

***Streptococcus agalactiae*, medios de conservación accesibles a laboratorios de diagnóstico de baja y mediana complejidad**

***Streptococcus agalactiae* and accessible conservation means for diagnostic laboratories of low and medium complexity**

Bqca. Margarita Ester Laczeski, Lic. Esp. Eduardo Raúl Pegels, MSc. Patricia Noemí Oviedo, Dra. C. Marina Inés Quiroga, MSc. Marta Inés Vergara

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones (FCEQyN UnaM). Misiones, Argentina.

RESUMEN

Introducción: Si bien *Streptococcus agalactiae* es comensal del tracto gastrointestinal y genitourinario, es la principal causa de enfermedades invasivas y de mortalidad en niños recién nacidos. La infección puede adquirirse a través de la aspiración de líquido amniótico infectado o durante el paso por el canal de parto.

Objetivos: comparar la utilidad de diversos métodos de conservación de cepas de *Streptococcus agalactiae* que resulten reproducibles, accesibles a laboratorios de baja y mediana complejidad, y asegurar su estabilidad fenotípica y genotípica mediante el método de preservación llamado subcultivo continuo, para el mantenimiento del cultivo en medio adecuado con transferencias a medio fresco a intervalos variables.

Métodos: Se seleccionaron al azar 40 cepas de *Streptococcus agalactiae*, las que se sometieron a verificación de viabilidad, pureza y caracterización fenotípica y genotípica antes y después de ser sometidas a conservación, utilizando idénticos medios, reactivos y metodología en ambas circunstancias. Se probaron diferentes medios de preservación de las cepas, que permitieran a laboratorios de baja y mediana complejidad su traslado a centros especializados para la vigilancia adecuada del organismo. Las cepas se conservaron durante nueve meses con subcultivos que mostraron las características originales.

Resultados: Los medios más efectivos fueron ATS-TA y LD 4 %-SO-20 °C, ya que *garantizaron viabilidad, pureza y estabilidad fenotípica y genotípica de las cepas*. Se demostró que el uso de este medio es una alternativa adecuada para la conservación de *Streptococcus agalactiae* en laboratorios donde la liofilización y la desecación no están disponibles y que son de bajo costo, rápidos y muy fáciles de usar en la práctica habitual.

Conclusiones: los medios ATS-TA y LD 4 %-SO-20 °C constituyen una buena alternativa para cortos períodos de preservación y transporte de cepas de *Streptococcus agalactiae* en laboratorios de baja y mediana complejidad.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*, conservación.

ABSTRACT

Introduction: Although *Streptococcus agalactiae* is commensal of the gastrointestinal and genitourinary tract, it is the main cause of invasive diseases and mortality in newborns. The infection can be acquired through the aspiration of infected amniotic fluid or during the passage through the birth canal.

Objectives: to compare the effectiveness of various methods for the conservation of *Streptococcus agalactiae* strains that can be reproducible and accessible to laboratories of low and medium complexity and guarantee their phenotypic and genotypic stability through a preservation method called continuous subculture, for the maintenance of the culture in an adequate environment with fresh medium transfers at variable interval periods.

Methods: 40 strains of *Streptococcus agalactiae* were randomly selected, which were subjected to verification of viability, purity and genotypic and phenotypic characterization before and after being subjected to conservation, using identical environments, reactive and methodologies in both circumstances. Different means of preservation of strains were tested, which allowed laboratories of low and medium complexity their transfer to specialized centers for the proper surveillance of the organism. The strains were kept for nine months with subcultures that showed original characteristics.

Results: The most effective environments were ATS-TA and LD-4 % -SO-20 °C because they guaranteed viability, purity and genotypic and phenotypic stability of the strains. It was shown that the use of this environment is an adequate alternative for the conservation of *Streptococcus agalactiae* in laboratories where lyophilization and dessication are not available and are low cost, fast and very easy to use in regular practice.

