



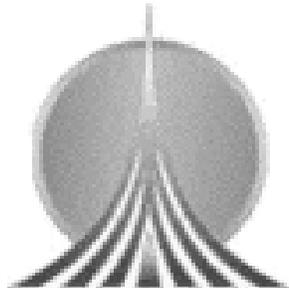
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A
LARGO PLAZO PARA BACTERIAS MICROAEROFÍLICAS
ESTRICTAS DE IMPORTANCIA MÉDICA**

**T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
MAGNOLIA JIMÉNEZ RODRÍGUEZ**

UNAM
FES
ZARAGOZA



**Q.B.P. EVERARDO ESCAMILLA AVILÉS
DIRECTOR DE TESIS**

**Q.B.P. JOEL SAUCEDO CONSTANTINO
ASESOR**

LO HUMANO, EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Sabiendo que no existirá una forma de agradecer toda una vida de sacrificios y esfuerzos quiero que sientan que la meta lograda, también es suya y que la fuerza que me ayudo a conseguirla fue su apoyo, confianza y amor, con todo mi cariño, admiración y respeto,

dedico esta tesis a mis padres

Margarita Lucia Rodríguez Carbajal
Guilebaldo Jiménez García

A mis hermanos

Por apoyarme en todo momento y estar siempre conmigo:

Antonio Jiménez Rodríguez

Hermenegildo Jiménez Rodríguez

Manuel Jiménez Rodríguez

Arcelia Ortiz Pérez

Ramón Jiménez Rodríguez

José Angel Jiménez Rodríguez

Fernando Jiménez Rodríguez

A todas mis amigas y amigos
que siempre me motivaron a seguir adelante

Agradecimientos

A la Dra. en C Patricia Isidra Cauich Sánchez
y al M. en C. Everardo Nazario Escamilla Avilés;
por compartirme sus experiencias sobre el tema
y por su valiosa colaboración, puesto que fueron
de gran importancia durante el desarrollo experimental,
así como también por su dedicación y paciencia al
revisar mi trabajo, enriqueciendo con sus conocimientos
el contenido de esta tesis

A mis mis profesores
Q.B.P. Joel Saucedo Constantino
Q.F.B. José Oscar González Moreno
Por su valiosa enseñanza
Por su paciencia y dedicación para
revisar mi trabajo enriqueciendo
con sus conocimientos el contenido
de esta tesis

A mi sinodal, Q.B.P. Dora Alicia Pérez González, por sus valiosos
comentarios y paciencia al revisar esta tesis

A Everardo Escamilla Avilés por la oportunidad de
trabajar bajo su dirección,
por compartir conmigo sus conocimientos,
por su paciencia y apoyo;
pero por sobre todas las cosas por su gran amistad

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional

Asesora Externa:
Dra. en C Patricia Isidra Cauich Sánchez

JURADO

Presidente: Q.B.P. Joel Saucedo Constantino

Vocal: Q.B.P. Everardo Escamilla Avilés

Secretario: Q.B.P. Dora Alicia Pérez González

Suplente: Q.F.B. José Oscar González Moreno

Suplente: Dra. en C Patricia Isidra Cauich Sánchez

**EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A LARGO
PLAZO PARA BACTERIAS MICROAEROFÍLICAS ESTRICTAS DE
IMPORTANCIA MÉDICA**

INDICE	páginas
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1.0. MARCO TEÓRICO	5
1.0.0. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN PARA CEPAS MICROBIANAS	5
1.1.0. Conservación por congelación	5
1.1.1. Agentes crioprotectores	10
1.2.0. Conservación por Liofilización	13
1.2.1. Congelación	19
1.2.2. Secado primario	23
1.2.3. Secado Secundario	25
1.3.0. Métodos opcionales de conservación	26
1.3.1. Conservación por transferencia periódica	26
1.3.2. Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril	28
1.3.3. Métodos restringidos	28

2.0. ANTECEDENTES DE LOS MICROORGANISMOS DE ESTUDIO	31
2.1.0. <i>Campylobacter jejuni</i>	31
2.1.1. Morfología y fisiología	32
2.1.2. Epidemiología	33
2.1.3. Patogenia	34
2.1.4. Identificación en el laboratorio y conservación	36
2.1.5. Manifestaciones clínicas	38
2.2.0 <i>Helicobacter pylori</i>	39
2.2.1. Morfología y fisiología	40
2.2.2. Epidemiología	40
2.2.3. Patogenia	41
2.2.4. Identificación en el laboratorio y conservación	42
2.2.5. Manifestaciones clínicas	44
2.3.0. <i>Haemophilus influenzae</i>	45
2.3.1. Morfología y fisiología	46
2.3.2. Epidemiología	46
2.3.3. Patogenia.	47
2.3.4. Identificación en el laboratorio y conservación	48
2.3.4.1. Características de su cultivo	48
2.3.4.2. Requerimientos nutricionales	49
2.3.5. Manifestaciones clínicas	51
2.4.0. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	52
2.4.1. Morfología y fisiología	52
2.4.2. Patogenia	53
2.4.3. Epidemiología	54
2.4.4. Identificación en el laboratorio y conservación	56
2.4.5. Manifestaciones clínicas	58

3.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	60
4.0. OBJETIVO	60
5.0. HIPÓTESIS	61
6.0. POBLACIÓN DE ESTUDIO	61
7.0. MATERIAL	61
7.1. Equipo	62
7.2. Medios de cultivo y reactivos	62
8.0. MÉTODO	63
8.1. Medios y condiciones de cultivo	63
8.2. Caracterización de las cepas de referencia	64
8.3. Preparación de los soportes y suspensiones bacterianas	68
8.3.1. Congelación.	
Preparación de las mezclas crioprotectoras	68
8.3.2. Liofilización. Preparación de los soportes	70
8.4. Recuento de viables en superficie. Método de Miles y Misra	73
9.0. RESULTADOS	76
9.1. Método de congelación a – 70°C	76
9.1.1. <i>Campylobacter jejuni</i>	76
9.1.2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	77
9.1.3. <i>Haemophilus influenzae</i>	78
9.1.4. <i>Helicobacter pylori</i>	79
9.2. Método de liofilización	80
9.2.1. <i>Campylobacter jejuni</i> almacenado a 4°C	80
9.2.2. <i>Campylobacter jejuni</i> almacenado a temperatura ambiente	81

9.2.3. <i>Haemophilus influenzae</i> almacenado a 4°C	82
9.2.4. <i>Haemophilus influenzae</i> almacenado a temperatura ambiente	83
9.2.5. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> almacenada a 4°C	84
9.2.6. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> almacenada a temperatura ambiente	85
9.2.7. <i>Helicobacter pylori</i> liofilizado	86
10.0. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	87
11.0. CONCLUSIONES	97
12.0. PROPUESTA	98
REFERENCIAS	99

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO PARA BACTERIAS MICROAEROFÍLICAS ERICTAS DE IMPORTANCIA MÉDICA

RESUMEN

Se evaluaron dos métodos de conservación a largo plazo: A) congelación a -70°C y B) liofilización para *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* en el primer caso en el que se usaron como crioprotectores las combinaciones: 1) caldo tioglicolato – glicerol 15% – sangre de carnero desfibrinada 50%; 2) caldo tioglicolato – glicerol 15% – albúmina bovina 0.5%; y 3) caldo tioglicolato – glicerol 15%; se observó una buena recuperación con el soporte compuesto por caldo tioglicolato – glicerol 15% – sangre de carnero desfibrinada 50% para las cuatro especies bacterianas; mientras la conservación por liofilización en la que se utilizaron los soportes: 1) suero de caballo–m–inositol 5% – sangre de carnero desfibrinada 0.5% y 2) leche descremada 5%–m–inositol 5%–sangre de carnero desfibrinada 0.5% se observó buena recuperación de *Campylobacter jejuni* y *Haemophilus influenzae* con el soporte compuesto por leche descremada 5%–m–inositol 5%–sangre de carnero desfibrinada 0.5% almacenados a 4°C y a temperatura ambiente a diferencia de *Neisseria gonorrhoeae* que se observó mejor recuperación con las mismas condiciones de almacenamiento solo con el soporte formado por suero de caballo–m–inositol 5% – sangre de carnero desfibrinada 0.5%. Este estudio mostró que para *Helicobacter pylori* ninguno de los soportes utilizados fue satisfactorio, puesto que no se recuperó de ninguno de los liofilizados.

