

GMO

GENÉTICA DE MICROORGANISMOS

GENETICS OF MICROORGANISMS



GMO 1

IDENTIFICACIÓN DEL MICROBIOMA EN MUESTRAS DE ESPUTO EN PACIENTES CON CUADROS CLÍNICOS DE TUBERCULOSIS, POR NGS (SECUENCIAMIENTO DE NUEVA GENERACIÓN)

Del Carpio Sanz A.O., C.R. Revilla Mogovejo, L.F. Luna Paredes, K. Tito Velásquez, R. Cáceres, T. Chávez, L. Lizarraga, V. Torres, H. Rojas, A. Gallegos. Universidad Nacional San Agustín de Arequipa, Arequipa, Perú. E-mail: adelcarpios@unsa.edu.pe

La tuberculosis es un problema de salud pública, la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, provoca disbiosis de la microbiota, condición que no solo influye en la latencia de *M. tuberculosis* y la manifestación de la enfermedad sino que también sería determinante de su progresión. Las nuevas técnicas de secuenciamiento masivo (NGS) permiten identificar al microbioma que acompaña al ser humano en condiciones de salud, el que puede variar asociado a la tuberculosis. En el presente estudio se identificó el microbioma en muestras de pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis, se recolectaron muestras de esputo en dos hospitales de Arequipa: 20 sin tratamiento (1), 6 con tratamiento (2), 2 Multidrogo – Resistentes (3) y 8 sin tuberculosis (4). Para identificar *M. tuberculosis* se utilizaron métodos convencionales y moleculares. La identificación del microbioma se llevó a cabo mediante el Secuenciamiento Illumina MiSeq, usando cebadores específicos que se dirigen a la región V4 del gen 16S rRNA. Se encontraron los siguientes filos: Pacientes (4): Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteria y Actinobacteria; Pacientes (1) Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y actinobacterias; Pacientes (2): Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes y Proteobacteria; Pacientes (3): Proteobacteria, Actinobacterias, Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacterias. Se evidencia variación a nivel de filo y género en los diferentes grupos de estudio, reflejada en la diversidad y cantidad del microbioma.

GMO 2

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA DE PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE ROTAVIRUS GRUPO A

Gómez Quintero E.L., K.A. Salvatierra, S.O. Miño. Laboratorio de Biología Molecular Aplicada (LaBiMAP), FCEQyN, UNaM, Misiones, Argentina. E-mail: elgq_11@hotmail.com.ar

En 2008, se implementó un sistema de clasificación basado en el genoma completo de Rotavirus grupo A. El mismo asigna un genotipo a cada uno de los once segmentos génicos de una cepa particular de acuerdo a valores de similitud genética (valor de corte), siendo, para el número de genotipos de proteínas no estructurales (NSP), 79% para NSP1, 85% para NSP2, NSP3 y NSP4, y 91% para NSP5. Desde su implementación, el NSP ha aumentado sustancialmente: NSP1 (14 a 31), NSP2 (5 a 22), NSP3 (7 a 22), NSP4 (11 a 27) y NSP5/6 (6 a 22). Por tanto, el objetivo del trabajo fue analizar la variabilidad genética de los genes NSP y corroborar si los valores de corte establecidos originalmente siguen vigentes. Las secuencias nucleotídicas se obtuvieron desde *GenBank*. Se realizaron alineamientos múltiples, calcularon matrices de distancias genéticas y construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud. Se observó que el 23% (7/31), 23% (5/22), 37% (8/22), 26% (7/27) y 23% (5/22) de los genotipos NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 y NSP5, respectivamente, poseían cepas que según los valores de corte no se ajustaban al genotipo determinado (conflictos). Para todos los genes NSP, incluir la filogenia, contribuye a resolver la clasificación de las cepas con conflictos. Una optimización de los valores de corte de 85 a 82% para NSP2, NSP3 y NSP4, y de 91 a 87% para NSP5, mejora la clasificación de cepas con conflictos. Este trabajo destaca la importancia de analizar periódicamente el sistema de clasificación y la necesidad de mantener el trabajo continuo con el *Rotavirus Classification Working Group*.

