, utilizando los cebadores descritos por Thoreson AC *et al.* (35) (Tabla 1). La reacción se realizó en un volumen final de 25 μ l, que contenía: 50 mM de KCl; 20 mM de Tris HCl pH 8,4; 2,5 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato; 1 pm/ μ l de cada cebador (ACT-1 y ACT-2); 1,25 U de Taq polimerasa (Invitrogen™, EE. UU.); y aproximadamente 90 ng/ μ l de ADN genómico. El programa de amplificación incluyó un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 4 min, seguido de 38 ciclos (94 °C/1 min, 52 °C/1 min y 72 °C/1 min); con una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Para descartar la posible inhibición de la reacción, las muestras que resultaron negativas en la PCR para el gen 16S ADNr o para el gen *vacA*, o para ambos, se analizaron mediante la amplificación de un fragmento del gen de la β -globina humana (Tabla 1) (32) y de una región del gen IL-1B humano (Tabla 1)

(28). Para la amplificación de la región del gen de la β -globina, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l, y la mezcla de reacción contenía: 50 mM de KCl; 20 mM de Tris HCl pH 8,4; 3,0 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato; 1 pm/ μ l de cada cebador; 1,25 U de *Taq* polimerasa; y alrededor de 60 ng/ μ l de ADN genómico. El programa de amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos (94 °C/30 s, 57,5 °C/45 s y 72 °C/45 s) y, finalmente, de un paso de extensión a 72 °C durante 5 min.

Para la amplificación de un fragmento de la región del gen IL1B, la reacción se realizó en un volumen final de 25 μ l, que contenía: 50 mM de KCl; 20 mM de Tris HCl pH 8,4; 2,5 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato; 1 pm/ μ l de cada iniciador; 1,25 U de *Taq* polimerasa; y 60 ng/ μ l de ADN genómico. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos (94 °C/1 min, 55 °C/1 min y 72 °C/1 min) y, finalmente, de una extensión a 72 °C durante 7 min.

Tipificación del gen *vacA* de *H. pylori*

La PCR para la genotipificación del gen *vacA* incluyó a los cebadores VA1-F y VA1-R para identificar a los alelos *s1* y *s2* de la región señal (Tabla 1) (3, 37), y a los cebadores VAG-F y VAG-R para diferenciar a los alelos *m1* y *m2* de la región media por diferencias en el tamaño del amplicón (Tabla 1) (3, 37). En ambos casos la reacción se realizó en un volumen final de 25 μ l, que contenía: 50 mM de KCl; 20 mM de Tris HCl pH 8,4; 3,0 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato; 1 pm/ μ l de la mezcla de cebadores; 1,25 U de *Taq* polimerasa; y 60 ng/ μ l de ADN genómico. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min, seguida por 35 ciclos [95 °C/1 min, 59 °C/1 min (región *s*) o 52 °C/1 min (región *m*), y 72 °C/1 min]. Los productos fueron visualizados mediante UV en geles de agarosa al 2% para la región señal y al 1,5% para la región media.

Diseño del estudio y análisis estadístico

La presente investigación, que corresponde a un estudio observacional de tipo descriptivo y de corte transversal, incluyó la determinación de la sensibilidad (S), la especificidad (E), el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) de las técnicas moleculares, usando la histología como técnica de referencia (23). El índice Kappa fue calculado con el fin de evaluar la concordancia entre los dos métodos empleados para la detección de *H. pylori* (examen histopatológico y PCR).

Por medio del programa SPSS versión 14,0, se realizaron modelos de regresión multinomial y de regresión ordinal con el fin de detectar la posible asociación entre la presencia de *H. pylori*, el genotipo de *vacA* identificado, la edad o el sexo de los pacientes y el desarrollo de las diferentes patologías incluidas en el estudio. En ambos casos se determinó que la diferencia era significativa si $p < 0,05$.

Aspectos éticos

El presente estudio fue aprobado por los Comités de Ética de la Universidad de los Andes y de la Universidad del Tolima.

RESULTADOS

El análisis histológico de las muestras de los 73 pacientes mostró que el 76,7% padecía gastritis no atrófica, el 5,5% gastritis atrófica, el 8,2% metaplasia y el 2,7% carcinoma gástrico. En el 6,8% de los pacientes no se detectó patología.

La prevalencia de infección con *H. pylori* fue de 58,9% (43/73) por medio de la PCR para la detección del fragmento específico de la especie del gen 16S ADNr, y de 67,1% (49/73) cuando la detección se realizó aplicando el análisis histológico. El índice Kappa calculado fue de 0,76, lo que indica una buena concordancia entre ambos métodos. Para esta técnica se obtuvieron valores de S = 86%, E = 96% y VPP y VPN de 2 y 77%, respectivamente.

Con respecto a la caracterización del gen *vacA*, se genotipificaron 50 de las 73 muestras (Tabla 2). El 52% eran *vacA s1m1*, el 42% *vacA s2m2*, el 4% *s1m2* y el 2% *s1*, *s2*, *m1*, *m2*. Este último resultado da indicios de infección con múltiples cepas de *H. pylori*, por lo que esta muestra se excluyó al realizar los modelos de regresión. La concordancia fue excelente (0,88) entre el método de PCR usado para la detección del gen *vacA* y el análisis histológico. La detección del gen *vacA* mostró S = 98%, E = 92%, y VPP = VPN = 96%.

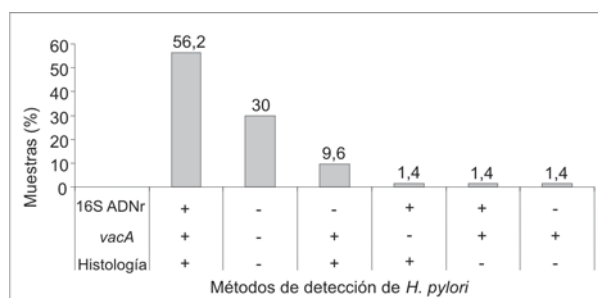
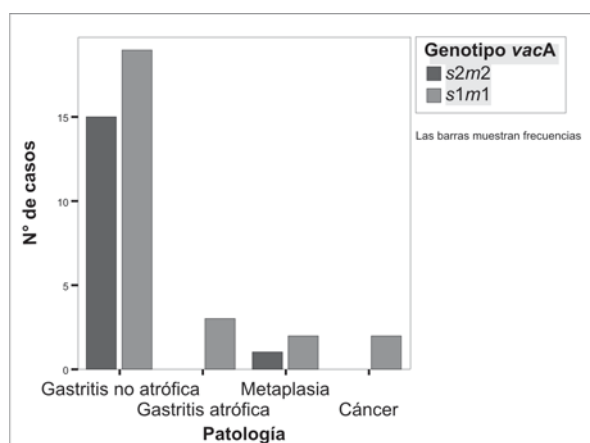
En aquellas muestras que resultaron negativas al realizar la detección molecular de *H. pylori* se amplificó

Tabla 1. Cebadores usados en el estudio

Región a amplificar	Cebadores	Secuencia	Tamaño del producto (pb)
16S ADNr	ACT-1	CTTGCTAGAGTGCTGATTA	537
	ACT-2	TCCCACACTCTAGAATAGT	
β -globina	PCO3	CAACTTCATCCACGTTCCACC	110
	PCO4	ACACAACTGTGTCTCACTAGC	
IL1B	IL-1B511F	TGGCATTGATCTGGTTTCATC	304
	IL-1B511R	GTTTAGGAATCTTCCCCTT	
<i>vacA m1/m2</i>	VAG-F	GGTCAAAATCGGTCATGG	<i>m1</i> : 570
	VAG-R	CCATTGGTACCTGTAGAAAC	<i>m2</i> : 645
<i>vacA s1/s2</i>	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	<i>s1</i> : 259
	VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	<i>s2</i> : 286

Tabla 2. Frecuencia de genotipos de *vacA* (total de muestras analizadas, n = 50)

Alelo	n	%
s1	28	56
s2	21	42
s1/s2	1	2
m1	26	52
m2	23	46
m1/m2	1	2

**Figura 1.** Comparación de tres métodos de detección de *H. pylori*. La presencia de *H. pylori* fue evaluada mediante la amplificación de un fragmento del gen 16S ADNr, la genotipificación del gen *vacA* y por histología. La figura muestra las diferentes combinaciones que se obtuvieron y el porcentaje de muestras que correspondió a cada categoría.**Figura 2.** Regresión multinomial de la relación entre los genotipos de *vacA* y el desarrollo de diferentes patologías gastroduodenales. El genotipo *vacA* s2m1 no fue considerado debido al bajo número de pacientes en esta categoría ($p > 0,05$).

exitosamente un fragmento del gen de la β -globina y de la interleuquina 1 β -humana.

La Figura 1 muestra las combinaciones de los resultados posibles (histología, detección del gen 16S ADNr y genotipificación de *vacA*) y la frecuencia de las muestras obtenidas en cada una de las categorías. Es posible apreciar que no siempre hubo concordancia entre los tres métodos. La regresión ordinal no mostró asociación entre el genotipo de *vacA* ($s1m1 > s2m1 > s2m2$) o la presencia de *H. pylori* (presente > ausente) y el desarrollo de diferentes patologías gastroduodenales (cáncer > metaplasia > gastritis atrofica > gastritis no atrofica), para un $p > 0,05$ (datos no mostrados). Al realizar la regresión multinomial para evaluar el efecto de cada una de las variables analizadas en forma independiente, tampoco se encontró asociación entre éstas (Figura 2).

DISCUSIÓN

En 2003, Bravo *et al.* (8) analizaron los estudios histológicos de pacientes de Ibagué, Tolima, y mostraron una prevalencia de infección por *H. pylori* de 59,5%. En el presente estudio, realizado con pacientes residentes en Tolima, se obtuvo una prevalencia de 67,1% por medio del análisis histológico y de 58,9% mediante la detección del gen 16S ADNr, específico para la especie, de modo que esta última es más cercana a la comunicada en la publicación citada. La discrepancia encontrada entre los dos métodos usados puede deberse al azar, según lo indica el valor del índice Kappa obtenido.

Teniendo en cuenta que el gen *vacA* está presente en todas las cepas de *H. pylori* y que no se han comunicado homólogos de éste en otras especies bacterianas (6), surgió la idea de realizar la amplificación de la región señal y la región media en todas las muestras, aunque éstas fueran negativas por histopatología o por la detección del gen 16S ADNr (Figura 1). Como era de esperarse, en la mayoría de las muestras el resultado obtenido por los tres métodos fue concordante.

Los datos de la Figura 1 sugieren que la detección de *H. pylori* por medio del gen *vacA* puede ser más sensible que mediante el gen 16S ADNr. Esto también se ve reflejado en el hecho que el índice Kappa muestra una mayor concordancia entre la detección por *vacA* y por histología, que entre ésta última y la detección por el gen 16S ADNr. Estos resultados pueden deberse a diferencias en la sensibilidad de las parejas de los cebadores usadas para amplificar cada uno de los fragmentos blanco. La diferencia en la sensibilidad de diversas parejas de cebadores ha sido descrita por varios autores en diferentes organismos (36).

Al comparar la sensibilidad de los dos métodos moleculares usados para la detección de *H. pylori* (16S ADNr y *vacA*), se observa que ambos son sensibles. Sin embargo, al tener en cuenta el VPP, se hace evidente que existe una mayor probabilidad de que los resultados

positivos obtenidos con *vacA* estén identificando a aquellas biopsias que resultaron ser positivas por histología, mientras que la probabilidad de identificar a la bacteria en estas muestras por medio de 16S ADN resulta, por el contrario, baja. En términos de especificidad, los dos métodos moleculares presentan valores bastante altos y ambos presentan VPN significativos, lo que indica que existe una alta probabilidad de que por medio de estas técnicas se obtengan resultados negativos en aquellas muestras negativas para *H. pylori* por histología. En conjunto, estos resultados muestran que la detección por medio de *vacA* da resultados más comparables con los obtenidos por histología que los obtenidos usando como blanco el gen 16S ADN.

Un estudio realizado en Alemania con 30 cepas informó que no se logró amplificar una de las muestras con los cebadores específicos para la región media. Después de analizar la región media de esta cepa, el estudio mostró una diferencia de 9,3% de nucleótidos con las cepas *m2*, y la denominó *m3* (10). Es posible que la infección en el paciente cuya muestra resultó ser positiva para la presencia de la bacteria tanto por histología como por el 16S ADN, pero que no produjo amplificación en ninguna de las regiones del gen *vacA*, esté causada por una cepa que presenta un genotipo de *vacA* que no puede ser amplificado por las parejas de cebadores utilizadas en este estudio. No obstante, sería necesario comprobar esta hipótesis por secuenciación.

La muestra en la que se amplificó el fragmento del gen 16S ADN y se tipificó el gen *vacA*, pero en la cual no se observaron bacilos compatibles con *H. pylori* por medio de histología, era de un paciente con cáncer gástrico. Se ha descrito que la colonización de *H. pylori* en regiones atróficas del estómago es escasa y que casi nunca se da en tejidos con metaplasia (6). Además, si se tiene en cuenta que para los análisis moleculares se tomó un fragmento del antro gástrico (región colonizada preferencialmente por *H. pylori*) y que para los análisis histopatológicos se tomaron fragmentos del tejido en donde se observaba lesión, se puede inferir que es probable que el microorganismo se encontrara en el antro gástrico y no en la región con la lesión. La muestra en la que se tipificó el gen *vacA* pero que no mostró amplificación del fragmento del gen 16S ADN o presencia de bacilos tipo *H. pylori* en el tejido correspondió también a un paciente con cáncer. En ésta pudo haber ocurrido lo mismo que en el caso anterior pero, teniendo en cuenta que hay indicios de que la detección del gen *vacA* es más sensible, es posible que se haya podido identificar este gen y no el gen 16S ADN.

H. pylori coloniza la mucosa gástrica humana y puede permanecer allí durante décadas sin que se presente ningún síntoma (6, 10, 21-23). Por otro lado, su presencia puede causar desde una inflamación leve hasta cáncer.

Se ha comunicado que este microorganismo es el agente etiológico de 70-80% de los casos de gastritis crónica y que puede ser responsable de hasta el 40% de los casos de cáncer gástrico a nivel mundial (9, 10). Esta bacteria fue clasificada como carcinógeno de clase I por la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer en 1994 (10, 29). No obstante, en este estudio no se encontró asociación entre la presencia de la bacteria, determinada por la detección del gen 16S ADN o por la presencia del gen *vacA*, y el desarrollo de gastritis no atrófica, atrófica, metaplasia o cáncer.

La frecuencia de los alelos *s1*, *s2*, *m1* y *m2* encontrada en este trabajo fue bastante similar entre sí y diferente, a su vez, a la encontrada en otros estudios realizados con cepas colombianas, en los que se comunica una mayor frecuencia de los alelos *s1* y *m1* comparados con los alelos *s2*, *m2* (11, 29). Esto puede deberse a que en este caso el número de pacientes con enfermedades gástricas graves fue menor. Con respecto a la tipificación del gen *vacA*, se observó una mayor asociación entre los alelos *s1* y *m1* y también entre los alelos *s2* y *m2*, lo cual concuerda con lo mostrado en otros estudios que han genotipificado cepas colombianas y de otras regiones del mundo (3, 5, 10, 11, 29).

Se determinó que una de las muestras presentaba los tipos *s1*, *s2*, *m1* y *m2*. Es probable que este paciente tenga una infección múltiple; sin embargo, con el método usado en esta investigación (la tipificación directa del ADN extraído de la biopsia) no es posible determinar el genotipo específico de las cepas presentes en el paciente. Esta falencia puede ser superada al cultivar y aislar la bacteria. No obstante, es necesario tener en cuenta que este agente es de difícil cultivo y potencialmente peligroso (25, 30).

Al realizar el análisis estadístico para hallar una posible asociación entre la presencia de la bacteria o el genotipo de *vacA* con el desarrollo de patología, no se encontró una asociación significativa (Figura 2). Los valores de $p > 0,05$ obtenidos pueden deberse a que el número de pacientes en varias de las categorías no fue suficiente teniendo en cuenta el número de variables analizadas. Otras investigaciones realizadas con cepas colombianas sugieren que *vacA* no parece ser útil como marcador de virulencia, debido a que un número elevado de individuos con cepas *vacA s1m1* padecen diferentes patologías gastroduodenales, incluso patologías leves como gastritis (11, 37). Esto concuerda con los hallazgos aquí referidos (Figura 2).

El presente estudio aportó datos sobre la prevalencia de *H. pylori* y los genotipos de *vacA* presentes en una muestra de individuos con trastornos gástricos. Éstos muestran que *vacA* sería un buen blanco para la detección de *H. pylori* a partir del ADN extraído de biopsias gástricas. Por otra parte, con estos resultados no fue posible demostrar una asociación entre la presencia de *H. pylori* o los distintos genotipos de *vacA* con el desa-

rollo de diversas patologías gástricas, como la gastritis no atrófica y atrófica, la metaplasia y el cáncer, para esta muestra de pacientes residentes en Tolima, Colombia.

Agradecimientos: a los participantes del proyecto “Tipificación del gen de la citotoxina vacuolizante de *Helicobacter pylori* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (2005-2007)”;

a los miembros del Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Bioinformática de la Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia; a los miembros de la Universidad del Tolima y del Grupo de Citogenética, Filogenia y Evolución de Poblaciones, Ibagué, Colombia; y al Fondo de Investigaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

- Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, *et al.* Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; 397: 176-80.
- Amieva MR, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S. *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell Microbiol* 2002; 4: 677-90.
- Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-7.
- Blanchard TG, Nedrud JG, Czinn SJ. Local and systemic antibody responses in humans with *Helicobacter pylori* infection. *Can J Gastroenterol* 1999; 13: 591-4.
- Blaser MJ, Parsonnet J. Parasitism by the “slow” bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Invest* 1994; 94: 4-8.
- Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 321-33.
- Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Olivieri C, Patrussi L, Ilver D, *et al.* The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* 2003; 198: 1887-97.
- Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Jaramillo R, García LS. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colombia Med* 2003; 34: 124 -31.
- Cassaro M, Rugge M, Gutiérrez O, Leandro G, Graham DY, Genta M. Topographic patterns of intestinal metaplasia and gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 2001; 95: 1431-8.
- Castillo-Rojas G, Mazari-Miriart M, López-Vidal Y. *Helicobacter pylori*: focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública de México* 2004; 538-48.
- Cittelly DM, Huertas MG, Martínez JD, Oliveros R, Posso H, Bravo MM, *et al.* Los genotipos de *Helicobacter pylori* en gastritis no atrófica difieren de los encontrados en úlcera péptica, lesiones premalignas y cáncer gástrico en Colombia. *Rev Med Chil* 2002; 130: 143-51.
- Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1992; 267: 10570-5.
- Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM Jr. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* 2003; 63: 951-7.
- Czajkowsky DM, Iwamoto H, Cover TL, Shao Z. The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2001-6.
- de Bernard M, Arico B, Papini E, Rizzuto R, Grandi G, Rappuoli R, *et al.* *Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol. *Mol Microbiol* 1997; 26: 665-74.
- de Bernard M, Burrone D, Papini E, Rappuoli R, Telford J, Montecucco C. Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol. *Infect Immun* 1998; 66: 6014-6.
- Fujikawa A, Shirasaka D, Yamamoto S, Ota H, Yahiro K, Fukada M, *et al.* Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nat Genet* 2003; 33: 375-81.
- Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, *et al.* The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome C release. *EMBO J* 2000; 19: 6361-70.
- Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 2003; 301: 1099-102.
- Gebert B, Fischer W, Haas R. The *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: from cellular vacuolation to immunosuppressive activities. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004; 152: 205-20.
- Hardin FJ, Wright RA. *Helicobacter pylori*: review and update. *Hosp Physician* 2002; 23-31.
- Lee A, Fox J, Hazell S. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect Immun* 1993; 1601-10.
- Letley DP, Rhead JL, Twells RJ, Dove B, Atherton JC. Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 2003; 278: 26734-41.
- Li Y, Wandinger-Ness A, Goldenring JR, Cover TL. Clustering and redistribution of late endocytic compartments in response to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 1946-59.
- Logan RPH, Walker MM. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Br Med J* 2001; 232: 920-2.
- McNulty CAM, Wyatt JL. *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1999; 52: 338-44.
- Morales-Espinosa R, Castillo G, González-Valencia G, Ponce de León S, Cravioto A, Atherton JC, *et al.* Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3001-4.
- Murillo LS, Land JA, Pleijster J, Bruggeman CA, Peña AS, Morré SA. Interleukin-1B (IL-1B) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) gene polymorphisms are not associated with tubal pathology and *Chlamydia trachomatis*-related tubal factor subfertility. *Hum Reprod* 2003; 18: 2309-14.
- Quiroga AJ, Cittelly DM, Bravo MM. Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes con enfermedades gastroduodenales. *Biomédica* 2005; 25: 325-34.
- Rivas-Traverso F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed* 2000; 11: 187-205.
- Rittig MG, Shaw B, Letley DP, Thomas RJ, Argent RH, Atherton JC. *Helicobacter pylori*-induced homotypic phagosome fusion in human monocytes is independent of the bacterial *vacA* and *cag* status. *Cell Microbiol* 2003; 5: 887-99.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic

- sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.
33. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1175-86.
34. Telford JL, Covacci A, Rappuoli R, Chiara P. Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 498-503.
35. Thoreson ACE, Borre MB, Andersen LP, Elsborg S, Holck S, Conway P, *et al.* Development of a PCR-based technique for detection of *Helicobacter pylori*. *Immunol Med Microbiol* 1995; 10: 325-34.
36. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3741-51.
37. Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relationship of *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* to *cagA* status, cytotoxin production, and clinical outcome. *Helicobacter* 1998; 3: 241-53.

Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 asociados a cuadros de diarrea

S. GONZÁLEZ FRAGA^{1,4,*}, A. VILLAGRA de TREJO², M. PICHEL¹, S. FIGUEROA²,
G. MERLETTI², M. I. CAFFER¹, M. CECILIA de CASTILLO³, N. BINSZTEIN¹

¹Departamento Bacteriología, INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires; ²Hospital del Niño Jesús, Pasaje Hungría 700 (4000) San Miguel de Tucumán;

³Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Ayacucho 491 (4000) San Miguel de Tucumán;

⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: sgfraga@anlis.gov.ar

RESUMEN

La infección por *Vibrio cholerae*, el agente causal del cólera, se transmite al hombre por ingestión de agua y alimentos contaminados. Aunque son los serogrupos O1 y O139 los que habitualmente se asocian al cólera epidémico, los aislamientos de otros serogrupos también son causales de gastroenteritis e infecciones extra-intestinales. Durante el período 2003-2005, se investigó la presencia de *V. cholerae* en la materia fecal de niños con diarrea atendidos en el Hospital del Niño Jesús, Tucumán. Se recuperaron 34 aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139. Se determinaron sus perfiles de virulencia por PCR, la sensibilidad a los antimicrobianos y la diversidad genética por electroforesis en campo pulsado. Se obtuvieron ocho perfiles de virulencia, aunque ningún aislamiento fue positivo para la toxina colérica ni para la toxina termoestable. Cuatro aislamientos fueron positivos para el sistema de secreción de tipo tres. El 17,6% de los aislamientos fueron resistentes o de sensibilidad intermedia a ampicilina y el 5,9% fueron resistentes a trimetoprima-sulfametoxazol. Los aislamientos resultaron muy diversos: se hallaron 27 patrones distintos en 29 aislamientos tipificables por electroforesis en campo pulsado. A pesar de su baja incidencia, *V. cholerae* continúa siendo un agente causal de diarrea en niños, los que se ven afectados por una amplia variedad de cepas circulantes.

Palabras clave: *V. cholerae* no-O1, no-O139, factores de virulencia, PFGE

ABSTRACT

Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139 isolates associated with diarrhea. *Vibrio cholerae*, etiologic agent of cholera, is transmitted to humans by ingestion of contaminated food or water. Even though serogroups O1 and O139 are the ones usually associated to epidemic cholera, isolates from other serogroups also cause gastroenteritis and extraintestinal infections. During the period 2003-2005, presence of *V. cholerae* in stools was investigated in children with diarrhea that sought assistance at the Niño Jesús Hospital in Tucumán. Thirty four isolates of *V. cholerae* non-O1, non-O139 were recovered. We characterized the isolates studying its virulence factors by PCR, antimicrobial susceptibility patterns and genetic diversity by pulsed-field gel electrophoresis. Eight virulence patterns were obtained although no isolate was positive for the cholera toxin or the thermostable toxin. Four isolates were positive for the type three secretion system. The 17.6% of the isolates were resistant or intermediate to ampicillin and 5.9% were resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole. By *Sfi*I-PFGE, all isolates were genetically very diverse, as 27 different patterns were identified in 29 typeable isolates by pulsed-field gel electrophoresis. Although it has a low incidence, *V. cholerae* continues to be a causative agent of diarrhea in children, who are affected by a variety of circulating strains of *V. cholerae* non-O1, non-O139.

Key words: *V. cholerae* non-O1 and non-O139 isolates, virulence factors, PFGE

INTRODUCCIÓN

Vibrio cholerae es el agente causal del cólera, una enfermedad infecciosa conocida desde la antigüedad. Es un habitante autóctono de los ecosistemas acuáticos, los que a su vez actúan como reservorios y vehículos de transmisión de este patógeno (8). La infección por *V. cholerae* es adquirida por la ingestión de agua o alimentos contaminados. Sus manifestaciones clínicas incluyen una profusa diarrea acuosa, vómitos y deshidratación, con gran pérdi-

da de sales y agua. *V. cholerae* ha sido clasificado en numerosos serogrupos, de los cuales sólo el O1 y, más recientemente, el O139 (20) han causado epidemias de cólera. Sin embargo, cepas pertenecientes a los serogrupos no-O1, no-O139 han sido aisladas de pacientes con síntomas que van desde una diarrea leve hasta la deshidratación grave, semejante a la observada en el cólera (23, 26). Por otro lado, cepas de estos serogrupos se han asociado a sepsis y a cuadros extraintestinales, como también a infecciones de heridas superficiales.

En 1991 el cólera reemergió en Perú (22), luego de aproximadamente 100 años de ausencia de casos en Sudamérica. Esta epidemia fue causada por *V. cholerae* O1 biotipo El Tor. En Argentina ocurrieron siete brotes de cólera entre 1992 y 1998. En el país se estableció un activo programa de vigilancia que incluyó la creación de la Red de Laboratorios de Diarreas y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria. En el marco de este programa y también a través de estudios de monitoreo en el medio ambiente, desde 1992 hasta 2007 se identificaron y caracterizaron alrededor de 3.500 aislamientos de *V. cholerae* O1 y no-O1 de origen humano y ambiental provenientes de distintas regiones del país (10, 17, 26). *V. cholerae* O1 fue aislado únicamente durante los periodos epidémicos, principalmente en el norte del país y en los meses de verano. En cambio, los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 siguieron un patrón diferente, ya que se recuperaron principalmente en primavera y verano, pero también en los meses de otoño e invierno. En general, los aislamientos clínicos estaban asociados a casos esporádicos de diarrea grave o moderada, aunque también hubo microorganismos recuperados de septicemias. En diciembre de 1999 y enero de 2000, ocurrió en Orán (provincia de Salta) un brote de diarrea que afectó a niños y adultos y que duplicó el número de coprocultivos esperados para la época del año; durante ese brote se recuperó *V. cholerae* no-O1 de diez pacientes y también de fuentes de agua de la zona.

Los principales factores de virulencia asociados al cólera epidémico incluyen la enterotoxina conocida como CT (11) y el factor de colonización TCP (*toxin coregulated pilus*) codificado en la isla de patogenidad VPI (33), ambos habitualmente ausentes en *V. cholerae* no-O1, no-O139 (21). Para estos serogrupos se postula un mecanismo de patogenia diferente, en el que intervienen otros factores de virulencia. La diarrea en general es acuosa, aunque puede presentar sangre y moco (23). Por otra parte, *V. cholerae* no-O1, no-O139 puede producir otros productos extracelulares como la toxina termoestable NAG-ST y las citolisinas VCC/HlyA y RTX (1, 5, 21), los que pueden estar contribuyendo a la virulencia de estas cepas. También se ha descrito una neuraminidasa codificada en otra isla de patogenidad (VPI-2), que cliva el ácido siálico de los gangliósidos presentes en las células eucariotas (19). Se cree que esta enzima aumenta la sensibilidad de las células hospedadoras a la toxina CT, ya que expone al gangliósido GM₁, receptor de la toxina. La neuraminidasa está habitualmente asociada a cepas toxigénicas; sin embargo, también ha sido descrita en aislamientos de *V. cholerae* no toxigénicos como la variante Amazonia (15). Recientemente se ha descrito la presencia de un sistema de secreción de tipo III en cepas de *V. cholerae* no-O1 que puede participar en la virulencia de estas cepas (13, 32).

Diferentes estudios muestran que *Vibrio cholerae* es una especie de alta diversidad genética, y ello se ha observado utilizando diferentes técnicas de tipificación como multilocus enzimolectroforesis (2), ribotipificación (14), diferentes estrategias basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (25, 31) y MLST (*multilocus sequence typing*) (16). Estas técnicas poseen diferente poder de discriminación y estudian distintas porciones del genoma. También hay estudios en los que se utilizó la electroforesis de campo pulsado (PFGE) con las enzimas de restricción *NotI* o *SfiI*, los que mostraron que esta técnica es muy discriminatoria para estudiar la diversidad genética de aislamientos de *V. cholerae* (4, 25, 31). En general, dichos estudios muestran un agrupamiento de los aislamientos O1 y O139 toxigénicos causales de epidemias –lo que indicaría una dispersión clonal de cepas epidémicas– y, por otra parte, una alta diversidad para los aislamientos no toxigénicos de los serogrupos O1 y no-O1.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los perfiles de virulencia y la diversidad genética de los aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 recuperados de niños con diarrea atendidos en el Hospital del Niño Jesús de San Miguel de Tucumán durante el período 2003-2005.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Se estudiaron 14 724 coprocultivos correspondientes a niños con diarrea atendidos en el Hospital del Niño Jesús de San Miguel de Tucumán entre el 1° de enero de 2003 y el 31 de diciembre de 2005.

Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*

Las muestras de materia fecal se obtuvieron principalmente por hisopado anal o rectal y se conservaron en el medio de transporte Cary Blair hasta su traslado al laboratorio del hospital. Se sembraron en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), y en agar sangre preparado con sangre humana al 5% en el medio tripteína de soja (Laboratorios Britania, CABA, Argentina); estas placas se incubaron durante 24 h a 37 °C luego de un enriquecimiento de 6-8 h en agua peptonada alcalina (APA) (Oxoid Ltd.). Las colonias amarillas en TCBS (sacarosa positivas) o hemolíticas en agar sangre y oxidasas positivas fueron caracterizadas utilizando las pruebas bioquímicas para *V. cholerae* descritas por Dodin *et al.* (12). Además, se realizó la prueba de la cuerda en desoxicolato de sodio, positiva para *Vibrio cholerae*. Los aislamientos de *V. cholerae* fueron serotipificados por aglutinación en placa utilizando sueros policlonales (anti-O139, O1, Ogawa e Inaba) producidos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Para confirmar la identificación realizada por pruebas bioquímicas se efectuó PCR múltiple A con cebadores específicos para *Vibrio cholerae* (6). Los resultados de la serotipificación se confirmaron mediante PCR múltiple B con el empleo de cebadores para detectar los serogrupos O1 y O139 (28), utilizando la técnica detallada en el próximo párrafo y en la Tabla 2. Los aislamientos de *V. cholerae* caracterizados en este estudio se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 analizados mediante PCR

Aislamiento	Toma de muestra	Barrio	Sexo	Edad	<i>V. cholerae</i> O1-O139	ctxA	tcpA ET ⁽¹⁾	tcpI	stn/sto	toxR	hlyA	rtxA	nanH	vcsV ₂	vcsN ₂	PV ⁽²⁾
T153	Ene-03	Alderetes	F	1 año 6 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T347	Ene-03	Banda del Río Salí	M	6 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T557	Ene-03	San Miguel de T.	F	10 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T997	Ene-03	Banda del Río Salí	F	1 año 8 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T1035	Ene-03	Alderetes	M	11 años	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T4747	Abr-03	Banda del Río Salí	F	14 años	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T16586	Nov-03	Banda del Río Salí	F	1 año 1 mes	+	-	-	-	-	+	ET	+	+	-	-	B
T17454	Nov-03	Banda del Río Salí	M	8 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	+	-	-	B
T18118	Dic-03	Villa Alem	F	2 años	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	G
T18641	Dic-03	Banda del Río Salí	F	2 años	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T597	Ene-04	Banda del Río Salí	M	9 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T1378	Ene-04	Famailá	M	2 años 8 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T1848	Feb-04	Banda del Río Salí	F	1 año	+	-	-	+	-	+	ET	+	+	-	-	E
T2734	Feb-04	Los Vázquez	F	11 meses	+	-	-	+	-	+	ET	+	+	-	-	E
T2799	Feb-04	Ciudadela	M	11 años	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T4463	Mar-04	Yerba Buena	M	2 años	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	+	+	F
T4956	Abr-04	Banda del Río Salí	M	1 año	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	H
T6228	May-04	San Miguel de T.	F	1 año 10 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	+	+	+	C
T8792	Jul-04	Banda del Río Salí	F	8 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	+	+	+	C
T14438	Oct-04	San Miguel de T.	F	2 años	+	-	-	-	-	+	ET	+	+	-	-	B
T14707	Nov-04	Villa 9 de Julio	M	1 año 2 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T15704	Nov-04	San Miguel de T.	M	3 años	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T15881	Nov-04	Banda del Río Salí	M	1 año	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	D
T17612	Dic-04	San Miguel de T.	M	1 año 3 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	+	-	-	B
T17659	Dic-04	Banda del Río Salí	F	2 años	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T987	Ene-05	Banda del Río Salí	M	4 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	+	-	-	B
T1917	Feb-05	Santiago del Estero	F	6 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T2508	Feb-05	Lules	M	1 año 2 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	+	-	-	B
T4174	Mar-05	San Miguel de T.	M	5 años	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	D
T4582	Mar-05	Banda del Río Salí	M	3 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	+	-	-	B
T4630	Mar-05	Reducción	F	4 años	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	D
T7189	May-05	Ranchillos	F	7 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T7959	Jun-05	Famailá	F	1 año 2 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	-	-	-	A
T9242	Jul-05	Costanera Norte	F	3 años 4 meses	+	-	-	-	-	+	ET	+	+	+	+	C

¹ET: El Tor; ²PV: perfil de virulencia

Tabla 2. Condiciones de las reacciones de PCR

Blanco de amplificación	Cebadores	Tamaño amplicón (pb)	Concentración cebador (μM)	Apareamiento (°C)	Extensión (min)	Referencia
PCR Múltiple A (<i>V. cholerae</i> - <i>ctxA</i> - <i>tcpA</i>)						
<i>V. cholerae</i>	pVC-F2 pVCm-R1	300	0,8			Chun <i>et al.</i> , 1999
<i>ctxA</i>	CT 94F CT 614R	564	0,4	60	1	Rivera <i>et al.</i> , 2001
<i>tcpA</i> El Tor	TCP 72F TCP 477R	461	0,4			Rivera <i>et al.</i> , 2001
PCR Múltiple B (O1-O139)						
O1	VCO1-F2 VCO1-R2	647	0,4			Rivera <i>et al.</i> , 2003
O139	VCO139-F2 VCO139-R2	741	0,4	55	1,5	
PCR Múltiple C (<i>stn</i> / <i>sto</i> - <i>rtxA</i>)						
<i>stn/sto</i>	67F 194F	172	1			Rivera <i>et al.</i> , 2001
<i>rtxA</i>	rtxA-F rtxA-R	417	0,8	55	1	Chow <i>et al.</i> , 2001
PCR Múltiple D (<i>hlyA</i> Clásico y El Tor)						
<i>hlyA</i>	489-F 744-F 1184-R	737 ⁽¹⁾ 480 ⁽²⁾	0,8	60	1	Rivera <i>et al.</i> , 2001
PCR <i>toxR</i>						
<i>toxR</i>	101F 837R	779	0,8	60	1	Rivera <i>et al.</i> , 2001
PCR <i>tcpI</i>						
<i>tcpI</i>	132F 951R	862	0,8	60	1	Rivera <i>et al.</i> , 2001
PCR <i>nanH</i>						
<i>nanH</i>	nanH-1 nanH-2	1900	0,6	55	1	Jermyn <i>et al.</i> , 2002
PCR <i>vcsN₂</i>						
<i>vcsN₂</i>	N2-F N2-R	500	0,3	52	1	Este trabajo
PCR <i>vcsV₂</i>						
<i>vcsV₂</i>	V2-F V2-r	720	0,3	55	1	Este trabajo

⁽¹⁾Positivo para los biotipos Clásico y El Tor, ⁽²⁾específico para El Tor

Sensibilidad a los antimicrobianos

Se evaluó la sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión con discos utilizando discos comerciales (Laboratorios Britania) de ampicilina (AMP, 10 μg), trimetoprima – sulfametoxazol (SXT, 1,25 / 23,75 μg), furazolidona (FUR, 100 μg), fosfomicina (FOS, 50 μg), tetraciclina (TET, 30 μg) y norfloxacin (NOR, 10 μg). Frente a la AMP, la SXT y la TET, los resultados obtenidos se interpretaron según las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, USA) para *V. cholerae*; en el caso de los demás antimicrobianos la interpretación se basó en las recomendaciones para *Enterobacteriaceae* (7).

Identificación de factores de virulencia por PCR

Sobre la base de protocolos ya publicados, se realizaron diferentes reacciones de PCR para detectar genes que codifican factores de virulencia, entre ellos: *ctxA* (que codifica la subunidad

A de CT); *tcpA* El Tor (que codifica la unidad estructural del factor de colonización TCP, alelo El Tor, TcpA); *tcpI* (que codifica una proteína asociada a la membrana interna y reguladora de la síntesis de TcpA); *toxR* (que codifica la proteína ToxR, reguladora de la expresión y la secreción de CT y TCP); *stn/sto* (que codifica la toxina termoestable NAG-ST); *hlyA* (que codifica la citolisina HlyA/VCC); *rtxA* (que codifica la toxina formadora de poros RTX); y *nanH* (que codifica una neuraminidasa) (5, 19, 27). Los protocolos fueron ligeramente modificados, ya que se implementó PCR múltiple A para *V. cholerae*, *ctxA* y *tcpA* El Tor y PCR múltiple C para *stn/sto* y *rtxA*, como se muestra en la Tabla 2. También se desarrollaron dos reacciones de PCR para los genes *vcsN₂* y *vcsV₂* que codifican la ATPasa y la proteína estructural del sistema de secreción de tipo III, recientemente encontrado en *V. cholerae* (13). La secuencia de los cebadores utilizados es la siguiente: N2-F: GCAGTTGAGCCAATTCCATTACAG; N2-R: CGACCAAACGAGATAATGCT; V2-F:

CTATTTGGCTCACTTGATGGGGC; V2-R: GCCACATCATTGCTTGCTACC. Las condiciones de ciclado y la concentración de los cebadores (Operon Biotechnologies, Cologne, Alemania) se muestran en la Tabla 2. Para todas las reacciones de amplificación, la concentración final de $MgCl_2$ fue de 1,5 mM. Los templados de ADN fueron preparados por el método de hervido y se utilizaron 2 μ l para la amplificación por PCR (volumen final 25 μ l). Como controles se utilizaron las siguientes cepas: RC138 (*V. cholerae* O139, *ctxA* +, *tcpA* El Tor +, *hlyA* El Tor, *toxR* +, *stn/sto* -, *rtxA* +) y RC2 (*V. cholerae* O1, *ctxA* +, *tcpA* El Tor -, *hlyA* Clásica, *toxR* +, *stn/sto* -, *rtxA* +), provistas por la Dra. Rita Colwell, Center of Marine Biotechnology, University of Maryland, EE.UU.; y la cepa 83-7771 (*V. cholerae* no-O1, no-O139, *ctxA* -, *tcpA* El Tor -, *hlyA* El Tor+, *toxR* +, *stn/sto* +, *rtxA* +), provista por el Dr. Clifford Clark, National Microbiology Laboratory, Canadá. También se utilizó una cepa autóctona BA312 como control positivo para *vcsV₂* y *vcsN₂*. Como control de reactivos se agregaron 2 μ l de agua en lugar del templado a la mezcla de reacción. El programa de ciclado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min seguida de 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de apareamiento a temperatura variable, tiempo variable de extensión a 72 °C y una extensión final a 72 °C durante 10 min (Tabla 2).

Diversidad genética por electroforesis de campo pulsado

Se utilizó el protocolo de PFGE estandarizado de la Red PulseNet Internacional para *Vibrio cholerae* (9). Brevemente, el ADN genómico se preparó mezclando en partes iguales una suspensión bacteriana de densidad óptica 0,9 a 610 nm en buffer Tris-EDTA 100 mM con agarosa SeaKem Gold 1%. Luego de una lisis de 1 h a 54 °C (solución para la lisis: Tris 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8, lauril sarcosina 1%, proteinasa K 0,1 mg/ml), se realizaron dos lavados con agua y cuatro lavados con TE 1X en baño con agitación a 50 °C. La restricción se realizó con 40 U de la enzima *SfiI* o con 30 U de *NotI* incubando toda la noche a 50 °C o 37° respectivamente. La cepa *Salmonella* Braenderup H9812 digerida con *XbaI* se utilizó como estándar. La electroforesis se realizó con agarosa SeaKem Gold 1% utilizando un equipo CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) en buffer TBE 0,5X con el siguiente programa: 2 a 10 seg, 13 h; 20 a 25 seg, 6 h. Para los aislamientos que presentaron una degradación completa del ADN se repitió el ensayo con el agregado de tiourea 50 μ M en el buffer de corrida TBE (29). Aquellos aislamientos en los que no se resolvió la degradación fueron considerados no tipificables por PFGE. Los patrones de PFGE se analizaron por inspección visual y utilizando también el programa BioNumerics versión 4.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Los dendrogramas se construyeron utilizando el coeficiente de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA.

RESULTADOS

Aislamiento de *Vibrio cholerae*

La frecuencia de aislamiento de *V. cholerae* obtenido de los coprocultivos fue 0,23%; *Shigella* spp. fue el patógeno bacteriano más frecuentemente aislado de diarreas durante el período estudiado y estuvo presente en el 10,30% de los 14 724 coprocultivos estudiados. También se aisló *Salmonella* spp. (1,54%) y *Aeromonas* spp. (1,73%). No se detectaron casos de cólera ni se aisló *V. cholerae* de los serogrupos O1 u O139.

Se recuperaron 34 aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 que se confirmaron con pruebas bioquímicas, serotipificación y PCR. En la Tabla 1 se presentan las fechas de toma de muestra, la ubicación geográ-

fica, el sexo y la edad de los pacientes, como así también los resultados de las reacciones de PCR de los diez factores de virulencia analizados y de las que confirmaron la identificación como *V. cholerae* no-O1, no-O139. Los pacientes que presentaron diarrea por *V. cholerae* no-O1, no-O139 tenían entre 3 meses y 14 años (mediana = 1,25).

Con respecto a las manifestaciones clínicas, 19 de los 34 pacientes estudiados (56%) presentaron diarrea de tipo acuosa, otros 12 (35%) presentaron diarrea mucosa con sangre y no se contó con información de los tres pacientes restantes. En cinco de estos casos se observó asociación con otros patógenos: en cuatro muestras de diarrea acuosa se identificaron parásitos y en una de diarrea sanguinolenta se aisló *Shigella sonnei*. Por otro lado, 22 de los pacientes (65%) presentaron deshidratación leve, seis deshidratación moderada y uno deshidratación grave.

Sensibilidad a los antimicrobianos

La mayoría de los aislamientos (74%) fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados. Cuatro aislamientos fueron resistentes a la ampicilina y dos fueron de sensibilidad intermedia. También se detectaron dos aislamientos resistentes a la trimetoprima-sulfametoxazol y un aislamiento resistente a la fosfomicina. Ningún aislamiento fue resistente a más de un antimicrobiano.

Factores de virulencia

Todos los aislamientos fueron negativos para *ctxA*, *stn/sto* y *tcpA* El Tor. Dos aislamientos fueron positivos para *tcpI* y, aunque fueron negativos para *tcpA* El Tor, como *tcpI* y *tcpA* pertenecen al mismo operón, es posible que posean otro alelo del factor de colonización TCP. Todos los aislamientos fueron positivos para *toxR*, mientras que 29 (85%) y 31 (91%) aislamientos fueron positivos para *hlyA* (hemolisina El Tor- ET) y *rtxA*, respectiva-

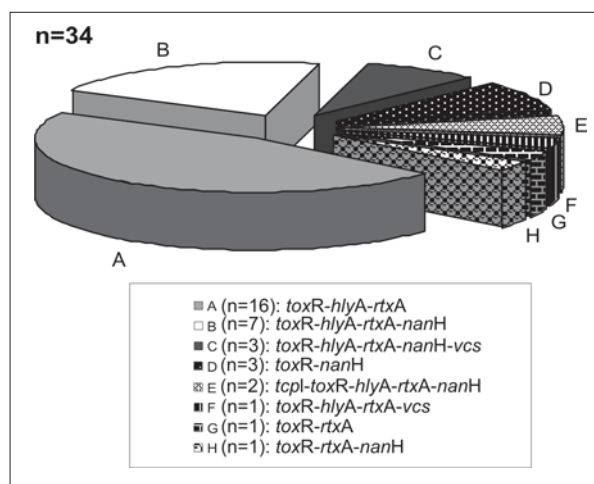


Figura 1. Distribución de los perfiles de virulencia de los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139.

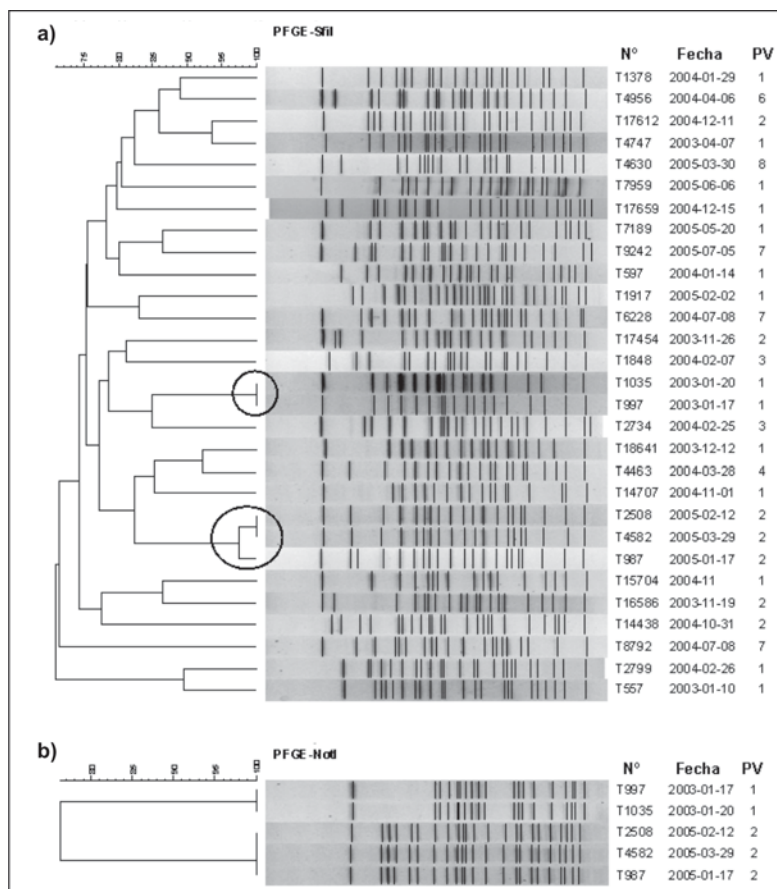


Figura 2. a) Dendrograma de *SfiI*-PFGE para los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139. b) Dendrograma de *NotI*-PFGE para los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 que presentaron patrones compartidos con la enzima *SfiI*. En las columnas de la derecha se presenta el número que identifica al aislamiento, la fecha de aislamiento y el perfil de virulencia por PCR (PV). Los círculos señalan los grupos identificados con un coeficiente de similitud mayor del 95%.

mente. El gen *nanH* estuvo presente en 16 aislamientos (47%) y los genes *vcsN₂* y *vcsV₂* amplificaron en 4 de los 34 aislamientos (12%). Al estudiar la presencia de factores de virulencia se detectaron ocho perfiles diferentes (Figura 1 y Tabla 1), con una mayor prevalencia (47%) para aquel que poseía los genes *toxR*, *hlyA* y *rtxA* (perfil A), seguido del que, además de estos tres genes, también incluía *nanH* (perfil B), con el 20%. El resto de los perfiles de virulencia estaba representado por uno a tres aislamientos.

Diversidad genética

De los 34 aislamientos estudiados, cinco (T347, T153, T18118, T15881 y T4174) fueron no tipificables por PFGE, incluso luego de agregar tiourea en el buffer de corrida. La técnica demostró tener alto poder de discriminación, ya que se encontraron 27 patrones electroforéticos diferentes entre los 29 aislamientos comparados (Figura 2a).

Solamente se identificaron dos grupos integrados por dos y tres aislamientos, cada uno con una similitud mayor al 95% al calcular el coeficiente de Dice (señalados en la Figura 2a). El primer grupo comprendió los aislamientos T1035 y T997, recuperados en enero de 2003; éstos fueron indistinguibles con las dos enzimas de restricción utilizadas (Figuras 2a y 2b) y tuvieron el mismo perfil de virulencia (perfil A). El segundo grupo estuvo integrado por los aislamientos T2508, T4582 y T987, recuperados entre enero y marzo del 2005; sus patrones de *SfiI*-PFGE difirieron en una sola banda y fueron indistinguibles por *NotI*-PFGE (Figura 2b). Estos tres aislamientos también compartían el mismo perfil de virulencia (perfil B). Los aislamientos de los dos grupos fueron recuperados en verano de pacientes que habitaban en barrios cercanos al Río Salí.

Al analizar los aislamientos con una similitud mayor al 90% se observaron dos nuevos grupos. Estos compren-

dían a los aislamientos T17612 y T4747 por un lado, y a T18641 y T4463 por otro. Los aislamientos diferían en más de siete bandas al ser analizados por *Sfi*I-PFGE y presentaban distintos perfiles de virulencia. También se identificaron grupos con mayor cantidad de aislamientos que tenían una similitud del 75% al 88%, pero que presentaban al menos diez bandas de diferencia y un máximo de cinco perfiles de virulencia diferentes.

DISCUSIÓN

A lo largo de los años 2003 al 2005 se realizó una intensiva vigilancia de diarreas por *V. cholerae* en el Hospital del Niño Jesús de San Miguel de Tucumán. Al confirmarse solamente 34 aislamientos de 14.724 coprocultivos, se puede afirmar que las diarreas por *V. cholerae* tienen baja incidencia en los pacientes pediátricos de San Miguel de Tucumán y afectan principalmente a niños de corta edad, los que en su mayoría exhiben diarrea de tipo acuosa, aunque fue llamativo el alto porcentaje de los casos (35%) que presentaron diarrea con sangre. El grado de deshidratación observado fue variable; como el tipo de diarrea predominante fue la acuosa, pensamos que la consulta temprana de las madres frente al cuadro de diarrea de sus hijos y la pronta instauración de la hidratación adecuada (oral, endovenosa, o ambas) evitó un grado de deshidratación mayor. De los 34 pacientes de los que se aisló *V. cholerae*, 21 (62%) vivían en zonas geográficas cercanas a ríos como el Salí, el Lules y el Canal Norte (Cuenca del Río Salí); esto se asume como un importante factor de riesgo para contraer diarreas causadas por *Vibrio* spp. y también por *Aeromonas* spp.

Aunque el tratamiento antimicrobiano de los cuadros diarreicos por *Vibrio cholerae* no tiene demasiada importancia en la evolución clínica, es útil para cortar la cadena epidemiológica y evitar así la diseminación del patógeno. Los antimicrobianos ensayados, sobre todo la furazolidona, la trimetoprima-sulfametoxazol y, en menor medida, la ampicilina, presentaron buena cobertura frente a estos aislamientos provenientes de una población pediátrica. Todos los aislamientos fueron sensibles a tetraciclina y norfloxacin, y aunque estos antimicrobianos no están autorizados para uso pediátrico, es importante ensayarlos para emplearlos, en caso de ser necesarios, en adultos. No se detectaron cepas multirresistentes.

Los aislamientos encontrados tuvieron diversos perfiles de virulencia; sin embargo, no se encontró correlación entre los síntomas y signos expuestos por los pacientes y los perfiles de virulencia de los aislamientos (datos no mostrados). Los aislamientos en ningún caso presentaron los genes que codifican la toxina CT (*ctxA*) o la toxina termoestable NAG-ST (*stn/sto*). En cambio, el gen que codifica el regulador ToxR (*toxR*) y los genes que codifican las citolisin HlyA/VCC y RTX (*hlyA* y *rtxA*) estuvieron ampliamente distribuidos entre los aislamientos.

Estos conformaron el perfil de virulencia más frecuente (perfil A, 47%). Tanto HlyA/VCC, que altera el balance osmótico de las células eucariotas (18), como RTX, que despolimeriza los filamentos de actina en células eucariotas (30), podrían explicar la patogenia de las cepas de *V. cholerae* CT negativas y quizás, los casos de diarrea muco-sanguinolenta. Los resultados de la caracterización de aislamientos de origen humano fueron concordantes con los encontrados para aislamientos ambientales recuperados del río Lules y de dos sitios del río Salí (17), ya que los perfiles de virulencia son muy semejantes. Esta similitud, sumada a la falta de correlación entre los perfiles de virulencia de los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 y la presentación clínica de la diarrea sugiere que, además de estos factores de virulencia del patógeno, la cantidad de microorganismos ingerida y el estado inmune del huésped tienen un papel muy importante en la evolución de la enfermedad. Por esta razón es importante la vigilancia de este patógeno, especialmente en las poblaciones más vulnerables, como los niños, los ancianos y los inmunocomprometidos.

Es interesante resaltar que se encontraron 16 aislamientos positivos para el gen que codifica la neuraminidasa (*nanH*), que pertenece a la isla de patogenidad VPI-2, habitualmente asociada a cepas epidémicas portadoras de la toxina CT (19). Sin embargo, la presencia de dicho gen no implica la presencia de la isla VPI-2 completa (24). Es necesario investigar este aspecto, como también el papel de la neuraminidasa en la patogénesis de aislamientos CT negativos.

También es importante destacar la presencia del sistema de secreción de tipo III (T3SS) –hasta ahora, el único descrito para *V. cholerae*– en cuatro de los aislamientos estudiados, ya que este sistema puede aportar mecanismos de patogenia alternativos para las cepas de *V. cholerae* no toxigénicas. A su vez, se ha descrito que los genes *vcs* que codifican el T3SS de *V. cholerae* también se encuentran en la isla VPI-2 (24). En el grupo de aislamientos analizados, solamente tres aislamientos portaban el gen *nanH* y los genes *vcs*. A su vez, hubo tres aislamientos con el gen *nanH* y sin los genes *vcs*, y un aislamiento que poseía los genes *vcs* y no el gen *nanH*. Esto estaría indicando una estructura distinta de la isla VPI-2 o una localización diferente de estos genes.

Al igual que en otros estudios (4, 31), se encontró alta diversidad genética en los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 analizados por PFGE, ya que solamente se identificaron dos pequeños grupos genéticamente muy relacionados, de dos y tres aislamientos cada uno. Si bien se observaron en el dendrograma otros grupos, con una similitud de entre 75% y 95%, los aislamientos dentro de esos grupos presentaban más de siete bandas de diferencia y distintos perfiles de virulencia. Esto sugiere que estos agrupamientos incluyeron aislamientos que pertenecían probablemente a diferentes linajes.

Nuestros resultados muestran que no existe un número limitado de clones que persiste en esta región, sino que existe gran diversidad entre las cepas de *V. cholerae* no-O1, no-O139 capaces de causar enfermedad en el hombre, aun dentro de una región acotada, como es el caso de la cuenca del río Salí. Estos resultados coinciden con los encontrados por Bidinost *et al.* (3) en el estudio llevado a cabo en la provincia de Córdoba con aislamientos ambientales y humanos. Más aún, esta diversidad ha sido también demostrada por nuestro grupo en un estudio reciente aplicando MLST sobre aislamientos de *V. cholerae* de Argentina (16).

Finalmente, informamos que se ha detectado un aislamiento portador de los genes *ctxA* y *tcpI*, recuperado en San Miguel de Tucumán en febrero de 2007 de un paciente varón de 2 años y 6 meses, que consultó por la guardia de emergencia por diarrea con reacción inflamatoria, vómitos y mal estado general. Dicho aislamiento, caracterizado como *V. cholerae* no-O1, no-O139 (resultados no publicados), evidencia la transferencia horizontal de genes, ya que *ctxA* y *tcpI* están usualmente asociados a *V. cholerae* O1.

Es necesario destacar la importancia de reactivar la vigilancia de *V. cholerae*, tanto en casos clínicos como en los reservorios acuáticos, para detectar oportunamente la aparición de cepas con potencial patogénico, ya sea del serogrupo O1 o de otros serogrupos.

Agradecimientos: al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la beca otorgada a S. González Fraga, y a M. Panagopulo por su asistencia técnica. Este estudio fue realizado con fondos del proyecto PICTR 2000-00010 otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

BIBLIOGRAFÍA

- Arita M, Takeda T, Honda T, Miwatani T. Purification and characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* 1986; 52: 45-9.
- Beltrán P, Delgado G, Navarro A, Trujillo F, Selander RK, Cravioto A. Genetic diversity and population structure of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 581-90.
- Bidinost C, Saka HA, Aliendro O, Sola C, Panzetta-Duttari G, Carranza P, *et al.* Virulence factors of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* isolated in Córdoba, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2004; 36:158-63.
- Choudhury SR, Bhadra RK, Das J. Genome size and restriction fragment length polymorphism analysis of *Vibrio cholerae* strains belonging to different serovars and biotypes. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 115: 329-34.
- Chow IK, Yuen K, Yam W. Detection of RTX Toxin Gene in *Vibrio cholerae* by PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2594-7.
- Chun J, Huq A, Colwell R. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 2202-8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th Informational Supplement, 2008; M100-S18. Wayne, PA, USA.
- Colwell RR. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 1996; 274: 2025-31.
- Cooper KL, Luey CK, Bird M, Terajima J, Nair GB, Kam KM, *et al.* Development and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae*. *Foodborne Pathog Dis* 2006; 3: 51-8.
- Costagliola M, López A, Malaspina A, Guerrero R, Medina D, Odizzio M, *et al.* Estudio de la presencia de *V. cholerae* en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya: período 1992-1996. *Frente Marítimo* 2000; 18: 53-8.
- De SN. Enterotoxogenicity of bacteria-free culture-filtrate of *Vibrio cholerae*. *Nature* 1959; 183: 1533-4.
- Dodin A, Fournier JM. Méthodes de laboratoire pour le diagnostic du vibriose cholérique et des autres vibrioses. Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur. Paris, Institut Pasteur 1992, p. 91-148.
- Dziejman M, Serruto D, Tam VC, Sturtevant D, Diraphat P, Faruque SM, *et al.* Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3465-70.
- Faruque SM, Chowdhury N, Kamruzzaman M, Dziejman M, Rahman MH, Sack DA, *et al.* Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2123-8.
- Figueiredo SC, Neves-Borges AC, Coelho A. The neuraminidase gene is present in the non-toxicogenic *Vibrio cholerae* Amazonia strain: a different allele in comparison to the pandemic strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 563-9.
- González Fraga S, Pichel M, Binsztein N, Johnson JA, Morris JG Jr, Stine OC. Lateral gene transfer of O1 serogroup encoding genes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 286: 32-8.
- González Fraga S, Pichel M, Costagliola M, Cecilia M, Jurquiza V, Peressutti S, *et al.* Environment and virulence factors of *Vibrio cholerae* strains isolated in Argentina. *J Appl Microbiol* 2007; 103: 2448-56.
- Gutiérrez MG, Saka HA, Chinen I, Zoppino FC, Yoshimori T, Bocca JL, *et al.* Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytotoxin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 1829-34.
- Jermyn WS, Boyd EF. Characterization of a novel vibrio pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (nanH) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology* 2002; 148: 3681-93.
- Kaper JB, Morris JG Jr, Levine MM. Cholera. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 48-86.
- Kurazono H, Pal A, Bag PK, Nair GB, Karasawa T, Mihara T, *et al.* Distribution of genes encoding cholera toxin, zonula occludens toxin, accessory cholera toxin, and El Tor hemolysin in *Vibrio cholerae* of diverse origins. *Microb Pathog* 1995; 18: 231-5.
- Levine M. South America: the return of cholerae. *Lancet* 1991; 338: 45-6.
- Morris JG. Non-O group 1 *Vibrio cholerae* strains not associated with epidemic disease. En: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik Ø, editors. *Vibrio cholerae* and Cholera. Washington D.C., ASM Press, 1994, p. 103-15.
- Murphy RA, Boyd EF. Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates. *J Bacteriol* 2008; 190: 636-47.
- Pichel M, Rivas M, Chinen I, Martín F, Ibarra C, Binsztein N. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 124-34.
- Rivas M, Cacace ML, Ayala LT, Baschkier A, Miliwebsky E, Caffer MI. Casos de gastroenteritis asociados a *Vibrio cholerae* no-O1 en Orán, Salta. *Rev Argent Microbiol* 1996; 28: 163-9.

27. Rivera I, Chun J, Huq A, Sack R, Colwell RR. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 2421-9.
28. Rivera I, Lipp E, Gil A, Choopun N, Huq A, Colwell RR. Method for extraction and application of multiplex PCR to detect toxigenic *V. cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. Environ Microbiol 2003; 5: 599-606.
29. Römmling U, Tümmler B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 2000; 38: 464-5.
30. Sheahan KL, Cordero CL, Satchell KJ. Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholerae* RTX toxin that covalently cross-links actin. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 9798-803.
31. Singh DV, Matte MH, Matte GR, Jiang S, Sabeena F, Shukla BN, *et al.* Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 910-21.
32. Tam VC, Serruto D, Dziejman M, Brieher W, Mekalanos JJ. A type III secretion system in *Vibrio cholerae* translocates a formin/spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization. Cell Host Microbe 2007; 1: 95-107.
33. Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 2833-7.

Diagnóstico molecular de histoplasmosis humana en muestras de sangre entera

A. I. TORANZO¹, I. N. TIRABOSCHI², N. FERNÁNDEZ², B. IBARRA-CAMOU¹, M. C. RIVAS¹, W. LEE¹, G. DAVEL¹, C. E. CANTEROS^{1*}

¹Departamento Micología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires; ²División Infectología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires.