Conclusions: The ATS-TA and LD-4 % -SO-20 °C environments are a good alternative for short periods of preservation and transportation of *Streptococcus agalactiae* strains in laboratories of low and medium complexity.

Key words: *Streptococcus agalactiae*, conservation.

INTRODUCCIÓN

Streptococcus beta hemolítico del grupo B de Lancefield, *Streptococcus agalactiae*, constituye parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal y urogenital humano, el cual adquiere relevancia en las gestantes a término, por la posibilidad de transmisión vertical al recién nacido, siendo una importante fuente de morbimortalidad perinatal.

Esta severa enfermedad puede prevenirse con un diagnóstico simple en la embarazada con edad gestacional entre 35 37 semanas para investigar *Streptococcus agalactiae*,^{1,2} y mediante la instauración de la profilaxis intraparto

(PIP) en aquellas colonizadas y/o con factores de riesgo, únicos recursos disponibles, en ausencia aún de vacunas. La implementación de dichas recomendaciones ha redundado en un significativo descenso de la enfermedad neonatal en aquellos países que las han adoptado.³

En Argentina, desde abril del año 2008 "la obligatoriedad de la realización de la búsqueda de *Streptococcus agalactiae* en todas las embarazadas con edad gestacional entre las semanas 35 y 37, presenten o no condiciones de riesgo, está reglamentada por la Ley No. 26.369 para todo el Territorio Nacional".⁴ Esto condujo a su búsqueda sistematizada en los centros de salud.

Una característica de las cepas de *Streptococcus agalactiae* es que la mayoría de los genes asociados a la virulencia codifican proteínas necesarias para la interacción celular huésped bacteria. Se han descrito variaciones geográficas, temporales y étnicas en la distribución de dichos genes.³

La penicilina es la droga de elección para la PIP. Se describieron cepas resistentes a eritromicina (ERI) y clindamicina (CLI), drogas recomendadas en gestantes alérgicas a β -lactámicos. Existen variaciones regionales en la resistencia a ERI y CLI, en diversos países, aún fronterizos y dentro de un mismo país, variaciones asociadas a las políticas en el uso de antimicrobianos.⁵⁻⁷ Es necesario mantener la vigilancia de biotipos, fenotipos y genotipos, con sus variaciones geográficas, temporales y étnicas, con el fin de colaborar en diversas estrategias como PIP y construcciones vacunales.

Por lo expuesto, en general los diversos comportamientos de muchos microorganismos hacia y en el hombre en distintos tiempos y regiones geográficas, hacen necesarios estudios cada vez más complejos para mejorar diagnósticos que sean útiles en tiempo y forma y aportar a la prevención.

Por todo esto es necesario mejorar los medios a utilizar para la conservación y transporte de cepas de *Streptococcus agalactiae* que aseguren viabilidad y estabilidad fenotípica y genotípica y que sean además accesibles a laboratorios de diagnóstico clínico, con el fin de posibilitar estudios ulteriores.

La liofilización y la criopreservación se emplean en la actualidad para la conservación de cultivos durante prolongados períodos de tiempo y son métodos de elección que aseguran la viabilidad, pureza y estabilidad de las cepas. Cuando no existen los recursos necesarios para su utilización, deben buscarse alternativas de preservación más económicas.⁸

Este estudio estuvo dirigido a comparar la utilidad de diversos métodos de conservación de cepas de *Streptococcus agalactiae* que resulten reproducibles, accesibles a laboratorios de baja y mediana complejidad, y asegurar estabilidad fenotípica y genotípica de estas mediante el método de preservación llamado subcultivos continuos, consistente en el mantenimiento del cultivo en medio adecuado con transferencias a medio fresco a intervalos variables.

MÉTODOS

Se seleccionaron al azar 40 cepas de *Streptococcus agalactiae*, las que se sometieron a verificación de viabilidad, pureza y caracterización fenotípica y genotípica antes y después de ser sometidas a conservación, con el uso de

idénticos medios, reactivos y metodología en ambas circunstancias. Antes de ser inoculadas se realizaron las siguientes pre-pruebas:

- *Pureza, viabilidad y cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)*: se investigó sembrando un inóculo representativo de cada cepa en placas de agar sangre ovina.