GMO 3

PERFILES GENÉTICOS DE VIRULENCIA EN AISLAMIENTOS SIMPÁTRICOS DE *Streptococcus agalactiae* Lehmann and Neumann OBTENIDOS DE SERES HUMANOS Y DE BOVINOS

Hernández L., J.S. Cadona, E. Bottini, C. Cacciato, C. Monteavaro, F. Traverso, S. Altamiranda, A.V. Bustamante, A.M. Sanso. Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, CIVETAN, FCV-UNCPBA, Buenos Aires, Argentina. E-mail: lbhernandez@vet.unicen.edu.ar

Streptococcus agalactiae es un patógeno asociado a mastitis bovina. En el hombre, puede causar enfermedades severas en adultos mayores o inmunodeprimidos y la colonización en mujeres embarazadas es la principal causa de infección neonatal. El análisis comparativo de cepas de distintos orígenes genera gran interés debido a la posibilidad de transmisión interespecífica. La patogenia está relacionada a varios factores de virulencia, el polisacárido capsular que permite la clasificación en 10 serotipos, islas de *pilus* que median la adhesión y otros, relacionados con la colonización y evasión del sistema inmune. Nuestro objetivo fue comparar aislamientos simpátricos de *S. agalactiae* que circulan entre el ganado y el hombre. Se analizaron 149 aislamientos humanos (colonizadores e infectivos) y 65 de vacas con mastitis obtenidos en la región pampeana, entre 2016 y 2021. La serotipificación y detección de 12 genes de virulencia se realizó por PCR. Entre los aislamientos humanos se destacan los serotipos Ia (36%), III (31%) y Ib (19%); entre los bovinos, III (51%), II (35%) y Ia (8%). Los genes de virulencia *bac*, *scpB* y *lmb* no se detectaron en aislamientos bovinos mientras que *lmb*, *bca*, *rib* y *spb1* presentaron diferentes frecuencias en ambos grupos. La tipificación de *pilus* mostró que PI-1 y PI-2a estuvieron sólo en las cepas humanas mientras que PI-2b se detectó en ambos grupos. El análisis de agrupamiento reveló 51 perfiles de virulencia no compartidos entre cepas de ambos orígenes. Este análisis proporciona evidencia de la coexistencia de dos subpoblaciones de *S. agalactiae*.

GMO 4

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÉNICA EN NIÑOS CON DIARREA ATENDIDOS EN DOS HOSPITALES DE BUENOS AIRES, ARGENTINA

Molina N.B., S. Oderiz, C. Vescina, M. Cordoba, J. Basualdo, M. Sparo. Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires, Argentina. E-mail: nbmolina@med.unlp.edu.ar

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es un agente etiológico de diarrea frecuente en niños de países en desarrollo. Este patotipo o variante patogénica se caracteriza por la producción de la toxina termolábil (LT) y/o la toxina termoestable (ST) con sus variantes (STP y STH). El diagnóstico etiológico de la infección con ETEC depende de la detección molecular de los genes de las toxinas. Sin embargo, en Argentina, la presencia de ETEC no se investiga de manera sistemática en casos de diarrea. El objetivo fue estimar la frecuencia de infección de ETEC en niños con diarrea, atendidos en hospitales de Tandil y La Plata, Argentina, durante 2016-2018. El diseño fue observacional, descriptivo, prospectivo y de corte transversal. El protocolo fue aprobado por Comité de Bioética, UNLP. La presencia de ETEC se investigó mediante la amplificación molecular de genes de toxinas (Molina *et al.*, 2022). Las cepas control fueron *E. coli* KNH-172 (LT y STP) y *E. coli* O126-53 (STH). Se estudiaron 601 niños con diarrea. La edad promedio fue tres años y cinco meses. La frecuencia de infección con ETEC fue 2,3% (14/601). La toxina LT fue prevalente (85,7%, 12/14). La distribución de genes fue LT (9/14), LT+STP (3/14), STP (1/14) y STH (1/14). Este estudio demostró la presencia de ETEC en niños con diarrea. La frecuencia de infección con ETEC alcanzó 2,3% y las cepas caracterizadas presentaron uno o dos genes de toxinas. Futuros trabajos más extensos que incluyan distintas regiones serán necesarios para establecer la relevancia de la infección con ETEC en la población pediátrica de Argentina.