Av. Córdoba 2351 (1120) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

*Correspondencia. E-mail: ccanteros@anlis.gov.ar

RESUMEN

Se evaluó el uso de sangre entera para el diagnóstico molecular de histoplasmosis utilizando un método artesanal de extracción de ADN fúngico y una PCR anidada que amplifica una porción del gen HcP100 específica de *Histoplasma capsulatum*. La sangre entera se trató con litocasa, enzima lisante de *Trichoderma harzianum* y proteinasa K, seguido de una extracción fenólica. Este tratamiento permitió una lisis completa de las células, mostró buen rendimiento en la obtención de ADN y posibilitó la detección de la banda de 210 pb específica de *H. capsulatum* en la PCR anidada. El límite de detección fue de 0,25-1 levaduras/ml de sangre. El método se evaluó en 31 muestras de sangre de 19 pacientes con diagnóstico microbiológico de histoplasmosis, en 21 muestras de pacientes con otras micosis o infecciones por micobacterias y en 30 controles sanos. La PCR fue positiva en sangre para 17/19 pacientes con histoplasmosis (14/15 inmunocomprometidos y 3/4 sin inmunocompromiso aparente). Las muestras de sangre de los 30 controles sanos y de 20 pacientes con otras patologías fueron negativas, sólo hubo un falso positivo correspondiente a un paciente con infección por *Mycobacterium avium-intracellulare*. El método presentó 89% de sensibilidad y 96% de especificidad para el diagnóstico de histoplasmosis en sangre entera.

Palabras clave: histoplasmosis, PCR, diagnóstico molecular, sangre entera

ABSTRACT

Molecular diagnosis of human histoplasmosis in whole blood samples. To assess the value of using whole blood samples for the molecular diagnosis of histoplasmosis, we applied an in-house DNA extraction method and a nested PCR targeting a 210 bp specific segment of the *Histoplasma capsulatum* HcP100 gene. A whole blood volume of 2.5-3 milliliters was centrifuged and the cellular pellet was treated with *Trichoderma harzianum* lyticase and proteinase K prior to applying a conventional phenol DNA extraction. This procedure allowed complete cell lysis, high DNA yield and specific amplification. The PCR detection limit was 0.25-1 yeast cells/ml of blood sample. The method was assessed on 31 blood samples from 19 patients with microbiological diagnosis of histoplasmosis, 30 healthy persons and 21 patients with other mycoses or mycobacterial diseases. Positive results were obtained in samples from 17/19 patients with histoplasmosis (14/15 immunocompromised and 3/4 without known immunological disorder). Blood samples from the 30 healthy controls and 20 patients with other conditions proved negative; the only false positive result was obtained from a patient with *Mycobacterium avium-intracellulare* infection. With 89% sensitivity and 98% specificity, this molecular method for detection of the agent in blood shows promising for the rapid diagnosis of human histoplasmosis.

Keys words: histoplasmosis, PCR, molecular diagnosis, whole blood sample

INTRODUCCIÓN

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* es el agente etiológico de la histoplasmosis, una enfermedad subaguda o crónica, endémica en el continente americano. En las últimas décadas se observó un aumento de la frecuencia de esta enfermedad mayormente atribuible a la población de pacientes inmunocomprometidos, ya sea por infección con el VIH o por recibir tratamientos

inmunosupresores a causa de trasplante de órganos, enfermedades oncohematológicas o collagenopatías (7).

Según datos de la Red Nacional de Laboratorios de Micología de Argentina, la histoplasmosis ocupa el cuarto lugar entre las micosis profundas diagnosticadas en el país (5) y es la segunda micosis sistémica potencialmente fatal asociada al SIDA (13).

Los pacientes inmunocomprometidos desarrollan formas diseminadas de la enfermedad por infección recién

te o reactivación de una infección preexistente; de no ser tratadas, estas formas tienen un mal pronóstico. Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre, astenia, anorexia, pérdida de peso, anemia, hepatoesplenomegalia, patología intersticial pulmonar y lesiones mucocutáneas, cuadro clínico que se asemeja al producido por infecciones de otras etiologías. Los pacientes con SIDA pueden presentar, además, otras patologías asociadas a la histoplasmosis, lo que dificulta el diagnóstico (14).

Cuando los pacientes presentan manifestaciones mucocutáneas, el diagnóstico puede realizarse rápidamente por observación microscópica de *H. capsulatum* en frotis o biopsias de lesiones utilizando coloraciones como Giemsa, ácido peryódico de Schiff o metenamina de plata; en estos casos la sensibilidad está limitada por la calidad de la muestra clínica y el entrenamiento del operador. Si las lesiones en la piel o en las mucosas están ausentes, se puede recurrir al hemocultivo por lisis-centrifugación, método que posee alrededor de un 70% de sensibilidad. En el resto de los casos son necesarias técnicas invasoras, como el lavado broncoalveolar (BAL) o las biopsias quirúrgicas (14). El diagnóstico definitivo se basa en el aislamiento del hongo en medios de cultivo donde desarrolla aproximadamente entre los 10 y 20 días. Sin embargo, en ocasiones el hongo no produce los conidios característicos de la fase micelial o presenta morfologías coloniales aberrantes, lo que dificulta, demora o impide su identificación (18). Por otra parte, el manejo en el laboratorio de los cultivos de este hongo es riesgoso y requiere el uso de instalaciones y prácticas correspondientes a los microorganismos de nivel de bioseguridad 3 (17).

Existen métodos alternativos de diagnóstico basados en la detección de antígenos y anticuerpos en suero. La presencia de anticuerpos depende del estado inmunológico del hospedero, y en la histoplasmosis asociada al SIDA sólo el 40% de los pacientes tienen serología positiva (14). La técnica de enzoinmunoanálisis (EIA) para detectar antígeno glicoproteico de *H. capsulatum* en suero u orina se considera la más sensible en inmunodiagnóstico. Sin embargo, no se dispone de reactivos comerciales que cumplan con las características analíticas requeridas para su uso en diagnóstico (9). Además, el desarrollo de este método en los laboratorios hospitalarios resulta trabajoso, de difícil estandarización y validación (10).

Recientemente, se describieron métodos moleculares basados en diferentes técnicas de PCR, herramienta sencilla y prometedora para el diagnóstico rápido de esta micosis. Tanto la PCR anidada como la PCR en tiempo real (RT-PCR) fueron probadas sobre diferentes especímenes clínicos (1-3, 11); sin embargo, el uso de sangre entera no se evaluó sistemáticamente en el diagnóstico. La búsqueda de ADN de *H. capsulatum* en sangre podría aumentar el número de casos diagnosticados, al tratarse de un material clínico de fácil obtención com-

parado con el BAL o con las biopsias quirúrgicas. Por lo expuesto, fue nuestro objetivo desarrollar un método molecular rápido de diagnóstico de histoplasmosis a partir de sangre periférica basado en una extracción artesanal del ADN y una PCR anidada previamente descrita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras clínicas

Se analizaron 31 muestras de sangre entera procedentes de 19 pacientes con diagnóstico microbiológico de histoplasmosis realizado entre diciembre de 2005 y enero de 2008. Todos los pacientes residían en el área de la Argentina más endémica para histoplasmosis (llanura del Río de la Plata) o la habían visitado. La primera muestra de cada paciente se tomó en el día uno o no más de 10 días después del diagnóstico. En 6 pacientes fue posible seguir la respuesta al tratamiento tomando muestras de sangre consecutivas con intervalos superiores a un mes a partir del momento del diagnóstico. Las muestras de sangre (3-4 ml) fueron recolectadas en tubos con EDTA como anticoagulante y mantenidas a una temperatura de entre 4 y 7 °C hasta la extracción del ADN.

En 10 de estos pacientes también se analizaron por PCR otros materiales clínicos: tres cortes histológicos de biopsia, siete sueros, dos BAL y un esputo. En la Tabla 1 se describen las muestras analizadas para cada paciente con histoplasmosis.

Para determinar la especificidad diagnóstica se analizaron 30 muestras de sangre de voluntarios sanos y 21 muestras de individuos con otras afecciones, a saber: cuatro pacientes con diagnóstico confirmado de infección fúngica invasora (una neumocistosis, una criptococosis, una coccidioidomicosis y una aspergilosis), ocho con otras enfermedades infecciosas (cuatro tuberculosis diseminadas, una actinomicosis pulmonar con fistulas en la piel, una infección por *Mycobacterium-avium intracellulare* (MAI) y dos meningitis asociadas a recambio de válvula) y nueve pacientes con diferentes patologías, sin signos ni síntomas clínicos, como así tampoco antecedentes epidemiológicos o estudios microbiológicos que probaran una enfermedad fúngica (seis tenían collagenopatías con lesiones en la mucosa o piel, dos neutropenia febril y uno sarcoma de Kaposi).

Muestra simulada

Para evaluar el límite de detección del método de extracción artesanal de ADN se utilizó sangre recolectada en tubos con EDTA de un voluntario sano. A partir de una suspensión de 10^6 levaduras/ml de *H. capsulatum* (cepa 02426) se realizaron diluciones sucesivas en factor 10 hasta obtener una concentración de entre 1-4 levaduras/ml. Los tubos con 3 ml de sangre del voluntario sano fueron inoculados con 1 ml de cada una de las diluciones. De esta manera, la concentración de levaduras/ml en cada tubo fue de $2,5 \times 10^5$; $2,5 \times 10^4$; $2,5 \times 10^3$; $2,5 \times 10^2$; 25; 2,5 y 0,25-1. Se incluyó un tubo con sangre entera libre de levaduras como control negativo.

ADN de microorganismos

Para la estandarización de la técnica de PCR se utilizó ADN purificado de dos cepas clínicas de *H. capsulatum* (062775 y 02426). Posteriormente, la técnica se probó sobre ADN purificado de diez aislamientos clínicos de *H. capsulatum* obtenidos entre 2002 y 2007.

Para determinar la especificidad analítica se utilizó ADN de otras especies fúngicas comúnmente involucradas en infecciones sistémicas y de micobacterias. Los ácidos nucleicos de *Coccidioides* sp. (n=5), *Paracoccidioides brasiliensis* (n=1) y *Blastomyces dermatitidis* (n=1) fueron obtenidos en el Servicio Micosis Profundas del Departamento Micología del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" siguiendo las normativas de bioseguridad

recomendadas por el centro de control de enfermedades de Atlanta, EE.UU. para el manejo de estos patógenos (17).

La extracción y purificación del ADN de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis* se efectuó a partir de cultivos de 84 h en agitación orbital (120 rpm) a 37 °C (fase levaduriforme) en caldo GYE (glucosa 2%, extracto de levadura 1%), utilizando las técnicas descritas por Möller *et al.* (12) y Perrotta *et al.* (15). El ADN de *Coccidioides* spp. se extrajo a partir de esférulas obtenidas en el medio de Converse a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 10% (8). Las esférulas, previamente inactivadas con timerosal 1%, fueron lavadas con alcohol 70° y posteriormente con agua bidestilada. El paquete de células fúngicas se separó por centrifugación a 5000 g durante 10 min. La extracción y purificación del ADN se realizó siguiendo el protocolo del equipo comercial DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), luego del tratamiento con 200 U de liticaa durante 2 h a 30 °C. Los ácidos nucleicos de los hongos dimorfos fueron conservados en buffer TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0) a -20 °C hasta su utilización.

Los ácidos nucleicos purificados de los patógenos oportunistas *Cryptococcus neoformans* (n= 5), *Candida* spp. (n=5) y *Aspergillus* spp. (n=5) fueron cedidos por los Laboratorios de Levaduras y de Hongos Miceliales del Departamento Micología. Los ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (n=4), *M. avium* (n=4), *M. intracellulare* (n=4), *M. kansasii* (n=2), *M. bovis* (n=1), *M. peregrinum* (n=1), *M. fortuitum* (n=1), *M. simiae* (n=1) y *M. chelonae* (n=1) fueron gentilmente cedidos por el Servicio Micobacterias del Departamento Bacteriología del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

Extracción de ADN de muestras clínicas y simuladas

Sobre el volumen total de cada muestra de sangre de paciente o simulada se realizó un método de extracción artesanal, brevemente descrito a continuación. La sangre de cada tubo se centrifugó a 2500 g durante 10 min a 5 °C y se eliminó el plasma. Sobre el paquete celular lavado dos veces con buffer TE, se realizó un pretratamiento con 6,5 µl de liticaa y 83 µl de enzima lisante de *Trichoderma harzianum* (6 µg/µl) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) en buffer sorbitol durante 2 h a 25 °C. Luego se realizó un tratamiento con solución de lisis: 500 mM EDTA, 1% [p/v] N-laurylsarcosina (Sigma) y 0.5 mg/ml proteinasa K (Gibco BRL, Grand Island, NY, EE.UU.), durante 2 h a 55 °C y 16 h a 37 °C (4). Finalmente, se realizó una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y el ADN se resuspendió en 50 µl de buffer TE.

Cada vez que se procesó una muestra de sangre se incluyó un control negativo (sangre entera libre de levaduras) y un control positivo (sangre entera con levaduras).

En suero, esputo y BAL, donde se dispuso de volúmenes de entre 1,5 y 5 ml, el ADN fúngico se extrajo utilizando el método artesanal.

Las biopsias de tejido incluidas en parafina fueron cortadas en fragmentos de entre 3 y 5 µm de espesor, desparafinadas y sometidas a tres ciclos de frío-calor antes de ser procesadas utilizando el equipo comercial DNeasy Tissue Kit (Qiagen) (1).

PCR anidada

Se utilizaron los cebadores diseñados por Bialek *et al.*, basados en la secuencia de ADN que codifica para la proteína de 100 kDa involucrada en el proceso de infección y supervivencia del hongo dentro de la célula del hospedero (1). Los cebadores externos Hc I (5'-GCG TTC CGA GCC TTC CAC CTC ACC-3') y Hc II (5'-ATG TCC CAT CGG GCG CCG TGT AGT-3') delimitan una secuencia de 391 pb. Los cebadores internos Hc III (5'-GAC ATC TAG TCG CGG CCA GGT TCA-3') y Hc IV (5'-AGG AGA GAA CTG TAT CGG TGG CTT G-3') delimitan una secuencia de 210 pb.

La PCR se estandarizó a las condiciones de nuestro laboratorio con leves modificaciones del protocolo original. Para un

volumen final de 25 µl se utilizó 2 mM cloruro de magnesio, 200 µM dNTPs, 1 U *Taq* polimerasa (Invitrogen, Tech-line Life, CA, EE.UU.), 0,1% de albúmina bovina fracción V (Sigma), 1 µM de iniciadores Hc I y Hc II y 2 µl de muestra extraída. El programa de amplificación usado fue 94 °C 5 min, 35 ciclos (94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min) y una extensión final de 72 °C 5 min. Con 2 µl del producto de la primera amplificación se realizó la segunda PCR (anidada), donde se disminuyó el cloruro de magnesio a 1 mM en la mezcla y se utilizaron los iniciadores Hc III y Hc IV a una concentración 1 µM. El programa de amplificación de la anidada fue 94 °C 5 min, 35 ciclos (94 °C 30 s, 67 °C 30 s, 72 °C 1 min) y una extensión final de 72 °C 5 min. Las reacciones se realizaron en un termociclador iCycler (BioRad, CA, EE.UU.). Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 2% en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5), teñidos con bromuro de etidio (10 µg/ml) y fotodocumentados (BioRad Gel Doc 1000, CA, EE.UU.). Como estándar de pares de bases se utilizó 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

Para cada material clínico la reacción de PCR se realizó por duplicado: en un tubo se agregó el ADN de la muestra y en el segundo, además del ADN del material clínico, 1 µl de ADN de *H. capsulatum* (10 ng/µl), este segundo tubo nos permitió evaluar la presencia de inhibidores de PCR. Cada vez que se realizó una PCR en muestras de sangre se incluyeron controles positivos, controles negativos y el control de inhibición.

La técnica de PCR para cada material clínico y para las muestras simuladas se realizó por duplicado, de forma independiente por dos operadores.

Análisis de los resultados

Los datos clínicos y de laboratorio de los pacientes fueron volcados en una planilla elaborada en Excel y se realizó un análisis descriptivo de los resultados. Se registró la edad y el sexo de los pacientes y los resultados de las muestras según la condición de inmunocompromiso. Se calculó la sensibilidad y la especificidad diagnóstica del método evaluado.

RESULTADOS

La población estudiada incluyó 12 pacientes de sexo masculino (63%) y 7 de sexo femenino (37%) con diagnóstico microbiológico de histoplasmosis. Las edades oscilaron entre 10 y 76 años (mediana 42 años). Quince pacientes eran inmunocomprometidos [10 VIH (+) y 5 con otras enfermedades inmunodebilitantes o antecedentes de tratamientos prolongados con corticoides]. Cuatro no tenían causa conocida de inmunocompromiso. En la Tabla 1 se consignan los pacientes, sus características clínicas, las muestras estudiadas, los métodos de diagnóstico utilizados y el resultado obtenido de cada análisis.

El ADN purificado de las cepas de referencia y de los 10 aislamientos clínicos de *H. capsulatum* mostraron la banda de 391 pb en la primera amplificación y la de 210 pb en la anidada. No hubo amplificación cuando se probó el ADN de las tres especies de hongos dimorfos causantes de micosis endémicas (*Coccidioides* spp., *P. brasiliensis* y *B. dermatitidis*), tampoco cuando se ensayó el ADN de las especies fúngicas oportunistas que pueden producir cuadros sistémicos semejantes al de histoplasmosis. Tampoco se observó amplificación con las 19 muestras de ADN obtenidas de las nueve especies de micobacterias probadas. Estos resultados permi-

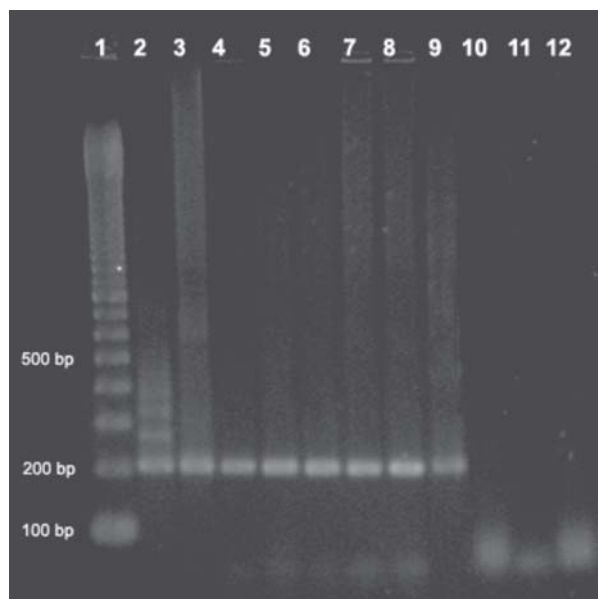


Figura 1. PCR anidada realizada a partir de ADN extraído de muestras de sangre simulada utilizando el método artesanal. 1: 100 bp ADN ladder, 2: ADN de *H. capsulatum* purificado (10 ng/μl), 3: $2,5 \times 10^5$ levaduras/ml, 4: $2,5 \times 10^4$ levaduras/ml, 5: $2,5 \times 10^3$ levaduras/ml, 6: $2,5 \times 10^2$ levaduras/ml, 7: 25 levaduras/ml, 8: 2,5 levaduras/ml, 9: 0,25-1 levaduras/ml, 10: sangre sin levaduras, 11 y 12: controles negativos.

ten determinar que la PCR utilizada tiene una sensibilidad y especificidad analítica de 100%.

El método de extracción artesanal nos permitió obtener ADN fúngico de las muestras de sangre y a partir de otros materiales cuando el volumen fue superior a 1 ml. La PCR anidada realizada sobre el ADN extraído artesanalmente de la sangre entera inoculada con distintas cantidades de levaduras dio un resultado positivo hasta el tubo de sangre inoculado con 1-4 levaduras en el volumen total (concentración final 0,25-1 levaduras/ml) (Figura 1).

La sensibilidad diagnóstica se estableció sobre la base del resultado de la PCR en la sangre de los 19 pacientes con histoplasmosis, sobre la muestra tomada en el momento o no más de 10 días después del diagnóstico microbiológico. La reacción fue positiva en 17 de los 19 pacientes, lo que resulta en una sensibilidad diagnóstica de 89% en muestras de sangre; este porcentaje aumenta a 94% si consideramos solamente a los pacientes inmunocomprometidos, que son aquellos para los que esta metodología tendría mayor aplicación. Entre los pacientes con histoplasmosis y PCR negativa en sangre, un paciente con SIDA tuvo dos muestras sucesivas con resultado negativo, una recolectada en el momento del diagnóstico microbiológico y otra a los 18 días; este paciente fue diagnosticado a partir de un raspado de lesiones en la piel, pero su hemocultivo fue negativo. El otro paciente para el que la PCR resultó negativa no tenía

inmunocompromiso documentado y la histoplasmosis se diagnosticó por cultivo de médula ósea.

En ocho pacientes donde se realizó conjuntamente PCR y hemocultivo, el método molecular detectó 7 de 8 casos de histoplasmosis (87%), mientras que el hemocultivo fue positivo sólo en 3 de 8 (37%).

De las 7 muestras de suero analizadas por PCR, 4 fueron positivas (57%), mientras que las tres muestras de biopsia, los dos BAL y el esputo fueron positivos. En este último material se detectó inhibición, la que se eliminó por dilución 1:2 del material extraído para PCR (Tabla 1).

Ninguna de las 30 muestras de sangre entera de voluntarios sanos resultó positiva. Tampoco fueron positivas las muestras de sangre de los cuatro pacientes con otras micosis, ni la de los nueve pacientes con diferentes patologías sin infección fúngica probada. Sólo en uno de los 8 pacientes con enfermedades infecciosas diferentes de micosis la PCR fue positiva. Este paciente con infección por MAI presentaba un síndrome febril con lesiones papulosas en la cara. La histoplasmosis no se pudo diagnosticar por las metodologías tradicionales: hemocultivo por lisis, directo y cultivo de la escarificación cutánea.

En 6 pacientes donde fue posible realizar un seguimiento del tratamiento utilizando la PCR en muestras de sangre pudimos observar su negativización entre los 2 y 5 meses, resultado que coincidió con la cura clínica. En tres de estos pacientes se reiteró la PCR en sangre después de transcurridos dos meses o más y la reacción se mantuvo negativa (Tabla 2).

DISCUSIÓN

El aumento de la población VIH (+) en nuestro país trajo aparejado un importante incremento de la histoplasmosis. El diagnóstico de esta micosis por métodos microbiológicos mediante el cultivo y la identificación de las cepas demora más de 10 días. Estos métodos tienen una sensibilidad discreta y requieren de infraestructura y equipamiento adecuado para manipular los cultivos de *H. capsulatum* en condiciones de bioseguridad, requisitos que no cumplen la mayoría de los laboratorios de nuestro país. Por otra parte, como mencionamos anteriormente, la detección de anticuerpos circulantes tiene baja sensibilidad en este grupo de pacientes y la técnica de EIA, altamente sensible para la búsqueda de antígenos en orina y suero, sólo se encuentra disponible en los Estados Unidos de Norteamérica (6, 9).

La adaptación de la PCR anidada a las condiciones de nuestro laboratorio demostró tener alta sensibilidad y especificidad analítica y diagnóstica. Esto coincide con lo publicado por Mauboun *et al.* (11), quienes utilizaron la misma técnica de PCR aquí aplicada e informaron 100% de sensibilidad al analizar diversos materiales clínicos, aunque estos autores sólo evaluaron dos muestras de sangre entera. Por su parte, Buitrago *et al.* (3) obtuvieron valores de 78,6% de sensibilidad diagnóstica

Tabla 1. Características de los pacientes con diagnóstico de histoplasmosis y resultados de los estudios micológicos realizados

Paciente	Edad	Sexo	Patología asociada	IDD	Material clínico	E. directo	Cultivo	PCR
1	19	F	Trasplante hepático	ND	Piel	-	+	
					Hemocultivo		-	
					Sangre entera			+
2	62	F	Artritis reumatoidea	+	Piel	+	+	
					Hemocultivo		-	
					Suero			-
					Sangre entera			+
3	61	M	Diabetes	+	Biopsia de pulmón	+	-	+
					Suero			-
					Sangre entera			+
4	10	M	Síndrome de hiper IgE		Biopsia de intestino	+	+	
					Hemocultivo		-	
					Suero			+
					Sangre entera			+
5	55	M	Tratamiento prolongado con corticoides	+	Biopsia de suprarrenal		+	
					Raspado de mucosa	+	+	
					Espujo	+	+	+
					Sangre entera			+
6	42	M	SCCIC	+	LCR	.	+	
					Suero			-
					Sangre entera			+
7	60	F	SCCIC	ND	Biopsia de paladar	+	-	
					Sangre entera			+
8	76	M	SCCIC	ND	MO	-	+	
					Sangre entera			-
9	36	M	SCCIC	ND	BAL	+	+	
					Sangre entera			+
10	40	M	VIH (+)	+	Piel	+	+	
					Hemocultivo		-	
					Sangre entera ⁽¹⁾			-
11	24	M	VIH (+)	-	MO	+	+	
					Hemocultivo		-	
					Sangre entera			+
12	54	M	VIH (+)	+	Raspado de mucosa	+	+	
					Sangre entera			+
13	38	M	VIH (+)	ND	BAL	+	+	+
					Biopsia de pulmón	+	+	
					Sangre entera			+
14	51	F	VIH (+)	ND	Biopsia de duodeno	+	+	
					Sangre entera			+
15	56	F	VIH (+)	ND	BAL	+	+	+
					Biopsia de piel	+	-	+
					Hemocultivo		+	
					Suero			+
					Sangre entera			+
16	33	M	VIH (+)	+	Hemocultivo		+	
					Suero			+
					Sangre entera			+
17	32	F	VIH (+)	+	Hemocultivo		+	
					Sangre entera			+
18	44	M	VIH (+)	ND	Biopsia mucosa nasal	+	+	
					Suero			+
					Sangre entera			+
19	10	F	VIH (+)	ND	Biopsia de piel	+		+
					Sangre entera			+

SCCIC: sin causa conocida de inmunocompromiso; ND: no determinada; ⁽¹⁾ en ese caso se analizó una segunda muestra de sangre pasados 18 días, con igual resultado; IDD: anticuerpos por inmunodifusión; E. directo: examen directo; MO: médula ósea; BAL: lavado broncoalveolar.

Tabla 2. Seguimiento de seis pacientes por PCR en sangre entera

Paciente N°	PCR	Fecha de extracción de sangre
2	+	17/12/2006 ⁽¹⁾
	-	09/03/2007
	-	29/05/2007
3	+	05/12/2006 ⁽¹⁾
	+	12/02/2007
4	+	06/02/2007 ⁽¹⁾
	+	06/06/2007
	-	13/11/2007
	-	17/01/2008
5	+	04/09/2007 ⁽¹⁾
	-	15/01/2008
6	+	01/08/2006 ⁽¹⁾
	+	28/12/2006
	-	07/03/2007
	-	25/06/2007
7	+	01/04/2006 ⁽¹⁾
	-	01/08/2006

⁽¹⁾ Se corresponde con la fecha del diagnóstico microbiológico.

en muestras de suero de 14 enfermos de histoplasmosis utilizando una RT-PCR; la única muestra de sangre entera incluida por estos autores resultó negativa.

Otros métodos de PCR aplicados a muestras de sangre fueron menos sensibles. Bracca *et al.* (2) utilizaron una PCR semianidada dirigida al gen que codifica el antígeno H para analizar 24 muestras de sangre de igual número de pacientes. Sólo 4 resultaron positivas y únicamente en dos casos pudieron corroborar este resultado mediante el diagnóstico microbiológico de histoplasmosis.

La alta sensibilidad que observamos en la PCR diseñada por Bialek *et al.* (1) utilizada en sangre entera podría deberse al volumen de material procesado. Mientras que la mayoría de los autores utilizan métodos comerciales donde los volúmenes de sangre procesados son de hasta 200 µl (3, 11, 16), nosotros partimos de volúmenes 12 a 15 veces mayores, lo que aumentaría las posibilidades de detectar el ADN fúngico. Esto podría ser una ventaja metodológica cuando las muestras clínicas superan 1 ml, no sólo por la cantidad de ADN disponible, sino también porque disminuiría el error de muestreo que se produce en el laboratorio al extraer alícuotas de materiales con una distribución de microor-

ganismos generalmente heterogénea, como ocurre en esputo y BAL.

El 100% de los cortes histológicos analizados mostraron resultados positivos por PCR, mientras que el porcentaje de positividad fue menor para las muestras de suero (57%). Probablemente el bajo porcentaje de resultados positivos observado en éstas se deba a que *H. capsulatum* es intracelular y la cantidad de ADN libre es bajo. Esta observación coincide con la realizada por Buitrago *et al.* (3), quienes detectaron cantidades significativamente inferiores de ADN de *H. capsulatum* en las muestras de suero y plasma en comparación con otras muestras analizadas por PCR cuantitativa.

En los ocho pacientes donde se realizó conjuntamente PCR y hemocultivo, se pudo determinar que la PCR en sangre fue más sensible que el hemocultivo. La sensibilidad de este método también supera la detección de anticuerpos en pacientes inmunocomprometidos y sería comparable con la descrita para la detección de antígenos circulantes por EIA (9), aunque se trata de una técnica más fácil de estandarizar.

Es importante recalcar la utilización de control de inhibición en cada una de las determinaciones, ya que nuestra experiencia nos permitió evidenciar la presencia de inhibidores en la muestra de esputo.

La PCR podría ser utilizada como un parámetro más para seguir la evolución del tratamiento de la histoplasmosis puesto que, en los casos en los que nos fue posible realizar este seguimiento del paciente, observamos correlación entre la cura clínica y la negativización de la reacción.

La notable reducción en el tiempo de diagnóstico lograda con estas técnicas moleculares (que sólo demandan entre 3 y 4 días) significaría una mejora en la supervivencia de los pacientes por la posibilidad de implementar rápidamente las terapias adecuadas. La disminución del riesgo biológico para el personal de laboratorio permitiría, además, ampliar la cobertura diagnóstica de la enfermedad y hacerla en centros donde las condiciones de bioseguridad necesarias para trabajar con cepas vivas de *H. capsulatum* no estén dadas.

Es preciso destacar que la PCR anidada requiere una serie de cuidados en el manejo del material para evitar la contaminación con amplicones que pueden ser la causa de falsos resultados positivos. Estos amplicones se eliminan del ambiente de trabajo con irradiación de luz ultravioleta (UV) antes de la extracción y de agregar los templados a la mezcla de reacción. Para evitar estas contaminaciones, la mezcla se realizó en un laboratorio apartado ediliciamente del resto y el agregado de templado de la primera y segunda PCR se realizó en laboratorios independientes, previamente irradiados con luz UV. Por el momento, estos cuidados dificultan la transferencia del método a laboratorios asistenciales. Las RT-PCR recientemente descritas son más sencillas y no presentan el problema de contaminación (3, 11). Dada la

eficiencia demostrada por el método de extracción artesanal de ADN descrito, a futuro éste se podría utilizar combinado con una RT-PCR; de esa manera se evitaría el problema de las contaminaciones y esto lo haría más atractivo para el diagnóstico de rutina en los laboratorios hospitalarios.

Nuestro estudio es el primero que evalúa sistemáticamente el uso de sangre periférica para el diagnóstico de histoplasmosis en un número considerable de pacientes. Los datos permiten concluir que la metodología aquí expuesta, extracción de ADN usando un método artesanal y PCR anidada para detectar ADN de *H. capsulatum*, es sensible y específica para el diagnóstico rápido de histoplasmosis a partir de muestras de sangre entera, especialmente cuando se incluyen controles internos para detectar inhibición.

Esta metodología tiene su mayor potencial en el diagnóstico presuntivo de histoplasmosis en pacientes con inmunocompromiso grave. Los laboratorios asistenciales que posean la infraestructura adecuada para desarrollar procedimientos de biología molecular podrían implementar la técnica para el diagnóstico rápido de esta micosis.

