

RECYT

Año 18 / N° 25 / 2016 / 11-14

Cinco Años de Experiencia en Conservación de *Streptococcus agalactiae*: Comparación de Dos Metodologías Alternativas

Five Years' Experience in Conservation of *Streptococcus agalactiae*: Comparison of Two Alternative Methodologies

Margarita E. Laczeski^{1,*}, Marina G. Novosak¹, Marta I. Vergara¹

1 - Módulo de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Avda. Mariano Moreno 1375, CP 3300, Posadas, Misiones, Argentina.

* E-mail: melaczeski@fceqyn.unam.edu.ar

Resumen

Streptococcus agalactiae (SGB) es responsable de enfermedad neonatal severa entre otras patologías. Actualmente existe la necesidad de la conservación para investigaciones que incluyan: búsqueda de genes de virulencia y resistencia antimicrobiana, estudios epidemiológicos, desarrollos biotecnológicos y envíos a centros de referencia. El objetivo de este trabajo fue comparar dos métodos de conservación: Tripteína Soya Agar al 7% a temperatura ambiente y oscuridad (ATS-S) y leche descremada al 20% a -80 °C (LD-80). Ciento cincuenta cepas fueron evaluadas a los tres, doce y sesenta meses. Luego del tiempo de conservación se comprobó su viabilidad, pureza, estabilidad antigénica y genética. Para cada período estudiado, los porcentajes de recuperación fueron: 100%, 80% y 15,33% para ATS-S y 100%, 100% y 98,66% para LD-80. A partir de los 12 meses existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos métodos. Concluimos que LD-80 es altamente eficaz para conservar cepas de SGB con porcentajes de recuperación cercanos al 100%.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*; Medios de conservación; Tripteína Soya Agar; Leche descremada.

Abstract

Streptococcus agalactiae (GBS) is responsible for severe neonatal disease and other pathologies. Currently, there is a need to conserve it to carry on studies involving the search for genes of virulence and antimicrobial resistance, epidemiological studies, biotechnological developments and shipments to referral centers. The aim of this study was to compare two methods of conservation of *Streptococcus agalactiae*: Trypticase Soy Agar (ATS-S) to 7% at room temperature and darkness and skim milk at 20% at -80 °C (LD-80). One hundred and fifty strains were evaluated at three, twelve to sixty months. After shelf viability, purity, antigenic and genetic stability were verified. Recovery rates were: 100%, 80% and 15.33% for ATS-S and 100%, 100% and 98.66% for LD-80 for each period studied. Significant differences ($p < 0.05$) were found between the two methods after the twelfth month. We conclude that LD-80 is highly effective to conserve GBS strains with recovery rates nearly a 100%.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*; Preservation media; Trypticase Soy Agar; Skim milk.

Introducción

Si bien *Streptococcus agalactiae* (SGB) es una bacteria integrante de la microbiota del tracto gastrointestinal y urogenital humano, adquiere relevancia en infecciones graves en el recién nacido y en adultos [1, 2]. Es también reconocido como un importante patógeno en pacientes adultos inmunocomprometidos e inmunocompetentes ya que es responsable, principalmente, de infecciones de piel y tejidos blandos, de endocarditis e infecciones osteoarticulares y meningitis [3, 4].

Por lo expuesto, además de optimizar los métodos

diagnósticos enfocados a evitar la transmisión en el recién nacido, existe la necesidad de conservar los aislamientos para poder realizar futuras investigaciones que incluyan la búsqueda de genes asociados a la virulencia y resistencia a los antimicrobianos, estudios epidemiológicos de circulación de cepas en la región para colaborar en el diseño de estrategias de vacunación, nuevas tendencias en desarrollos biotecnológicos y para su transporte a centros de referencia [5, 6].

Para optimizar el estudio y desarrollo de estas potencialidades es conveniente resguardar a las bacterias en colecciones de cultivos, conservando *ex situ* sus caracte-

rísticas fenotípicas, genotípicas y su viabilidad [7]. A fin de alcanzar este objetivo se investigan en la actualidad diversas metodologías.