- *Caracterización fenotípica*: se realizaron determinaciones bioquímicas convencionales y serológicas de grupo y serotipo utilizando el kit comercial (*Phadebact Strep B Test- ETC internacional-Bactus AB Sweden*) y el test de aglutinación provisto por *Statens Serum Institut (Strep- B.Latex. Copenhagen S. Denmark)*, que contiene 10 serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX).

- *Caracterización genotípica*: se efectuó la extracción de ADN procariota a partir de cultivo bacteriano en medio líquido y detección de los genes utilizando PCR según técnica de J. Sambrook.^{9,10} Se estudiaron los genes de virulencia: *bac* (5´TGTAAGGACGATAGTGTGAAGAC3´) Gene Bank AB221536, *rib* (5´CAGGAAGTGCTGTTACGTTAAAC3´) Gene Bank U58333 y *lmb* (5´GACGCAACACACGGCAT3´) Gene Bank AF062533, sintetizados por *Operon Molecules for Life* (EE.UU.).

MEDIOS Y CONDICIONES DE USO

Caldo tripticasa soya (Laboratorios Britania-Argentina) con glicerina al 15 % a -20 °C (CTS +15 % Glic-20 °C), agar columbia (Laboratorios Britania) semisólido (0,7 % de agar) a temperatura ambiente y resguardo de luz (AC TA), agar columbia semisólido (0,7 % de agar) a 4 °C (AC 4 °C), agar tripticasa soya semisólido a temperatura ambiente y resguardo de luz (ATS TA), agar tripticasa soya semisólido a 4 °C (ATS 4 °C), caldo Todd-Hewitt (Laboratorios Britania) semisólido (0,7 % de agar) a temperatura ambiente y resguardo de luz (CTH TA), caldo Todd-Hewitt semisólido a 4 °C (CTH 4 °C), leche descremada al 4 % con 300 µL de sangre ovina origen comercial (HEMO-G, Argentina), a -20 °C (LD 4 % - SO 20 °C).

Se distribuyó un volumen de 5 mL medidos con pipeta de doble aforo en frascos de vidrio de igual tamaño y capacidad (7 mL). Luego de las pre-pruebas a las que se sometieron las cepas se sembraron en los medios de conservación antes mencionados. Para esto, manteniendo el inóculo constante, se preparó una suspensión equivalente al No. 1 de la escala de MacFarland, y se transfirieron 100 µL a cada medio a estudiar.

A los 3, 6 y 9 meses de la siembra inicial, se transfirió una ansada de cada uno de los distintos medios de conservación a placas de agar sangre ovina para evaluar viabilidad y pureza y cuantificación de las UFC.

POS-PRUEBAS

Viabilidad, pureza, cuantificación y caracterización fenotípica: se tomó de cada frasco un inóculo de 5 µL de cultivo microbiano, el cual se transfirió a placas de agar sangre ovina mediante siembra cuantitativa y se realizó la caracterización fenotípica. Las placas se incubaron durante 24 hs a 37 °C en atmósfera de CO₂ y se realizó la cuantificación de las UFC obtenidas, las que se reinsubieron por otras 24 hs con el fin de proceder a un nuevo recuento. Para la cuantificación se

consideró solo a las colonias de *Streptococcus agalactiae* obtenidas en estado de pureza, en cada medio, temperatura y atmósfera estudiado.

Caracterización genotípica: se seleccionaron al azar 20 cepas de las 40 estudiadas en la pre-prueba. Se investigaron nuevamente los genes: *bac*, *lmb* y *rib*.

RESULTADOS

PRE-PRUEBA

La pureza, viabilidad, cuantificación de las UFC y caracterización fenotípica y genotípica de las 40 cepas se logró con 100 % de confiabilidad.