Cabe enfatizar, no obstante, que los métodos moleculares deben ser validados a través de estudios multicéntricos donde un importante número de muestras permita determinar su robustez. Por el momento, el diagnóstico definitivo de la enfermedad debe realizarse por la metodología microbiológica clásica que comprende el examen directo, el cultivo y la serología.

Agradecimientos: los autores agradecen a la Dra. Viviana Ritacco por la revisión crítica de este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling, Robertson V, Knobloch J *et al.* Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1644-7.
2. Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1753-5.
3. Buitrago MJ, Gómez-López A, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Evaluación de una técnica de PCR cuantitativa para el diagnóstico clínico de la histoplasmosis importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 16-22.
4. Canteros CE, Zuiani MF, Ritacco V, Perrotta DE, Reyes-Montes MR, Granados J *et al.* Electrophoresis karyotype and chromosome-length polymorphism of *Histoplasma capsulatum* clinical isolates from Latin America. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45: 423-8.
5. Davel G, Canteros C y participantes del Programa Nacional de Control de Calidad en Micología. Situación de las micosis en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2007; 39: 28-33.
6. Gutiérrez ME, Canton A, Connolly P, Zarnowski R, Wheat JL. *Histoplasma* antigen detection in panamanian patients with disseminated histoplasmosis and AIDS. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 681-3.
7. Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 115-32.
8. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Coccidioidomycosis. En: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, editors. *Medical Mycology*, Philadelphia- London, Lea & Febiger, 1992, p. 356-96.
9. LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat LJ. Evaluation of the IMMY ALPHA *Histoplasma* antigen enzyme immunoassay for diagnosis of histoplasmosis marked by antigenuria. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 802-3.
10. Lindsley MD, Holland HL, Bragg SL, Hurst SF, Wannemuehler KA, Morrison CJ. Production and evaluation of reagents for detection of *Histoplasma capsulatum* antigenuria by enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 700-9.
11. Maubon D, Simon S, Aznar C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58: 441-4.
12. Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 6115-6.
13. Negroni R, Helou SH, López-Daneri G, Robles AM, Arechavala AI, Bianchi MH. Interrupción de la profilaxis secundaria antifúngica en la histoplasmosis asociada a SIDA. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 75-8.
14. Negroni R. Micosis sistémicas tropicales asociadas a SIDA. *Enf Emerg* 2003; 5: 27-40.
15. Perrotta D, Abrantes R, Canteros C, Rodero L, Davel G. Caracterización molecular de aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* mediante RAPD-PCR. *Rev Argent Microbiol* 2001; 33: 160-6.
16. Rickerts V, Bialek R, Tintelnot K, Jacob V, Just-Nübling G. Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 821-3.
17. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, Centers for Disease Control and Prevention, and National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. En: Fleming D, Richardson JH, Tulis JJ, Vesley D, editors. *Laboratory Safety Principles and Practices*. Washington D.C., ASM Press, 1995, p. 293-354.
18. Zuiani MF, Rivas MC, Lee W, Guelfand L, Davel G, Canteros CE. *Histoplasma capsulatum* con morfología aberrante aislado en Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2006; 38: 79-83.

Esporotricosis en un gato doméstico

Se realizó el diagnóstico de esporotricosis a partir de muestras obtenidas de una lesión nasal de un gato macho de raza siamés, de 3 años, de hábitos peridomiciliarios. El animal fue llevado a la consulta debido a ruidos nasales inspiratorios y estornudos esporádicos, sin secreción nasal ni lesiones evidentes. Luego presentó un ligero elevamiento del perfil nasal, sin compromiso óseo en el estudio radiográfico. Como dato anamnésico importante, los dueños observaron que el animal durante el día frecuentaba un sitio con abundante resaca de pinos.

Se realizaron lavado nasal e hisopado nasal profundos, y se obtuvieron muestras para cultivo y estudio citológico. Los extendidos teñidos con Giemsa mostraron regular cantidad de elementos levaduriformes pleomorfos, algunos de ellos muy delgados, distribuidos entre escasos hematíes y polimorfonucleares y escasa cantidad de macrófagos con abundantes levaduras en su interior, morfológicamente compatibles con *Sporothrix* sp. (Figura 1). Se realizaron coloraciones de PAS (Figura 2) y Grocott (Figura 3) a fin de confirmar la naturaleza fúngica de los elementos observados.

Los cultivos en agar sangre y agar Sabouraud a diferentes temperaturas de incubación permitieron el aislamiento de un hongo dimorfo, que en los microcultivos se identificó como *Sporothrix schenckii* (Figuras 4a y 4b).

Se alertó a los propietarios del animal del importante potencial zoonótico de la patología (1, 2) y asumieron conservar y tratar a la mascota.

Se instauró inmediatamente tratamiento por vía oral de itraconazol en dosis de 10 mg/kg/día (1). Hubo un importante agravamiento de la lesión nasal en los primeros 4 días de tratamiento (Figura 5). A posteriori, a partir del día 18, se constató una evidente mejoría, con desaparición de los estornudos y ruidos inspiratorios y con el reacomodamiento del perfil nasal (Figura 6).



BIBLIOGRAFÍA

1. Greene CE. Enfermedades infecciosas en perros y gatos, 2ª edición. México, McGraw-Hill Interamericana, 2000.
2. Acha PN, Szyfres B. Bacteriosis y micosis. En: Acha PN, Szyfres B, editores. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington D.C., OPS-OMS, 2001, p. 362-4.

R. Iachini
Instituto de Zoonosis Luis Pasteur
Av. Díaz Vélez 4821
(1405) Ciudad Autónoma de
Buenos Aires, Argentina.
E-mail: r_iachini@yahoo.com.ar

***Toxocara canis* bajo la lupa**

El género *Toxocara* incluye nematodos de cuerpo grueso y estriado recubierto con una cutícula que presenta estriaciones transversales; estos nematodos son de color blanco o blanco pardo.

Los adultos miden hasta 10 cm de largo; en el extremo anterior presentan alas cervicales mucho más largas que anchas (2,4 mm x 0,2 mm) que se van estrechando hacia atrás, lo que les da un aspecto de lanza (Figura 1). En el extremo cefálico se hallan los labios, que algunas veces tienen protuberancias dentiformes (Figura 2).

Los machos suelen medir de 4 a 6 cm de largo por 2 a 2,5 mm de ancho. El extremo posterior tiene una forma característica de enrollado en espiral. Las hembras miden de 6,5 a 10 cm de largo por 2,5 a 3 mm de ancho (Figura 3, derecha). A diferencia del macho, la hembra presenta un extremo posterior romo (Figura 3, izquierda).



Figura 1. Extremo anterior de *T. canis* que muestra las alas cervicales.



Figura 2. Extremo cefálico de *T. canis* en el cual se aprecian los labios y las protuberancias dentiformes.

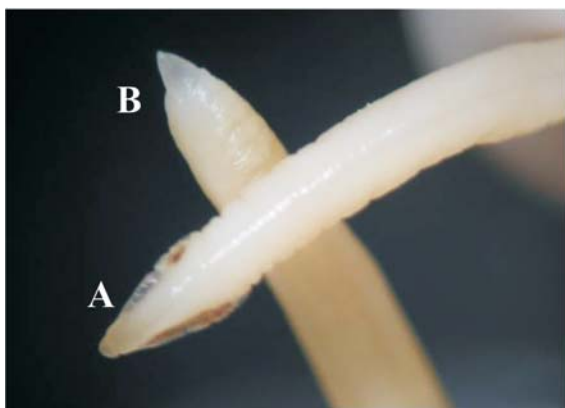


Figura 3. Izquierda (A), extremo anterior de *T. canis* que muestra las alas cervicales; (B) extremo posterior romo. Derecha, adultos hembra y macho.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Bojanich MV. Tesis de Maestría: Efecto de los epítopes glucídicos en la especificidad de los enzimoimmunoensayos para toxocariosis. Carrera de Magíster en Ciencias Médicas Tropicales. Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina, 2006.
2. Riera Lizandra MC. Tesis Doctoral: Estudios sobre la Toxocariosis humana en Barcelona. Puesta a punto y ensayo de una técnica diagnóstica. Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. Barcelona, España, 1990.

M.V. Bojanich, M.A. López
Área Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Área Inmunología, Instituto de Medicina Regional.
Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
E-mail: mavibojanich@yahoo.com.ar

Prevalence of *mef* and *ermB* genes in invasive pediatric erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentina

A. CORSO*, D. FACCONI, C. GALIÁ, P. GAGETTI, M. RODRÍGUEZ, J. PACE, M. REGUEIRA,
THE "ARGENTINEAN SIREVA WORKING GROUP"

Servicio Antimicrobianos, Departamento Bacteriología, INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán",
Av. Vélez Sarsfield 563, (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Correspondence. E-mail: acorso@anlis.gov.ar

ABSTRACT

During the period 1993-2001, a total of 1,499 pneumococci isolates were recovered through the Argentinean surveillance of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children under 6 years of age, 3.5% of which were erythromycin resistant. Among the 50 erythromycin-resistant strains available, 58% (n=29) harbored *mefA/E* genes (15 *mefA*, 30%; and 14 *mefE*, 28%), 34% (n=17) *ermB*, and 6% (n=3) both *mefA/E* plus *ermB* genes, while one isolate was negative for all the acquired genes studied. The England¹⁴⁻⁹ (42%), Poland^{6B-20} (20%) and Spain^{9V-3} (16%) clones were responsible for the emergence of pneumococcal macrolide resistance in pediatric population from Argentina.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, macrolide, Argentina, *mef*, *erm*

RESUMEN

Prevalencia de los genes *mef* y *ermB* en aislamientos invasivos de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a eritromicina recuperados de pacientes pediátricos en Argentina. En el marco del programa de vigilancia regional SIREVA, se analizaron 1499 aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* causantes de enfermedad invasiva en menores de 6 años, recuperados entre 1993 y 2001. Se detectó un 3,5% de resistencia a eritromicina. De los 50 aislamientos resistentes a eritromicina que pudieron ser estudiados, el 58% (n=29) tenían los genes *mefA/E* (15 *mefA*, 30% y 14 *mefE*, 28%), el 34% (n=17) el gen *ermB* y el 6% (n=3) la combinación de genes *mefA/E* y *ermB*. Sólo un aislamiento fue negativo para todos los genes analizados. Los clones internacionales England¹⁴⁻⁹, Poland^{6B-20} y Spain^{9V-3} representaron el 78% del total de aislamientos resistentes (42, 20 y 16%, respectivamente) y se consideraron los responsables de la emergencia de la resistencia a macrólidos entre los neumococos que afectan a la población pediátrica de Argentina.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*, macrólidos, Argentina, *mef*, *erm*

INTRODUCTION

Streptococcus pneumoniae is an important cause of morbidity and mortality in humans and one of the major causes of meningitis, community-acquired pneumonia and other respiratory tract infections (19). Over the last years, resistance to penicillin G in *S. pneumoniae* has increased in Latin America and worldwide (6, 11, 13). Consequently,

macrolides are being used as initial empiric therapy for community-acquired respiratory tract infections (12). Unfortunately, resistance to macrolides in pneumococci has also evolved rapidly (3, 6, 9, 13, 15, 17) and a total of four different mechanisms of resistance have been described: i) antibiotic efflux, mediated by *mefA/E* genes, ii) target-site modification by methylation of 23S rRNA due to *erm* genes, iii) mutations in domain II or V of 23S rRNA, and iv) mutations in riboproteins L4 or L22 (12, 17). The *mefA*

This work was partially presented at the XVIth Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal disease. Palm Cove, Cairns, Australia, September 25-29, 2005.

Argentinean SIREVA Working Group: Cecilia Vescina, Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata, Pcia. de Bs. As.; Martha Von Specht, Hospital Provincial de Pediatría, Posadas, Pcia. de Misiones, Diana Gómez and Victoria Monzani, Instituto Nacional de Epidemiología J. H. Jara/ Hospital Materno Infantil Don V. Tetamanti, Mar del Plata, Pcia. de Bs. As.; Clara Mayoral, Hospital de Niños Dr. O. Alassia, Santa Fe, Pcia. de Santa Fe; Andrea Nepote, Laboratorio Central de Santa Fe, Santa Fe, Pcia. de Santa Fe; Andrea Badano, Hospital de Niños Dr. V. J. Vilela, Rosario, Pcia. de Santa Fe; Beatriz García, Hospital H. Notti, Guaymallén, Pcia. de Mendoza; Claudia Hernández, Hospital de Pediatría SAMIC Dr. J. P. Garrahan - CABA; Cristina Pérez, Hospital Provincial Castro Rendón, Pcia. de Neuquén; Sonia Flores, Hospital Enrique Vera Barros, La Rioja, La Rioja; Ana Littvik, Hospital Rawson, Córdoba, Pcia. de Córdoba; María José Rial, Hospital de Niños Dr. Pedro de Elizalde, CABA; Lydia Carvajal, Hospital de Niños Santísima Trinidad, Pcia. de Córdoba; Hortensia Cano, Hospital Regional de Río Gallegos, Río Gallegos, Pcia. de Santa Cruz; Julio Pace, Clínica Bazterrica, CABA; Adriana Procopio, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, CABA, Argentina.

E genes have been associated with erythromycin resistance (14- and 15-membered macrolides) and display an M-phenotype (14, 17). The *ermB* gene is known to confer cross-resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins B, yielding the MLS_B-phenotype (12).

Since 1993, Argentina and other Latin American countries have participated in the Sistema Regional de Vacunas (SIREVA) Project, a regional epidemiological surveillance conducted by the Pan American Health Organization (11). The SIREVA Project focuses on the prevalence of capsular types and antimicrobial resistance patterns of *S. pneumoniae* causing invasive infections in children under 6 years of age. During the period 1993-2001, a total of 1,499 invasive *S. pneumoniae* isolates were collected in Argentina through the SIREVA surveillance, 52 of which were erythromycin-resistant. Macrolide resistance emerged in Argentina in 1995 and increased from 0% in the period 1993-1994 to 1.4% in 1995-1997 and 6% in 1998-2001.

The aim of the present study was to determine both the prevalence of *mefA/E* and *erm* genes, and the clonal relationship among invasive erythromycin-resistant *S. pneumoniae* isolates.

MATERIALS AND METHODS

A total of 1,499 *S. pneumoniae* were submitted to the National Reference Laboratory from 39 hospitals, 17 provinces and Buenos Aires city. Fifty out of 52 erythromycin-resistant isolates from 14 hospitals (8 cities, 7 provinces) were available for further investigation. Thirty-one isolates (62%) were recovered from patients with pneumonia, twelve (24%) with meningitis, and seven (14%) with other infections. This subset of resistant isolates was recovered from blood (38%), pleural fluid (38%) and cerebrospinal fluid (24%). Eighty percent of isolates (n=40) were recovered from children ≤ 2 years old (0-6 months, 14 strains; 6-12 months, 12 strains; 1 year, 12 strains; and 2 years, 2 strains), the remaining 10 strains were from children ranging from >2 to <6 years old. Serotyping was determined by the capsular Quellung method using commercial antisera (Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark) as recommended by the manufacturer. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by the agar dilution procedure using Mueller-Hinton agar (Difco, BD, USA) supplemented with 5% horse blood and incubated overnight at 35 °C. MICs values to penicillin, cefotaxime, trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline, chloramphenicol, ofloxacin, vancomycin, erythromycin, azithromycin, and clindamycin were interpreted according to CLSI guidelines (7). Isolates showing resistance to erythromycin but susceptibility to clindamycin expressed the M-phenotype, while isolates showing resistance to both erythromycin and clindamycin were grouped as having the MLS_B-phenotype. Double disk diffusion assays using erythromycin (15 µg) and clindamycin (2 µg) disks (disk supplied by BBL, BD, USA) were performed in order to evaluate the inducible or constitutive expression of the MLS_B-phenotype.

DNA templates were prepared by the boiling method and 5 µl of these extracts were used in each PCR assay. Reactions were performed under standard conditions in a final volume of 50 µl, using a Biometra thermal cycler (Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Germany). Amplification of *mefA/E*, *ermB*, *ermC*, *ermA* and *ermTR* genes was performed with previously reported primers (24).

Discrimination between *mefA* and *mefE* alleles was performed by *Bam*HI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) cleavage of the 348-bp *mefA/E* amplicon (17). Briefly, *Bam*HI renders two fragments of 284 and 64 bp with the *mefA* allele, while *mefE* has no restriction sites.

PFGE was carried out using *Sma*I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) as previously described (8). DNA fragments were resolved in 1% agarose gel using a CHEF-DR III apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) by applying a switch time of 5 to 35 seconds during 23 h at 11.3 °C (8). PFGE patterns were visually compared to 16 international clones described by McGee (16), kindly provided by Marguerite Lovgren (National Centre for Streptococcus, Edmonton, Alberta, Canada), and categorized using the Tenover criteria (25). MLST was performed at the Microbiology Laboratory, The Rockefeller University, NY, USA as previously described (27).

RESULTS AND DISCUSSION

Among the 50 erythromycin-resistant *S. pneumoniae* examined in this study, 25 (50%) and 8 (16%) isolates displayed non-susceptibility to penicillin and cefotaxime, respectively. Resistance to tetracycline and chloramphenicol was observed in 22 (44%) and 6 (12%) isolates, respectively. All isolates were susceptible to ofloxacin and vancomycin (Table 1). The MIC range for erythromycin and azithromycin was 4 - ≥ 512 µg/ml, while the range for clindamycin was 0.06-512 µg/ml. Isolates were grouped into those expressing the M-phenotype (n=29; 58%) or the MLS_B-phenotype (n=21; 42%), and no induction was observed for the strains expressing the MLS_B-phenotype (Table 1). Isolates displaying the MLS_B-phenotype showed higher MICs to erythromycin, azithromycin and clindamycin than isolates with the M-phenotype, and were also associated with a high percentage of resistance to penicillin, tetracycline and chloramphenicol (Table 1).

All 29 M-phenotype isolates were positive for *mefA/E* genes (Table 2). Among the MLS_B-phenotype isolates (n=21), 17 yielded PCR positive for *ermB* gene and 3 contained both *mefA/E* and *ermB* genes. One isolate displaying the MLS_B-phenotype was repeatedly negative for *mefA/E*, *ermB*, *ermC*, *ermA* and *ermTR* acquired genes. Therefore, mutation in 23S rRNA or in riboproteins L4 or L22 might be a likely mechanism involved in this phenotype (12).

When we analyzed erythromycin resistance determinants in the complete set of 50 isolates, it was observed that 58% harbored the *mefA/E* genes, 34% the *ermB* and 6% both the *mefA/E* and the *ermB* genes. In North-American countries, the *mef* genes are more prevalent in *S. pneumoniae* (4, 12). In contrast, in Europe and South Africa, the *ermB* gene is the most frequent, while in Asian countries, the prevalence of genotypes is variable (12, 21, 23). Additionally, we determined by PCR-RFLP that 17 (53%) strains harbored the *mefE* allele, while the remaining 15 (47%), the *mefA* variant (Table 2). The *mefA* and *mefE* alleles are located in different genetic elements, Tn 1207.1 and MEGA, respectively, showing different epi-

Table 1. Susceptibility of *S. pneumoniae* isolates according to erythromycin-resistant phenotype.

Phenotype		ERY	AZM	CLI	PEN	CTX	SXT	TET	CHL	VAN	OFX
M (n=29)	MIC range	4-32	4-64	0.06-0.25	0.008-4	≤0.004-2	0.015->32	0.06-32	0.25->32	0.12-0.5	1-2
	MIC ₅₀	16	16	0.12	0.015	0.015	0.25	0.12	2	0.25	2
	MIC ₉₀	16	32	0.12	2	1	8	16	4	0.25	2
	% NS	100	100	0	20.7	13.8	58.6	13.8	6.9	0	0
MLSB(n=21)	MIC range	16->512	8->512	8-512	=0.008-4	≤0.04-2	0.25-16	0.06->32	1-32	0.12-0.5	1-2
	MIC ₅₀	512	512	256	0.12	0.03	1	32	2	0.25	2
	MIC ₉₀	>512	>512	512	1	1	8	32	16	0.25	2
	% NS	100	100	100	90.5	19	61.9	85.7	19	0	0

ERY, erythromycin; AZM, azithromycin; CLI, clindamycin; PEN, penicillin; CTX, cefotaxime; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; TET, tetracycline; CHL, chloramphenicol; VAN, vancomycin; OFX, ofloxacin. MIC values are in µg/ml; % NS, percentage of non-susceptible strains.

Table 2. Genotypic characterization and clonal relationship of erythromycin-resistant *S. pneumoniae* isolates.

Phenotype	Genotype	Sma I-PFGE/International clone	Serotype
M (29)	<i>mefA</i> (15)	A / England ¹⁴ -9 (12)	14 (11), 23A (1)
		B / Poland ^{6B} -20 (1)	6B (1)
		C / Spain ^{9V} -3 (1)	14 (1)
		H (1)	19F (1)
MLSB _B (21)	<i>mefE</i> (14)	A / England ¹⁴ -9 (7)	14 (6), 19A (1)
		C / Spain ^{9V} -3 (6)	14 (3), 9V (3)
		G (1)	14 (1)
		B / Poland ^{6B} -20 (9)	6B (9)
	<i>ermB</i> (17)	D / Spain ^{6B} -2 (3)	6B (2), 19F (1)
		E / Spain ^{23F} -1 (1)	23F (1)
		F (3)	6B (3)
		I (1)	11A (1)
	<i>ermB</i> + <i>mefE</i> (3)	A / England ¹⁴ -9 (2)	6B (2)
		E / Spain ^{23F} -1 (1)	23F (1)
	non gene detected (1) ^a	C / Spain ^{9V} -3 (1)	9V (1)

Number of isolates are indicated in parentheses; ^aPCR were negative for *ermB*, *ermC*, *ermA* and *ermTR* genes.

demological behavior as described (14, 17). Tetracycline resistance in *S. pneumoniae* displaying the MLS_B-phenotype has been associated with the presence of Tn1545, Tn1116, Tn3872 or Tn6002 transposons which encode *tetM* and *ermB* genes (5, 18). Although we did not look for presence of the *tetM* gene, 90% (n=18) of the *S. pneumoniae* isolates harboring the *ermB* gene were tetracycline-resistant, which suggests the presence of Tn1545 or Tn1545-like in Argentina (data not shown).

Serotype analysis (n; %) showed that the most frequent serotypes were: 14 (22; 44%) and 6B (17; 34%), while the remaining 11 *S. pneumoniae* expressed 6 different serotypes: 9V (4; 8%), 23F (2; 4%), 19F (2; 4%), 23A (1; 2%), 11F (1; 2%) and 19F (1; 2%) (Table 2). All 22 serotype 14 isolates expressed the M-phenotype, while 16 out of 17 serotype 6B strains harbored the *ermB* gene

(MLS_B-phenotype), two of which also contained the *mefE* gene (Table 2). We have previously reported that *S. pneumoniae* serotype 14 was the most frequent one causing invasive infections in pediatric patients (11, 22). Herein, we found that the emergence of erythromycin-resistant *S. pneumoniae* was mainly related to both serotypes 14 and 6B.

When analyzing the *Sma*I-PFGE pattern, 9 clonal types (A to I) were established (Figure 1, Table 2). Moreover, 88% of all isolates were related to 5 international clones (n; %): England¹⁴-9 (21; 42%), Poland^{6B}-20 (10; 20%), Spain^{9V}-3 (8; 16%), Spain^{6B}-2 (3; 6%) and Spain^{23F}-1 (2; 4%) (Table 2). Six strains, belonging to F-I patterns, were not related to any of the international clones used in this study as described by McGee *et al.* (Figure 1) (16). Eighty-one percent (n=17) of the England¹⁴-9 clones were sero-

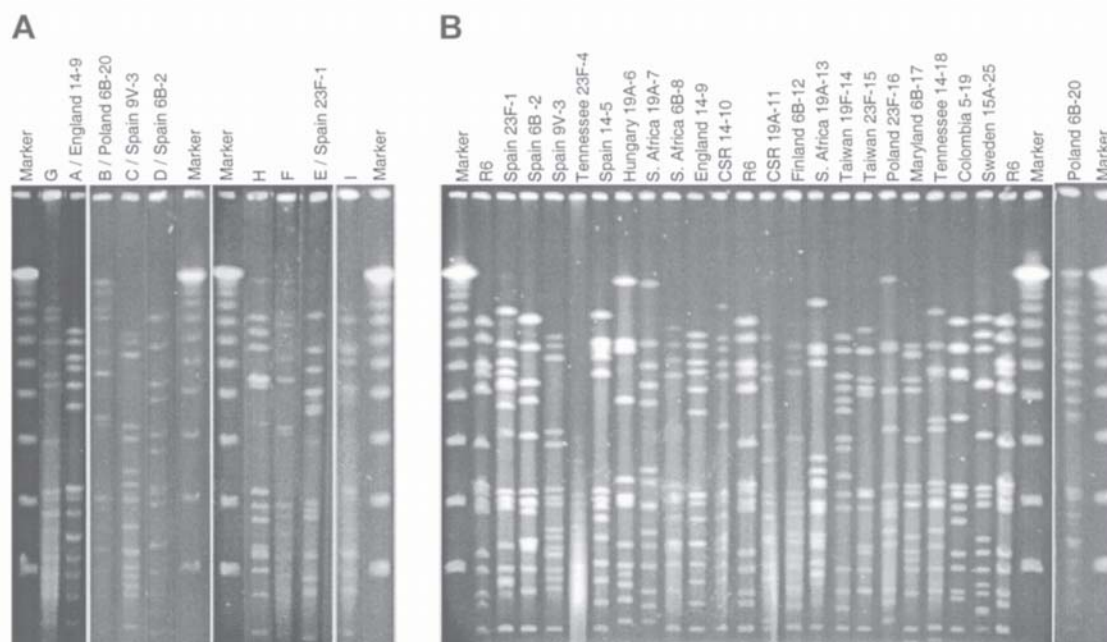


Figure 1. *Smal*-PFGE patterns of *S. pneumoniae* isolates. Marker: Lambda ladder PFG Marker (New England Biolabs). *Smal*-digested DNA of *S. pneumoniae* R6 was also included as reference pattern. **Panel A.** Erythromycin-resistant *S. pneumoniae* clones determined in the present study, clones A to I. Clones A to E were related to some *S. pneumoniae* international clones. **Panel B.** *S. pneumoniae* international clones described by McGee *et al.* and in PMEN web site (16, 20).

type 14, while all 10 Poland^{6B}-20 isolates were serotype 6B (Table 2). Erythromycin-resistant Spain^{9V}-3 isolates expressed serotypes 9V and 14 (Table 2). We and other authors have previously reported that the major penicillin-resistant *S. pneumoniae* clone in Argentina was the Spain^{9V}-3 serotype 14 clone (1, 22). Additionally, MLST analysis of *S. pneumoniae* isolates from Brazil and Uruguay also described the association of the Spain^{9V}-3 clone with serotype 14 (16, 20). Therefore, the presence of the Spain^{9V}-3 clone expressing serotype 14 seems common in our region and suggests a capsular switching of 9V to 14. A genetic analysis between Spain^{9V}-3 clones expressing 9V or 14 serotypes should be necessary to evaluate the origin and evolution of these clonal variants in Argentina. A representative isolate from the three major dominant clones was selected and typing was confirmed by MLST: England¹⁴-9 (ST 9), Poland^{6B}-20 (ST 315) and Spain^{9V}-3 (ST 156). In agreement with other authors, these three international clones were mainly implicated in the global dissemination of macrolide-resistance (10, 20, 26). Nineteen out of twenty-one England¹⁴-9 isolates harbored the *mefA/E* gene (12 *mefA* and 7 *mefE*), and 9 out of 10 Poland^{6B}-20 strains carried the *ermB* gene in agreement with previous data (16, 20). Association was not found between serotypes or *mef* variants and geographical regions. The Spain^{9V}-3 clone is usually susceptible to macrolides, but in this study and, in agreement with other

authors, we found an association between this clone and the *mef* genes (2, 16).

In summary, 58% of the erythromycin-resistant isolates from the period 1993-2001 harbored the *mefA/E* gene, 34% the *ermB* gene, 6% contained the dual efflux (*mefA/E* genes) plus methylase (*ermB*) mechanisms, and one isolate had neither gene. The emergence of erythromycin-resistant *S. pneumoniae* was principally due to the England¹⁴-9, Poland^{6B}-20 and Spain^{9V}-3 international clones.

Data from the Argentinean SIREVA surveillance of the period 2005-2006 showed that macrolide resistance reached 16.4% with a similar distribution of M- (57.9%) and MLS_B-(42.1%) phenotypes (unpublished data). Moreover, almost 80% of these erythromycin-resistant *S. pneumoniae* belong to serotypes 14 (52%) or 6B (27%) (unpublished data), which suggests that nowadays both England¹⁴-9 and Poland^{6B}-20 international clones are still the major clones involved in the spread of macrolide-resistance in Argentina. This is the first study both assessing the mechanisms of macrolide resistance in invasive pediatric *S. pneumoniae* isolates from Argentina, and the genetic relatedness between these organisms. Knowledge of the mechanisms and epidemiology of macrolide resistance in this pathogen is essential to predict the current and future use of these drugs as both first and second line antibiotics.

Acknowledgments: We thank José Luis Di Fabio and Jean-Marc Gabastou, Area of Technology and Health Service Delivery, Unit of Essential Medicines, Vaccines and Health Technology, PAHO Washington DC, USA. We also thank Marguerite Lovgren, National Centre for Streptococcus, Edmonton, Alberta, Canada, for providing the *S. pneumoniae* international clones, Prof. Alexander Thomasz and Herminia De Lencastre, Microbiology Laboratory, The Rockefeller University, NY, USA, for the MLST sequences. We thank Carla Duncan for her critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Albarracín Orio A, Cortés PR, Tregnaghi M, Piñas GE, Argentinean Network Pneumococcus Study Group, Echenique JR. A new serotype 14 variant of the pneumococcal Spain9V-3 international clone detected in the central region of Argentina. *J Med Microbiol* 2008; 57: 992-9.
- Ardanuy C, Fenoll A, Berrón S, Calatayud L, Liñares J, the Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Increase of the M phenotype among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Spain related to the serotype 14 variant of the Spain^{9V}-3 clone. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3162-5.
- Bonofiglio L, Ojeda MI, de Mier C, Vay C, Famiglietti A, Gutkind G, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* recovered from adult patients with community-acquired pneumonia in an Argentinean teaching hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 260-3.
- Brown SD, Farrell DJ, Morrissey I. Prevalence and molecular analysis of macrolide and fluoroquinolone resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected during the 2000-2001 PROTEKT US Study. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4980-7.
- Calatayud L, Ardanuy C, Cercenado E, Fenoll A, Bouza E, Pallares R, *et al.* Serotypes, clones, and mechanisms of resistance of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates collected in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3240-6.
- Castanheira M, Gales AC, Mendes RE, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America: results from five years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 645-51.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement, 2006; M100-S16. Wayne, PA, USA.
- Corso A, Severina EP, Petruk VF, Mauriz YR, Tomasz A. Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing respiratory disease in the United States. *Microbial Drug Resist* 1998; 4: 325-37.
- Culasso C, Carvajal L, Paolucci R, Ceballos A, Paredes M. *Streptococcus pneumoniae*: evolution of antibiotic resistance in a pediatric hospital in Córdoba, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2001; 33: 149-54.
- de la Pedrosa EGG, Morosini MI, van der Linden M, Ruiz-Garbajosa P, Galán JC, Baquero F, *et al.* Polyclonal population structure of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain carrying *mef* and *mef* plus *erm(B)*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1964-9.
- Di Fabio J, Castañeda E, Agudelo C, De La Hoz F, Hortal M, Camou T, *et al.* Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva.Vigía Group, 1993 to 1999. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 959-67.
- Farrel DJ, Morrissey I, Bakker S, Felmingham D. Molecular characterization of macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated from the PROTEKT 1999-2000 study. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50 Suppl 1: S39-S47.
- Felmingham D, Reinert RR, Hirakata Y, Rodloff A. Increasing prevalence of antimicrobial resistance isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and comparative *in vitro* activity of the ketolide, telitromycin. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50 Suppl 1: S25-S37.
- Klaassen CH, Mouton JW. Molecular detection of the macrolide efflux gene: to discriminate or not to discriminate between *mef(A)* and *mef(E)*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1271-8.
- Klugman KP, Lonks JR. Hidden epidemic of macrolide-resistant pneumococci. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 802-7.
- McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, *et al.* Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2565-71.
- Montanari MP, Mingoia M, Cochetti I, Varaldo PE. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant pneumococci in Italy. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 428-31.
- Montanari MP, Cochetti I, Mingoia M, Varaldo PE. Phenotypic and molecular characterization of tetracycline- and erythromycin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2236-41.
- Obaro S, Adegbola R. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. *J Med Microbiol* 2002; 51: 98-104.
- Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. PMEN. Clone collection. <http://www.sph.emory.edu/PMEN>
- Reinert RR, Reinert S, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Appelbaum P. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2903-13.
- Rossi A, Corso A, Pace J, Regueira M, Tomasz A. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Argentina: frequent occurrence of an internationally spread serotype 14 clone. *Microbial Drug Resist* 1998; 4: 225-31.
- Song JH, Chang HH, Suh JY, Ko KS, Jung SI, Oh WS, *et al.* Macrolide resistance and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: a study of the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP). *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 457-63.
- Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2562-6.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria of bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
- Wolter N, von Gottberg A, du Plessis M, de Gouveia L, Klugman KP, the Group for Enteric, Respiratory and Meningeal Disease Surveillance in South Africa (GERMS-SA). Molecular basis and clonal nature of increasing pneumococcal macrolide resistance in South Africa, 2000-2005. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 62-7.
- Zemlicková H, Crisóstomo MI, Brandileone MC, Camou T, Castañeda E, Corso A, *et al.* Serotypes and clonal types of penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in five Latin American countries. *Microbial Drug Resist* 2005; 11: 195-204.