Entre los métodos de conservación de estas bacterias se encuentran los de corto plazo como es el método comúnmente usado de resiembra continua, los de mediano plazo como el uso de congeladores que conservan las células a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y los de largo plazo referidos sobre todo a la liofilización como método *gold standard* [6, 8-10].

Esta investigación se realizó con el propósito de comparar la utilidad de dos métodos de conservación y evaluar su capacidad de garantizar la conservación de cepas de SGB para posteriores estudios epidemiológicos y/o moleculares.

Materiales y Métodos

Ciento cincuenta cepas de SGB recuperadas de gestantes a término, fueron mantenidas por un período de 5 años en dos medios de conservación: Tripteína Soya Agar al 7% (semisólido) a temperatura ambiente y oscuridad (ATS-S) y leche descremada al 20% a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (LD-80).

Antes de su inoculación en los medios de conservación en estudio se comprobaron la viabilidad, la pureza, las características antigénicas y genéticas de las cepas. Las características antigénicas se probaron por el test de aglutinación para grupo con partículas de látex (Phadebact Strep B Test- ETC International-Bactus AB, Suiza) y serotipo con sueros del Statens Serum Institut (Strep- B.Latex. Copenhagen, Dinamarca). La caracterización genética se efectuó por búsqueda de genes de virulencia (*bac*, *bca*, *hylB*, *lmb* y *rib*) [11-15] por técnica de PCR convencional [16] con los cebadores que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencia de cebadores de genes de virulencia utilizados para evaluar características genéticas de las cepas de *Streptococcus agalactiae*

Genes	Sentido 5'- 3'	Reverso 5'- 3'	GenBank
<i>bac</i>	TGTAAGGACGATAGTGGAAGAC	CATTTGTGATCCCTTTTGC	AB221536.1
<i>bca</i>	CAGGAAGGGGAACAACAGTAC	GTATCCTTTGATCCATCTGGATACG	M97256.1
<i>rib</i>	CAGGAAGTCTGTACGTTAAAC	CGTCCATTAGGGTCTTCC	U58333.1
<i>hylB</i>	TTATCATCCAGCGCTCCTAG	GTGGTGATAACTGACTTCTGGGA	Y15903.1
<i>lmb</i>	GACGCAACACACGGCAT	TGATAGAGCACTTCCAAATTG	AF062533.1

El medio semisólido ATS-S se preparó con Tripteína Soya Agar (Laboratorios Britania, Argentina) modificando el volumen de agua destilada estéril para obtener una concentración final de agar de 7%. Una vez preparado, el medio se esterilizó en autoclave a $118 - 121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos y se distribuyó en volúmenes de 5 ml, medidos con pipeta de doble aforo en frascos de vidrio de igual tamaño y capacidad (7 ml). Así fraccionado y previo a la inoculación de las cepas, el medio ATS-S se mantuvo 24 h a temperatura ambiente y luego 48 h a $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ con la finalidad de comprobar su esterilidad.

El medio de LD-80 se preparó en agua destilada estéril

con leche descremada de origen comercial al 20% la que fue sometida a vapor fluente durante 15 minutos. Un mililitro de este medio se distribuyó en criotubos SCT-200-C (Axygen Scientific, EE.UU). A fin de corroborar su esterilidad, criotubos seleccionados al azar fueron sembrados en agar sangre ovina al 5% y mantenidos a $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h.

En ambos medios se inocularon 100 μl de las cepas en estudio. El inóculo se obtuvo de un cultivo puro en caldo Todd-Hewitt y en fase de crecimiento exponencial, ajustado al equivalente al N° 1 de la escala de MacFarland.

A los 3; 12 y 60 meses de la siembra inicial, se transfirieron 5 μl de cada uno de los medios de conservación a placas de agar sangre ovina al 5% con siembra para recuento de colonias. Las placas se cultivaron a $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de CO_2 durante 24 - 48 h.

Del desarrollo obtenido se evaluó viabilidad y pureza de las cepas, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas y se determinó la estabilidad antigénica y genética con idéntica metodología utilizada en las determinaciones previas.