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO PARA BACTERIAS MICROAEROFÍLICAS ESTRUCTAS DE IMPORTANCIA MÉDICA

INTRODUCCIÓN

El empleo de bacterias es de gran importancia para el desarrollo de la investigación médica, la industria y la docencia, tan es así, que desde 1880¹ han existido investigadores e instituciones que se han dedicado al cuidado, mantenimiento y conservación de cepas bacterianas².

Louis Pasteur, fue el primer poseedor de una colección de cepas microbianas, él dio a conocer el primer medio semisintético líquido para el desarrollo bacteriano. El primer medio sólido fue descrito por Robert Koch, él empleó la superficie de una papa cocida para aislar colonias puras, también utilizó gelatina y suero para solidificar los medios. La introducción de medios sólidos por Koch, permitió el aislamiento y caracterización de las bacterias.

Con el tiempo, se desarrollaron procedimientos para almacenar microorganismos durante muchos meses y hasta varios años, empleando métodos diversos como congelación, inmersión bajo capa de aceite, conservación al alto vacío, liofilización etc. pero siempre hubo mutaciones y eventualmente pérdida del cultivo³.

Los datos de muchos criobiologistas comenzaron la era moderna de la criobiología, desde el descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol por Polge, Smit y Parkes en 1949. Desde entonces los agentes crioprotectores marcan un descubrimiento, al ser usados para asegurar la sobrevivencia de innumerables sistemas después de almacenarse a bajas temperaturas estabilizadas⁴.

Al inventarse la técnica de liofilización, en la cual las células se congelan bruscamente a -50°C y simultáneamente se deshidratan, se obtuvo un método en el que la mayoría de las células se mueren por ruptura y las que sobreviven permanecen deshidratadas. Al añadir medio de cultivo líquido a las células deshidratadas y colocarlas a una temperatura y en condiciones de atmósfera adecuadas las células comienzan a dividirse. Esto marcó otro descubrimiento, para asegurar la sobrevivencia de los microorganismos⁴.

El uso de agentes crioprotectores en los medios de preservación primero fue implementado en 1941 con Woodcock, utilizando azúcares para proteger eritrocitos contra las lesiones en la congelación. Numerosos investigadores a su vez han utilizado desde entonces diversos agentes para aumentar la sobrevivencia de las bacterias congeladas. Ling (1965),

Merymann y Hornblower (1972), Pribor (1974) y Nei (1981), consideraron que las lesiones por congelar son menores con la adición de agentes crioprotectores tales como glicerol, azúcar o leche, que inhiben la formación de hielo intracelular durante el congelado rápido⁵.

En todos los laboratorios de microbiología no solo es fundamental mantener al cepario vivo, si no también, resulta necesario conservar a las bacterias por periodos prolongados de tiempo con todas sus características fisiológicas, bioquímicas y fenotípicas, dado que con ellas se va a trabajar en investigaciones o bien para desarrollar procesos industriales destinados a la producción, además de uso en parámetros en control de calidad.

Debido a todo esto es necesario elegir métodos de conservación apropiados para cada cepa bacteriana, existen una gran variedad de métodos de mantenimiento y conservación de bacterias cuya utilización va a depender, además, de las posibilidades de cada laboratorio, del tiempo previsto (cortos, medianos o largos) y características de las bacterias; dos de los mejores métodos son la congelación a -70°C y la liofilización.

Muchos microorganismos pueden conservarse durante periodos largos de tiempo, observándose que crecen abundantemente, sin embargo, pueden perder muchas de las características biológicas que tenían originalmente; cuando esto sucede decimos que no han sido satisfactoriamente conservados; entonces la función básica de la conservación de un cultivo no es solamente mantenerlo vivo sino también mantener sus características originales.

En instituciones de muy diversas índole, dedicadas a varios aspectos de la microbiología es necesario conservar cepas, como ejemplo podríamos citar: centros de enseñanza, hospitales, laboratorios químico farmacéuticos, biología molecular, genética microbiana, producción de antígenos y de sueros hiperinmunes, etc.

El número de laboratorios de producción, que utilizan microorganismos para la producción de antibióticos, enzimas, vitaminas, aminoácidos, etc., es cada día mayor y podría decirse que la parte más importante de estas industrias la constituye su colección de cepas; por lo tanto la persona dedicada al mantenimiento y conservación de ellas es la clave sobre la que giran estos procesos.

Las cepas mantenidas en el laboratorio deben conservarse puras, viables y revisarse continua y frecuentemente sus características morfológicas y metabólicas, si presentan variaciones o mutaciones que si no se vigilan pueden ocasionar pérdidas económicas serias, contaminación de fermentadores y líneas de producción y pérdida de las cepas. En la

enseñanza e investigación, cuando esto sucede se obtienen resultados lamentables.

La obtención de cepas es fundamental para el trabajo de laboratorio de referencia y esto requiere del envío sistemático de las mismas en condiciones adecuadas por parte de los laboratorios suministradores. Para lograr este propósito es indispensable el empleo de medios de cultivo que posibiliten mantener la viabilidad de los microorganismos durante todo el tiempo necesario hasta alcanzar su destino^{6,7}.

1.0. MARCO TEÓRICO

1.0.0. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN PARA CEPAS MICROBIANAS

Para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología depende de que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminantes durante el proceso de conservación, así como del tiempo de conservación en que sobrevivan al menos el 70-80% de los microorganismos y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables⁸.

Los métodos de conservación a largo plazo son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Aún así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en si mismo. Los métodos de conservación pertenecientes a este grupo son dos: congelación a -70°C y liofilización⁸.

1.1.0. Conservación por congelación

La sobrevivencia de microorganismos congelados en agua es frecuentemente baja, por los daños, ocasionados a las células dentro de una simple suspensión de sales. Polge (1949) demostró las propiedades crioprotectoras del glicerol y desde entonces, en aquel tiempo un amplio rango de compuestos son identificados como crioprotectores. Aunque varían en sus propiedades químicas los crioprotectores se caracterizan por ser altamente solubles en agua, permanece su concentración después de congelar, son capaces de enlazar hidrógenos y muestran una baja toxicidad⁷.

Se hacen suspensiones densas de bacterias en leche descremada en o bien en soluciones más ricas según las características de las bacterias, en frascos de tapón a rosca y se llevan a un congelador a -20°C o a -70°C , de esta forma permanecen vivos muchos microorganismos durante largos periodos de tiempo⁹ o bien se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura⁸.

Sin embargo el enfriamiento rápido de las bacterias mesófilicas, desde una temperatura normal de crecimiento hasta 0°C causa la muerte o lesiona un cierto porcentaje de las células que componen el cultivo. Las bacterias gram negativas parecen ser más susceptibles al frío que los microorganismos gram positivos. Las respuestas de los microorganismos a la congelación son variables: unos la resisten, pero son susceptibles a sufrir lesiones durante la descongelación; y algunos se ven inactivados por la congelación¹⁰.

La congelación a -70°C es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales, y además existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento. También resulta ser el método más molesto para realizar el envío de las cepas.