POS-PRUEBA

Se obtuvieron idénticos resultados en pureza, viabilidad, cuantificación de las UFC y caracterización fenotípica de las 40 cepas. No se produjo contaminación ni cambios morfológicos de las bacterias ni de las colonias.

La caracterización genotípica en las 20 cepas seleccionadas fue exitosa con la detección de los genes estudiados, manteniéndose la expresión genética. La figura muestra el rendimiento de los medios ensayados.

DISCUSIÓN

Si bien el método de preservación de cepas llamado "de subcultivos continuos" varía según composición de los medios de conservación, condiciones de temperaturas, ambientes y tiempos de mantenimiento de cultivos, es condición fundamental que las cepas a preservar se encuentren en condiciones óptimas de crecimiento, ya sea en fase exponencial tardía o en fase estacionaria temprana como forma de asegurar títulos adecuados de los microorganismos y su viabilidad. De hecho, la elección de un medio de preservación a usar es tan importante como las condiciones en las cuales se mantendrá dicha preservación.

Es conocido el concepto de que para la conservación de una cepa de *Streptococcus*, las bajas temperaturas (-20 °C) y el agregado de suero hacen un excelente medio, pero son numerosos los laboratorios de diagnóstico clínico a los que les resulta onerosa esa posibilidad. Por eso decidimos ensayar diversos medios con la modificación de temperaturas y condiciones de mantenimiento, para una adecuada conservación de las cepas de *Streptococcus agalactiae*, que posibilite a laboratorios de baja y mediana complejidad un transporte ágil, adecuado y exitoso a los centros especializados.

El método de conservación a elegir, cualquiera que sea la cepa microbiana en cuestión, debe garantizar no solo la supervivencia en un buen porcentaje de esta, sino también que la población mantenga sus características fenotípicas y genotípicas.