Los resultados se analizaron con el Programa SPSS Statistics 19, utilizando la prueba de *chi-cuadrado* para un nivel de confianza de 95%. Valores de *p* menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Para ambos medios en estudio (ATS-S y LD-80), el 100% de las cepas conservadas durante tres meses fueron viables, manteniéndose en estado de pureza y conservando sus características fenotípicas y genotípicas, con recuento de colonias mayor a 100.000 UFC/ml (Figura 1).

En las cepas conservadas durante 12 meses se observó que en ATS-S, el 80% se recuperaron en estado de pureza con recuentos de colonias entre 10.000 a 100.000 UFC/ml. En LD-80, el 100% de las cepas conservaron su estado de pureza, con recuentos iguales o mayores a 100.000 UFC/ml (Figura 1). Tanto en uno como en otro medio de conservación, las cepas puras recuperadas mantuvieron sus características fenotípicas y genotípicas originales.

A los sesenta meses, en ATS-S se observó que el 15,33% fueron recuperadas en estado de pureza con recuentos de colonias entre 100 - 1.000 UFC/ml y 84,66% resultaron no viables. En cambio, en LD-80, el 98,66% de las cepas mantuvo sus características originales con recuento de colonias mayor a 100.000 UFC/ml y sólo 1,34% resultaron no viables. El 100% de las cepas puras recuperadas, independientemente del medio de conservación utilizado, mantuvo sus características fenotípicas y genotípicas (Figura 1).

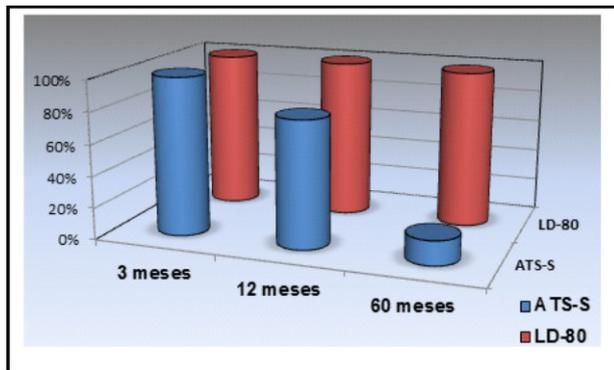


Figura 1: Porcentajes de recuperación de cepas de *Streptococcus agalactiae* a los 3, 12 y 60 meses de cultivo en 2 medios de conservación. ATS-S: Tripteína Soya Agar al 7‰ a temperatura ambiente y oscuridad, LD-80: leche descremada al 20% a -80 °C.

Utilizando la prueba de *chi*-cuadrado para un nivel de confianza de 95%, se presentaron diferencias significativas en la recuperación de las cepas a los 12 y 60 meses ($p < 0,05$) entre los dos métodos de conservación estudiados.

Discusión

La necesidad de mantener colecciones viables de cepas bacterianas es frecuente en un gran número de instituciones. Los principales motivos para ello, incluyen: fines diagnósticos, docencia, investigación, envío a centros de referencia, disponibilidad de cepas patrones y obtención de nuevos productos derivados de nuevas tecnologías [5, 7, 8].

En la actualidad con el advenimiento y el avance de la biotecnología, donde los límites están puestos únicamente por la imaginación y la ética, la conservación de cepas bacterianas se ha convertido en una fuente importante de recursos [6].

No existe un solo método de conservación universal que permita el mantenimiento de todos los géneros y especies bacterianas de manera que las características importantes a mantener permanezcan estables.

El medio de conservación utilizado debe ajustarse al conocimiento previo presente en la bibliografía para cada microorganismo en particular.

La elección del método para cada caso es dificultosa y depende de numerosos factores: cantidad y validación de las cepas, finalidad de la conservación y necesidad de la frecuencia de apertura [17].

Cualquiera resulte ser el método de conservación seleccionado, debe garantizar una viabilidad no menor al 70% por el período en el cual se pretende conservar las cepas, minimizando las alteraciones producidas por cambios fenotípicos y/o genéticos [10].

En nuestro estudio con 150 cepas de SGB sometidas a evaluación dos métodos de conservación a mediano plazo [10] con el objetivo de mantener las cepas, inicialmente, por un período de tiempo de 5 años y garantizar estudios epidemiológicos, moleculares y proyectar los de índole biotecnológica [18].