Los factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes⁸:

a) Edad de las células:

En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado. Esto sucede en el caso de microorganismos que esporulan, en algunos pleomórficos e incluso en algunos más sencillos.

b) Velocidad en la congelación y descongelación:

Si se considera un sistema acuoso rico en agua congelable como lo son los sistemas biológicos, el cual se somete a un enfriamiento progresivo comienza a formarse hielo, en general, a una temperatura inferior a 0°C. Como la cristalización del hielo provoca una concentración de la fase líquida restante, el avance de la solidificación del agua estará ligado a un descenso de temperatura del sistema. En este periodo de enfriamiento el producto contiene cristales de hielo que nadan en una fase líquida cada vez más concentrada (soluciones intersticiales) ¹¹.

Aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37°C. Por lo tanto, otro factor a tener en cuenta es la manera de realizar la descongelación, y el número de ciclos de congelación – descongelación. La descongelación lenta es más letal que la rápida, ya que aumenta el volumen de cristales de hielo. El grado de muerte por descongelación puede ser por dos factores, el efecto inmediato, muertes que ocurren al congelarse la muestra y el efecto de almacenamiento que consiste en la lenta pérdida de viabilidad debida al

tiempo que permanecen las bacterias sobrevivientes en estado congelado, y que depende de la temperatura a la que se mantenga la muestra¹².

c) Crecimiento de los cristales de hielo:

Este crecimiento es controlado por dos procesos físicos distintos: la incorporación de las moléculas en la red cristalina y la difusión de las moléculas desde el seno del líquido hacia la superficie del cristal (transferencia de masa), correlacionada a la difusión de calor desde el cristal hacia el líquido (transferencia de calor).

d) Influencia de las sustancias disueltas:

En general, cuando el agua contiene solutos, el crecimiento de los cristales de hielo es inferior al que se mide en el agua pura un mismo subenfriamiento. Si bien las sales minerales bajan considerablemente la velocidad de cristalización del agua, ciertas sustancias como el glicerol o las proteínas tienen un efecto aún más notable. Por regla general, la cristalización es más lenta conforme aumenta la concentración de las soluciones.

e) Temperatura de almacenamiento:

Debe ser lo más baja posible. Lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195°C , o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140°C ⁸.

f) Congelación en los sistemas celulares:

Los fenómenos de congelación son esencialmente los mismos en un tejido, suspensión celular o solución, después de una primera etapa de separación de hielo, se produce la solidificación de las soluciones intersticiales concentradas. La repartición del hielo según una forma inicial más o menos fina dependerá de la velocidad de enfriamiento y de la composición química.

Un problema específico es la localización del hielo al interior o exterior de las células, por lo cual, se puede decir que un enfriamiento rápido produce una cristalización simultánea de líquidos intracelulares y pericelulares, un enfriamiento lento origina al principio la cristalización del hielo solo en el exterior de las células. La separación del hielo determina una concentración del medio por lo que las células se deshidratan (fenómeno de criosinéresis). Después puede continuar la cristalización extracelular sola o la intracelular, según la velocidad a la que se extraiga el agua de la célula¹¹.

g) Empleo de agentes crioprotectores:

En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar. Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%. También se pueden utilizar sustancias no ionizables de bajo peso molecular (glicerol, dimetilsulfóxido, glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc.) que provocan la solidificación amorfa y vítrea en lugar de la cristalización evitando así la formación de zonas intracelulares con alta concentración de sales. O también se pueden utilizar sustancias ricas como la leche descremada, suero, extracto de carne, proteínas

purificadas como albúmina, determinadas macromoléculas como polivinilpirrolidona, dextranos etc⁸.

h) Efectos tóxicos de los crioprotectores:

Un prerrequisito para los crioprotectores es que el aditivo no debe ser tóxico, aunque hay aditivos como el metanol que frecuentemente exhibe toxicidad a concentraciones por arriba de la óptima. Se ha observado que el metanol al 6% es un excelente crioprotector para *Escherichia coli* congelada en caldo. La concentración de los solutos durante la congelación es un importante factor el cual puede exacerbar la toxicidad del aditivo. El dimetilsulfóxido muestra una interesante conducta, el aditivo es no tóxico a bajas temperaturas (menores de 4°C) y se hace tóxico a temperaturas elevadas (mayores de 37°C)⁷.

1.1.1. Agentes crioprotectores

Los aditivos o agentes crioprotectores pueden ser clasificados de diversas formas: los de bajo peso molecular y los de alto peso molecular. Pero la división más común de los agentes crioprotectores, es la que se basa en la cantidad de penetración, los que penetran rápidamente como metanol, etanol, etilenglicol, propilenglicol, dimetilformamida, metilacetamida, o algunos otros como dimetilsulfóxido, glicerol que penetran más fácilmente, y los mono-, oligo- y polisacáridos, manitol, sorbitol, dextrano, almidón, metilcelulosa, albúmina, celulosa, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, óxido de polietileno, alcohol polivinílico, son compuestos no penetrantes o impermeables causando crioprotección extracelular, cuando se presentan en concentraciones del 10 al 40%.

Algunos agentes crioprotectores penetrantes solamente protegen a la célula y no a la membrana citoplasmática, de este modo se tienen tres categorías de agentes crioprotectores:

- a) Crioprotectores que penetran en la membrana citoplasmática y la pared celular (ejemplo: glicerol y dimetilsulfóxido), son de bajo peso molecular, estos compuestos reducen los daños en la célula por la alteración de las condiciones físicas del hielo y el soluto en el medio.
- b) Crioprotectores que penetran pared celular, pero no membrana citoplasmática (mono- y disacáridos, aminoácidos, polímeros con bajo peso molecular).
- c) Crioprotectores que no penetran uniformemente la pared celular (polímeros de alto peso molecular, proteínas, polisacáridos, óxido de polietileno, polietilenglicol, dextran etc.), pueden funcionar impidiendo parcialmente la deshidratación celular por medio de incremento de la viscosidad del medio extracelular^{7, 13}.

Puesto que los agentes crioprotectores representan un factor muy importante para la conservación de los microorganismos, es necesario elegir el crioprotector adecuado. Algunos de los agentes crioprotectores más usados en bacteriología son los siguientes:

- a) Alcoholes y derivados:

Mientras los alcoholes polihídricos, especialmente glicerol, pero además glicoles y alcoholes de azúcares son comúnmente usados, como crioprotectores, el uso de alcoholes monovalentes, es comparativamente menos frecuente, probablemente debido a su toxicidad para algunos sistemas biológicos. Sin embargo, metanol y etanol pueden ser

sorprendentemente efectivos con menor toxicidad para algunas células procariotas y eucariotas, el metanol puede ser tan efectivo crioprotector como el dimetilsulfóxido o el glicerol para algunas cepas criosensibles como *S. cerevisiae*. Glicerol (1, 2,3-propanotriol), al mismo tiempo con dimetilsulfóxido pueden ser los crioprotectores más extensamente usados en microbiología. El efecto crioprotector del glicerol fue descubierto por Keith quién observó que al adicionar el glicerol del 5 – 42 % a suspensiones de *E. coli* en agua permitió la supervivencia a largo plazo a – 20°C. El glicerol al 50% fue adoptado para la preservación rutinaria de procariotes patógenos y virus a temperaturas de entre 4°C a – 20°C mucho antes de 1950. Después el glicerol fue aplicado en concentraciones de 2 – 55 % (\bar{X} = 10%) para la congelación de diversos virus, bacterias incluyendo rickettsias, micoplasmas, mixomicetes, hongos filamentosos, levaduras, algas y protozoarios¹³.

b) Péptidos, proteínas y glicoproteínas:

La albúmina de suero puede ser usada como crioprotector a concentraciones de 0.1 – 4 %, por largo tiempo, especialmente para virus y rickettsias. La albúmina de suero humano es protectora así como el dimetilsulfóxido para virus de sarampión a – 65°C. Con *E. aerogenes*, la albúmina humana y ovalbúmina fue comparable con dimetilsulfóxido y glicerol. La sangre inactivada de varias especies vertebradas (ternera, caballo, carnero, humana, conejo y pollo) puede ser incorporada dentro del medio a congelar, usualmente con una concentración de 10 – 20% y frecuentemente es combinada con otros crioprotectores para la refrigeración de virus, de algunas bacterias, incluyendo clamidias, micoplasmas y cianobacterias, levaduras hongos filamentosos y protozoarios. Con la adición de crioprotectores efectivos, como el suero de la sangre o albúmina del suero puede protegerse a las células contra posibles efectos tóxicos del glicerol, o del dimetilsulfóxido, durante la

congelación-descongelación. Por otro lado la sangre desfibrinada en si misma es crioprotector principalmente por el contenido del suero¹³.

c) Sulfóxidos:

Los sulfóxidos son tioésteres oxidados que contienen un átomo de oxígeno por molécula (el grupo S-O en la molécula de sulfóxido, es casi químicamente inerte) solubles en agua en contraste con otros tioésteres. La oxidación de sulfóxidos, resulta en sulfonas, con dos átomos de oxígeno por molécula, dimetilsulfona que carece de capacidad crioprotectora. El dimetilsulfóxido fue introducido a la criobiología, como muy efectivo, penetra rápidamente y es el crioprotector universal, tiene también propiedades radioprotectoras para organismos. Fue originalmente usado como crioprotector de células rojas sanguíneas, aplicado en la crioprotección de virus, bacterias rickettsias, micoplasmas, clamidias, cianobacterias, hongos filamentosos, levaduras, algas y protozoarios. Solo el grado químicamente puro de dimetilsulfóxido, puede ser usado como crioprotector, la concentración óptima de dimetilsulfóxido es extensamente variada como del 1 al 32% (\bar{X} = 10%)¹³.

1.2.0. Conservación por Liofilización

Algunas observaciones hechas en el siglo XVIII permitieron conservar vivos ciertos organismos por medio de la desecación de los mismos, sin embargo no fue sino hasta principios del siglo XX que se anunciaron los principios de la liofilización. Así entonces la primera aplicación de la liofilización en microorganismos fue realizada en 1911 por Hammer¹⁴ Masucci y Boyer fueron quienes en los años 1930 forjaron y utilizaron por primera vez la palabra “liofilo”, que etimológicamente significa “amigo de los solventes”.

En efecto, los productos liofilizados se presentan bajo la forma de cuerpos sólidos, porosos, friables y ávidos de agua (el agua que precisamente les ha sido quitada). La liofilización es un proceso que consiste en desecar bajo presión reducida un producto previamente congelado, sublimando el solvente, siendo generalmente agua u otras sustancias volátiles.

El procedimiento de liofilización, combina las ventajas del método de deshidratación y el de congelación. Este proceso permite conservar a los microorganismos, eliminando las resiembras periódicas, y con ello, la manipulación constante, además de conservarlos por periodos mayores de tiempo¹⁵.

Este método está basado en la obtención de un medio ambiente herméticamente cerrado, enfriable en donde una solución acuosa llega hasta su punto de congelación, por medio de vacío, existiendo un arrastre del producto. El hielo se transforma en vapor de agua, sublimándose y quedando el material no volátil distribuido en el espacio correspondiente al volumen inicial, siendo ésta una superficie sólida y muy frágil, que es redisoluble en agua^{16, 17}.

Respecto a los crioprotectores se pueden utilizar varios dependiendo del tipo de microorganismo, pero para liofilizar no se debe utilizar glicerol, debido a su elevado punto de evaporación y a su higroscopicidad, que provoca que los liófilos queden muy viscosos. Tampoco es conveniente utilizar el dimetilsulfóxido, porque es algo tóxico, y al concentrarse por la evaporación del agua puede dañar a las células microbianas.

Por lo tanto, para la liofilización se recomiendan como crioprotectores el inositol para la mayoría de las bacterias y la leche descremada para hongos y actinomicetos, pero para algunos microorganismos pueden ser más convenientes otros crioprotectores, como por ejemplo el glutámico-

glutamato para las bacterias lácticas, mezclas de glucosa con caldo de hígado para bacterias anaerobias, etc⁸.

La liofilización es un proceso que incluye un gran número de variables, la eficiencia de este proceso depende de un buen control de sus condiciones, por lo cual la determinación de la temperatura eutéctica es fundamental en el proceso, puede calcularse teórica y prácticamente. “Para el caso particular de productos biológicos es muy difícil el cálculo teórico debido a que generalmente se desconoce el comportamiento fisicoquímico de las soluciones y suspensiones biológicas debido a su naturaleza química compleja y en algunos casos variable”¹⁸.

Una vez realizado el proceso de liofilización tampoco se da crecimiento en las células conservadas por este método, puesto que se les ha quitado el agua mediante la liofilización. Con ello la estabilidad genética es alta, pero a veces no tanto como en la congelación, porque la liofilización se consigue por sublimación del hielo de las células.

Por lo tanto, primero tenemos que congelar el agua libre de las células y después eliminarla mediante el vacío, sin que haya necesidad de subir la temperatura, lo que acabaría afectando a la viabilidad del microorganismo. Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores. Las células microbianas así conservadas se someten a un tratamiento más complejo que en el caso de la congelación⁸.

Sin embargo, este es un método muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas, pues una vez conseguidos los liófilos pueden almacenarse a temperatura ambiente (18°C-20°C), con lo cual su envío es muy cómodo.²⁸

Debido a la moderada manera de eliminar la humedad, las condiciones de liofilización pueden optimizarse deliberadamente para conseguir la máxima sobrevivencia de las células microbianas. La baja temperatura de rehidratación, los aditivos protectores en la suspensión microbiana y el almacenamiento de los liófilos con vacío, aumentan la viabilidad del microorganismo.²⁹

“La liofilización o criodesecación se puede definir como la operación que consiste en secar una solución o un material impregnado de agua, manteniéndolo primero a una temperatura lo suficientemente baja como para que la mayor parte del agua que contiene se congele y se extraiga después por sublimación del hielo. El producto liofilizado está caracterizado por una textura porosa. Esta es una razón etimológica del término liofilización (lyo: disolvente, phil: amigo), ya que los productos liofilizados se caracterizan por una gran afinidad de disolución debida en parte a su textura porosa, y en parte, al hecho de que la deshidratación se efectúa a baja temperatura, evita la desnaturalización de las sustancias termolábiles”.¹¹

El proceso de liofilización puede dividirse en tres partes principales:

Congelación
Secado primario
Secado secundario

Los factores que hay que tener en cuenta para hacer una buena liofilización son lógicamente los mismos que influyen en la congelación, a los que habrá que añadir otros que surgen como consecuencia de la deshidratación.

Los factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son:

a) Tipo de microorganismo:

Hay algunos microorganismos que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior. Algunos hongos filamentosos, especialmente los no esporulados, no se pueden guardar liofilizados y hay que recurrir a otros métodos⁸.

Los microorganismos gram positivos son generalmente más resistentes a los daños por la liofilización que los gram negativos.

Una revisión hecha a las características de liofilización de 70 cepas de importancia médica por Mello Snell (1985), en el cual, reportó que la mayoría de las cepas resistió a la liofilización, incluyendo cepas como *Clostridium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pasteurella*, *Yersinia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. maltophilia*. Y también observó con este estudio que especies como *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacteroides melanogenicus*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni* resultaron muy sensibles al proceso de liofilización⁷.

b) Concentración celular:

Lo mejor es liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de 10^8 - 10^9 células/mL en el caso de las bacterias y algo inferior en el caso de hongos filamentosos y levaduras⁸.

c) Composición del medio de suspensión:

Al intentar liofilizar células en agua o en una simple solución salina, se obtiene un pobre resultado y una sobrevivencia variable o pobre. Un medio para liofilizar, debe de ser por lo tanto formulado para que proteja a los organismos, desde el momento de la congelación y proteja de los daños provocados por el secado 1^a y 2^o, para que se pueda producir un inóculo estable durante el almacenamiento en el anaquel.