GMO 5

BACTERIAL DIVERSITY USING METAGENOMICS OF 16S rRNA IN THE INTESTINAL MICROBIOTA OF PATIENTS UNDER TREATMENT AGAINST *Helicobacter pylori*, LIMA – PERU

Jaramillo Valverde L.J., K. Levano Najarro, A. Vásquez Domínguez, R. García De La Guardia², S. Davison³, A. Gómez³, H. Guio Chunga. ¹INBIOMEDIC Research and Technological Development Center, Lima, Peru; ²Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú; ³Department of Animal Science, University of Minnesota, St. Paul, MN, USA. E-mail: luisjaramillovalverde@gmail.com

The intestinal microbiota (IM) is comprised of various types of symbiotic microorganisms, mainly bacteria, whose composition varies between individuals. However, the use of medications can lead to an imbalance in the IM, generating the state of dysbiosis. Based on previous studies, we hypothesized that IM bacterial diversity is affected during *Helicobacter pylori* (HP) treatment in Peruvian patients during 2020–2021. In this longitudinal study of 11 participants who completed HP treatment, we collected four stool samples for each one: 1) control (person living in the same household), 2) before treatment, 3) at the end of treatment and 4) fifteen days after treatment. DNA was extracted and 16S rRNA sequencing was performed using the Illumina MiSeq platform. We got amplicon sequence variant (ASV) using the QIIME2 packages and diversity analysis were carried out using the R software (version 4.1.1). We confirm our hypothesis because the alpha diversity (Shannon and Simpson indices) of bacteria was altered after anti-HP treatment. In the case of beta diversity, we report similar behavior in bacterial composition within the compared groups ($R^2=0.55$, $p<0.001$). Finally, we report six taxonomic families that could be significantly altered by anti-HP treatment: Bifidobacteriaceae, Lactobacillaceae, Lachnospiraceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae and Prevotellaceae. Based on our results, we propose that studying the role of altered bacterial in the composition of IM could offer strategies to improve clinical outcomes against anti-HP treatment.

GMO 6

ANÁLISIS DE LAS VARIANTES CIRCULANTES DEL VIRUS SARS-COV-2 EN LA PROVINCIA DE CORRIENTES, ENERO 2022

Sánchez D.B., G.A. Acevedo, Y.A. Giménez, R.B. Figueredo, M.F. Ferrini, M.C. Zimmermann. Laboratorio de Medicina Genómica, Facultad de Medicina, UNNE, Corrientes, Argentina. E-mail: deboriisanchez@gmail.com

Desde el inicio de la pandemia producida por el virus SARS CoV-2 hemos sido testigos de la aparición de nuevas variantes que poseen mayor transmisibilidad, evasión de la respuesta inmune y letalidad. La secuenciación genómica ha sido una herramienta esencial para comprender mejor los patrones evolutivos y de dispersión viral. A tales efectos, es de suma importancia contar con datos provinciales, permitiendo a las entidades sanitarias tomar medidas de control y prevención acorde a la problemática presentada. El objetivo de este trabajo fue describir las variantes en circulación en la provincia de Corrientes, durante el mes de enero de 2022. Para ello, se estudiaron 92 muestras de hisopado nasofaríngeo detectables para SARS CoV-2, procedentes de distintas localidades de la provincia. Las muestras clínicas se procesaron para realizar secuenciación del fragmento CDC-29 de la proteína Spike, mediante la reacción de Sanger y posterior electroforesis capilar en el Analizador genético ABI 3500. El análisis bioinformático de los datos se llevó a cabo mediante el uso de los *software* SeqScape y Allview. Es importante destacar que, en el periodo analizado, la variante Ómicron BA.1 ha sido la predominante en circulación comunitaria en la provincia, alcanzando 100% de las identificaciones en la última semana analizada. Este estudio permitió tomar acciones a nivel epidemiológico de vital trascendencia en nuestra región, ya que Corrientes cuenta con zonas fronterizas Argentina – Brasil, siendo un punto estratégico de vigilancia genómica.