En nuestro estudio, el medio ATS-S resultó ser apropiado para períodos de tiempo cortos de 3 meses con 100%

de recuperación de las cepas, obteniéndose una pérdida considerable de la viabilidad a los 12 meses, aunque inferior al 30%, valor indicado como satisfactorio en la bibliografía [10, 19].

Para bacterias menos exigentes, como *Salmonella* spp. y otras enterobacterias, se indica que medios semisólidos de características similares a ATS-S, son adecuados para el mantenimiento de cepas por tiempo incluso superiores a 10 años [20]. Nuestra experiencia de 5 años, indica que ATS-S, no es recomendable para SGB como medio de conservación a mediano plazo (2 a 5 años).

Los resultados muestran que ATS-S resulta apropiado para laboratorios dedicados al diagnóstico, con equipamiento de baja o mediana complejidad, conforme lo hemos comunicado en estudios previos [21]. La ventaja de su utilización son los bajos costos de mantenimiento y su desventaja, la necesidad de requerir subcultivos sucesivos, los que pueden desencadenar alteraciones fenotípicas y genotípicas en las cepas conservadas.

Las cepas preservadas en el medio de conservación LD-80 presentaron un alto porcentaje de viabilidad y pureza, cercano al 100%, luego de los 5 años de estudio. Este hecho lo convierte en una excelente opción, como método para garantizar el mantenimiento de SGB, durante un período útil y aplicable, con plazos programados.

Nuestros resultados concuerdan con autores que indican que la leche descremada tiene características criogénicas protectoras reconocidas [6, 22] y puede, por lo tanto, garantizar la viabilidad y estabilidad de la información genética por períodos aún mayores a los de este estudio.

Los tiempos de conservación considerados, permiten la utilización de LD-80 en laboratorios de mediana a alta complejidad dedicados a docencia, investigación y desarrollo. Este método, presenta como principal ventaja, la de permitir el mantenimiento de las cepas por tiempos a mediano y largo plazo y como limitación, la necesidad de contar con congeladores que alcancen los -80 °C.

Consideramos que nuestro aporte podría ser de importancia para aquellos laboratorios que cuenten con congeladores que permitan alcanzar temperaturas de -80 °C.

Conclusiones

Nuestros resultados indican que ATS-S es un medio de conservación aconsejable que permite el mantenimiento de las cepas en condiciones de pureza por un tiempo de 3 a 12 meses, períodos compatibles con necesidades diagnósticas o de envío de cepas a centros de referencias para confirmación de ciertas características como la sensibilidad inusual a los antimicrobianos.

Es necesario el uso de medios llamados de mediano plazo que otorguen mayor seguridad, permitiendo la conservación de las cepas de SGB, por tiempos prolongados que permitan implementar nuevas técnicas a fin de aportar a la vigilancia epidemiológica de la circulación de estas

cepas en la región y abordar estudios vanguardistas que incluyan el aprovechamiento biotecnológico de SGB.

Destacamos la utilidad para un período de 5 años de LD-80. Este medio resultó altamente eficaz para conservar las cepas de SGB con porcentajes de recuperación cercanos al 100%.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado gracias a las cepas de *Streptococcus agalactiae* recuperadas durante proyectos de investigación realizados por la Cátedra de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones entre los años 2004 y 2011, con subsidios recibidos de la Universidad Nacional de Misiones y la Agencia de Investigación Científica y Tecnológica PICTO-UNaM N° 36831 BID 1728/OC-AR. FONCYT. (Integrantes: Marta Vergara, Marina Quiroga, Eduardo Pegels, Patricia Oviedo, Margarita Laczeski). Las cepas fueron conservadas para el presente estudio y forman parte de la tesis doctoral de la primera autora.

Agradecemos a la Dra. Marina Quiroga por su colaboración en la revisión de la presente publicación.