Regway y Lapage (1974) compararon la efectividad de más de 20 carbohidratos y relacionaron compuestos como protectores para liofilizar para una variedad de especies de bacterias incluyendo cepas sensibles como *Haemophilus suis* y *Neisseria gonorrhoeae*, los solutos fueron categorizados como protectores en el siguiente orden (de mayor a menor efectividad): meso-inositol (más efectivo), carbohidratos, alcoholes (ej. manitol), disacáridos no reductores (ej. trehalosa), disacáridos reductores (ej. lactosa), monosacáridos (ej. glucosa), glicerol, pentosas (menos efectividad, o pobremente protectoras)⁷.

También es recomendado el uso de suero-inositol, meso-inositol y suero de caballo o bien caldo-inositol, caldo nutritivo y meso-inositol¹⁹.

d) Determinación de temperatura eutéctica:

La determinación de la temperatura eutéctica específica para cada producto es importante para el proceso de liofilización de las sustancias biológicas. La técnica empleada para su determinación está basada en la propiedad que tienen las soluciones acuosas de conducir electricidad cuando tienen agua libre, disminuyendo conforme las moléculas de agua van siendo congeladas, hasta llegar a un punto en el que no hay conductividad. Los productos se congelan en un pequeño vaso con un termopar que determina la temperatura y dos electrodos que establecen un voltaje y miden resistividad de la solución o suspensión una vez que el producto llega a una temperatura de -60°C aproximadamente, se dejan calentar a temperatura ambiente, llevándose simultáneamente un registro de datos de temperatura y resistividad. El valor de la temperatura eutéctica se alcanza en el momento en el que la resistividad es menor a $100\mu\Omega$ ¹⁸.

e) Grado de deshidratación alcanzado:

Debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial.

f) Atmósfera de oxígeno en el tubo:

Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células^{8, 20}.

g) Temperatura durante la sublimación:

Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de -50°C .

h) Condiciones de almacenamiento:

La temperatura debe ser constante, preferentemente a 18°C y sin bajar de los 0°C . Los liófilos se deben guardar en la oscuridad⁸.

1.2.1. Congelación

Durante la congelación de una solución binaria diluida que consiste de un solo soluto en agua, el hielo puro se separa y la solución residual (fluido intersticial) se vuelve más concentrado con respecto al soluto, hasta que se forma una composición en la cual el agua y el soluto solidifican.

La temperatura a la cual ocurre la solidificación final se le llama “temperatura eutéctica” y la composición correspondiente de la solución concentrada antes mencionada, se le llama “composición eutéctica”.

La temperatura eutéctica es la temperatura más baja a la cual el material no congelado existe en equilibrio con el material congelado.

En un ciclo normal de liofilización, el material se enfría hasta alrededor de 5-10°C por debajo del punto eutéctico y se mantiene a esta temperatura por lo menos de 2-3 horas con objeto de asegurar la completa solidificación, elevando después la temperatura hasta la temperatura de secado (sublimación) y en esta etapa es importante que el agua este completamente congelada.

Si la liofilización se conduce con éxito, en la pastilla liofilizada al hacer cortes transversales, se observan perfectamente los pequeños canales por donde sublima el agua. En caso de colapso pierde su estructura porosa, bloquea el paso de vapor de agua y evita el enfriamiento evaporativo.

Esta situación, podría causar fusión parcial del material congelado remanente. “Se debe tomar en cuenta el hecho de que muchos materiales tienen un rango de temperaturas eutécticas en vez de un punto eutéctico”, si no se encuentra un verdadero eutéctico, entonces al sobre enfriar el soluto este puede precipitarse como partículas amorfas por debajo de unas temperaturas específicas^{21, 22}.

Por lo cual la congelación para la liofilización puede efectuarse de diferentes maneras:

a) Congelación lenta:

Cuando se considera adecuado obtener cristales grandes de agua, la temperatura debe ir disminuyendo muy lentamente, de este modo se permite crecer a dichos cristales con pequeña área total²¹. Después de una congelación lenta la forma es irregular y con frecuencia laminar. Estas

diferencias porosas se relacionan con las propiedades mecánicas, el producto que ha sufrido una congelación lenta es, por lo general, más friable y tiende a presentar una coloración más oscura que el que se ha sometido a una congelación rápida.

Un enfriamiento lento en un sistema biológico permite una permanencia relativamente prolongada del producto en la zona de las temperaturas intermedias, donde las soluciones intersticiales concentradas pueden originar reacciones perjudiciales para las sustancias sensibles a las concentraciones elevadas en electrólitos, a las variaciones de pH, etc¹¹.

b) Enfriamiento muy rápido:

Mediante el enfriamiento brusco; por ejemplo al utilizar nitrógeno líquido (-170°C), hielo seco (-80°C) o freón comprimido (no recomendable por su efecto ecológico), se obtendrán cristales pequeños, con el consiguiente aumento de superficie o área expuesta a la liofilización (sublimación). Esta técnica también se utiliza, cuando el producto se daña si se produce recristalización bajo condiciones moderadas de congelamiento²¹. Inversamente, el enfriamiento rápido favorece la formación de cristales de hielo intracelular, responsable de deterioros mecánicos a las estructuras. En general existe una velocidad óptima de enfriamiento que permite una conservación máxima de la actividad biológica del producto tratado¹¹.

c) Introducción del tratamiento térmico durante la congelación:

Cuando sucede que durante el proceso de congelación normal un material tiene su estructura amorfa y esta estructura no es deseable, por que ocasiona mala reconstitución, es posible introducir un paso de calentamiento precediendo a la sublimación. El tratamiento térmico consiste de una primera congelación del material a una temperatura

suficientemente baja y calentamiento gradual a una temperatura predeterminada, para permitir cristalizar a la formas metaestables y luego enfriar nuevamente a una temperatura apropiada, antes de liofilizar²¹.

d) Congelación seriada (en capas):

La congelación seriada se define como la congelación separada de los componentes de un producto, capa tras capa, esta técnica puede aplicarse para anticipar la ocurrencia de una mezcla con un punto eutéctico muy bajo. El método contiene una mayor estabilidad al producto²¹.

e) Congelación en esferas:

La solución o suspensión a ser liofilizada se gotea dentro de un recipiente que contiene nitrógeno líquido (-170°C). Al subir la temperatura del nitrógeno por tomar al calor de las gotas, se forman pequeñas burbujas de gas alrededor de las gotas que se están empezando a congelar, las cuales las mantienen flotando. Cuando las gotas están completamente congeladas lentamente van depositándose en el fondo del recipiente; durante la liofilización, el calor, se suministra también del fondo de la cama de esferas congeladas, sin embargo, en este caso es importantísimo el papel que juega el enfriamiento evaporativo.²¹.

Para la congelación de una suspensión de bacterias en un medio habitual se tiene que, cuando la temperatura es ligeramente inferior al punto de congelación del medio, el citoplasma queda en sobrefusión (sin congelar) entre - 1°C y - 10°C. Pero como la tensión de agua en el interior es mayor que en el exterior, existe una tendencia a restablecer el equilibrio que puede ser por pérdida del agua de la célula (cuando la congelación

se efectúa lentamente) o bien por cristalización de agua en el interior (cuando la congelación se realiza rápidamente).

En ambos casos la consecuencia es que las sales intracelulares se concentran, lo que supone que la solución del citoplasma puede llegar a saturarse, con precipitación de sales. Ello conlleva a varias consecuencias, los cristales de sales y la alta concentración de electrolitos provocan la desnaturalización de las proteínas y daños a la membrana, de modo que pueden salir componentes del citoplasma (fosfato, ribosa, péptidos y nucleótidos procedentes de la actuación de ribonucleasas y peptidasas latentes) otro efecto es el daño mecánico a la pared celular y a la membrana provocado por los cristales de hielo²³.