GMO 7

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE TIPIFICACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Nosema ceranae*, UN PARÁSITO DE LA ABEJA

Lannutti L., J.I. Saborit, M. Florin-Christensen, L. Schnittger.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad de Morón (UM), Buenos Aires, Argentina. E-mail: llannutti@hotmail.com

Por su servicio de polinización, *Apis mellifera*, la abeja melífera europea, es de gran importancia para la producción y obtención de alimentos en todo el mundo. Uno de los patógenos más relevantes que infectan a la abeja es *Nosema ceranae*, un microsporidio intracelular obligado, agente causal de la nosemosis. Esta genera hambruna, inmunosupresión y diarrea, debilitando y comprometiendo la viabilidad de la colmena. En la actualidad, se desconoce la diversidad genética y estructura poblacional de *N. ceranae* en Argentina en relación con otras regiones geográficas. Por ello, estamos desarrollando una herramienta de tipificación multilocus, basada en SRTs (*Short Tandem Repeats*), que permita estudiar los parámetros de la población. Mediante una búsqueda bioinformática en el genoma de *N. ceranae* se identificaron 100 micro y minisatélites con repeticiones de entre 2 y 47 pb como posibles marcadores. En un primer paso, se diseñaron 46 pares de *primers* con los que se amplificaron fragmentos de hasta 600 pb a partir de ADN genómico de cinco aislamientos de *N. ceranae* de diferentes regiones climáticas de Argentina y extranjeras (Alemania, España, Hungría y Italia), para identificar polimorfismos de tamaño en los amplicones generados. Hasta el momento, se pudieron identificar siete loci potencialmente polimórficos. Además, se observó para tres de ellos la presencia de hasta cuatro bandas generadas con el mismo par de *primers*, utilizando cinco muestras diferentes, lo que podría indicar variantes alélicas en la misma colmena o bien tetraploidía de esta especie.

GMO 8

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Actinomucor elegans* LBM 239 TOLERANTE A CARBENDAZIM AISLADO DE SUELO HORTÍCOLA DE MISIONES

Belardita A., A.J. Baumann, G.V. Díaz, I.J.B. Szylak, B.V. Argüello, P.D. Zapata. Instituto de Biotecnología Misiones (InBioMis), Misiones, Argentina. E-mail: agusbelardita@gmail.com

El Carbendazim es un fungicida sistémico cuyos efectos tóxicos sobre los seres vivos se consideran una amenaza para el medio ambiente. La capacidad de tolerancia de los hongos puede ser aprovechada en estrategias biotecnológicas para mitigar sus efectos ambientales. Previamente, el grupo de investigación aisló al hongo LBM 239 de muestras de suelo hortícola de Misiones, el cual presentó tolerancia al Carbendazim a 100 ppm. El objetivo fue identificar el aislamiento LBM 239 mediante métodos moleculares utilizando los marcadores de ADN ribosomal 18S, ITS y D1/D2 28S. Se realizó la amplificación por PCR estándar con los cebadores NS1-NS4, ITS1-ITS4 y NL1-NL4, respectivamente. Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas consenso de 1005, 549 y 693 pb que fueron depositadas en el GenBank, con números de acceso MW015099, OL778828 y MW015105. Se contrastaron las secuencias obtenidas con las existentes en la base de datos del NCBI utilizando la herramienta Blastn. El alineamiento por pares arrojó un 99,65% de identidad con secuencias reportadas de *Actinomucor elegans*. Además, se realizó la reconstrucción de árboles filogenéticos a partir de las secuencias concatenadas de dichos marcadores utilizando como referencia los árboles presentados en Nguyen *et al.* (2017). El aislamiento LBM 239 se agrupó con secuencias de *A. elegans*, con un valor de bootstrap de 100. De esta manera, se confirmó la identidad específica del aislamiento LBM 239 como *A. elegans*. La identificación correcta de hongos a nivel de especie es primordial para su potencial aplicación biotecnológica en el ambiente.