Referencias

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Prevention of perinatal group B: revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep.* 59: p. 1-31. 2010.
- Kilian, M. *Streptococcus* and *Enterococcus*. En: Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J. and Barer, M., Eds., *Medical Microbiology*, 17th Edition, Elsevier, Amsterdam, p. 178-193. 2007.
- Abdelghany, M.; Schenfeld, L. Group B streptococcal infective endocarditis. *J Infect Public Health.* 7: p. 237-239. 2014.
- Gutiérrez, K. Bone and joint infections in children. *Pediatr Clin North Am.* 52: p. 779-794. 2005.
- Uruburu, F. History and services of culture collections. *Int Microbiol.* 6: p. 101-103. 2003.
- Morales-García, Y.E.; Osvaldo Rodríguez-Andrade, E.D.; De la Torre, J; Martínez Contreras, R.D.; Pérez y Terrón, R.; *et al.* Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos. *Bio-Tecnología.* 14: p 11-29. 2010.
- Del Puerto, C.A. Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. *Vaccimonitor.* 18: p. 20-24. 2009.
- Prakash, O.; Nimonkar, Y.; Shouche, Y.S. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiol Lett.* 339: p. 1-9. 2013.
- Burguet-Lago, N.; Sierra-Prado, N.; Brito-Godoy, L.C. Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 43: p. 0-0. 2012.
- Weng Alemán, Z.; Díaz Rosa, O.E.; Álvarez Molina, I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* 43: p. 2005-2012. 2005.
- Persson, E.; Berg, S.; Bevanger, L.; Bergh, K.; Valsö-Lyng, R.; Trollfors, B. Characterisation of invasive group B streptococci based on investigation of surface proteins and genes encoding surface proteins. *Clin Microbiol Infect.* 14: p. 66-73. 2008.
- Hannoun, A.; Shehab, M.; Khairallah, M.T.; Sabra, A.; Abi-Rached, R.; Bazi, T.; *et al.* Correlation between group B streptococcal genotypes, their antimicrobial resistance profiles, and virulence genes among pregnant women in Lebanon. *Int J Microbiol.* P. 796512. 2009.
- Nobbs, A.H.; Lamont, R.J.; Jenkinson, H.F. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73: p. 407-450. 2009.
- Burns, G.; Plumb, J. GBS public awareness, advocacy, and prevention-what's working, what's not and why we need a maternal GBS vaccine. *Vaccine.* 31: p. D58-D65. 2013.
- Dutra, V.G.; Alves, V.M.; Olendzki, A.N.; Dias, C.A.; de Bastos, A.F.; Santos, G.O.; *et al.* *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infect Dis.* 14: p. 323-330. 2014.
- Luque, J.; Luque Cabrera, J. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier Health Sciences, España. 2001.
- García, M.D.; Uruburu, F. La conservación de cepas microbianas. *Act SEM.* 30: p. 12-6. 2000.
- Atsushi Toda, Kuriko Yamada, Shin-Ichiro Nishimura. An Engineered Biocatalyst for the Synthesis of Glycoconjugates: Utilization of β 1,3-N-Acetyl-D-glucosaminyltransferase from *Streptococcus agalactiae* type Ia expressed in *Escherichia coli* as a fusion with maltose-binding protein. *Adv Synth Catal.* 344: p. 61-69. 2002.
- Weng Alemán, C.Z.; Junco Díaz, R.A.; Díaz Rosa, O.E. Colección de cultivos microbianos: Apuntes sobre su desarrollo. 41: p. 0-0. 2003.
- Weng Aleman, Z.; Junco Díaz, R.; Díaz Rosa, O.; Alvarez Molina, I.; Beltrán Díaz, J.; Rodríguez Salazar, M. Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 43: p. 0-0. 2005.
- Laczeski M.E.; Pegels, R.E.; Oviedo, P.N.; Quiroga, M.I.; Vergara, M.I. *Streptococcus agalactiae*, medios de conservación accesibles a laboratorios de diagnóstico de baja y mediana complejidad. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 51: p. 129-139. 2013.
- Borrero Maura, R. y *et al.* Conservación de cepas vacunales de *Leptospira* a -70 °C. *Rev. Cubana Med. Trop.* 58: p. 50-5. 2006.

Recibido: 24/09/2014

Aprobado: 06/08/2015