Los cambios estructurales al congelar, pueden afectar drásticamente las propiedades de disolución del producto liofilizado. En algunos casos, estos problemas dan como resultado, una reconstitución inaceptable del producto liofilizado que se refleja en altos tiempos de disolución o por la opalescencia permanente de la solución, que se forma después de añadir el solvente a la pastilla liofilizada.

1.2.2. Secado primario

Durante el secado primario (sublimación) el solvente (vapor) es extraído directamente del material (congelado).

Conforme los cristales de hielo van sublimando se van formando capilares en forma de largos hoyos en la masa congelada. A través de estos hoyos el agua cristalizada de las capas más profundas de la cama va escapando hacia fuera por sublimación, en los lugares donde sublima el hielo se forman pequeños orificios. A través de estos pequeños orificios, el agua en forma de vapor escapa de las capas cada vez más bajas o profundas de la masa congelada.

El grosor o espesor de la capa seca, aumenta gradualmente durante el proceso de secado y el vapor de agua experimenta un aumento de resistencia a escapar en la capa seca. De este modo la velocidad de sublimación va disminuyendo durante el proceso²¹.

Casi invariablemente se usa agua como solvente; el hielo únicamente sublima por debajo del punto triple del agua (0.01°C y 6.09 milibar). El secado empieza siempre por la parte superior del material congelado (cuando se trata de masas congeladas en recipientes tales como ampollitas o viales), o bien de la superficie exterior (cuando la masa congelada esta en forma esférica u otra semejante).

En general el flujo de vapor de agua se impide por tres tipos de resistencia a saber:

- a) Resistencia de la capa de producto seco.
- b) Resistencia del tapón de hule a pesar de que estos son de forma especial, es decir, que se les coloca sobrepuestos, dejando orificios laterales.
- c) Resistencia de la cámara de liofilización (debido a su diseño geométrico específico).

La relación entre el flujo del calor y la diferencia de la temperatura se puede describir por un coeficiente del traspaso térmico del frasco a partir de tres mecanismos paralelos:

- a) Conducción directa del estante al frasco vía puntos del contacto entre el frasco y del estante.
- b) Conducción a través del vapor entre el fondo del frasco y el estante.
- c) Traspaso térmico radiactivo.

El suministro de calor al nivel de sublimación es un factor determinante para lograr una velocidad óptima en esta etapa del proceso.

La temperatura de sublimación debe alcanzarse, tan alto como sea posible, sin permitir la fusión de la masa congelada a modo de obtener la mayor diferencial de temperatura, así como la máxima diferencia de presión de vapor de agua entre el producto y el condensador de hielo cuya posición se encuentra alejada lo más posible del producto en proceso, denominada fuerza impulsora de sublimación^{21, 24}.

Otro factor que también influye durante el secado primario son las curvas del interior del frasco de vidrio utilizado, puesto que la acumulación de calor, en este frasco contribuye de manera significativa en el traspaso térmico durante el secado²⁵ así como también la posición del frasco para el traspaso térmico conocida como el efecto del frasco del borde, en donde se ha encontrado que la sublimación es más alta para los frascos situados en la parte de enfrente comparada a los frascos del centro²⁶.

1.2.3. Secado Secundario

Después del secado primario, la remoción de la humedad residual de la pastilla porosa depende de la naturaleza del material, la temperatura del producto y de la presión de vapor, el contenido de humedad residual depende de la efectividad del secado del anaquel²¹.

La humedad residual cerca de la tapa de la pastilla es mucho más baja que la humedad cerca del fondo, por lo menos durante e inmediatamente después de la liofilización²⁷.

En las partes laterales externas del anaquel, el secado es más efectivo, este fenómeno parece que sucede en todo tipo de liofilizadora. Por turbulencia de las moléculas de gas en las esquinas, tiene lugar una mejor conducción de calor entre el anaquel y el producto. Si la cantidad de humedad residual disminuye obteniéndose un producto estable, aún después de liofilizar, el secado secundario es necesario para remover el

agua absorbida, intermolecularmente; para el secado secundario, frecuentemente se elige una temperatura más alta, y la presión dentro de la cabina tenderá a ser más baja, a diferencia del secado primario²¹.

Debido a la moderada manera de eliminar la humedad, las condiciones de liofilización pueden optimizarse deliberadamente para conseguir la máxima sobrevivencia de las células microbianas. La baja temperatura de rehidratación, los aditivos protectores en la suspensión microbiana y el almacenamiento de los liófilos con vacío, aumentan la viabilidad del microorganismo.²⁹

1.3.0. Métodos opcionales de conservación

Son los que se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de congelación y liofilización, bien por carecer de los equipos necesarios, o bien porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos.

Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método alternativo, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de estos métodos.

1.3.1. Conservación por transferencia periódica

La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido. Sin embargo, estas células no pueden permanecer indefinidamente en el mismo medio, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celulares, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco⁸.

Este es el peor método para conseguir la estabilidad genética, puesto que al estar las células creciendo hay una alternancia de generaciones, y al cabo del tiempo las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus características.

Si se va a utilizar este método es aconsejable retardar el envejecimiento y alargar los periodos entre dos resiembras. Esto se puede conseguir de varias maneras como por ejemplo: disminuyendo la cantidad de inóculo; rebajando la proporción de algunos nutrientes en el medio de cultivo; inoculando en picadura los microorganismos que son anaerobios facultativos, ya que el crecimiento en presencia de oxígeno es más rápido y origina productos generalmente tóxicos; y almacenando los cultivos a 4°C-8°C³⁰.

A veces también se suele recubrir el crecimiento con una capa de aceite mineral estéril, con esto se consigue también evitar en la medida de lo posible la desecación del medio de cultivo, que podría ser tóxico para las células al aumentar su concentración. Hay que tener en cuenta que los microorganismos muy aerobios, como por ejemplo los hongos filamentosos, no se pueden guardar en tubos completamente cerrados.

Por último, otro inconveniente que tiene la transferencia periódica es que la contaminación de los cultivos resulta más fácil al tener que manejar los tubos a lo largo del tiempo y también por la posibilidad de entrada de ácaros en los mismos⁸.

1.3.2. Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril

Es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias.

Consiste en suspender en agua estéril unas cuantas células del cultivo que se quiere conservar.

Se pueden preparar en criotubos. En este caso la concentración celular no debe ser superior a 10^4 - 10^5 células/mL en el caso de bacterias y levaduras. Para los hongos filamentosos que no esporulan, se pueden poner en suspensión trocitos de agar con el crecimiento del hongo. En el caso de microorganismos marinos, la suspensión se hace en agua de mar diluida⁸.

1.3.3. Métodos restringidos.

En este grupo se encuentran métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos muy determinados que no resisten bien la liofilización o la congelación, como por ejemplo los géneros bacterianos *Spirillum*, *Rhodospirillum*, etc.

Los métodos aquí citados se basan en la paralización del crecimiento por eliminación del agua disponible para las células.

a) Desección en papel de filtro.

Se utiliza un papel bastante absorbente (Whatman N° 3) que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles).

También es posible desecarlos por el procedimiento que se llama desecación líquida (L-Dry) porque se utiliza para ello el liofilizador, pero sin que haya habido congelación previa de las células. El vacío producido por el liofilizador deseca las células, pero hay que evitar que un vacío excesivo provoque evaporación brusca con ebullición o que la temperatura disminuya demasiado, ocasionando la congelación incontrolada de las células⁸.

b) Desección en suelo, arena, silicagel, etc.