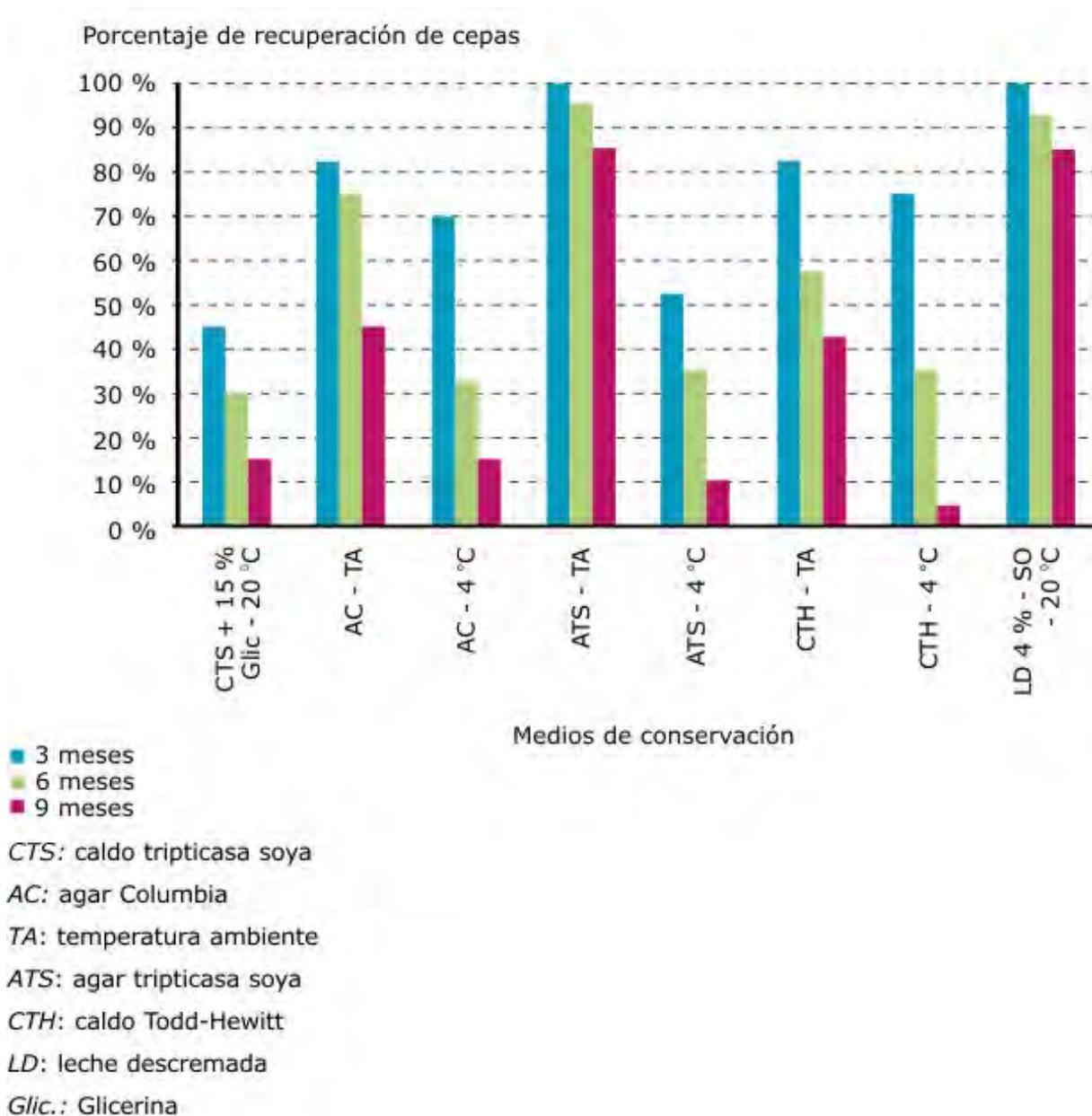


Fig. Rendimiento individual de los medios de conservación a los 3,6 y 9 meses.

Es de esperar que al menos las propiedades que los hacen importantes se mantengan inalterables, considerando las posibilidades técnicas y económicas disponibles y el tiempo necesario para el mantenimiento de las cepas para su transporte entre laboratorios o para ser utilizadas con fines educativos. De todo esto surge la necesidad de mantener un registro sistematizado de los medios y métodos de preservación de *Streptococcus agalactiae*.

Del análisis de estos resultados, el mayor rendimiento en la conservación de las cepas de *Streptococcus agalactiae* se obtuvo con los medios de ATS TA y LD 4 % - SO - 20 °C, lo que concuerda con otros autores, quienes consideran que la conservación a temperatura ambiente y -20 °C¹¹ resulta satisfactoria.¹²