Uso de linezolid para el tratamiento de recién nacidos con infecciones por *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina

G. BERBERIAN*, G. CASTRO, S. FISTOLERA, M. TRAVAGLIANTI,
H. LOPARDO, A. MASTROIANNI, M. T. ROSANOVA

Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Combate de los Pozos 1881 (1245)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: griselberberian@yahoo.com.ar

RESUMEN

Se presentan pacientes internados en el Servicio de Neonatología del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan" tratados con linezolid por infecciones por *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina. El linezolid mostró buena eficacia clínica y seguridad en este grupo etéreo.

Palabras clave: linezolid, recién nacidos, enterococos resistentes a vancomicina

ABSTRACT

Linezolid for the treatment of newborns infected with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Five patients hospitalized in the neonatal unit between 2002 and 2007, infected with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* treated with linezolid are presented in this study. This antibiotic showed good clinical efficacy and safety, since no adverse events occurred in this group of patients.

Key words: linezolid, newborns, vancomycin-resistant enterococci

La infección hospitalaria es uno de los determinantes primordiales de morbilidad y mortalidad en los recién nacidos. El enterococo, que forma parte de la flora normal del tracto genitourinario y gastrointestinal, es el segundo agente etiológico de infección nosocomial y tercera causa de sepsis neonatal tardía en distintos centros neonatales (16). En el servicio de Neonatología del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan" (CABA, Argentina), los cocos gram-positivos (CGP) causan el 75% de las infecciones. *Enterococcus* spp. ocupa el tercer lugar luego de los estafilococos coagulasa negativos y de *Staphylococcus aureus*.

Enterococcus faecium resistente a la vancomicina (EVR) ha surgido como un patógeno de adquisición nosocomial en los últimos años, lo que ocasiona múltiples inconvenientes en la elección de un tratamiento adecuado con los antibióticos disponibles en la actualidad.

El primer caso comunicado de EVR en América Latina fue una bacteriemia en un niño con cáncer en el Hospital Pediátrico de Mendoza, en 1996 (12). En el Hospital Garrahan, el primer caso de infección documentada ocurrió en 2001. Hasta el año 2007 ya sumaban 66 casos, de los cuales 29 correspondieron a infecciones invasoras entre las que se cuentan 15 bacteriemias (10).

El linezolid (LZD) es un antibiótico (ATB) de origen sintético derivado de la oxazolidinona con actividad dirigida a bacterias gram-positivas, incluyendo a aquellas multiresistentes. Actúa por inhibición ribosomal de la síntesis proteica. Fue aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para uso pediátrico en 2002. Esta droga no presenta resistencia cruzada con otros antibióticos y puede ser administrada por vía parenteral u oral, con una biodisponibilidad cercana al 100% (13). Hay escasos estudios acerca del uso de esta droga en el período neonatal. Presentamos 5 casos clínicos de recién nacidos tratados con LZD por infecciones producidas por EVR.

Se realizó un estudio observacional en el que se incluyeron pacientes (p) menores de 2 meses internados en la unidad neonatal entre los años 2002 y 2007, con infección probada por EVR. Se evaluaron las características generales y clínicas, los factores de riesgo para la adquisición de la infección y la seguridad y tolerabilidad del LZD en esta población. El LZD fue utilizado según la dosis recomendada para la edad, de 10 mg/kg cada 8 horas. La seguridad fue evaluada sobre la base de los datos clínicos, de laboratorio y de la presencia de efectos adversos. Los controles de laboratorio incluyeron hemograma, bilirrubinemia, transaminasas, creatinina e ionograma al inicio, a las 72 h y semanal, hasta el fin del

Tabla 1. Casos de infección por *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina tratados con linezolid: UCIN⁽¹⁾ 2002-2007

Año/ mes	Pa- ciente	Factores de riesgo							Diagnóstico		Tto. Durac. (días) Vía	Evolución			
		EG (Sem.)	PN (g)	Enfermedad de base	ATB	CVC	ARM	SV	QX	INT			Clínico	Material de aislamiento microbiológico	Edad al diagn. (días)
2002	1	33 RNPT	1 600 PAEG	Obstrucción intestinal	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Peritonitis 2.ª a ECN	Líquido peritoneal	32	14 EV	Fallece
2004	2	39 RNT	3 000 PAEG	Asociación Vacter con cardiopatía congénita (T. de Fallot)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Endocarditis	Sangre	31	60 EV: 30 O: 30	Vive
2005	3	38 RNT	2 900 PAEG	Uropatía obstruktiva	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	Infección urinaria	Orina	55	14 EV: 7 O: 7	Vive
2006	4	40 RNT	4 250 PAEG	Cardiopatía congénita (Hemitronco arterioso)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Peritonitis 2ª a ECN	Líquido peritoneal +	47	14 EV	Vive
2007	5	42 RNT	3 660 PAEG	Cardiopatía congénita (Interrupción arco aórtico)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Infección urinaria	Herida Qx Orina	60	14 EV: 7 O: 7	Vive

⁽¹⁾ Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales, Tto: tratamiento antibiótico, EG: edad gestacional, Sem.: semanas, PN: peso de nacimiento, ATB: antibiótico previo, CVC: catéter venoso central, ARM: asistencia respiratoria mecánica, SV: sonda vesical, QX: cirugía, INT: internación previa, M: masculino, RNPT: recién nacido pretérmino, PAEG: peso adecuado a la edad gestacional, ECN: enterocolitis necrotizante, EV: endovenoso, RNT: recién nacido a término, O: Oral, DAP: ductus arterioso permeable.

Tabla 2. Perfil de sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina obtenidos de los distintos pacientes

Aislamiento	TEI 30 µg ⁽¹⁾	TEI µg/ml ⁽²⁾	VAN µg/ml ⁽²⁾	GEN 120 µg ⁽¹⁾	STR 300 µg ⁽¹⁾	LZD 30 µg ⁽¹⁾	Q&D 15 µg ⁽¹⁾	CMP 30 µg ⁽¹⁾	NIT 300 µg ⁽¹⁾	MIN 30 µg ⁽¹⁾	FOS 200 µg ⁽¹⁾	TET 30 µg ⁽¹⁾
1	11 I	12 I	>256 R	21 S	6 R	29 S	17 I	22 S	6 R	30 S	15 I	26 S
2	11 I	64 R	>256 R	6 R	25 S	29 S	22 S	26 S	26 S	32 S	10 R	24 S
3	11 I	24 I	>256 R	14 S	6 R	26 S	21 S	14 I	17 S	28 S	18 S	28 S
4	10 R	48 R	>256 R	6 R	6 R	25 S	18 I	6 R	14 I	20 S	14 I	24 S
5	10 R	16 I	>256 R	6 R	6 R	26 S	19 S	25 S	15 I	30 S	6 R	28 S

TEI: teicoplanina, VAN: vancomicina, GEN: gentamicina, STR: estreptomina, LZD: linezolid, Q&D: quinupristina-dalfopristina, CMP: cloranfenicol, NIT: nitrofuranos, MIN: minociclina, FOS: fosfomicina, TET: tetraciclina.

⁽¹⁾ Halos de inhibición en mm obtenidos por el método de difusión con discos según recomendaciones del CLSI (4).

⁽²⁾ Valores de concentración inhibitoria mínima obtenidos por E test (AB-Biodisk, Solna, Suecia).

S: sensible, I: sensibilidad intermedia, R: resistente.

Todos los aislamientos mostraron halos de inhibición de 6 mm para ampicilina (10 µg), ampicilina/sulbactama (10/10 µg), vancomicina (30 µg), kanamicina (120 µg) y ciprofloxacina (5 µg). Para rifampicina (5 µg), cuatro

aislamientos se comportaron de esa manera y el restante dio un halo de 9 mm, también dentro del rango de resistencia.

tratamiento. La eficacia fue evaluada considerando la respuesta clínica y la negativización microbiológica.

Un total de 5 recién nacidos de sexo masculino recibieron LZD por infección con EVR; sólo uno tenía el antecedente de prematuridad. Todos tenían alguna enfermedad de base: cardiopatía (2 p), obstrucción intestinal (1 p), uropatía (1 p) y polimorfomación con cardiopatía asociada –asociación VACTER– (1 p).

La media de edad al momento de la infección fue de 45 días (rango: 31-60 días). Todos habían recibido antibióticos, habían sido sometidos a cirugía y se les había colocado sonda vesical. Cuatro pacientes tuvieron, además, catéteres vasculares centrales y asistencia respiratoria mecánica con anterioridad al desarrollo de la infección.

El diagnóstico clínico fue de: infección urinaria (2 p), enterocolitis necrotizante con peritonitis secundaria (2 p) –en uno de ellos asociada a infección superficial de sitio quirúrgico– y endocarditis (1 p) (Tabla 1). Los criterios diagnósticos utilizados se basaron en las definiciones del CDC/NHSN (National Healthcare Safety Network) de 2008 (7). Los niños con infección urinaria presentaron manifestaciones clínicas compatibles con infección sistémica y urocultivo positivo monomicrobiano obtenido por punción suprapúbica. El diagnóstico de infección de sitio quirúrgico se basó en la observación clínica de supuración local y el aislamiento microbiológico por punción-aspiración de la herida. Los dos niños con enterocolitis necrotizante presentaron clínica de abdomen agudo y neumatosis intestinal radiológica, lo que requirió la exploración quirúrgica que permitió confirmar el diagnóstico, en ambos casos complicados con peritonitis secundaria. Para el diagnóstico de endocarditis se utilizaron los criterios de la Universidad de Duke, que son los universalmente utilizados para la definición de endocarditis en niños y adultos. El niño que presentaba endocarditis cumplía los criterios definitivos para el diagnóstico de la enfermedad, con 2 criterios mayores: 1) bacteriemia continua con hemocultivos positivos durante 5 días consecutivos por EVR en ausencia de otro foco primario; y 2) compromiso endocárdico evaluado por ecocardiograma, donde se evidenció la vegetación sobre la válvula tricúspide. Se identificaron, además, tres de los criterios menores: cardiopatía congénita predisponente, eritrosedimentación acelerada e insuficiencia cardíaca.

En todos los casos se aisló EVR y se efectuó el estudio de sensibilidad a los ATB mediante los métodos convencionales (4); el perfil obtenido se muestra en la Tabla 2. El hallazgo microbiológico de EVR fue en sangre (1 p), orina (2 p), líquido peritoneal como única muestra positiva (1 p) y asociado a herida quirúrgica (1 p). El tratamiento con LZD se realizó a la dosis de 10 mg/kg cada 8 h durante 2 a 6 semanas, de acuerdo con el foco clínico. El LZD fue bien tolerado y se obtuvo una buena respuesta clínica y negativización microbiológica en todos los ca-

sos. Un paciente falleció a los 14 días del tratamiento por motivos no relacionados con la infección por EVR. Era un recién nacido pretérmino de 1 600 g que presentó una enterocolitis necrotizante grave estadio III B con perforación intestinal, que requirió tratamiento quirúrgico y tuvo buena evolución inicial, aunque falleció a las 2 semanas de iniciado el tratamiento antibiótico por una descompensación hemodinámica con cultivos negativos.

En los últimos años se ha evidenciado un aumento de la incidencia de infecciones enterocócicas graves, principalmente en las terapias pediátricas y neonatales y en pacientes oncohematológicos, con aparición de EVR. Estas cepas han demostrado tener un gran potencial de diseminación, ya que fueron capaces de colonizar hasta a un 40% de los recién nacidos internados (11).

Dentro de los factores de riesgo para la adquisición de la infección por EVR se encuentran la internación prolongada, las cirugías, los catéteres y el uso previo de ATB como la vancomicina, β -lactámicos y carbapenemes (3). En concordancia con estas observaciones, nuestros pacientes habían recibido ATB de amplio espectro, tenían cirugía previa y sonda vesical, y el 80% tenía, además, catéteres vasculares centrales y asistencia respiratoria mecánica con anterioridad al diagnóstico de la infección.

La emergencia de EVR ha generado un desafío terapéutico en esta población, ya que requiere el uso de combinaciones de drogas o la administración de ATB de uso experimental, o bien de eficacia no confirmada en niños (3).

El LZD ha probado ser una alternativa segura y efectiva en adultos con infecciones por CGP resistentes (14). La posibilidad de ser administrado tanto por vía oral como parenteral con muy buena biodisponibilidad y su actividad contra EVR lo han convertido en una alternativa terapéutica valiosa. Con el fin de realizar un uso racional del ATB, en el Hospital Garrahan se ha dispuesto su administración sólo en casos de infecciones causadas por EVR en las que no hay disponible otra alternativa terapéutica.

En 2003 se publicó una revisión de 958 casos en pacientes menores de 12 años en los que el LZD demostró ser seguro y bien tolerado (15). En recién nacidos la experiencia es limitada y se restringe, principalmente, a infecciones por EVR. En los 5 recién nacidos tratados, el LZD mostró buena eficacia clínica y seguridad para el tratamiento de infecciones por EVR, incluyendo formas graves como la endocarditis. Publicaciones previas mostraron resultados similares, con un índice de curación de alrededor del 90%, tanto en la población pediátrica como neonatal (5, 8, 15, 16), aunque el número de casos documentados aún es limitado. Otros estudios muestran una eficacia que varía del 76 al 100% en función de la forma clínica, con un menor índice de curación en infecciones óseas, endocarditis e infecciones asociadas a catéter (2).

Los efectos adversos comunicados fueron leves, transitorios y reversibles con la suspensión de la droga. Los más comunes fueron los gastrointestinales, dermatológicos y hematológicos, estos últimos relacionados con tratamientos de más de 14 días de duración (15). El LZD fue bien tolerado en nuestra población, la que no presentó efectos adversos clínicos o de laboratorio durante el tratamiento. Estos datos son comparables con los que ofrece la literatura, donde se observó menos efectos adversos con el uso de LZD que con vancomicina (11,6% vs. 31,6%, respectivamente). La experiencia en neonatos con infecciones por EVR está limitada a una reducida serie de casos (1, 6, 9).

Debe tenerse en cuenta el alto potencial de diseminación de EVR, lo que implica un riesgo de transmisión de la resistencia a otros patógenos más virulentos, como *S. aureus*. Además, ya ha sido comunicada la resistencia a LZD, por lo que consideramos que los esfuerzos deben focalizarse en la prevención de la emergencia y diseminación de dichas resistencias, a través de políticas de uso racional de ATB, control de infecciones y educación del personal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ang JY, Lua JL, Turner DR, Asmar BI. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* endocarditis in a premature infant successfully treated with linezolid. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 1101-3.
2. Birmingham MC, Rayner CR, Meagher AK, Flavin SM, Batts DH, Schentag JJ. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant, gram-positive infections: experience from a compassionate-use program. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 159-68.
3. Butler KM. Enterococcal infection in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006; 17: 128-39.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement, 2008; M100-S18. Wayne, Pa, USA.
5. Deville JG, Adler S, Azimi PH, Jantusch BA, Morfin MR, Beltran S, *et al.* Linezolid versus vancomycin in the treatment of known or suspected resistant gram-positive infections in neonates. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22 Suppl 9: S158-S63.
6. Hoehn R, Groll AH, Schaefer V, Bauer K, Schloesser RL. Linezolid treatment of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in very low birth weight premature neonates. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 256-8.
7. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008; 36: 309-32.
8. Kaplan SL, Deville JG, Yogev R, Morfin MR, Wu E, Adler S, *et al.* Linezolid versus vancomycin for treatment of resistant gram-positive infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 677-85.
9. Klingowski U, Huth RG, Habermehl P, Knuf M. Linezolid in two premature babies with necrotizing enterocolitis and infection with vancomycin-resistant enterococcus. *Klin Pädiatr* 2004; 216: 21-3.
10. Lopardo H, Blanco A, Carbonaro M, Ruvinsky S, Andión E, Venuta ME, *et al.* Impacto de 10 años de vigilancia de colonización con enterococos resistentes a vancomicina en un hospital pediátrico de alta complejidad. *Medicina Infantil* 2008; 15: 114-20.
11. Malik RK, Montecalvo MA, Reale MR, Li K, Maw M, Muñoz JL, *et al.* Epidemiology and control of vancomycin-resistant enterococci in a regional neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 352-6.
12. Marín ME, Mera JR, Arduino RC, Correa AP, Coque TM, Stamboulia D, *et al.* First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in Argentina. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 235-6.
13. Paladino J. Linezolid: an oxazolidinone antimicrobial agent. *Am J Health Syst Pharm* 2002; 59: 2413-25.
14. Rubinstein E, Isturiz R, Standiford HC, Smith LG, Oliphant TH, Cammarata S, *et al.* Worldwide assessment of linezolid's clinical safety and tolerability: comparator-controlled phase III studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1824-31.
15. Saiman L, Goldfarb J, Kaplan SA, Wible K, Edge-Padbury B, Naberhuis-Stehouwer S, *et al.* Safety and tolerability of linezolid in children. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22 Suppl 9: S193-S200.
16. Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, *et al.* Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 1996; 129: 63-71.

Alterations in growth and branching of *Neurospora crassa* caused by sub-inhibitory concentrations of antifungal agents

R. C. PEREIRA^{1,2}, S. SAID^{1*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 14040-903, São Paulo, Brazil; ²Gerência Geral de Medicamentos, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Brasília, 70770-502, Distrito Federal, Brazil.

*Correspondence. E-mail address: susaid@usp.br

ABSTRACT

Six antifungal agents at subinhibitory concentrations were used for investigating their ability to affect the growth and branching in *Neurospora crassa*. Among the antifungals herein used, the azole agent ketoconazole at 0.5 µg/ml inhibited radial growth more than fluconazole at 5.0 µg/ml while amphotericin B at 0.05 µg/ml was more effective than nystatin at 0.05 µg/ml. Morphological alterations in hyphae were observed in the presence of griseofulvin, ketoconazole and terbinafine at the established concentrations. The antifungal agents were more effective on vegetative growth than on conidial germination. Terbinafine markedly reduced growth unit length (GU) by 54.89%, and caused mycelia to become hyperbranched. In all cases, there was a high correlation between hyphal length and number of tips ($r > 0.9$). All our results showed highly significant differences by ANOVA, ($p < 0.001$, $\alpha = 0.05$). Considering that the hyphal tip is the main interface between the fungus and its environment /through which enzymes and toxins are secreted and nutrients absorbed, it would not be desirable to obtain a hyperbranched mycelia with inefficient doses of antifungal drugs.

Key words: antifungal drugs, apical growth, *Neurospora crassa*

RESUMEN

Alteraciones de crecimiento y ramificación en *Neurospora crassa* provocadas por concentraciones sub-inhedoras de agentes antimicóticos. Se investigó el efecto de seis agentes antimicóticos en concentraciones subinhibitorias sobre el crecimiento y la ramificación en *Neurospora crassa*. El agente azólico ketoconazol a la concentración de 0,5 µg/ml inhibió el crecimiento radial más que el fluconazol a 5,0 µg/ml, y la anfotericina B a 0,05 µg/ml fue más eficiente que 0,05 µg/ml de nistatina, entre los agentes poliénicos usados. En presencia de griseofulvina, ketoconazol y terbinafina a las concentraciones establecidas se observaron alteraciones morfológicas en las hifas. Los agentes antimicóticos fueron más eficientes sobre el crecimiento vegetativo que sobre la germinación conidial. La terbinafina redujo marcadamente (54,89%) la longitud de la unidad de crecimiento y provocó la hiperramificación del micelio. En todos los casos, existió gran correlación entre la longitud y el número de ápices de las hifas ($r > 0,9$). Todos los resultados mostraron diferencias altamente significativas de acuerdo con ANOVA ($p < 0,001$, $\alpha = 0,05$). Considerando que el ápice de la hifa es la principal interfase entre el hongo y su ambiente, a través de la cual las enzimas y las toxinas son secretadas y los nutrientes son absorbidos, un micelio hiperramificado resultante de dosis ineficientes de agentes antimicóticos sería perjudicial.

Palabras clave: drogas antimicóticas, crecimiento apical, *Neurospora crassa*

INTRODUCTION

Due to several correlated factors like the emergence of AIDS and other highly infectious diseases, organ transplantation and cancer chemotherapy, the nosocomial immunocompromised population has noticeably increased over the last decades, bringing along the spectre of opportunistic fungal infections (5, 21, 25). It is important to call attention to the limited number of effective antifungal compounds available and the need to develop new clinical options (3, 9). Fungi are eukaryotic organisms that share a large set of potential drug targets with their hosts, hindering the development of new agents (21). In spite of this, new azoles (voriconazole and posaconazole), a class

of echinocandins, especially caspofungin and anidulafungin, have recently been examined (8, 15, 24).

The aim of the present work was to study the effects of subinhibitory concentrations of six antifungal drugs on different phases of the development of *N. crassa*, used as fungal model, by analyzing changes in conidial germination, vegetative growth and morphology of hyphal branching.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

Neurospora crassa wild type 74OR 8-1a (ATCC) kept on slants of Vogel's Minimum Medium (VMM) supplemented with 2% (w/v) glucose and stored at 4 °C, was used throughout this work.

For the experiments, fungus was grown in this medium at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 3 days, and at room temperature for 4 days.

Antifungal drugs

Sub-lethal concentrations of six antifungal agents from four classes of antibiotics having different mechanisms of action were tested. Griseofulvin, a carbamate, exerts its fungistatic action by inhibiting cell division, leading to the disruption of the mitotic spindle structure (22). Fluconazole and ketoconazole are azole agents that decrease ergosterol synthesis by inhibiting cytochrome P450 enzymes (16). Terbinafine, an agent from the allylamines class, acts by inhibiting the enzymes responsible for squalene conversion (17). Polyenic macrolides (nystatin and amphotericin B) have in common a mechanism of action by means of which they selectively bind to ergosterol (7). In earlier experiments, different concentrations of antifungals have been tested in order to establish those that would allow a certain fungus growth degree. Lethal concentrations of antifungals would not fulfill the aims of this study. It is worth pointing out that the excipient used, usually lactose and/or magnesium stearate contained in the tablets or capsules wherefrom the employed antifungals were extracted, are innocuous for man. Tablets or capsules were pulverized and dissolved in dimethylsulphoxide [DMSO 99.5% (v/v)] to yield drug solutions at the established concentrations, after adequate dilution. Samples were aseptically added to the VMM at 45°C . The final medium DMSO concentration was adjusted to a maximum of 0.5% (v/v). Controls contained the same final DMSO concentration, but no antifungal drug was added.

Evaluation of antifungals on fungal growth and morphology

To evaluate the effect of antifungal drugs on *N. crassa* growth, 7-day old conidia were inoculated on VMM containing the antifungals, in Petri dishes and incubated at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h. Growth was followed by measuring colony radii after 7; 15; 20 and 24 h in three replicates for each concentration. Fungus growth rate was determined using 50.00 cm race tubes containing VMM supplemented or not with each antifungal. Media at the end of the race tube were inoculated with conidia. Mycelia lengths were daily measured. Growth rate was calculated from averages obtained after a 24-h interval. Growth Units (GUs) were determined according to Trinci's technique (23): approximately 50 conidia were inoculated on VMM in Petri dishes, spread and incubated at 30°C for 15 h. Photographs were taken with a Zeiss Stemi SV11 stereomicroscope under transmitted light using T-MAX 400 film. Total hyphal lengths and number of branches per hyphal length were measured on the enlarged photographic prints. GU values at each experimental condition were calculated from the quotient between total length and number of branches.

Evaluation on conidial germination and vegetative growth

Approximately 100 conidia were inoculated on dialysis membranes, overlaying VMM with antifungals, and incubated for 5 h at 30°C . The total numbers of conidia, as well as the amounts germinated were evaluated under a Zeiss Axioskop microscope. To assess the effect of drugs on vegetative hyphae, conidia were allowed to grow for 24 h on VMM. Mature hyphae were then sectioned about 1.0 cm below the apex, allowing to rest on the agar for 1 h to achieve osmotic stabilization. Next, the pieces of dialysis membranes covered with hyphae, were transplanted onto VMM supplemented with different antifungal drug concentrations and incubated for an additional 24 hours.

Statistical Analysis

ANOVA and Student's *t* tests for significance were performed at the level of $\alpha = 0.05$. Correlation between hyphal length and number of tips (GU) was determined by regression analysis.

RESULTS

Radial growth

In previous experiments, several concentrations of each antifungal had been tested to determine the sub-lethal concentration. We observed a significant colony radial growth inhibition compared to controls, but less than 50% (data not shown). A concentration was established for each drug according to its effects (5.00 $\mu\text{g/ml}$ griseofulvin; 5.00 $\mu\text{g/ml}$ fluconazole; 0.50 $\mu\text{g/ml}$ ketoconazole; 0.25 $\mu\text{g/ml}$ terbinafine; 0.05 $\mu\text{g/ml}$ nystatin; 0.05 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B). At equal concentration, fluconazole caused an inhibition approximately 4-fold higher than that produced by griseofulvin (Table 1). At one-half the concentration of ketoconazole, the inhibition by terbinafine resulted in a 2-fold increase. Among the polyene antifun-

Table 1. Standard concentration of antifungals and inhibitory effect on colony radius.

Drug	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)	ANOVA
Griseofulvin	5.00	10.57	-
Fluconazole	5.00	43.99	++
Ketoconazole	0.50	15.99	+
Terbinafine	0.25	31.84	++
Nystatin	0.05	0	-
Amphotericin B	0.05	33.54	++

(-) non significant ($p > 0.05$); (+) significant ($p < 0.01$); (++) extremely significant ($p < 0.001$). Antifungals were added to VMM, and conidia were inoculated over dialysis membranes. Plates were then incubated at 30°C for 24 h and colony radius determined. Values are the average of at least 3 replicates and were tested for significance (ANOVA, $p < 0.001$, $\alpha = 0.05$)

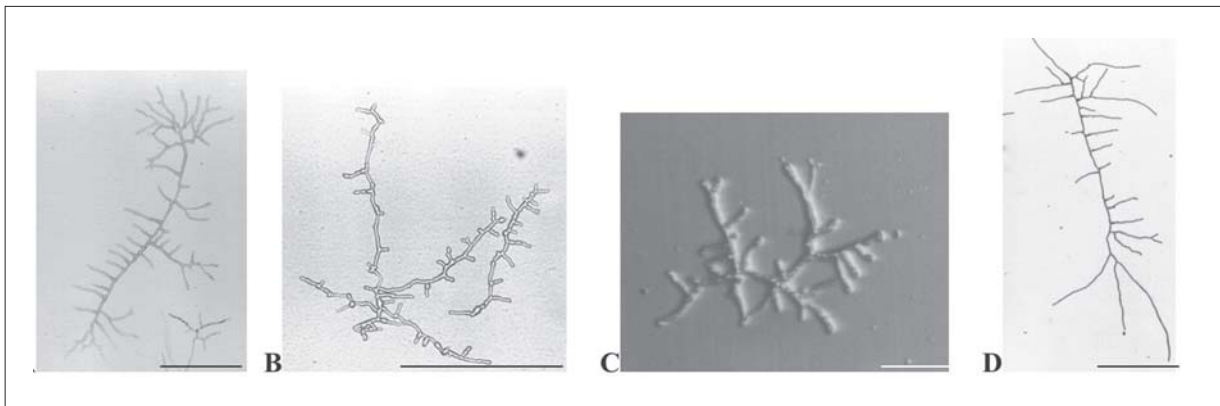


Figure 1. Antifungal effect on morphology and branching pattern of *N. crassa* hyphae. Micrographs of single hyphae grown on supplemented (A, griseofulvin; B, ketoconazole; and C, terbinafine) or non-supplemented (D) VMM were taken after 15 h of incubation at 30 °C. Bars, 100 μ m (A, B e D) and 500 μ m (C).

gals, amphotericin B led to a 33% growth inhibition, whereas, nystatin at the same concentration, did not result in inhibition. Neither DMSO used to prepare the test solutions nor the pharmaceutical excipients presented significantly inhibited growth at the doses of antifungals employed (Student's *t*, $p < 0.001$, $\alpha = 0.05$).

Alterations in hyphal morphology

It is known that in its normal growth, *Neurospora crassa* displays highly polarized and regularly spaced branches emerging from a main hypha (Figure 1D). In the presence of griseofulvin (Figure 1A), the branches became curled denoting a loss of the polarized growth. Supplementation of VMM with ketoconazole resulted in shorter and bud-like branches (Figure 1B); terbinafine induced unusual multipolar germination of conidia leading to short hyphae (Figure 1C). No alterations on hyphal morphology were detected in nystatin, amphotericin B and fluconazole presence.

Percentages of conidial germination and inhibition of vegetative growth

All drugs caused a reduction of approximately 30 ~ 40% of conidial germination after 5 h incubation, with the exception of terbinafine, in whose presence less than 20% of the total conidia inoculum, germinated (Figure 2). Terbinafine was more effective on conidial germination than on inhibiting vegetative growth (80% against 50%, respectively). The inhibitor effect of griseofulvin, fluconazole and ketoconazole was stronger on vegetative growth than on conidial germination. Polyene drugs did not significantly inhibit vegetative growth.