La desecación se lleva a cabo con ayuda de sílica gel. La técnica directa consiste en colocar algunas gotas de una suspensión concentrada de células cosechadas en la fase estacionaria, en leche estéril en un pequeño tubo que contenga sílica gel (alrededor de 1 cm. de altura) previamente esterilizado. Todo lo anterior se conserva a temperatura ambiente dos semanas y después se transfieren a 4°C³⁰. Se añaden las células a estos sustratos que las protegerán al desecar. Los microorganismos productores de esporas se pueden conservar durante bastante tiempo por este método.

c) Desección en bolitas de alginato.

Éste es un procedimiento bastante eficaz. Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua. Estas bolitas de alginato

se pueden conservar en tubos cerrados herméticamente y a temperaturas de entre 4°C y 18°C, pudiéndose guardar incluso a -80°C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato. Este es un método que se está utilizando incluso para la conservación de algas y células vegetales.

d) Desección en sal gorda para halobacterias.

Para su conservación por este método se mezclan las células con sal y se dejan desecar espontáneamente. Debido a la higroscopicidad de la sal, la desecación no es total, pero las células dejan de multiplicarse por ser insuficiente el nivel de agua disponible⁸.

e) Método de Stamp.

Es una técnica simple y no requiere aparatos costosos. Los microorganismos se suspenden en gelatina nutritiva al 10 % con 0.25 % de ácido ascórbico, para obtener una suspensión de alrededor del 15 %. Esta deberá tener aproximadamente 1×10^{10} microorganismos viables/mL. Con un cuenta gotas verter algunas gotas sobre una superficie de material de plástico. Pasar a un desecador con pentóxido de fósforo, y mantener en condiciones de vacío parcial. Los finos discos, que se han formado, se transfieren a un recipiente estéril con tapón de algodón hidrófilo, que se conserva a temperatura ambiente con cloruro de calcio. Para obtener un subcultivo se pasa a uno de los discos a un medio adecuado, se calienta para que se disuelva y se siembra en el medio sólido que se considere apropiado. Este método no es satisfactorio para gonococos, meningococos, ni *Vibrio cholerae*³¹.

2.0. ANTECEDENTES DE LOS MICROORGANISMOS DE ESTUDIO

2.1.0. *Campylobacter jejuni*

El microorganismo actualmente clasificado como *Campylobacter jejuni* (en un principio denominado *Vibrio jejuni*) fue descubierto en 1931 por Jones y Little como agente causal de disentería invernal en vacunos. Estudios anteriores a este descubrimiento realizados por Doyle en 1914 descubrió un vibrión aislado del intestino de cerdos con diarrea y lo denominó *Vibrio coli*. Mac Fadyean, Stockmann y Smit en 1918 establecieron la participación de una bacteria microaerófila en el aborto del ganado bovino y ovino de morfología similar a las especies del género *Vibrio* por lo que se le denominó *Vibrio fetus*.

En 1956 Elizabeth King describe un grupo de bastones microaerófilos, curvos y móviles aislados de la sangre de niños con disentería aguda que ella denominó vibrión, ella observó que estos vibriones podían estar estrechamente relacionados por el microorganismo descrito por Jones y Little y que podría ser causante de síndromes diarreicos infantiles de etiología desconocida.

En 1963, Sébald y Veron proponen el género *Campylobacter* cuando se reconoció que las bacterias conocidas como *V. fetus* no pertenecían a la familia *Vibrionaceae*. En 1972, Dekeyser y col. aislaron los vibriones relacionados de las heces de pacientes con enteritis aguda usando una técnica de filtración que permitía el paso de pequeños bastones curvos a través de la membrana.

En 1973, Butzler y col. aislaron *Campylobacter* a partir de materia fecal en el 5% de los niños con diarrea usando la técnica de filtración. En 1977, Skirrow desarrolló un medio selectivo adicionado de antimicrobianos que

permitió en forma simple el aislamiento rutinario de *Campylobacter* a partir de heces^{32, 33}.

2.1.1. Morfología y fisiología

El nombre del género *Campylobacter* deriva de la palabra griega *campylo* que significa curvado: Los microorganismos del género son bacilos Gram negativos helicoidalmente curvados y delgados que miden de 0.2 a 0.5 μm de ancho y de 0.5 a 5 μm de longitud.

Se han informado de diversas formas morfológicas de *Campylobacter*, entre ellas, formas en espiral, en S, en ala de gaviota, de coma y cocoide. De manera característica, los microorganismos tienen forma de coma cuando se ven en los tejidos infectados pero son filamentosos o cocoides después del aislamiento en el laboratorio. Las formas en espiral son más abundantes en los cultivos jóvenes, mientras que las formas cocoides predominan en los cultivos viejos.

Los microorganismos tienen un tipo de movilidad distintivos en sacacorchos rápido, que se observa mejor en el microscopio con contraste de fase o con campo oscuro. La mayor parte de las especies son unipolares o bipolares.

Los microorganismos del genero *Campylobacter* son microaerófilicos y requieren una baja tensión de oxígeno (3 a 15 %) y nivel aumentado de CO_2 (3 a 5 %) para la proliferación.

Estas bacterias son sumamente sensibles al peróxido de hidrógeno y a los iones superóxido que aparecen en los medios de cultivo cuando se exponen al aire y a la luz. El frasco con vela proporciona una atmósfera adecuada para algunas cepas de *Campylobacter* pero otras cepas

pueden no proliferar en estas condiciones a menos que se agregue un sobre generador de CO₂. Las campilobacterias son incapaces de utilizar los azúcares, de forma oxidativa o fermentativa³⁴ *C. jejuni* es catalasa y oxidasa positivas³⁵.

La hidrólisis de hipurato es una prueba importante usada para la identificación de especies de *Campylobacter* que causan enfermedad humana. La prueba rápida del hipurato en tubo fue descrita por Hwang y Ederer y modificada para el uso con el *Campylobacter spp* por Harvey, se utiliza con frecuencia para distinguir al *C. jejuni* de otras especies de *Campylobacter*^{36, 37}.

2.1.2. Epidemiología

Con anterioridad a la década de los años 1970, las campilobacterias eran conocidas principalmente por los microbiólogos veterinarios como microorganismos que producían abortos espontáneos en vacas y ovejas y como causa de otras patologías en los animales³⁸.

Las campilobacterias se hallan en todo el mundo como comensales en el conducto intestinal de gran cantidad de animales salvajes y domésticos. En medicina veterinaria las infecciones causadas por estos microorganismos tienen gran interés debido a las serias pérdidas económicas que experimentan los granjeros como resultado de los abortos y la infertilidad de los ovinos infectados³⁵.

La infección de los animales se transmite se forma venérea y los microorganismos pueden alojarse en los tractos genitourinario e intestinal durante lapsos prolongados sin causar síntomas. *C. jejuni* tiene el espectro más amplio de reservorios animales que incluye a las aves de corral, los perros, los gatos, los ovinos y los bovinos.

Las grandes epidemias de infecciones humanas se han rastreado hasta el consumo de leche, agua y alimentos contaminados, que constituyen los principales vehículos para la transmisión de los microorganismos a los seres humanos, también los animales de compañía, como perros y gatos, se pueden infectar y convertirse en fuentes de infección humana, sobre todo para los niños pequeños³⁹.

Sin embargo, también se ha demostrado la diseminación de un ser humano a otro por la vía fecal-oral. El *C. jejuni* infecta a las personas de todas las edades, pero el diagnóstico es más frecuente en los niños que en los adultos. La atención de los niños pequeños con diarrea causada por *C. jejuni* conlleva el riesgo de la infección de las personas adultas que los cuidan.

La incidencia de la infección es mayor durante el verano y el otoño. Algunos estudios efectuados en ciertos hospitales de Estados Unidos y otros países indican que el *C. jejuni* causa tantas enteropatías en los seres humanos como las especies de los géneros *Salmonella* y *Shigella*.