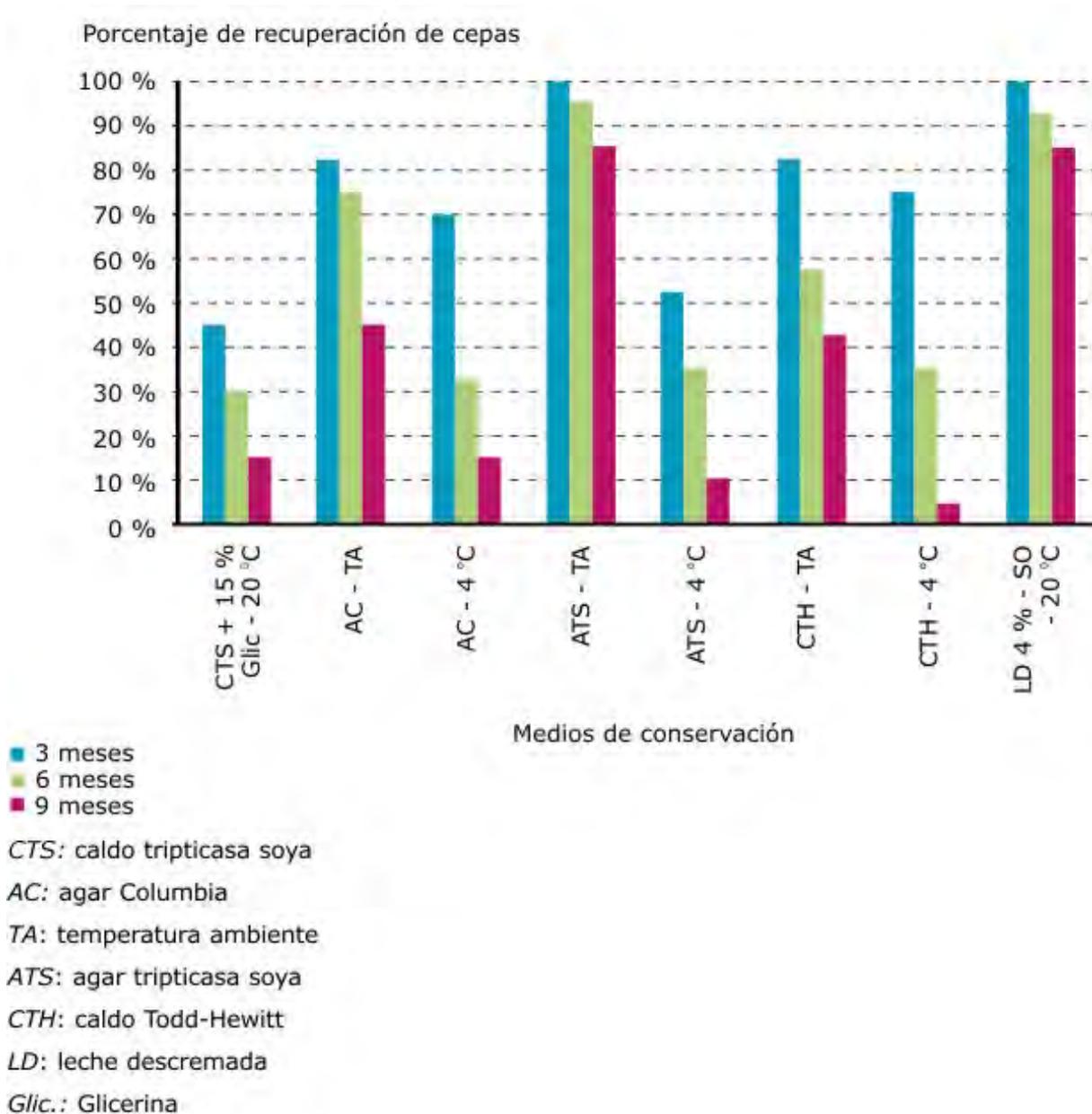


Fig. Rendimiento individual de los medios de conservación a los 3,6 y 9 meses.

Existen diversas publicaciones relativas al tema que sugieren diversos medios y condiciones para la preservación, aun para diferentes microorganismos y para diversos fines, incluidos los industriales.¹³⁻²¹

Investigadores como *George Siberry KN* y otros,²² quienes trabajan con microorganismos del género *Streptococcus* (*S. pneumoniae*), sugieren que, independientemente del medio utilizado, los cultivos mantenidos a -20 °C dejan de ser viables al cuarto mes, lo que discrepa con los resultados mostrados en este estudio.

La recuperación de microorganismos viables fue del 100 % para ambos medios de conservación, ATS TA y LD 4 % - SO -20 °C, a los tres meses, con lo que se logró una recuperación del 85 % a los nueve meses del estudio, por lo que se recomiendan ambos para el mantenimiento de cepas de *Streptococcus agalactiae* y

se aconseja un repique cada tres meses para asegurar el 100 % de viabilidad y pureza de cepas.

No se incluyó la conservación a 70 °C, que demostró ser la mejor alternativa de conservación en trabajos realizados por *R Borrero Maura*,¹⁸ *KN George Siberry*,²² entre otros, y por nuestro grupo de trabajo de la Cátedra de Bacteriología (realizado en estudios con otros fines), por tratarse de una metodología no accesible a laboratorios de baja y mediana complejidad.