Effect on growth rate

Terbinafine caused a strong reduction of *N. crassa* growth rate (Table 2), whereas none of the polyene anti-

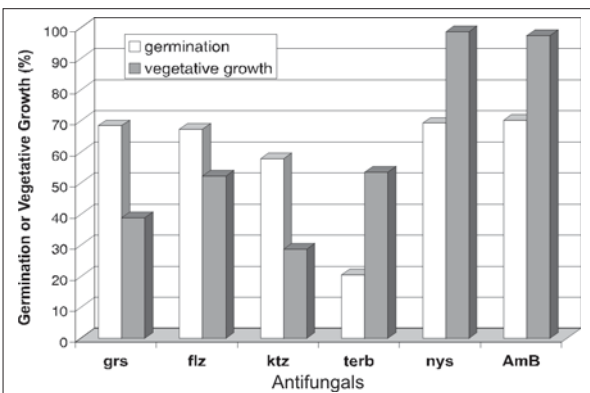


Figure 2. Effect of antifungals on conidial germination and vegetative growth of *N. crassa*. Seven-day old conidia or 24-h-old hyphae transplanted from non-supplemented VMM, were inoculated onto antifungal-supplemented media, overlaid with dialysis membranes, and incubated at 30 °C for 5 h for conidial germination (white bar) and 24 h for vegetative growth (solid bar). Griseofulvin (grs), fluconazole (flz), ketoconazole (ktz), terbinafine (terb), nystatin (nys), and amphotericin B (AmB).

Table 2. Growth rates of *N. crassa* in drug-supplemented media.

Condition	Growth rate (cm/h)	SEM	ANOVA
Control	0.485	0.026	
Griseofulvin	0.429	0.017	+
Ketoconazole	0.368	0.022	+
Fluconazole	0.443	0.016	+
Terbinafine	0.168	0.043	++
Nystatin	0.550	0.046	-
Amphotericin B	0.484	0.031	-

SEM standard error of mean; - non significant ($p > 0.05$); + significant ($p < 0.01$); ++ highly significant ($p < 0.001$). Race tubes containing 40.0 ml of VMM supplemented or not with antifungals were inoculated at one end and incubated at 30 °C for 5 days. Mycelial lengths were measured at daily intervals; results are an average of at least 5 determinations.

Table 3. Effect of antifungals on the GU of *N. crassa*.

Condition	n	GU (μm)	SEM	Variation (%)	r	Dunnett's test
Control	16	243.76	12.2		0.9008	
Griseofulvin	10	242.67	10.1	- 0.45	0.9324	-
Fluconazole	14	258.27	9.7	+ 5.65	0.9630	-
Ketoconazole	8	215.89	17.8	- 11.43	0.9184	-
Terbinafine	13	109.96	5.8	- 54.89	0.9443	+
Nystatin	15	353.75	18.0	+ 45.10	0.9448	+
Amphotericin B	8	376.02	23.8	+ 54.25	0.9585	+

n, number of replicates; SEM, standard error of mean; r, correlation coefficient; -, non significant; +, significant ($p < 0.01$). Values obtained were submitted to Dunnett's multiple comparison tests of significance.

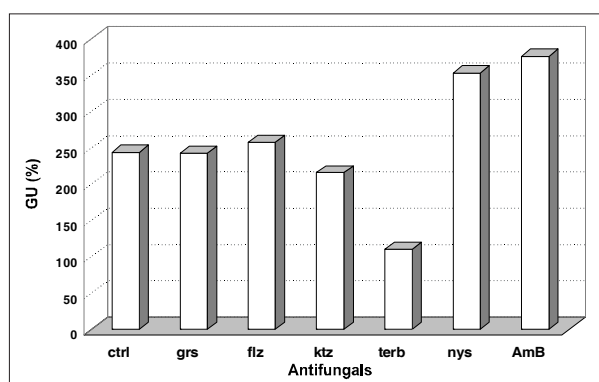


Figure 3. Effects of antifungals on Growth Unit (GU) of *N. crassa*. Parameters were obtained from the ratios between total length of a given hypha and its respective number of tips, shown on digitally enhanced micrographs of at least 8 determinations. Controls (ctrl) contained no antifungal; standard errors remained below 10%. Griseofulvin (grs), fluconazole (flz), ketoconazole (ktz), terbinafine (terb), nystatin (nys), and amphotericin B (AmB).

fungals showed this effect to a significant extent (ANOVA, $\alpha = 0.05$). The other agents tested only exhibited moderate inhibition effects. Under the conditions employed, an initial 24-hour adaptation period post inoculation was shown, followed by a constant growth rate. Adaptation to terbinafine required approximately 48 h.

Alterations in the hyphal growth unit

The hyphal GU is the ratio between the length of a given hypha and its number of tips or branches. The total length and number of tips per hypha were determined from digitally enhanced micrographs of single hypha. An extremely significant level of correlation (r) was obtained at all conditions examined (Table 3); and run tests indicated that a linear model was followed in each case (2). ANOVA ($\alpha=0.05$) of these results indicated a highly significant difference at different conditions. Dunnett's multiple comparison test showed that griseofulvin, fluconazole and ketoconazole did not significantly altered GU, while terbinafine caused total lengths to be reduced by more

than 50%. Polyene antifungals increased GU values by 45 ~ 55% (Figure 3).

DISCUSSION

It has been reported that DMSO concentrations greater than 2.0% may inhibit growth and disrupt *Neurospora crassa*'s apical actin cap (4, 11). The concentration used in the present work (0.5% v/v) caused none of these effects when radial growth was evaluated. A direct relationship between the antimycotic concentration and radial growth inhibition was observed for all drugs studied. However, agents acting on similar metabolic fungal pathways affected them to a different extent. For instance, the same concentration of amphotericin B and nystatin (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) caused a 33.54% inhibition and no inhibition, respectively. Drugs acting on the same molecular targets, like fluconazole and ketoconazole, respectively inhibited fungal growth in different ways. Such differences may be explained by the drug's structural variety leading to different binding affinities to affected enzymes. Terbinafine's inhibition of squalene epoxidase has been proven to be more effective than azole's action on 14 α -demethylase (25). It is also known that fungi present distinct physiological features according to their various developmental stages (18). Therefore, in this study, the antimycotic effect was evaluated during both conidial germination and vegetative growth phases and as a result, a variety of effects were observed. Thus, although unable to cause a significant inhibitory effect during vegetative growth, macrolides reduced conidia germination by approximately 30%. Although azole drugs are known to act on identical molecular targets, they affected fungal growth differently according to their phase. Fluconazole reduced vegetative growth by 52.26%, but ketoconazole caused only a 28.66% inhibition. In turn, ketoconazole reduced conidial germination by 42.20% while fluconazole reduced this parameter by 32.74%. Structure-activity relationships could account for such differences (20). Irrespective of the growth phase, terbinafine proved to be the most ef-

fective agent of all those studied, as it decreased vegetative growth by 53.5% and conidial germination by 79.58%. With the exception of nystatin and amphotericin B, antifungals added to VMM, on average, significantly reduced the growth rate between 8.58% for fluconazole and 65.45% for terbinafine. It has been previously established for a variety of fungal species, that different growth conditions or the presence of inhibitors can lead to alterations in hyphae morphology, growth and branching patterns (23). Determining the hyphal growth unit could bring about new data concerning these alterations. The present results show that griseofulvin, fluconazole and ketoconazole, kept the growth unit and hyphal density unaltered relative to controls. On the other hand, terbinafine significantly reduced the growth unit length by over 50%. This could be explained as a result of the higher number of branches per length of hypha (i.e. the number of branches in the terbinafine-supplemented medium could practically be doubled with respect to the controls).

Hyphae morphology on non-supplemented VMM showed polarized growth and regularly spaced branches, in agreement with previous reports (1). Under the effect of griseofulvin, hyphae became rugged and curled. This phenotype is similar to that of the *N. crassa* dynein-deficient *ropy* mutant (19). Fluconazole caused slight increase in mycelium density and branches emerged in irregular fashion from the main hypha. Also, at closer examination, apex frequently showed a dichotomic pattern very similar to that observed in hyphae submitted to cold shock (12) or in the presence of the calcium channel blocker, verapamil (6). The incorporation of ergosterol precursors into the plasma membrane may also lead to a barrier of altered fluidity, reflecting effect on the function of calcium-dependent ATPases and other integrating proteins (13). The hyperbranched growth pattern observed under the effect of terbinafine closely resembled that of *spray* and *frost* *N. crassa* mutants (6). It is generally accepted that for filamentous fungi, life is at the tip (10), since the main biological processes such as growth, reproduction, morphogenesis, substrate absorption, environment recognition, and protein secretion occur in the apical region. It is to be noted that previous reports had shown that protein secretion in filamentous fungi is restricted to the growing tips and that conditions that increase growing surface lead to an increase in the amount of protein secretion (14).

In this work, we demonstrated that at least two of the antimycotics tested, induced morphological alterations. Griseofulvin disorganized polarized growth, while terbinafine led to hyperbranching. Considering that increased branching could result in increased active growth area, it may be speculated that for pathogenic fungi this could be translated into increased pathogenicity. Misuse of medicines, especially of antibiotic agents, is a well known clinical occurrence and the main cause of bacterial (and, more recently demonstrated) fungal resistance.

Early interruption of treatment, often times prior clinical cure, can result in the selection of resistant strains. Eventually, plasma levels of these drugs could decrease to levels similar to those shown in our work to have caused hyperbranching.

In conclusion, a potentially more resistant strain may be induced to increasing branching that in turn, may lead to a higher level of protein and toxin secretion.

Acknowledgements: This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nº 97/03619-7 and is part of a thesis submitted by Rogério Coutinho Pereira to Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, in partial fulfillment of the requirements for the Master's degree. RCP received a master fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are thankful to M. A. S. C. Chellegatti for typing the manuscript.

REFERENCES

- Barja F, Thi B, Turian B. Localization of actin and characterization of its isoforms in the hyphae of *Neurospora crassa*. FEMS Microbiol Lett 1991; 77: 19-24.
- Bolton S. Analysis of variance. In: Bolton S, editor. Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications. New York, Marcel Dekker, 1997, vol. 737, p. 265-325.
- Cassone A. Cell wall of pathogenic yeasts and implications for antimycotic therapy. Drug Exp Clin Res 1986; 12: 635-43.
- Chalmers JH. Toxicity of antibiotics and other drugs to *Neurospora*. Neurospora Newsletter 1974; 21: 20-1.
- Debono M, Gordee RS. Antibiotics that inhibit cell wall development. Annu Rev Microbiol 1994; 48: 471-97.
- Dicker JW, Turian G. Calcium deficiencies and apical hyperbranching in wild-type and the frost and spray morphological mutants of *Neurospora crassa*. J Gen Microbiol 1990; 136: 1413-20.
- Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 7-10.
- Falagas ME, Ntziora F, Betsi GI, Samonis G. Caspofugin for the treatment of fungal infections: a systematic review of randomized controlled trials. Int J Antimicrob Agents 2007; 29: 136-43.
- Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 501-17.
- Gooday GW, Gow NAB. Tip growth. In: Heath IB, editor. Tip Growth in Plant and Fungal Cells. San Diego, Academic Press, 1990, p. 31-58.
- Jackson SL, Heath IB. Evidence that actin reinforces the extensible hyphal apex of the oomycete *Saprolegnia ferax*. Protoplasma 1990; 154: 66-70.
- Kawano CY, Said S. Morphological alterations induced by cold shock in *Neurospora crassa*. J Basic Microbiol 2002; 42: 381-7.
- Lee AG. How lipids interact with an intrinsic membrane protein: the case of the calcium pump. Biochim Biophys Acta 1998; 1376: 381-90.
- Lee IH, Walline RG, Plamann M. Apolar growth of *Neurospora crassa* leads to increased secretion of extracellular proteins. Mol Microbiol 1998; 29: 209-18.
- Letscher-Bru V, Herbrecht R. Caspofugin: the first representative of a new antifungal class. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 513-21.

16. Odds FC. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 463-71.
17. Petranyi G, Meingassner JG, Mieth H. Antifungal activity of the allylamine derivative terbinafine *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1365-8.
18. Schmith JC, Brody S. Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriol Rev* 1976; 40: 1-41.
19. Seiler S, Plamann M, Schliwa M. Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicle traffic during cell morphogenesis in *Neurospora*. *Curr Biol* 1999; 9: 779-85.
20. Staben C. Resistance to azole drugs in *Neurospora crassa*. *Exp Mycol* 1995; 19: 163-5.
21. Stephenson J. Investigators seeking new ways to stem rising tide of resistant fungi. *JAMA* 1997; 277: 1-10.
22. Tamaki K. Successful treatment of pigmented purpuric dermatosis with griseofulvin. *British J Dermatol* 1995; 132: 159-60.
23. Trinci APJ. The hyphal growth unit of wild type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. *Arch Microbiol* 1973; 91: 127-36.
24. Vazquez JA. Anidulafungin: a new echinocandin with a novel profile. *Clin Ther* 2005; 27: 657-73.
25. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 382-402.

Recibido: 15/07/08 – Aceptado: 23/12/08

Mycobacteriophages as versatile tools for genetic manipulation of mycobacteria and development of simple methods for diagnosis of mycobacterial diseases

E. J. STELLA¹, A. I. DE LA IGLESIA^{1,*}, H. R. MORBIDONI^{1, 2**}

¹Cátedra de Microbiología, Virología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario;

²Independent Researcher, Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

*Co-corresponding author.

**Correspondence. E-mail: morbiatny@yahoo.com

ABSTRACT

Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is responsible for over two million deaths per year worldwide. Due to its long doubling time (18 h), the microbiological detection of *M. tuberculosis* by conventional methods takes up to one month, unless the number of bacilli in the biological sample is high enough. Thus, drug resistance assessment requires at least one month for obtaining the primary culture and another month to determine its susceptibility to anti-mycobacterial drugs. Moreover, for a long time, the lack of genetic tools for mycobacteria has been a barrier for undertaking studies aimed at understanding the mechanisms of drug resistance and drug target identification, being all these topics of utmost importance considering the increase in the number of drug-resistant clones and the few therapeutic options available. Mycobacteriophages are promising as a novel source of genetic elements for mycobacteria manipulation, as well as for the development of versatile, simple, fast and cheap methods for drug resistance assessment of *M. tuberculosis* clinical isolates. We herein describe the background related to the use of mycobacteriophages, with emphasis placed on their utilization for drug resistance analysis in our country.

Key words: mycobacterial genetics, mycobacteriophages, diagnostic tools, tuberculosis

RESUMEN

Micobacteriófagos como herramientas versátiles para la manipulación genética y el desarrollo de métodos simples para el diagnóstico de enfermedades micobacterianas. La tuberculosis, enfermedad causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, es responsable de más de dos millones de muertes anuales en el mundo. Debido a su largo tiempo de duplicación (18 h), la detección bacteriológica de *M. tuberculosis* por métodos convencionales necesita de un mes o aun más, a menos que el número de bacilos en la muestra clínica sea suficientemente alto. Por consiguiente, se necesita un mínimo de dos meses para determinar la resistencia de este microorganismo a las drogas antituberculosas: uno para obtener el cultivo primario y otro para ensayar la sensibilidad frente a aquellas. La falta de herramientas para la manipulación genética de micobacterias ha dificultado la identificación de los blancos de acción de las drogas y el estudio de los mecanismos de resistencia a éstas, tópicos de la mayor relevancia dado el aumento mundial del número de aislamientos clínicos multirresistentes y las pocas opciones terapéuticas disponibles. Los micobacteriófagos son considerados nuevas herramientas para la manipulación de las micobacterias, así como para el desarrollo de métodos simples, rápidos y económicos para determinar la sensibilidad a drogas de los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. En esta revisión se describen los antecedentes del uso de micobacteriófagos con énfasis en su utilización para el análisis de resistencia a drogas antituberculosas en nuestro país.

Palabras clave: genética de micobacterias, micobacteriófagos, herramientas diagnósticas, tuberculosis

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is a major cause of illness and death worldwide, especially in Asia and Africa. Far from being eradicated, tuberculosis has re-surfaced, riding on the back of famine and poverty and the HIV pandemic, leading the World Health Organization (WHO) to declare tuberculosis a global emergency in the mid '90s. A number of programs have been designed with the aim of stopping and reversing the incidence of tuberculosis by the

year 2015 (40, 41, 65, 87). As detailed in several WHO publications, some of the goals have been achieved while others are evading control in spite of the massive budget available for TB control (US\$ 3.3 billion across 90 countries accounting for 91% of global cases). Globally, an estimated 9.2 million new cases and 1.7 million deaths from TB occurred in 2006, of which 0.7 million cases and 0.2 million deaths corresponded to HIV-positive people, with an estimated 0.5 million cases of multi-drug-resistant TB (MDR-TB) (43, 87).

Among the number of reasons that sustain the spread of tuberculosis in the world, we must mention the consequences of global economy-driven immigration, failing national tuberculosis programs and lack of knowledge of the tubercle bacillus as a microbe, since until recently, information on its genetics and physiology has been scarce.

Some of the WHO recommendations aim at global TB control, patient management, laboratory service and research and development (32, 35, 68). Regarding this last point, the utilization of mycobacteriophages has been a driving force to pierce the shield of mycobacteria by becoming the basis for the development of tools for the molecular analysis of these bacilli. This review intends to illustrate some of the valuable results of the research on mycobacteriophages.

BACTERIOPHAGES: THE CRUSHING WEIGHT OF NUMBERS

Bacteriophages (phages) are prokaryotic infecting viruses and the most abundant organisms in biosphere, according to Bergh *et al.* roughly 10^{30} phages (9). They play important roles in keeping the balance of microbial communities, not only because during infection, bacteria may be killed by the ensuing phage replication but also because phages are a reservoir of genetic information and, therefore, are providers of genetic variability to the infected host. Since no two identical phages have been identified so far, it may be concluded that genetic variability is extremely large and, as in the rest of the biological universe, phages may undergo expansion and contraction of their numbers and families depending on the variation in the numbers of their preferred microbial hosts. Due to their small genomes [generally less than 150 kilobase pairs (kbp), with an average of 40-70 kbp] and the simplicity of their amplification, phages, in general, have been marvellous tools for the analysis of biological processes such as genetic recombination and transfer of genetic information, and because of this ability, for the artificial genetic manipulation of bacterial species in order to study various aspects of their physiology (9, 16, 17, 20, 50, 51).

After infection, phages may follow three different paths: one is the "lytic" cycle: their replication lead to an increase in the mass of phage proteins and nucleic acids which will finally be assembled by different mechanisms prior to the lysis of the bacteria and the release of the phage progeny; a second route and quite an important one for molecular biologists and geneticists the "lysogenic" cycle, is the reversible integration of the phage DNA into the bacterial genome. The third path is the "pseudo lysogeny" a seldom detected phage strategy, which we will not consider further.

For the purpose of integrating into the bacterial chromosome, phages contain DNA sequences highly homolo-

gous to a specific chromosomal sequence present in the bacteria which the phage infects, which are known as "attachment sites", represented as *attB* and *attP* for bacteria and phages, respectively. These sequences vary between different phages and bacteria, therefore leading to a universe of possible integration events, provided that two *att* sequences (B and P) are similar enough. Thus via site-specific recombination, the phage genome is integrated within the bacterial chromosome at a precise location. The phages that follow that path are called temperate phages, the process is known as lysogeny and the integrated phage is called a "prophage". In this way, the phage replicates synchronously with the bacterial genome, being able to excise out of the chromosome, provided that specific signals (such as DNA damage) are sensed. Once the prophage is induced, a lytic cycle will follow, producing lysis of the bacterial cell and release of the infective particles.

Regardless of the temperate or lytic nature of the phage, once the structural constituents (capsids and tails and replicated DNA) are ready in the bacterial cytoplasm, there is a coordinated assembly of capsid and tails along with DNA packaging. At this point, it will be important, for the sake of future references in this review, to define two strategies for the packaging. The first one consists in the "headful" mechanism in which the assembled virion "loads" a determined amount of DNA, which could be self or bacterial DNA that has been chopped down by endonucleases. In this way, a percentage of the released virions would carry bacterial DNA and thus, the phage would act as a generalized transducing phage, since it could deliver different regions of bacterial DNA to a susceptible bacterial host with enough chromosomal homology to allow for genetic recombination. This useful tool has allowed the researcher to "move around" different alleles of a gene among strains (62, 99, 101), thus enabling the construction of strains bearing a combination of precisely defined mutant alleles. In consequence, through a new round of infection of a permissive host, the infective phage particles may lead to a swapping of gene alleles in the bacterial chromosome.

The second strategy occurs in phages that use a replication mechanism that produces subsequent multiple copies of their DNA in a single molecule ("concatemers"). The packaging mechanism is based on the recognition of a defined sequence in the amplified phage DNA which is present in each phage genome monomer. This sequence works as a "stop" signal and is associated with a nuclease that recognizes and cuts the DNA at the signal while packaging. That translates into the packaging of one genome of "self" DNA that fits into the head of the virion.

Perhaps, the most important of these two strategies for the geneticists and molecular biologists is the second one, since, due to the specificity of the nucleic acid packaging into the assembled phage capsid, a phage progeny may contain only phage DNA inside the virions, un-

less it is artificially manipulated or errors in the excision of the prophage take place.

Phage lambda, one of the most studied phages, has yielded large amount of information on the molecular biology of the process of virion assembly, as well as helped define the host's cellular components that are needed for a successful production of phage progeny. At the same time, the knowledge gained from the analysis of its genome organization and regulation of gene expression has allowed the use of lambda for three very advantageous applications:

1- the construction of genomic libraries into lambda derived vectors lacking non-essential genome sequences, thus capable of accommodating a few kbp of foreign DNA (22, 36, 111), and upon infection, the integration of the lambda derivative into a precise chromosomal spot of otherwise non-integrative cloning vectors, leading to the expression of cloned genes without gene dosage effect;

2- the construction of plasmid vectors containing the sequence coding for the lambda DNA packaging system (known as a "cos" site, and thus, by extension, the "cos" containing plasmid is dubbed a "cosmid") for cloning and packaging of large fragments of any chromosomal DNA (52, 53, 55, 56), and

3- the construction of an *in vitro* packaging kit with purified heads and tails for packaging "your favourite source of DNA" in a compatible form (such as cosmids containing an amount of DNA of any source with a size within the packaging range of the phage) (54, 57). Thus, genomic libraries of any organism could easily be made and amplified by infection of a suitable bacterial host for further studies.

As will be described below, these basic principles have been wisely extrapolated from the *E. coli* and lambda phage to mycobacteria by the work from G. Hatfull and W.R. Jacobs.

USING MYCOBACTERIOPHAGES TO BREAK OPEN THE MYCOBACTERIAL PANDORA BOX

Although phages able to infect mycobacteria were reported several years ago, they were mainly used for typification purposes (13, 23, 61) —except for the very early work by Y. Mizuguchi on lysogeny by mycobacteriophages, mostly only available in Japanese language— until Dr. Bill Jacobs and Dr. Graham Hatfull joined forces to tackle the genetic analysis of *M. tuberculosis*. By the early '90s, although the chemical composition of the lipid-rich cell envelope of this pathogen had been analyzed in detail, and there were several studies on the immunological and cell biology aspects of the infection, up to that moment there had been no means to genetically study the tubercle bacilli or any other mycobacteria. The lack of natural or chemically induced competence for transformation was one of the reasons for this road block. Jacobs and Hatfull assumed that—as has happened in other bac-

terial systems— phages may provide regulatory signals and genetic elements that could be used for vector design. Thus, they started to look for novel mycobacteriophages in the environment and, while embarking in a very fruitful "phage-hunting" program (81), they constructed cloning vectors containing promoters of mycobacteriophages L5 and D29 (80, 98). Those cloning vectors, which were rapidly adopted by the scientific community, constituted the first generation of vectors for genetic manipulation of mycobacteria, although suitable conditions for transformation through electroporation had to be developed for their widespread utilization (45, 97).

Temperature-sensitive derivatives of phage TM4, deficient in replication at high temperature, were also obtained, allowing the regulated delivery of transposons—carrying genes encoding for resistance to antibiotics—into the mycobacterial chromosome (12). In that way, random insertions which may cause auxotrophies could easily be obtained. Since the genetic sequence of the transposon is known, junction DNA sequences could be obtained with little difficulty leading to the identification of chromosomal position of the insertion site. Therefore, insertional mutants of *M. tuberculosis* H37Rv (a virulent lab strain) could be used for infection of susceptible animal models such as mice or even *in vitro* infection of macrophages, which is the usual niche for this pathogen. Thus, the place—and therefore the gene—in the genome where the transposon was inserted could be identified, allowing for the first studies focused on the impact of the loss of specific genes in the virulence of *M. tuberculosis* (58, 59, 92-94).

Through a highly defined PCR-based cloning system in a cosmid, Hatfull and Jacobs were also able to make precise deletions in any gene of the mycobacterial genome, provided that the sequence of adjacent DNA was known (11). That was the first time in which "custom-made" mutants were obtained in mycobacteria by using mycobacteriophages (although it was also accomplished at the same time by the utilization of suicide plasmids by Gicquel's group at the Institut Pasteur), thus opening the door for an exhaustive functional and structural protein analysis. Moreover, as mentioned above, mutants carrying specific gene deletions could be tested for their virulence attenuation, helping to pin down the genes involved in pathogenesis.

Thus, phages were not only a successful and handy tool-box for development of cloning vectors but also a scaffolding used for strain construction by means of transduction of chromosomal fragments. Unfortunately, that could only be achieved in the non-pathogenic saprophytic *M. smegmatis*, since so far no generalized transducing phage has been described for *M. tuberculosis*. From that point on, the knowledge gathered by the application of these novel phage-based technologies has been breathtaking, leading—among several other examples—to the understanding of the differences during the onset of the

infection between the pathogenic *M. tuberculosis* and the vaccine strain *M. bovis* var. BCG, the identification of most of the targets for currently used anti-tubercular drugs and epidemiological studies on the distribution of strains with different level of virulence (14, 39, 59, 109, 114).

As mentioned before, the quest for novel tools for genetic analysis led these researchers to a phage-hunting program that was used for undergraduate student mentorship in biological sciences (47). During that exciting period, 50 new phages were isolated, sequenced and characterized, giving copious amounts of information on gene organization and horizontal gene transfer in mycobacteria (37, 38, 46, 66, 67, 74, 82, 83). The genetic analysis of those newly isolated phages showed high diversity, but also a remarkable degree of mosaicism, product of illegitimate recombination (81). Hatfull *et al.* (46) recently reported a summary of the information obtained in the analysis of 37 of those 50 new mycobacteriophages, pointing out that all of them were double-stranded DNA phages, most of them belonged to the group of *Sipho-viridae* phages with long flexible non-contractile tails, while a few belonged to the group of the *Myoviridae* phages that contain contractile tails. Most of the mycobacteriophages showed isometric heads at the electron microscope, although some of them (e.g. Che9c, Corndog) exhibited large elongated heads. While lytic genetic cassettes (encoding for enzymes involved in "poking" holes in the bacterial cell membrane to help virion release) have been detected in the majority of the sequenced phages, integration components (*attP* sites and recombinases) are roughly present in half of them (46). A very interesting outcome of those studies is the detection of proteins involved in recombination, some of which are homologous to the well-known RecA bacterial protein. In a strikingly important and elegant approach, the Hatfull's group has recently developed a method based on recombinogenic enzymes from phage Che9, which might soon replace the specialized transduction method (104-107). The "recombineering" method avoids the costly *in vitro* cosmid packaging, thus it is much cheaper and will soon become the preferred method for creating specific deletions in the mycobacterial chromosome.

Although more studies are needed, it is clear that phages are a treasure chest, which will be providing a large number of genetic elements for mycobacteria manipulation for a long time.

MYCOBACTERIOPHAGES AS DIAGNOSTIC TOOLS

Pioneering work by Hugo David in the early '80s showed that phage D29 was able to infect *M. tuberculosis* as well as *M. smegmatis*, but not *M. avium* (26). During the characterization of its infective cycle, Dr. David wisely foresaw the possible application of that phage for the assessment of drug resistance in clinical isolates of

M. tuberculosis (25). The principle was that aliquots of *M. tuberculosis* cultures from clinical isolates treated with anti-tubercular drugs blocking macromolecular synthesis [such as streptomycin (STR) and rifampicin (RIF)], would not allow for the replication of added D29 phages, unless the clinical isolate was resistant to that drug. Thus, by performing a simple phage amplification assay on bacilli cells treated with drugs or left untreated, one could distinguish between drug-susceptible and drug-resistant *M. tuberculosis* isolates (see Figure 1 for a scheme). Therefore, phage amplification would quickly be visualized by a second round of infection of the fast-growing *M. smegmatis*, thus reducing the time-around to inform drug susceptibility from 45-60 days, by conventional bacteriological means, to four days. For this approach to be consistent, the fraction of added phages not adsorbing to the tubercle bacilli had to be eliminated to avoid false positives, since these phages would also give lysis on *M. smegmatis*. The problem was solved by Mc Nerney *et al.* (73), who found a chemical compound (ferrous ammonium sulphate) that would eliminate unabsorbed virions, so that only phages finding viable *M. tuberculosis* cells would be able to yield phage progeny because their internalization would protect them from the chemical "virucide". Further studies by McNerney *et al.* (70, 71), Wilson *et al.* (112) and Elthringham *et al.* (33) laid the foundation for the use of D29 for drug susceptibility determination in *M. tuberculosis* isolates. Thus, a novel method based on mycobacteriophages was available for the test.

On the other side, Jacobs and collaborators continued their development of phage derivatives aiming at *M. tuberculosis* detection as well as drug susceptibility testing, but instead of using the lytic D29 phage, they preferred to use a genetically modified derivative of the tem-

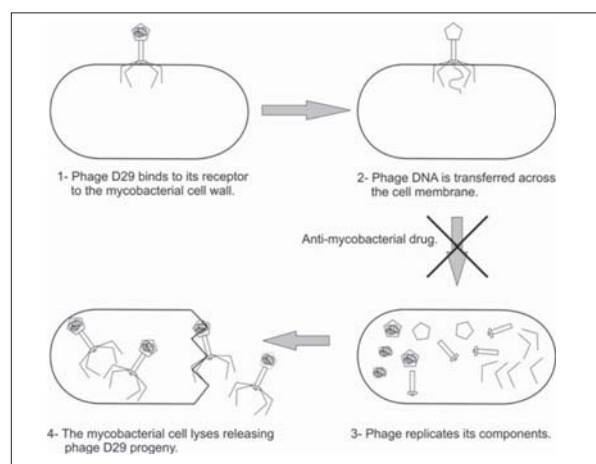


Figure 1. Basis of the D29-based assay. The scheme shows adsorption of the phage particle, injection of phage DNA into the mycobacterial cell and phage replication. Treatment of a drug-susceptible *M. tuberculosis* clinical isolate with appropriate drugs will kill the bacilli, thus inhibiting the phage replication. On the contrary, a drug-resistant *M. tuberculosis* clinical isolate would survive allowing the phage replication.

perate mycobacteriophage TM4 that had previously been isolated from a *M. avium* strain. In a very elegant approach, these researchers cloned the firefly luciferase (*lux*) gene in a dispensable region of the TM4 and L5 (60, 80, 88, 89, 91). Luciferase is an enzyme responsible for converting the enzyme substrate luciferin into a derivative with subsequent light emission. This reaction, when performed *in vitro*, requires the addition of ATP, but this technology would only work in whole cells (since ATP cannot enter the cell) if the mycobacterial cell is viable and therefore synthesizes its own ATP. In consequence, "light emission" was equivalent to viable *M. tuberculosis* cells and the strategy of treatment with anti-mycobacterial drugs was still appropriate. Since the protocol called for determination of the emitted light, and therefore, the placement of a luminometer inside a biosafety cabinet would be required, the Jacobs' group went one step further by developing the "Bronx Box", a closed system based on 96 well microtiter plates on top of which a Polaroid film system was assembled (6, 7, 10). Each well would contain aliquots of *M. tuberculosis* cultures with the addition of different drugs and a Polaroid film would be exposed during the incubation of the device (manipulation of the Bronx Box had to be performed in a biosafety cabinet). In that way, light emission could be detected from the wells where productive infection of viable bacilli took place.