GMO 9

COLONIZACIÓN RADICAL DE PLANTINES DE YERBA MATE POR CEPAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Boycho M.E., I.J. Cortese, A.L. Onetto, M.L. Castrillo, M.E. Laczeski. Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Biotecnología Misiones "Dra. María Ebe Reca" (InBioMis), Misiones, Argentina. E-mail: boychomarisa@gmail.com

En ensayos previos el grupo de trabajo aisló dos cepas de *Bacillus altitudinis* de plantines de yerba mate en la provincia de Misiones y las seleccionó por sus propiedades para promover el crecimiento vegetal *in vitro* y en vivero. El objetivo del presente ensayo fue comprobar la colonización de las raíces de plantines de yerba mate por *B. altitudinis* T5S-T4 y *B. altitudinis* 19RS3. Para ello se realizaron tres tratamientos que consistieron en *B. altitudinis* T5S-T4, *B. altitudinis* 19RS3, la combinación de ambas cepas y un control negativo. Para cada cepa, se realizó una suspensión bacteriana con una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Se realizó la desinfección superficial de las raíces de cuatro plantines de yerba mate orgánicos y se las sumergió en 30 ml de cada suspensión bacteriana durante 48 h en cámara de germinación. Se lavaron las raíces con agua destilada estéril y se realizó la extracción de ADN, utilizando un kit comercial. La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, utilizando cebadores cepa específicos diseñados previamente y una temperatura de hibridación de 56° C. Se detectó la cepa *B. altitudinis* T5S-T4 tanto en el tratamiento individual como en el combinado, sin embargo, la cepa *B. altitudinis* 19RS3 no se identificó bajo el límite de detección ensayado. No se obtuvieron amplificaciones para el control negativo. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de *B. altitudinis* T5S-T4 para colonizar casi inmediatamente las raíces de los plantines de yerba mate. Esta característica la convierte en una buena candidata para su futura aplicación como biofertilizante.

GMO 10

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE ESPECIES DE *Diaporthe* ASOCIADAS AL CANCRO DEL TALLO DEL GIRASOL (CTG)

Mancebo M.F.¹, M.E. Bazzalo¹, R.J. Reid¹, A. Zambelli². ¹Advanta Semillas, Balcarce, Argentina; ²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata-CONICET, Balcarce, Buenos Aires, Argentina. E-mail: andres.zambelli@mdp.edu.ar

El cancro del tallo del girasol (CTG) por *Diaporthe* es una enfermedad de creciente relevancia debido al aumento sostenido de su prevalencia en la principal zona girasolera argentina. Usualmente los hongos causales del CTG se identificaron por las características morfológicas del cultivo *in vitro*, aunque este criterio puede llevar a errores. Por ello se recomienda la complementación con filogenias basadas en secuencias génicas. Un relevamiento en lotes de girasol de la región pampeana sur permitió coleccionar 187 aislados fúngicos obtenidos de plantas con síntomas de CTG los que se cultivaron *in vitro*. A partir de aislados representativos de cada grupo morfológico se obtuvieron secuencias parciales de los loci ITS (*nuclear ribosomal internal transcribed spacer*), β -tubulina y EF1- α (*translation elongation factor 1- α*), se alinearon con secuencias homólogas de distintas especies de *Diaporthe* disponibles en GenBank y se construyeron árboles por el método de máxima verosimilitud. La reconstrucción filogenética con cada locus individual mostró algunas diferencias menores en los agrupamientos, dependiendo de las tasas evolutivas o sea de si se trata de secuencias codificantes (β -tubulina y EF1- α) o no (ITS). A su vez se trabajó con los tres loci concatenados. El análisis filogenético combinado con la morfología *in vitro* sugiere la existencia de seis especies asociadas a CTG: *D. helianthi*, *D. gulyae*, *D. caulivora*, *D. sojae*, *D. kongii* y *D. longicolla*. El desarrollo de métodos de PCR específicos para los loci de estudio puede constituir una herramienta útil para el diagnóstico y el seguimiento epidemiológico de CTG.