Los otros medios de conservación estudiados evidencian una pérdida importante de viabilidad, ya en los tres primeros meses, y una marcada disminución de esta hacia los nueve meses de estudio, por lo que, según nuestra experiencia, no son apropiados para la conservación de este microorganismo.

Autores, como *C. Dauval Borges*,¹¹ concuerdan en que el caldo Todd Hewitt semisólido con agregado de levadura puede ser una alternativa de conservación hasta los cien días con el 90 % de probabilidad de supervivencia.

En el presente estudio la evaluación a los tres meses de CTH TA muestra una recuperación del 82,5 % de viabilidad. Todos los medios de preservación estudiados, excepto los dos recomendados (ATS TA y LD 4 % -SO -20 °C), tienen una recuperación menor del 50 % a los nueve meses de estudio.

Al evaluar el parámetro temperatura, se observa que *Streptococcus agalactiae* se conserva mejor a temperatura ambiente que a 4 °C, independientemente del medio estudiado, y a 20 °C en leche descremada al 4 % con agregado de 300 µL de sangre ovina.

De acuerdo con nuestra experiencia no se recomienda la conservación en heladera, conclusión esta que concuerda con otros estudios que sugieren la conservación de estreptococos a temperatura ambiente y resguardo de la luz,¹⁷ pero discrepa con otras publicaciones que refieren a la conservación a 4 °C como una alternativa viable.¹⁵

La congelación es un proceso que, si bien genera estrés a las células vivas, estado este transitorio, se convierte en una alternativa útil para la conservación de microorganismos bacterianos, como ocurriera en nuestro caso con las temperaturas de 20 °C.¹⁴

El medio de menor recuperación de *Streptococcus agalactiae* desde el inicio del estudio, y por lo tanto el menos recomendado en esta investigación, es CTS + 15 % Glic -20 °C, lo que concuerda con *M. Floccar*⁸ "por la disminución del metabolismo y la inhibición de la velocidad de crecimiento de las bacterias por la falta de oxígeno", pero discrepa con otros autores que sugieren al glicerol como crioprotector necesario, al "simular una vitrificación alrededor de la bacteria", protegiendo las membranas citoplasmáticas.^{13,14,23}

La recomendación de dos medios de conservación diferentes concuerda con lo establecido por la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC), en sus guías generales, la cual enuncia que, por seguridad y para minimizar la probabilidad de pérdida de las cepas, cada una debe ser mantenida por al menos dos procedimientos diferentes.²⁴

Si bien generalmente los métodos de conservación más recomendados para períodos prolongados de tiempo son la criopreservación y la liofilización,^{8,15} los resultados de esta investigación sugieren que ATS TA y LD 4 % - SO -20 °C

resultan apropiados para la conservación y transporte de cepas de *Streptococcus agalactiae*, ya que a las ventajas de su sencilla elaboración se suman el manejo y las condiciones de almacenamiento de fácil implementación en laboratorios de limitados recursos.

Se concluye que, teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y la relación costo-beneficio, los medios ATS TA y LD 4 % - SO -20 °C pueden ser recomendados como una buena alternativa a ser usada para cortos periodos de preservación y transporte de cepas de *Streptococcus agalactiae* en laboratorios de baja y mediana complejidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schrag S, Gorwitz K, Fultz-Butts. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports. 2002;51(11):1-22.
2. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC, 2010. MMWR Recomm Rep. 2010;59 (RR-10):1-36.
3. Brimil N, Barthell E, Heindrichs U, Kuhn M, Lütticken R, Spellerberg B. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. Int J Med Microbiol. 2006;296:39-44.
4. Ley Nacional N° 26.369/2008. Examen obligatorio de detección de estreptococo Grupo B *Agalactiae*, a embarazadas. Boletín Oficial del 7 de Mayo de 2008 [Internet]. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud; 2011 [citado 17 mar 2012]. Disponible en: <http://www.sogiba.org.ar/novedades/novedades06.htm>
5. Pegels E, Quiroga M, Oviedo P, Pereyra E, Galloso P, Vergara M. Caracterización fenotípica de resistencia a macrólidos en *Streptococcus agalactiae*: primer estudio en misiones. Rev Cienc Tecnol. 2008;10a:811.
6. Quiroga M, Pegels E, Oviedo P, Laczeski M, Vergara M. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Misiones, Argentina. En: Méndez Vilas A, editor. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz, España: Formatex Research Center; 2011.
7. Pérez J, Limansky A, Toresani I, Ebner G, Di Bartolomeo S, De Inocente I, et al. Distribución de tipo capsular y sensibilidad a antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* productores de infecciones en Argentina. Rev Arg Microbiol. 2004;36(2):637.
8. Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. Rev Arg Microbiol. 1998; 30:42-51.
9. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.