In spite of the very solid conceptual development, and the possibility of signal amplification through electronic devices and image manipulation, the TM4-based method was only tested by the group that developed it, although with good results for drug resistance determination (turn-around time 2 days, sensitivity for detection of resistance to RIF and INH 100%) (6-8, 10, 48).

Some of the reasons for the preference of the D29-based method as opposite to the TM4-based one are the following: a- D29 kills bacilli, rendering the sample safe from a biosafety point of view; b- no addition of a substrate is needed since there is no reporter gene and; c- there is no need for costly equipment. Perhaps, these reasons explain in part the preference of D29 in several laboratories and multi-centric tests, as will be discussed in the next section.

PCR-BASED METHODS FOR DETECTION OF *M. TUBERCULOSIS* AND DRUG RESISTANCE ANALYSIS

Tuberculosis is perhaps one of the very few situations at a microbiology lab when the utilization of PCR-based methods does not solve the question of the presence of a viable microorganism causing disease, as well as its drug susceptibility. Since the "culprit" of the disease has to be isolated from microbiological media and, at least a month is required to produce visible colonies on solid bacteriological media (that are needed to subsequently perform drug susceptibility testing using the gold standard

method), there is an urge for a quicker way to detect viable bacilli to confirm a positive detection of mycobacterial DNA by PCR. In addition, specificity issues were a concern at the early stages of the use of molecular biology methods, because PCR is capable of detecting few copies of a target nucleic acid, but extreme care has to be taken to avoid false positives due to the presence of DNA from environmental non-pathogenic mycobacteria to which we are constantly exposed. Even when the information gathered in the last ten years of research allowed for the identification of sequences only present in *M. tuberculosis* (14), by using a PCR-based method, we may only say that the cause of sickness is very likely to be that pathogen, especially if clinical symptoms are compatible with tuberculosis. Thus, the utilization of a PCR-based method for direct detection of *M. tuberculosis* in sputum is an unsettled controversy due to the number of different in-house protocols used and the variable results published. In spite of that the method may safely be used to confirm that a primary isolate is of *M. tuberculosis* and not of a non-tuberculous mycobacteria (NTM) by using well-established gene markers such as IS6110 (15, 30, 49, 69, 84, 85).

In spite of that, according to a recent meta-analysis, in-house PCR-based methods has limited value for the diagnosis of pulmonary tuberculosis (42), although they keep their potential for extra-pulmonary cases where bacillary counts are very low but the sample is less toxic to PCR protocols. Cerebral spinal or pleural fluids are two of such cases, as both pleural tuberculosis and tuberculous meningitis are extremely dangerous situations where a rapid diagnostic improves the chances of saving the patient's life (15, 86).

Although it is beyond the scope of this review, we should briefly address the issue of drug resistance mechanisms in mycobacteria. This field has been one of the most benefited by the number of advances in genetic analysis. So far, the mechanisms of action and of resistance to common anti-bacterial drugs, such as rifampicin (RIF) and streptomycin (STR), that are also used for the treatment of tuberculosis have also been determined in mycobacteria. Similar studies were conducted leading to an understanding of the novel mechanisms of action of drugs specifically active against mycobacteria. Surprisingly, most of the currently used anti-tubercular drugs are in reality pro-drugs that need to be activated to produce the inhibitory effect (31, 110). That is the case for isoniazid (INH) and the related molecule ethionamide (ETH), as well as for thiacetazone (TAC), isoxyl (ISO) and pyrazinamide (PZA). Therefore, we may think of at least three factors leading to resistance to those drugs: loss of the activating protein, mutations in the target for the active molecule and efflux mechanisms that pump out pro-drugs (29, 31, 34, 75, 108, 110, 114). In spite of the great deal of research, there are several reports of clinical strains with resistance phenotypes, for which no mutations were

detected in the genes, known to be implicated in the action of the drug. As an example, there are reports of *M. tuberculosis* INH-resistant strains for which no mutation has been found in any one of the four known genes involved in the INH-resistance phenotype. Thus, it would be a daunting task to use a PCR protocol to determine whether a clinical strain is susceptible or not to a drug because of the considerations mentioned above. As a result, when performing the detection of mutant alleles linked to drug resistance, a negative PCR must not be interpreted as lacking a resistant phenotype, so therefore, the fundamental question of drug resistance evaluation still requires a better method. If we think of performing the analysis directly on the sample (which, in most cases is sputum, since pulmonary tuberculosis is the most frequent form observed) we have to consider that, besides the mentioned facts, PCR is also known for its vulnerability to inhibitors of different nature present in the clinical sample. Since sputum is not sterile and contains a large amount of cell debris, proteases, and various other macromolecules, the inhibition of the PCR reaction is a very possible outcome (21, 102). Thus, in spite of its versatility and sensitivity, PCR may not be a good method for the determination of drug resistance in *M. tuberculosis*, taking into consideration the problems inherent to the nature of the biological sample and the large number of genes involved in resistance to some of the currently used anti-tubercular drugs. However, as novel methods are being developed and tested, a way to overcome these problems may be feasible.

TESTING OF D29-BASED METHODS IN LATIN AMERICAN CLINICAL SETTINGS

It did not take too long from the development of the D29-based method to implementing its testing in a number of mycobacteriology reference laboratories in Latin America, thanks to the help provided by Dr. Juan Carlos Palomino and Dr. Ruth McNerney (at the Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium and the London School of Hygiene & Tropical Medicine, Keppel Street, London, U.K., respectively), the driving force for that project. Both researchers were confident of the performance of this very fast and cheap method in our local medium- or low-resource clinical settings. It was already a well-known fact that a large fraction of RIF-resistant clinical isolates would also be resistant to INH as well (43). These two anti-tubercular drugs are the most important ones in the therapeutic scheme usually employed in our countries, being maintained during the two phases of the treatment. Therefore, resistance to one or both drugs would seriously compromise the treatment outcome and the patient recovery. The fast detection of clinical isolates bearing mutations causing RIF and INH resistance would, then, be of utmost importance.

With these needs in mind, several laboratories tested the D29-base method to determine the status of RIF resistance in *M. tuberculosis* clinical isolates. The published results compared the performance of the D29 method (also called PhaB, Phage Amplified Biologically Assay) against the gold standard method (bacteriological culture in Lowenstein Jensen medium -also known as Proportion Method, PM), as well as against two other rapid methods, the REMA [Resazurin Micromethod Assay, (78)] and the BacTec or MGIT systems (90). The results reported in those publications showed that PhaB and REMA could be used to shorten the turn-around time, with good sensitivity and specificity but being much cheaper than costly methods such as the BacTec and MGIT (1, 5, 19, 24, 72, 113).

The PhaB method has been used in several countries (5, 18, 19, 64) and has also been the subject of two meta-analysis highlighting the interest of the researchers on this method (63, 76, 77). In our country, the team led by Dr. L. Barrera (INEI-ANLIS Instituto Nacional de Microbiología "Dr. Carlos G. Malbrán") pioneered the use of D29 for the determination of RIF resistance with great success (95). Unfortunately, most of the published tests were performed with the focus on the analysis of RIF resistance and, only in very few cases on INH or STR resistance. Thus, our laboratory assayed PhaB to analyze RIF, INH and STR resistance (28); and more recently fluoroquinolone resistance (FQs). Our results agreed with previous publications highlighting the relative simplicity, low cost and biological safety of this method. While drug susceptibility testing by the gold standard method (PM) starting from primary cultures, takes 28-42 days in Lowenstein-Jensen culture medium and 21 days in 7H11 medium (results may be obtained within 7-12 days when vital dyes are used), PhaB results can be obtained at 48, 72, and 96 h, respectively, when susceptibility to RIF, STR and INH is assayed. The sensitivity and specificity of the method (with a 95% confidence interval) were as follows: PhaB-RIF 97.7% (86.2-99.9), 100% (84-100); PhaB-INH 93.61% (81.43-98.33), 100% (81.50-100); and PhaB-STR 96% (85.14-99.30), 100% (97.07-100). Thus, these results are quite encouraging and show that PhaB may be used for drug susceptibility analysis in clinical isolates of *M. tuberculosis*. Some of our results are shown in Figure 2. Unfortunately, our results suggest that PhaB may not be a good choice to assess FQs resistance, since the time required to obtain a reliable result without major modifications of the protocol was comparable to that obtained when using REMA (seven days). Therefore, for the purpose mentioned and under its current protocol, PhaB offers no advantage when compared to REMA (Stella E.J., personal communication).

Although PhaB is not a validated method and therefore, cannot be informed to the treating Infectious Disease fellow, it would be reasonable to expect a worldwide multicentric study for its validation on the basis of

the extraordinary time reduction, from the 30-45 days required for conventional microbiological technique to the two to four days mentioned above.

PHAGE-BASED METHODS: WEAKNESSES TO ADDRESS

In spite of the obvious advance in the determination of drug susceptibility of clinical strains of *M. tuberculosis* produced by the development of methods based on the utilization of simple reagents such as mycobacteriophages, there is an unfulfilled promise in those methods, which is their ability to detect viable tubercle bacilli directly in clinical samples. A commercial kit based on D29 has been tested but the results were not as satisfactory as should be expected from a commercial source, including false positives and not interpretable results (2-4, 96, 100). Fortunately, the study of sputum smears by optical microscopy is still the best choice for detection of tubercle bacilli directly in the sample. A simple and cheap stain (acid-fast or Ziehl Neelsen stain) that takes advantage of the uniqueness of the lipid-rich composition of mycobacteria, will clearly reveal its presence in sputum. This method is limited by the number of bacilli present in the sample, having a sensitivity of 10^4 bacilli/ml of sputum. All samples with no microscopically detectable bacilli may require bacteriological confirmation, especially if the clinical symptoms are suggestive of pulmonary tuberculosis. Those samples that have detectable numbers of *M. tuberculosis* will require the evaluation of the drug resistance status, a practice indicated when that patient has risk factors (such as previous treatment, contact with confirmed tuberculosis cases, or time in institutions such as prisons or mental health facilities). At this point, we face again the same problem: the need for a rapid method that will not require the 30 days needed to obtain the primary culture and the 30 - 45 days required to perform the anti-tubercular drug testing. As we have described, PhaB can be effective for the determination of drug susceptibility in primary cultures, but why is that it does not work in direct samples? A very likely explanation resides in the chemical and biological complexity of sputum: in that biological fluid, a matrix of high molecular weight glycoproteins traps the tubercle bacilli in the sputum (27, 44, 103); along with the bacilli, other bacteria from the upper respiratory tract and mouth, as well as intact and lysed cells from the host respiratory tract are present. To add complexity to this scenario, lysed cells provide large amount of proteins, carbohydrates and enzymes that may be harmful to the phage, such as proteases, and other macromolecules as glycoproteins, that may interfere with phage adsorption to mycobacteria. Thus, it is extremely unlikely that a phage particle would be able to find its prey within this matrix while avoiding both the chemical and enzymatic "insults" from the materials in the sample.

A PhaB based protocol developed by Park *et al.* (79) was tested in mock samples (sputum samples from healthy volunteer donors to which known quantities of *M. bovis* var BCG had been added). According to their published results, it was capable of detecting 10^3 - 10^4 CFU/ml of sputum, which is about the same sensitivity demonstrated by optical microscopy. Unfortunately, our lab could not reproduce those good results in several attempts using the Park's protocol. Moreover, to the best of our knowledge, the protocol had not been tested in any other laboratory. Notwithstanding those facts, phage-based methods would be usable in direct samples if the rheological features of the sample could be adequately modified, a task that our group is currently engaged in.

MYCOBACTERIOPHAGES "MADE IN ARGENTINA": ADDING ANOTHER BRICK TO THE WALL

Due to the simple techniques required for phage isolation, that make phage biology an attractive subject for undergraduate work, we have started our own "phage-hunting" program, with the goal of isolating phages, sequencing their genomes and utilizing them as tools to study mycobacterial cell envelope organization. By using the saprophytic fast growing *M. smegmatis* as a host, we searched for phages in soil samples from different geographic places in Argentina. As a result, we isolated 17 mycobacteriophages, five of which were characterized as temperate ones. We performed Transmission Electronic Microscopy (TEM), which allowed us to analyze the structural features of the virions; as expected, a large variety of head morphologies and tail lengths was found. As an example, TEM of two phages, D29 (used in the PhaB assay) and F (isolated in our laboratory) are shown in Figure 3. The genome sequencing of the newly isolated temperate mycobacteriophages will allow us to develop our own series of integrative cloning vectors which will increase the already available variety of vectors of this type, since chances are that their chromosomal integration sites will be different from those already reported.

One of the most rewarding aspects of our current research in the field of mycobacteriophages has been the isolation of phage resistant *M. smegmatis* mutants with alterations in the cell envelope composition, as evidenced by changes in colony morphology, sliding motility and biofilm formation. To this end, a combination of simple techniques and culture media were used; i.e. the addition of the Congo Red dye to rich medium plates allowed us to detect morphology alterations as well as changes in the intensity of the color of the colony, due to the increase in the amount of bound dye which preferentially binds glycolipids (results from one of these phages are shown in Figure 4). Thus, by using simple techniques, we are able to start studying complex biological features of mycobacteria, such as cell envelope composition with the ulti-

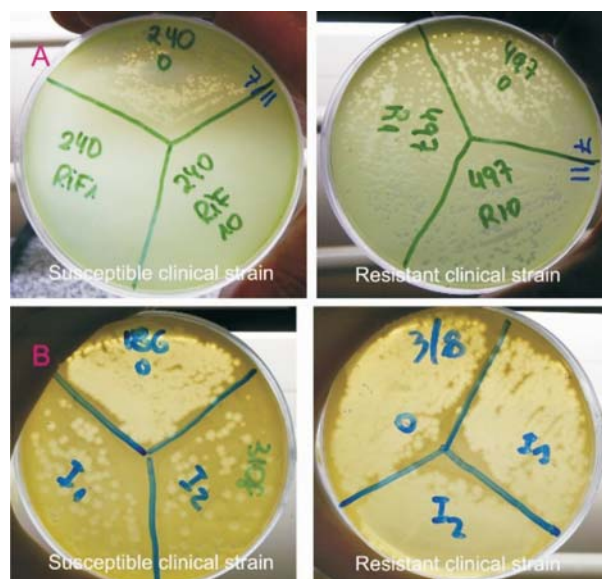


Figure 2. After the phage addition and an adequate incubation time, an aliquot of the mixture of mycobacteria and phage is plated on top of indicator plates containing a lawn of *M. smegmatis* cells. Lysis of indicator cells is easily scored after 24 h of incubation. Panel A: left, RIF-susceptible strain; right, RIF-resistant strain. Panel B: left, INH-susceptible strain; right, INH-resistant strain. Drug concentrations marked on the plate surfaces are as follows: RIF, 0, 1 and 10 µg/ml; INH, 0, 1 and 2 µg/ml.

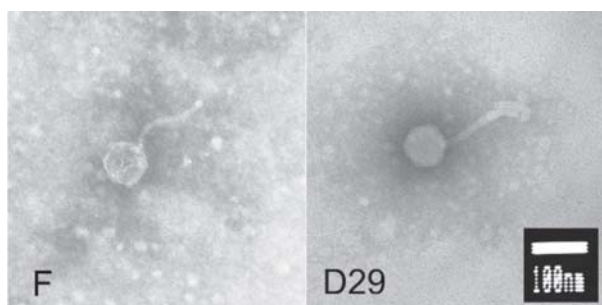


Figure 3. Transmission Electron Microscopy. Samples were analyzed in a Jeol 1200 EX II Electron Microscope at 85KiloVolts, with a magnification of 50,000X.

mate goal of identifying mycobacteriophage receptor(s), a research field for which information is extremely scarce.

In conclusion, by “bursting into” the molecular biology field of mycobacteria, mycobacteriophages have reached the status of powerful allies to both researchers and clinical microbiologists. There is little doubt that their ensuing application will allow the genetic analysis of mycobacteria towards the ultimate goal of unveiling the intimacies of the host-pathogen interaction, which will in turn help to design novel anti-mycobacterial drugs and better vaccines.

Acknowledgements: Experimental work carried in the laboratory and described in this review was supported by grants from Sustainable Science Institute (USA) and Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional de Rosario to HRM; and fellowships to All through a Fogarty International Center/NIH

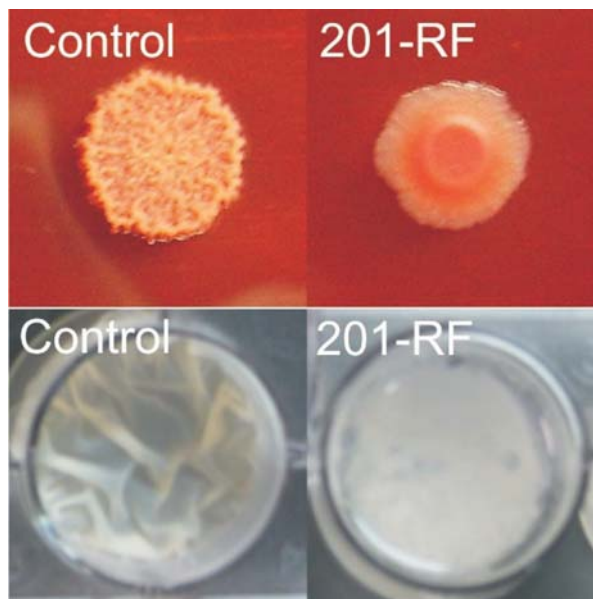


Figure 4. Impact of a phage resistance phenotype on *M. smegmatis* cell envelope. Upper panel, Congo Red medium; lower panel, biofilm formation. Left panels, *M. smegmatis* strain mc²155 (parental strain); right panels, mutant resistant to phage F.

grant, AIDS International Training and Research Program (Grant #5D43 TW0010137), and Fogarty International Programme. EJS is a Fellow from CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina). HRM is an independent researcher from the Research Council of the Universidad Nacional de Rosario (CIUNR).

REFERENCES

1. Albay A, Kisa O, Baylan O, Doganci L. The evaluation of FASTPlaqueTB test for the rapid diagnosis of tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 211-5.
2. Albert H, Muzaffar R, Mole RJ, Trollip AP. Use of the FASTPlaque test for TB diagnosis in low-income countries. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6: 1130-1.
3. Albert H, Trollip A, Seaman T, Mole RJ. Simple, phage-based (FASTPlaque) technology to determine rifampicin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 1114-9.
4. Albert H, Trollip AP, Seaman T, Abrahams C, Mole RJ, Jordaan A, *et al.* Evaluation of a rapid screening test for rifampicin resistance in re-treatment tuberculosis patients in the Eastern Cape. *S Afr Med J* 2007; 97: 858-63.
5. Alcaide F, Gali N, Dominguez J, Berlanga P, Blanco S, Orus P, *et al.* Usefulness of a new mycobacteriophage-based technique for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2867-71.
6. Banaiee N, Bobadilla-del-Valle M, Bardarov S Jr, Riska PF, Small PM, Ponce-de-Leon A, *et al.* Luciferase reporter mycobacteriophages for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3883-8.
7. Banaiee N, Bobadilla-del-Valle M, Riska PF, Bardarov S Jr, Small PM, Ponce-de-Leon A, *et al.* Rapid identification and susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from

- MGIT cultures with luciferase reporter mycobacteriophages. *J Med Microbiol* 2003; 52: 557-61.
8. Banaiee N, January V, Barthus C, Lambrick M, Roditi D, Behr MA, *et al.* Evaluation of a semi-automated reporter phage assay for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in South Africa. *Tuberculosis (Edinb)* 2008; 88: 64-8.
 9. Banks DJ, Beres SB, Musser JM. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. *Trends Microbiol* 2002; 10: 515-21.
 10. Bardarov S Jr, Dou H, Eisenach K, Banaiee N, Ya S, Chan J, *et al.* Detection and drug-susceptibility testing of *M. tuberculosis* from sputum samples using luciferase reporter phage: comparison with the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 53-61.
 11. Bardarov S, Bardarov S Jr, Pavelka JM Jr, Sambandamurthy V, Larsen M, Tufariello J, *et al.* Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology* 2002; 148: 3007-17.
 12. Bardarov S, Kriakov J, Carriere C, Yu S, Vaamonde C, McAdam RA, *et al.* Conditionally replicating mycobacteriophages: a system for transposon delivery to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10961-6.
 13. Bates JH, Stead WW, Rado TA. Phage type of tubercle bacilli isolated from patients with two or more sites of organ involvement. *Am Rev Respir Dis* 1976; 114: 353-8.
 14. Behr MA, Mostowy S. Molecular tools for typing and branding the tubercle bacillus. *Curr Mol Med* 2007; 7: 309-17.
 15. Bonington A, Strang JI, Klapper PE, Hood SV, Parish A, Swift PJ, *et al.* TB PCR in the early diagnosis of tuberculous meningitis: evaluation of the Roche semi-automated COBAS AmpliCor MTB test with reference to the manual Amplicor MTB PCR test. *Tuber Lung Dis* 2000; 80: 191-6.
 16. Brussow H. Phages of dairy bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 283-303.
 17. Brussow H, Hendrix RW. Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 2002; 108: 13-6.
 18. Butt T, Ahmad RN, Kazmi SY, Mahmood A. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by mycobacteriophage assay. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 899-902.
 19. Chauca JA, Palomino JC, Guerra H. Evaluation of rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage D29-based assay. *J Med Microbiol* 2007; 56: 360-4.
 20. Cheetham BF, Katz ME. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol Microbiol* 1995; 18: 201-8.
 21. Chin DP, Yajko DM, Hadley WK, Sanders CA, Nassos PS, Madej JJ, *et al.* Clinical utility of a commercial test based on the polymerase chain reaction for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1872-7.
 22. Christensen AC. Bacteriophage lambda-based expression vectors. *Mol Biotechnol* 2001; 17: 219-24.
 23. Crawford JT, Bates JH. Phage typing of the *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* complex. A study of strains of diverse geographic and host origin. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 386-9.
 24. da Silva PA, Boffo MM de MI, Silva AB, Palomino JC, Martin A, *et al.* Comparison of redox and D29 phage methods for detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 293-6.
 25. David HL, Clavel S, Clement F, Moniz-Pereira J. Effects of antituberculosis and antileprosy drugs on mycobacteriophage D29 growth. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18: 357-9.
 26. David HL, Seres-Clavel S, Clement F, Rastogi N. Further observations on the mycobacteriophage D29-mycobacterial interactions. *Acta Leprol* 1984; 2: 359-67.
 27. Davies JR, Carlstedt I. Isolation of large gel-forming mucins. *Methods Mol Biol* 2000; 125: 3-13.
 28. de la Iglesia AI, Stella EJ, Morbidoni HR. Comparison of the performances of two in-house rapid methods for antitubercular drug susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 808-10.
 29. DeBarber AE, Mdululi K, Bosman M, Bekker LG, Barry CE, III. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9677-82.
 30. Del Portillo P, Thomas MC, Martinez E, Maranon C, Valla-dares B, Patarroyo ME, *et al.* Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 324-8.
 31. Dover LG, Alahari A, Gratraud P, Gomes JM, Bhowruth V, Reynolds RC, *et al.* EthA, a common activator of thio-carbamide-containing drugs acting on different mycobacterial targets. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1055-63.
 32. Dye C, Maher D, Weil D, Espinal M, Raviglione M. Targets for global tuberculosis control. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 460-2.
 33. Eltringham IJ, Wilson SM, Drobniewski FA. Evaluation of a bacteriophage-based assay (phage amplified biologically assay) as a rapid screen for resistance to isoniazid, ethambutol, streptomycin, pyrazinamide, and ciprofloxacin among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3528-32.
 34. Escribano I, Rodriguez JC, Llorca B, Garcia-Pachon E, Ruiz M, Royo G. Importance of the efflux pump systems in the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to fluoroquinolones and linezolid. *Chemotherapy* 2007; 53: 397-401.
 35. Espinal M, Raviglione MC. From threat to reality: the real face of multidrug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 216-7.
 36. Ferrari E, Henner DJ, Hoch JA. Isolation of *Bacillus subtilis* genes from a charon 4A library. *J Bacteriol* 1981; 146: 430-2.
 37. Fullner KJ, Hatfull GF. Mycobacteriophage L5 infection of *Mycobacterium bovis* BCG: implications for phage genetics in the slow-growing mycobacteria. *Mol Microbiol* 1997; 26: 755-66.
 38. Ghosh P, Kim AI, Hatfull GF. The orientation of mycobacteriophage Bxb1 integration is solely dependent on the central dinucleotide of *attP* and *attB*. *Mol Cell* 2003; 12: 1101-11.
 39. Glickman MS, Cox JS, Jacobs WR Jr. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell* 2000; 5: 717-27.
 40. TB. A global emergency, WHO, July 1994. *Lepr Rev* 1995; 66: 270-1.
 41. Grange JM, Zumla A. The global emergency of tuberculosis: what is the cause? *J R Soc Health* 2002; 122: 78-81.
 42. Greco S, Rulli M, Girardi E, Piersimoni C, Saltini C. Diagnostic accuracy of in-house PCR for smear-positive pulmonary tuberculosis: meta-analysis and meta-regression. *J Clin Microbiol* 2009, Jan 14. (Published ahead of print).
 43. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO Geneva/IUATLD Paris. International Union against Tuberculosis and Lung Disease. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 72-89.
 44. Hakansson A, Carlstedt I, Davies J, Mossberg AK, Sabharwal H, Svanborg C. Aspects on the interaction of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* with human respiratory tract mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: S187-91.

45. Hatfull GF. Genetic transformation of mycobacteria. Trends Microbiol 1993; 1: 310-4.
46. Hatfull GF, Cresawn SG, Hendrix RW. Comparative genomics of the mycobacteriophages: insights into bacteriophage evolution. Res Microbiol 2008; 159: 332-9.
47. Hatfull GF, Pedulla ML, Jacobs-Sera D, Cichon PM, Foley A, Ford ME, *et al.* Exploring the mycobacteriophage metaproteome: phage genomics as an educational platform. PLoS Genet 2006; 2: e92.
48. Hazbon MH, Guarín N, Ferro BE, Rodríguez AL, Labrada LA, Tovar R, *et al.* Photographic and luminometric detection of luciferase reporter phages for drug susceptibility testing of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol 2003; 41: 4865-9.
49. Hellyer TJ, Desjardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD, Eisenach KD. Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 1996; 34: 2843-6.
50. Hendrix RW. Bacteriophages: evolution of the majority. Theor Popul Biol 2002; 61: 471-80.
51. Hendrix RW, Lawrence JG, Hatfull GF, Casjens S. The origins and ongoing evolution of viruses. Trends Microbiol 2000; 8: 504-8.
52. Hohn B. DNA sequences necessary for packaging of bacteriophage lambda DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 7456-60.
53. Hohn B. DNA as substrate for packaging into bacteriophage lambda, *in vitro*. J Mol Biol 1975; 98: 93-106.
54. Hohn B. *In vitro* packaging of lambda and cosmid DNA. Methods Enzymol 1979; 68: 299-309.
55. Hohn B, Collins J. A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. Gene 1980; 11: 291-8.
56. Hohn B, Koulikova-Nicola Z, Lindenmaier W, Collins J. Cosmids. Biotechnology 1988; 10: 113-27.
57. Hohn B, Murray K. Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 3259-63.
58. Hondalus MK, Bardarov S, Russell R, Chan J, Jacobs WR Jr, Bloom BR. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 2000; 68: 2888-98.
59. Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM, *et al.* The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 12420-5.
60. Jacobs WR Jr, Barletta RG, Udani R, Chan J, Kalkut G, Sosne G, *et al.* Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. Science 1993; 260: 819-22.
61. Jimenez-Misas CA, Valdivia Alvarez JA. Distribution of phagetype patterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Cuba (1987-1991). Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89: 137-8.
62. Kaiser D, Dworkin M. Gene transfer to mycobacterium by *Escherichia coli* phage P1. Science 1975; 187: 653-4.
63. Kalantri S, Pai M, Pascopella L, Riley L, Reingold A. Bacteriophage-based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis 2005; 5: 59.
64. Kisa O, Albay A, Bedir O, Baylan O, Doganci L. Evaluation of FASTPlaqueTB-RIF for determination of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. Int J Tuberc Lung Dis 2003; 7: 284-8.
65. Kumaresan J, Heitkamp P, Smith I, Billo N. Global partnership to stop TB: a model of an effective public health partnership. Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8: 120-9.
66. Lee MH, Pascopella L, Jacobs WR Jr, Hatfull GF. Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guerin. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 3111-5.
67. Lee S, Kriakov J, Vilcheze C, Dai Z, Hatfull GF, Jacobs WR Jr. Bx21, a new generalized transducing phage for mycobacteria. FEMS Microbiol Lett 2004; 241: 271-6.
68. Maher D, Dye C, Floyd K, Pantoja A, Lonnroth K, Reid A, *et al.* Planning to improve global health: the next decade of tuberculosis control. Bull World Health Organ 2007; 85: 341-7.
69. Marei AM, El-Beheidy EM, Mohtady HA, Afify AF. Evaluation of a rapid bacteriophage-based method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Med Microbiol 2003; 52: 331-5.
70. McNerney R, Kambashi BS, Kinkese J, Tembwe R, Godfrey-Faussett P. Development of a bacteriophage phage replication assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 2004; 42: 2115-20.
71. McNerney R, Kiepiela P, Bishop KS, Nye PM, Stoker NG. Rapid screening of *Mycobacterium tuberculosis* for susceptibility to rifampicin and streptomycin. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4: 69-75.
72. McNerney R, Mallard K, Urassa HM, Lemma E, Donoghue HD. Colorimetric phage-based assay for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2007; 45: 1330-2.
73. McNerney R, Wilson SM, Sidhu AM, Harley VS, al-Suwaidi Z, Nye PM, *et al.* Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as a tool for the detection of viable *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis*. Res Microbiol 1998; 149: 487-95.
74. Mediavilla J, Jain S, Kriakov J, Ford ME, Duda RL, Jacobs WR Jr, *et al.* Genome organization and characterization of mycobacteriophage Bxb1. Mol Microbiol 2000; 38: 955-70.
75. Milano A, Pasca MR, Provvedi R, Lucarelli AP, Manina G, Ribeiro AL, *et al.* Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system. Tuberculosis (Edinb) 2009; 89: 84-90.
76. Pai M, Kalantri S, Pascopella L, Riley LW, Reingold AL. Bacteriophage-based assays for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a meta-analysis. J Infect 2005; 51: 175-87.
77. Pai M, Kalantri SP. Bacteriophage-based tests for tuberculosis. Indian J Med Microbiol 2005; 23: 149-50.
78. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2720-2.
79. Park DJ, Drobniewski FA, Meyer A, Wilson SM. Use of a phage-based assay for phenotypic detection of mycobacteria directly from sputum. J Clin Microbiol 2003; 41: 680-8.
80. Pearson RE, Jurgensen S, Sarkis GJ, Hatfull GF, Jacobs WR Jr. Construction of D29 shuttle plasmids and luciferase reporter phages for detection of mycobacteria. Gene 1996; 183: 129-36.
81. Pedulla ML, Ford ME, Houtz JM, Karthikeyan T, Wadsworth C, Lewis JA *et al.* Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. Cell 2003; 113: 171-82.
82. Pham TT, Jacobs-Sera D, Pedulla ML, Hendrix RW, Hatfull GF. Comparative genomic analysis of mycobacteriophage Tweety: evolutionary insights and construction of compatible site-specific integration vectors for mycobacteria. Microbiology 2007; 153: 2711-23.
83. Piuri M, Hatfull GF. A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells. Mol Microbiol 2006; 62: 1569-85.
84. Plikaytis BB, Eisenach KD, Crawford JT, Shinnick TM. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobac-*

- terium bovis* BCG by a polymerase chain reaction assay. Mol Cell Probes 1991; 5: 215-9.
85. Querol JM, Farga MA, Granda D, Gimeno C, Garcia-de-Lomas J. The utility of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Chest 1995; 107: 1631-5.
 86. Rafi W, Venkataswamy MM, Ravi V, Chandramuki A. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis: a comparative evaluation of in-house PCR assays involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, MPB-64 and 65 kDa antigen. J Neurol Sci 2007; 252: 163-8.
 87. Raviglione MC. The TB epidemic from 1992 to 2002. Tuberculosis (Edinb) 2003; 83: 4-14.
 88. Riska PF, Jacobs WR Jr, Bloom BR, McKittrick J, Chan J. Specific identification of *Mycobacterium tuberculosis* with the luciferase reporter mycobacteriophage: use of p-nitro-alpha-acetylamino-beta-hydroxy propiophenone. J Clin Microbiol 1997; 35: 3225-31.
 89. Riska PF, Su Y, Bardarov S, Freundlich L, Sarkis G, Hatfull G, *et al.* Rapid film-based determination of antibiotic susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a luciferase reporter phage and the Bronx Box. J Clin Microbiol 1999; 37: 1144-9.
 90. Rusch-Gerdes S, Pfyffer GE, Casal M, Chadwick M, Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials. J Clin Microbiol 2006; 44: 688-92.
 91. Sarkis GJ, Jacobs WR Jr, Hatfull GF. L5 luciferase reporter mycobacteriophages: a sensitive tool for the detection and assay of live mycobacteria. Mol Microbiol 1995; 15: 1055-67.
 92. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 12712-7.
 93. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. Mol Microbiol 2003; 48: 77-84.
 94. Sassetti CM, Rubin EJ. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 12989-94.
 95. Simboli N, Takiff H, McNerney R, Lopez B, Martin A, Palomino JC, *et al.* In-house phage amplification assay is a sound alternative for detecting rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in low-resource settings. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 425-7.
 96. Singh S, Saluja TP, Kaur M, Khilnani GC. Comparative evaluation of FASTPlaque assay with PCR and other conventional *in vitro* diagnostic methods for the early detection of pulmonary tuberculosis. J Clin Lab Anal 2008; 22: 367-74.
 97. Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, Jacobs WR Jr. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol 1990; 4: 1911-9.
 98. Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, *et al.* New use of BCG for recombinant vaccines. Nature 1991 6; 351: 456-60.
 99. Takano T, Ikeda S. Phage P1 carrying kanamycin resistance gene of R factor. Virology 1976; 70: 198-200.
 100. Takiff H, Heifets L. In search of rapid diagnosis and drug-resistance detection tools: is the FASTPlaqueTB test the answer? Int J Tuberc Lung Dis 2002; 6: 560-1.
 101. Thierauf A, Pérez G, Maloy AS. Generalized transduction. Methods Mol Biol 2009; 501: 267-86.
 102. Thomsen VO, Kok-Jensen A, Buser M, Philippi-Schulz S, Burkardt HJ. Monitoring treatment of patients with pulmonary tuberculosis: can PCR be applied? J Clin Microbiol 1999; 37: 3601-7.
 103. Thornton DJ, Davies JR, Kraayenbrink M, Richardson PS, Sheehan JK, Carlstedt I. Mucus glycoproteins from "normal" human tracheobronchial secretion. Biochem J 1990; 265: 179-86.
 104. van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Methods 2007; 4: 147-52.
 105. van Kessel JC, Hatfull GF. Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets. Mol Microbiol 2008; 67: 1094-107.
 106. van Kessel JC, Hatfull GF. Mycobacterial recombineering. Methods Mol Biol 2008; 435: 203-15.
 107. van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. Recombineering mycobacteria and their phages. Nat Rev Microbiol 2008; 6: 851-7.
 108. Vilcheze C, Av-Gay Y, Attarian R, Liu Z, Hazbon MH, Colangeli R, *et al.* Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol 2008; 69: 1316-29.
 109. Vilcheze C, Wang F, Arai M, Hazbon MH, Colangeli R, Kremer L, *et al.* Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. Nat Med 2006; 12: 1027-9.
 110. Wang F, Langley R, Gulten G, Dover LG, Besra GS, Jacobs WR Jr, *et al.* Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. J Exp Med 2007; 204: 73-8.
 111. Williams BG, Blattner FR. Construction and characterization of the hybrid bacteriophage lambda Charon vectors for DNA cloning. J Virol 1979; 29: 555-75.
 112. Wilson SM, al-Suwaidi Z, McNerney R, Porter J, Drobniewski F. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Med 1997; 3: 465-8.
 113. Yzquierdo SL, Lemus D, Echemendia M, Montoro E, McNerney R, Martin A, *et al.* Evaluation of phage assay for rapid phenotypic detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006; 5: 11.
 114. Zimhony O, Cox JS, Welch JT, Vilcheze C, Jacobs WR Jr. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Med 2000; 6: 1043-7.

VTEC 2009

Buenos Aires

**7th International Symposium
on Shiga Toxin (Verocytotoxin)
Producing *Escherichia coli*
Infections**

10 al 13 de mayo de 2009

**Centro Cultural Borges,
Buenos Aires, Argentina**

Local Steering Committee:

Chair

Marta Rivas

Co-Chair

Marina Palermo

Adriana Bentancor

María Gracia Caletti

Ángel Cataldi

Isabel Chinen

Laura Duverne

Ramón Exeni

Cristina Ibarra

Gabriel Lores Arnaiz

Marcelo Masana

Elsa C. Mercado

Horacio A. Repetto

Carlos Seijo

Raquel Wainsztein

SCIENTIFIC PROGRAM

STEC/VTEC epidemiology from around the world

Reservoirs. Sources and routes of transmission

Pathogenesis. Host response to STEC/VTEC infections.

Animal models of HUS

Virulence factors. Genomics

Clinical and diagnostic aspects of STEC/VTEC
infections and HUS

Strategies of control and prevention

www.vtec2009.com.ar

REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La Revista Argentina de Microbiología es una publicación trimestral editada por la Asociación Argentina de Microbiología y destinada a la difusión de trabajos científicos en las distintas áreas de la Microbiología. La Asociación Argentina de Microbiología se reserva los derechos de propiedad y reproducción del material aceptado y publicado.

Tipos de contribución. La Revista Argentina de Microbiología acepta: artículos originales, informes breves, artículos especiales, imágenes microbiológicas, editoriales y suplementos.

Los *artículos originales* son trabajos de investigación completos y deben presentarse respetando las siguientes divisiones: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Bibliografía. Se admite la presentación de Resultados y Discusión como una sección conjunta.

Los *informes breves* son trabajos de menor extensión, entre los que se incluyen casuísticas, casos clínicos y descripciones de técnicas o dispositivos nuevos avalados por trabajos experimentales concluyentes. Se deberá omitir la división del texto en secciones y el manuscrito no podrá exceder las ocho páginas, con un máximo de quince citas bibliográficas y tres tablas o figuras.

Los *artículos especiales* son actualizaciones o consensos de grupos de trabajo acerca de temas de gran interés en el ámbito regional o internacional. Sus autores deben ser especialistas en la materia y el texto debe incluir una amplia y actualizada revisión bibliográfica.

Recientemente, la Revista Argentina de Microbiología ha incorporado la sección *imágenes microbiológicas*. Las contribuciones enviadas para esta sección pueden corresponder a fotos de bacterias, hongos, parásitos o virus, tomadas de exámenes en fresco o con coloraciones, y observadas bajo microscopía óptica, electrónica o de fluorescencia. También se admiten otras imágenes fotográficas, por ejemplo, microorganismos en medios de cultivo, lesiones ilustrativas en pacientes o en animales de experimentación; imágenes radiográficas y ecográficas, de tomografías computadas, de resonancias magnéticas nucleares, etc. Estas imágenes de gran valor didáctico y no necesariamente excepcionales, deben estar acompañadas de un texto explicativo y de flechas indicadoras, cuando corresponda. El conjunto no debe exceder una página impresa.

En todos los casos se exigirá excelente calidad fotográfica, de modo que sea posible la fiel reproducción de la imagen enviada. La versión electrónica (que siempre se deberá suministrar, además de la impresa) se realizará en el formato jpg, con alta resolución.

Los *editoriales* abordan tópicos de gran actualidad y particular relevancia para la comunidad científica especializada en la Microbiología. La oportunidad y autoría de los editoriales, así como sus lineamientos generales, quedan exclusivamente a criterio del Comité Editor.

Los *suplementos* corresponden a extensas revisiones de un tema específico realizadas por una o varias sociedades científicas o universidades, o a los resúmenes de las contribuciones efectuadas en el marco de eventos científicos organizados por la Asociación Argentina de Microbiología, o alguna de sus Divisiones o Filiales (comunicaciones orales, *posters*, conferencias, mesas redondas, etc.), a cargo de editores invitados.

Las propuestas temáticas de los suplementos y sus lineamientos generales deberán ser aceptados por el Comité Editor.

La revisión de los manuscritos correspondientes a suplementos estará a cargo de revisores elegidos por el Comité Editor (extensas revisiones) y de los editores invitados (resúmenes de eventos). El suplemento deberá ser financiado en su totalidad por la entidad que ha organizado la reunión científica, la que tendrá en cuenta que el suplemento se deberá distribuir entre todos los socios de la Asociación Argentina de Microbiología y todos los participantes del evento. Con respecto a la edición, el suplemento deberá respetar exactamente el formato y el estilo de la Revista Argentina de Microbiología en todos sus aspectos (tapa, tipo de papel, impresión, tablas, figuras, fotos, etc.), tal como se describe en las instrucciones para los autores. Los suplementos correspondientes a los resúmenes de los eventos deben incluir en este orden: nómina de los miembros del Comité Editor de la Revista Argentina de Microbiología, datos de presentación del evento (título completo, lugar y fecha), índice (en español y en inglés), agradecimientos, nómina de las autoridades del evento y mensaje/s del/los presidente/s. A continuación se presentarán los resúmenes numerados desde el uno con números arábigos. Al final del suplemento debe incluirse el Índice alfabético de autores y las instrucciones para los autores de la Revista Argentina de Microbiología, en español y en inglés. El programa esquemático del evento sólo se podrá incluir en forma de tríptico, suelto en el interior del suplemento.

La Revista Argentina de Microbiología apoya las políticas para registro de ensayos clínicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), reconociendo la importancia de esas iniciativas para el registro y divulgación internacional de información sobre estudios clínicos, en acceso abierto. En consecuencia, solamente se aceptarán para publicación, a partir de 2007, los artículos de investigaciones clínicas que hayan recibido un número de identificación en uno de los Registros de Ensayos Clínicos validados por los criterios establecidos por OMS e ICMJE, cuyas direcciones están disponibles en el sitio del ICMJE. El número de identificación se deberá registrar al final del resumen.

Presentación de los originales. Los manuscritos deberán ser enviados al Comité Editor de la Revista Argentina de Microbiología, Deán Funes 472, (C1214AAD) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, y acompañados de una nota de acuerdo al siguiente modelo:

Comité Editor de la Revista Argentina de Microbiología:

En mi carácter de autor responsable (a quien debe dirigirse la correspondencia) declaro que el resto de los autores han acordado que los represente frente a la RAM con respecto al envío del manuscrito "...Título...", y son responsables junto a mí del contenido de este trabajo. El mismo no ha sido publicado previamente (ni tampoco otro con contenido similar) ni está siendo considerado en otra

revista para su publicación. Asimismo, manifiesto mi conformidad de otorgar los derechos de copia (copyright), una vez concretada la publicación, a la Revista Argentina de Microbiología.

El material será analizado por el Comité Editor y sometido a la consideración de dos árbitros científicos designados para cada caso. El Comité Editor se reserva el derecho de rechazar aquellos manuscritos cuyos contenidos se superponen total o parcialmente con trabajos ya publicados, o aquellos cuya temática no se corresponde con la de la Revista Argentina de Microbiología. Asimismo, se reserva el derecho de efectuar las modificaciones gramaticales o literarias que considere necesarias.

Los manuscritos podrán ser redactados indistintamente en español o en inglés, aunque el Comité Editor estimula a los autores a escribir los trabajos en inglés para favorecer su difusión y lectura a nivel internacional. Los autores cuya primera lengua no sea el español deberán remitir los manuscritos en inglés. Los artículos originales, informes breves y artículos especiales incluirán dos resúmenes de hasta 200 palabras. El primero de ellos estará redactado en el idioma empleado en el trabajo, y el segundo, en el otro idioma, estará encabezado por el título completo del trabajo. Evitar en los resúmenes las abreviaturas y las citas bibliográficas.

Los manuscritos podrán ser enviados por correo electrónico o en CD-ROM. Las hojas deberán estar numeradas correlativamente, y el texto se escribirá dejando márgenes amplios, a doble espacio, con un tamaño mínimo de letra de 12 puntos. Las letras en **negrita** o *itálica* se usarán sólo cuando corresponda.

En la primera página se indicará: título del trabajo (sólo la primera letra en mayúscula, el resto en minúscula), iniciales de los nombres y apellidos completos de todos los autores; lugar de trabajo (nombre de la institución y dirección postal), de haber autores con distintos lugares de trabajo, se colocarán superíndices numéricos (no encerrados entre paréntesis) junto a los nombres, de manera de identificar a cada autor con su respectivo lugar de trabajo; fax y/o correo electrónico del autor responsable de la correspondencia (que se indicará con un asterisco en posición de superíndice ubicado junto al nombre) y título abreviado del trabajo, de hasta 50 caracteres, para cabeza de página.

En la segunda página se incluirán los dos **resúmenes**, seguido cada uno de ellos de una lista de tres a seis palabras clave, en el idioma correspondiente.

Introducción. Incluirá antecedentes actualizados acerca del tema en cuestión y los objetivos del trabajo definidos con claridad. Las citas bibliográficas deberán ser elegidas muy cuidadosamente y no se deberá realizar una exhaustiva revisión del tema.

Materiales y Métodos. Contendrá la descripción de los métodos, aparatos, reactivos y procedimientos utilizados, con el detalle suficiente para permitir la reproducción de los experimentos.

Resultados. Se presentarán a través de **una** de las siguientes formas: en el texto, o mediante tabla/s y/o figura/s. Se evitarán repeticiones y se destacarán sólo los datos importantes. Se dejará para la sección Discusión la interpretación más extensa.

Las **tablas** se presentarán en hoja aparte, numeradas consecutivamente con números arábigos, encabezadas con un título explicativo, con las leyendas y/o aclaraciones que correspondan al pie. Las llamadas para las aclaraciones al pie se harán empleando números arábigos entre paréntesis y superíndice. Sólo los bordes externos de la primera y la última fila y la separación entre los títulos de las columnas y los datos se marcarán con línea continua. No se marcarán los bordes de las columnas.

Las **figuras** se presentarán en hoja aparte, numeradas consecutivamente con números arábigos. Los dibujos deberán estar en condiciones que aseguren una adecuada reproducción. Los gráficos de barras, tortas o estadísticas deberán tener el formato gif. Los números, letras y signos tendrán dimensiones adecuadas para ser legibles cuando se hagan las reducciones necesarias. Las referencias de los símbolos utilizados en las figuras deberán ser incluidas dentro de la misma figura y no en el texto de la leyenda.

Las **fotografías** deberán ser realizadas en color o en blanco y negro, con buen contraste, en papel brillante y con una calidad suficiente para asegurar una buena reproducción. Los dibujos originales o las fotografías tendrán al dorso los nombres de los autores y el número de orden escritos con lápiz. Las leyendas de las figuras se presentarán reunidas en una hoja aparte, ordenadas numéricamente. La versión electrónica deberá ser realizada en el formato jpg, con alta resolución.

Tanto las figuras como las fotografías deberán ser legibles y no deberán superar los 580 píxeles de ancho. Las **abreviaturas** deberán ser explicitadas después de su primera mención en el texto. Las unidades de medida se expresarán siguiendo las normas del *Système International d'Unités*.

Discusión. Se hará énfasis sobre los aspectos del estudio más importantes y novedosos, y se interpretarán los datos experimentales en relación con lo ya publicado. Se indicarán las conclusiones a las que se arribó, evitando la reiteración de datos y conceptos ya vertidos en secciones anteriores.

Agradecimientos. Deben presentarse en un tamaño de letra menor y en un solo párrafo

Bibliografía. Las citas bibliográficas se escribirán en hoja aparte y se presentarán en orden alfabético de autores, numeradas correlativamente empleando números arábigos (no usar el formato lista, opción de Word). En el texto, las citas aparecerán con números entre paréntesis, en correspondencia con el número con que aparecen en la bibliografía. Las referencias a comentarios personales y a trabajos inéditos deberán mencionarse como **comunicación personal**, escrito entre paréntesis. Cuando el número de autores de una cita sea superior a seis, se deberá indicar los nombres de los seis primeros seguidos por el marcador *et al.*

Para las referencias se seguirán los siguientes modelos:

a. Publicaciones periódicas

Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3198-202.

Los títulos de las revistas serán abreviados según el Index Medicus (el listado puede obtenerse en <http://www.nlm.nih.gov>).

b. Capítulos de libros/módulos

Ruoff KL, Whitley RA, Beighton D. *Streptococcus*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C., ASM Press, 2003, p. 405-21.

c. Presentaciones en congresos u otros eventos científicos

Aguilar M, Punschke K, Touati D, Pianzola MJ. Estudios fisiológicos y genéticos en la bacteria sulfato reductora *Desulfoarculus baarsii*. Terceras Jornadas Rioplatenses de Microbiología, 1997, Resumen J2, p. 102, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

d. Presentaciones en congresos u otros eventos científicos reproducidas dentro de un suplemento publicado por la Revista Argentina de Microbiología

Fellner MD, Correa RM, Durand K, Teyssié AR, Picconi MA. Análisis del ADN circulante de virus Epstein-Barr (EBV) en pacientes inmunosuprimidos con y sin linfomas asociados. VIII Congreso Argentino de Virología, Resumen 10416. Rev Argent Microbiol 2005; 37 Supl 1: 95.

e. Institucionales

Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement, 2005; M100-S15. Wayne, Pa, USA.

Presentación del CD-ROM. El CD-ROM con la versión electrónica de la contribución enviada deberá tener una etiqueta o rótulo que indique: el nombre del trabajo, el programa y la versión usados para confeccionar el texto, las figuras y las fotografías; y el nombre de los archivos que contiene.

Recomendaciones. Incluir todo el texto del artículo en un sólo archivo; en caso de haber imágenes, éstas deben enviarse en archivos separados; tipear las mayúsculas, los espacios entre palabras, las *itálicas* y las **negritas** tal como se desea que salgan luego en el impreso; no dar espacios antes y después de los subtítulos; justificar el texto; para encolumnar las tablas, usar la tecla de tabulación y no la barra espaciadora. Antes de enviar un manuscrito, es recomendable consultar algún ejemplar reciente de la RAM; de este modo se podrá verificar si se han seguido las pautas de formato y estilo requeridas y, eventualmente, efectuar las modificaciones necesarias.

Costo de la página. Por cada página publicada se cobrarán \$ 50, o \$ 150 si ésta incluye fotos en color (Argentina, socios de la AAM), \$ 100 o \$ 300 (Argentina, no socios de la AAM) y U\$S 40 o U\$S 120 (otros países).

Separatas. Se suministrarán 25 separatas sin cargo.

Secretaría: Deán Funes 472, (C1214AAD) Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina; Tel.: (54-11) 4932-8858 y (54-11) 4932-8948; e-mail: info@aam.org.ar; <http://www.aam.org.ar>

SUSCRIPCIÓN ANUAL (4 números)

Socios AAM	\$ 100
Argentina no socios	\$ 200
América Latina	U\$S 100
Otros países	U\$S 150

Pago: Por giro postal a la orden de Asociación Argentina de Microbiología.

REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

The Revista Argentina de Microbiología is published by the Asociación Argentina de Microbiología (AAM) on a quarterly basis. It encourages scientific papers in the field of Microbiology. The Asociación Argentina de Microbiología reserves the right to use, reproduce and publish the accepted contributions.

Types of Publications. The Revista Argentina de Microbiología will publish: original articles, brief reports, special articles, images in microbiology, editorials and supplements.

Original Articles: they are full research papers having the following sections: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References. Results and Discussions may be subsumed into one section.

Brief Reports: they are less extensive than *Original Articles*. They include case reports and descriptions of new techniques and procedures based on experimental work. Division into sections is omitted; manuscripts must not exceed 8 pages, references will be limited to a maximum of 15, tables and figures to a maximum of 3.

Special Articles: they are updates or workshop results which should be based on subject matter of local and international weight and include a new and comprehensive bibliography. Their authors must be specialists in their fields.

Images in Microbiology: the Revista Argentina de Microbiología has just incorporated this new section. Images may include: high quality pictures of bacteria, fungi, parasites and viruses using staining or direct observation through optical, electron or fluorescent microscopy; they may also include photographic images of microorganisms in culture media, lesions in humans and laboratory animals, X-rays and ultrasound images, tomographies, magnetic resonance, etc. Images having instructional worth, though not necessarily breaking new ground, should be accompanied by explanatory texts and diagrams if required. The set of images should fit one printed page at most.

Images should use photographic material of the highest possible quality to ensure very good reproduction. Electronic versions, which should always accompany the printed version, must use jpg in a high resolution format.

Editorials: this section is the sole domain of the Editing Committee, who will determine editorial policy and authorship. Editorials focus upon the main topics under current discussion in the field of Microbiology.

Supplements: they will mainly consist of the reviewing in detail of both specific subjects considered by scientific organizations and universities and abstracts of lectures, round tables and oral and visual communications from scientific meetings sponsored by the Asociación Argentina de Microbiología, its divisions or branches and presided by invited editors. Subjects and overall outlines should be approved by the Editing Committee.

The articles under *Supplements* will be examined by reviewers selected by the Editing Committee in the case of extensive reviewing, and by invited editors in the case of abstracts of meetings. *Supplements* will be wholly financed by the body organizing the meeting, taking into account that copies have to be distributed to all the members of the Asociación Argentina de Microbiología and all the persons taking part. The style and format must conform to the standards of the Revista Argentina de Microbiología set out in the Instructions to Authors in all respects: cover design, paper quality, preparation of tables and illustrations and printing, for example. *Supplements* of the meetings should list: the names of the members of the Editing Committee of the Revista Argentina de Microbiología; title, date and venue of the meeting; contents of the meeting in Spanish and English; acknowledgements; organizing officers and presidential message; the abstracts, numbered consecutively with Arabic numerals starting from 1, should follow. An alphabetical index of authors and the Spanish and English versions of the Instructions to Authors of the Revista Argentina de Microbiología must be printed at the end of the *Supplement*. The meeting schedule will accompany the *Supplement* as a separate leaflet.

The Revista Argentina de Microbiología follows the policies of the World Health Organization (WHO) and of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) for clinical trial registration, recognizing the importance of those initiatives for international dissemination of information on clinical research, in open access. Accordingly, only articles of trials previously registered in one of the Clinical Trial Registries that meet WHO and ICMJE requirements will be accepted for publication, starting in 2007. The list of registries accepted by WHO and ICMJE is available in ICMJE site. The trial registration number should be published at the end of the abstract.

Preparation of Manuscripts. Manuscripts must be addressed to the Editing Committee of the Revista Argentina de Microbiología, Deán Funes 472 (C1214AAD) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, together with a note according the following model: Editorial Board Revista Argentina de Microbiología:

I, the undersigned, as responsible corresponding author, hereby state that the rest of the authors have agreed that I should represent them before RAM concerning the submission of the manuscript entitled "...Title...", and further declare that they are jointly responsible for the contents of the above-mentioned work. Neither this manuscript nor any other with substantially similar contents has previously been published or is being currently considered for publication elsewhere. Furthermore, I express my consent to transfer copyright to Revista Argentina de Microbiología once the manuscript is published.

All material will be examined by the Editing Committee first and then by two scientific reviewers selected for each work. The Editing Committee will exercise the right to refuse manuscripts the subject matter of which falls outside the field covered by the Revista Argentina de Microbiología, or deals partially or fully with topics already discussed in published papers. The Editing Committee will also correct grammar and style where necessary.

Manuscripts may be written in Spanish or English; nevertheless, the Editing Committee encourages authors to use English so that their work reaches wider international diffusion. Authors whose first language is not Spanish must submit their papers in English. *Original Articles*, *Brief Reports* and *Special Articles* must be accompanied by two copies of an abstract not exceeding 200 words: one of the copies should be written in the same language as the paper, the other, in the other language: the full title of the manuscript should be typed in this copy. Abbreviations and references are discouraged in abstracts.

The original manuscript must be sent by e-mail or CD-ROM; pages must be numbered, typewritten on one side only using as a minimum size 12 characters, double-spaced and with wide margins. **Bold** and *italics* printing types may be used when necessary.

Title page: it should include the title (using capitals only for first letters); authors' names (initials of first name, full family name); place of work: institution and mailing address. If the place of work is different the institutional affiliation of each author should be given with superscriptions added to their names to identify each author with his/her affiliation. Fax number and e-mail address of the corresponding author, whose name should be asterisked, must be given. A short title with up to 50 characters should also be given for use as a running head.

Second page: the Spanish and English versions of the abstract will be printed on the second page, each version listing from 3 to 6 keywords.

Introduction. It should clearly state the antecedents of the study and the purpose in undertaking it. References should be carefully chosen and the problem addressed should not be reviewed in detail.

Materials and Methods. Methods, procedures, reagents, and equipment used must be accurately described so that experiments can be replicated.

Results. Results will be shown in **one** of these ways: in the text or in tables and illustrations. Repetition should be avoided by presenting only the most important data. In-depth interpretation will be under Discussion.

Tables should be typed on separate pages and numbered consecutively with Arabic numerals; they should have a title above and a legend and/or explanation below. Reference marks for explanations should use superscripted Arabic numerals in parentheses. Lines will only be used for the first and the last row and to separate the headings of the columns from the data; vertical lines between columns should not be inserted.

Illustrations should be presented on separate pages and numbered consecutively with Arabic numerals. Drawings must ensure good reproduction. Bar graphs, pie charts and tables should use a gif format. The size of numbers, letters and signs should be large enough to remain legible if reductions are required. References of symbols in the figures should be given in the body of the figures and not in the legends.

Photographs: both black and white and color photographs are accepted, their quality must be very high, with good contrast so that reproductions are precise; a gloss finish must be used. Original drawings and photographs must have the names of the authors and the sequence number in pencil overleaf. The legends of the illustrations should be typed on a separate page and in numerical order. Electronic forms must use a high resolution jpg format. Illustrations and photographs must not exceed 580 pixels in width. Abbreviations should be defined at their first appearance in the text. Units of measure should be expressed in the *Système International d'Unités*.

Discussion. Emphasis should be laid on the new and most important findings of the study; experimental data should be examined in the light of previously published work. Conclusions should be presented avoiding the repetition of what has already been stated in the preceding sections.

Acknowledgements. They must be typed in smaller print in only one paragraph.

References. The names of the authors cited should be listed in alphabetical order and numbered in sequence with Arabic numerals on a separate page. It should be noted that the Word list format must not be used. A citation in the text must be accompanied by the corresponding number in the Reference list in parentheses. Unpublished work and personal comments should be presented as: **personal communication**. Should the number of authors be more than six, the name of the first six must be followed by *et al*.

Sample references:

a. Periodical publications

Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3198-202.

The abbreviated title of the journal must follow the style of the Index Medicus (the list maybe obtained in <http://www.nlm.nih.gov>).

b. Chapters of books/modules

Ruoff KL, Whiley RA, Beighton D. *Streptococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C., ASM Press, 2003, p. 405-21.

c. Presentations in meetings

Aguilar M, Punschke K, Touati D, Pianzola MJ. Estudios fisiológicos y genéticos en la bacteria sulfato reductora *Desulfoarculus baarsii*. Terceras Jornadas Rioplatenses de Microbiología, 1997, Resumen J2, p. 102, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

d. Presentations in meetings in a supplement

Fellner MD, Correa RM, Durand K, Teyssié AR, Picconi MA. Análisis del ADN circulante de virus Epstein-Barr (EBV) en pacientes inmunosuprimidos con y sin linfomas asociados. VIII Congreso Argentino de Virología, Resumen 10416. Rev Argent Microbiol 2005; 37 Supl 1: 95.

e. Institutional publications

Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement, 2005; M100-S15. Wayne, Pa, USA.

Preparation of the CD-ROM. The label should show: title of work, program and program version used for the text, figures and photographs, and the title of each of the files on the CD-ROM.

Recommendations. Text format: type the whole text in only one file; images, if any, must be filed separately; capitals, spaces between words, *italics* and **bold** types should be those to be used in the printed version; there should be no spaces before or after subheads; the text should be justified; use tab-settings instead of spacing-bars for tables. Before submitting a manuscript one of the latest issues of **RAM** should be consulted in order to comply with the Instructions to Authors.

Publishing charges. Each published page will cost \$ 50, or \$ 150 (pesos) when the page includes color photographs to AAM Argentine members; or \$100 or \$300 (pesos) to Argentine non-member price; and US\$ 40 or US\$ 120 to all other contributors.

Reprints. Twenty-five off prints will be provided free of charge.

The Secretary: Deán Funes 472, (C1214AAD) Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina; Tel.: (54-11) 4932-8858 and (54-11) 4932-8948; e-mail: info@aam.org.ar; <http://www.aam.org.ar>

ANNUAL SUBSCRIPTION (4 issues)	
AAM members	\$ 100
Argentina non members	\$ 200
Latin America	US\$ 100
Other countries	US\$ 150

Payment: By check or money order, to the order of Asociación Argentina de Microbiología. Price includes mail postage.

Merck Química Argentina le ofrece la gama más amplia de productos para microbiología utilizados en todos los mercados.

Únicos medios de cultivo granulados:

- Mayor seguridad en la manipulación
- Menor toxicidad
- Mayor disolución
- No hay apelmazamiento
- No hay desmezcla
- Alta reproducibilidad

¡También cumplen ISO 11133!



Monitoreo de Higiene:

- Hy-Lite (Luminómetro)
- Hy-Rise (Varillas)
- Envirocheck (Placas y paletas de Contacto)

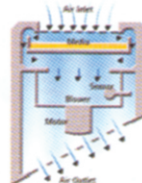
Singlepath® y Duopath® Test con aprobación AOAC para la detección rápida de patógenos en alimentos:

Salmonella, E. Coli O157, Verotoxinas,
Campylobacter, Listeria, Listeria mono-
cytogenes, Bacillus Cereus y Legionella.



Sistemas de Monitoreo Microbiológico de Aire:

- Mas-100
- MAS-100 Ex
- MAS-100 Eco
- MAS-100 ISO
- MAS-100 CG Ex



Medios listos para usar (ágares y caldos):

- Ahorro de tiempo y costos
- Calidad alta y constante



Colorantes para microbiología:

Gram, Ziehl-Neelsen, PAS y muchos más.



También comercializamos medios cromogénicos y fluorogénicos, peptonas y bases, suplementos selectivos, reactivos para anaerobiosis y muchísimos reactivos auxiliares.

Merck Química Argentina S.A.I.C

Edificio Panamericana Plaza - Tronador 4890 5° piso - (1430) Buenos aires - Argentina
Tel. +54 (11) 4546 8100 / Fax +54 (11) 4546 8144

Servicio de atención personalizada: 0800-888-Merck (63725)
merck@merck.com.ar / www.merck.com.ar





BD

Ayudando a las personas
a vivir saludablemente

BD Diagnostic Systems

Asesoramiento integral para
obtener resultados confiables.



BD Preanalytical Systems

Experiencia al servicio
de la calidad y bioseguridad.



BD Biosciences

Excelencia en herramientas
para investigación y diagnóstico.

Contactenos al:

e-mail: crc_argentina@bd.com

tel: 0800 444 55BD (23)