10. Cariaga Martínez AE, Zapata PD. Protocolos de Extracción de ADN. En: El laboratorio de Biología Molecular. Edición ampliada. Misiones, Argentina, Editorial Universitaria de Misiones, 2007. p. 2339.
11. Dauval Borges C, Urdanivia Cruz MO, Herrera Alonso F. Ensayo de un medio de cultivo para conservación y transporte de estreptococo. Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]. 2002 [citado 8 enero 2012];40(1):26-30.
Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032002000100005&lng=es
12. Weng Alemán Z, Junco Díaz RA, Díaz Rosa OE, Álvarez Molina I, Beltrán Díaz JR, Rodríguez Salazar MC. Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]. 2005 [citado 8 enero 2013];43(2).
Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032005000200005&lng=es
13. García MD, Uruburu F. La conservación de cepas microbianas. Actualidad SEM. 2000;30:12-6.
14. Sánchez Leal LC, Corrales Ramírez LC. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Nova Publicación Científica. 2005;3(4):21-9.
15. Brahmadathan KN, Pandian R, Koshi G. Long-term preservation of streptococci. Indian J Med Res. 1996;101:645.
16. Brahmadathan KN. Preservation of *Streptococcus pneumoniae* by sand desiccation. Indian J Med Microbiol. 1998;16:17980.
17. Wasas AD, Huebner RE, Blanche M, Klugman KP. Long-term survival of *Streptococcus pneumoniae* at room temperature on dorset egg medium. J Clin Microbiol Internet]. 1998 [cited 8 Jan 2012];36(4):113940. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC104708/>
18. Borrero Maura R, González Rodríguez A, del Puerto Sardiñas C, Batista Santiesteban N, Valdés Abreu Y. Conservación de cepas vacunales de *Leptospira* a -70 °C. Rev Cubana Med Trop [Internet]. 2006 [citado 8 enero 2012];58(1).
Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602006000100009&lng=es
19. Hunt GA, Gourevitch A, Lein J. Preservation of Cultures by Drying on Porcelain Beads. J Bacteriol. 1958;76(4):453-4.
20. Grivell AR, Jackson JF. Microbial Culture Preservation With Silica Gel. J Gen Microbiol. 1969; 58:423-5.
21. Uzunova-Doneva T, Donev T. Anabiosis and conservation of microorganisms. J Culture Collections. 2004-2005;4:17-28.
22. Siberry KN, Brahmadathan RP, Lalitha MK, Steinhoff MC, John TJ. Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. Bulletin of the World Health Organization 2001;79(1):43-7.

23. Hubalek Z. Review. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Criobiology*. 2003;46:205-29.

24. Weng Alemán Z, Esther Díaz RO, Álvarez Molina I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Rev Cubana Hig Epidemiol* [Internet]. 2005 [citado 8 enero 2013];43(3).

Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032005000300006&lng=es

Recibido: 15 de mayo de 2012.

Aprobado: 20 de agosto de 2012.

Lic. *Margarita Ester Laczeski*. Universidad Nacional de Misiones (FCEQyN UnaM). Mariano Moreno 1375, Posadas, Misiones Argentina. C.P. 3300LQH. Correo electrónico: mlaczeski@gmail.com