De acuerdo con algunos datos la incidencia de *C. jejuni* en las personas con diarrea es similar a la de *Yersinia enterocolitica*, aproximada al 9% de los casos diagnosticados. Con frecuencia el *C. jejuni* causa enfermedades diarreicas agudas en personas que viajan a países en desarrollo. En notable contraste con los hallazgos en los países desarrollados, en los países del tercer mundo el *C. jejuni* se aísla mucho más a menudo de las personas sanas en especial durante los 5 primeros años de vida³⁴.

2.1.3. Patogenia

La susceptibilidad individual a la infección parece variar de forma considerable. Los estudios epidemiológicos han demostrado que la ingestión de apenas 500 microorganismos en la leche puede provocar la

enfermedad en algunas personas, mientras que en otras la ingestión de menos de 10^6 microorganismos no causa diarrea.

Es probable que la variación de la virulencia relativa de las diferentes cepas también sea un determinante importante de la dosis infecciosa.

La infección entérica por *C. jejuni* da como resultado la invasión de la mucosa, caracterizada por la ulceración de la superficie mucosa, la formación de abscesos en las criptas y la necrosis hemorrágica del íleon y el yeyuno.

El examen de las heces durante la infección revela diarrea hemorrágica en una gran proporción de los casos y en general hay leucocitos en las heces, incluso en niños pequeños. Se han identificado tres propiedades potencialmente patogénicas del *C. jejuni* la invasividad, la producción de enterotoxina y la producción de citotoxina. La colonización del revestimiento mucoso del conducto gastrointestinal parece desempeñar un papel importante en la capacidad del microorganismo de producir la enfermedad. Para la colonización son cruciales los flagelos que incrementan la adherencia y que en virtud de su movilidad permiten que los microorganismos atraviesen la capa mucosa que cubre la superficie del intestino.

Las cepas de *Campylobacter* aisladas de los pacientes con diarrea acuosa producen una enterotoxina termolábil que estructural e inmunológicamente están relacionadas con la enterotoxina colérica.

La toxina causa una diarrea secretora por la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa en la mucosa intestinal y por la alteración del transporte normal de los iones en los enterocitos.

2.1.4. Identificación en el laboratorio y conservación

Las características del cultivo son muy importantes para el aislamiento y la identificación de *C. jejuni*, se requiere medios selectivos y la incubación debe efectuarse en atmósfera con O₂ reducido (5%) y la adición de CO₂ (10%).

La incubación de las placas primarias debe ser entre 42°C a 43°C aunque el *C. jejuni* crece bien entre 36 a 37°C la incubación a 42°C impide el crecimiento de la mayor parte de las otras bacterias presentes en las heces y permiten la proliferación de las *campilobacterias* termófilas. Las colonias se desarrollan totalmente de 24 a 48 horas.

El aislamiento de *C. jejuni* de muestras de material obtenido del recto y material fecal se ha visto facilitado por el desarrollo de medios selectivos. Los medios selectivos apropiados incluyen los medios de Butzler, de Skirrow y Campy-BAP. Estos medios contienen diversos antibióticos para inhibir la proliferación excesiva de la flora rectal competitiva³⁴.

Las colonias tienden a ser incoloras o de color gris pueden ser acuosas y extenderse o redondas y convexas y ambos tipos de colonias pueden aparecer sobre las placas de agar⁴⁰.

Las características estructurales de *Campylobacter* son las típicas de bacterias Gram negativas, una pared celular en la que destaca la presencia de galactosa, manosa y ramnosa, en la membrana externa sobresale la presencia del antígeno somático O también referido como lipopolisacarido al cual se debe la diversidad serológica de *C. jejuni* ya que se conocen más de 60 antígenos "O".

Dan M⁴¹ utilizó para evaluar la recuperación a largo plazo de *Campylobacter jejuni* dos métodos de congelación, a – 70°C y en nitrógeno líquido, y empleó 3 medios de preservación Cary-Blair, Amies y solución salina-glicerol, y preservó en los 3 a otros microorganismos enteropatógenos (*Salmomella*, *Shigella*) eficientemente por un periodo de 12 meses, excepto a *Campylobacter jejuni*⁴¹. Luechtefeld NW⁴² menciona que cepas puras de *Campylobacter* congeladas a – 70°C en un medio con glicerol y caldo brucela los mantiene viables por varios años; aun que no menciona cuantos y en que cantidad de microorganismos.

Para mantener una cepa de *Campylobacter jejuni* a corto plazo se puede utilizar medio Mueller Hinton M-H, preparado con 0.25% de agar, extracto de Fildes y 0.15% de carbón activado a 4°C por cuatro semanas, o bien en caldo M-H con glicerol al 30% y sangre a – 10°C durante 30 días o a – 70°C por tres meses³³ también se han realizado estudios para su conservación a – 10°C en un medio compuesto por fosfato salino (PBS) pH 6.7, carbón 0.0025%, FBP al 0.1% (sulfato ferroso, metabisulfito de sodio, piruvato de sodio), L-cistina, glicerol 10%, por un periodo de 135 días⁴³.

El medio FBP fue nuevamente probado a – 85°C y a – 20°C, donde se obtuvo una recuperación de 100% y 80% respectivamente después de un año⁴⁴.

Se estudió también su comportamiento en un medio de caldo brucela-albúmina y glicerol al 10% a – 20°C y a – 65°C, en donde se observó que a – 20°C no fueron recuperadas después de un mes y a – 65°C los resultados de la viabilidad disminuyeron 6.5 logaritmos, también se liofilizaron cepas con sacarosa al 12% y leche descremada al 10%, el resultados entre estos dos soportes no fue diferente⁴⁵, pero en ambos se recuperaron microorganismos.

2.1.5. Manifestaciones clínicas

La infección por *C. jejuni* puede manifestarse de varias formas diferentes. La enteritis aguda es la presentación más común, con síntomas que duran de un día a una semana o más tiempo.

El periodo de incubación es variable (1 a 7 días), y a menudo se producen síntomas como fiebre, cefalea y mialgias con un promedio de 12 a 24 horas antes del comienzo de los síntomas intestinales. La diarrea puede variar de deposiciones blandas a una diarrea acuosa masiva o deposiciones con sangre y células inflamatorias. El dolor abdominal es un síntoma común y se manifiesta como cólico. Durante el punto álgido de la enfermedad, pueden producirse diez o más deposiciones diarreicas al día, la enfermedad suele ser autolimitada⁴⁶.

La infección también puede dar como resultado una colitis aguda con fiebre, cólicos abdominales y diarrea hemorrágica. El tenesmo es un síntoma frecuente y en las formas más severas, los pacientes tienen un aspecto tóxico. De forma ocasional el dolor abdominal agudo, en general en el cuadrante inferior derecho, puede ser el síntoma de infección más importante o único. Asimismo la fiebre muy alta y persistente puede ser la única manifestación de la infección.

Se produce bacteriemia en menos del 1 % de los pacientes infectados por *C. jejuni*. Si bien las infecciones extraintestinales son raras, se han informado casos de meningitis, colecistitis e infecciones urinarias³⁴.

2.2.0 *Helicobacter pylori*

La presencia de microorganismos espirales en el estómago de mamíferos fue descrito inicialmente por Bizzozzer en 1893, tres años después en 1896, Solomón describió microorganismos espirales “espirilos” tanto en gatos como en perros, en 1906, Baltour observó espiroquetas en gastritis y úlcera intestinas de perros y monos.

La primera descripción de este microorganismo en humanos fue realizada por Krienitz, en 1906 con estas evidencias de la presencia de éste microorganismo en el epitelio gástrico se retoman estos estudios en 1924, por Lucko y Seth, quienes describieron, la presencia de una considerable producción de ureasa en el estómago, producida por *Helicobacter pylori*.

En 1938, Doenges describió espiroquetas con la descripción morfológica actual de *Helicobacter pylori* en estomago de víctimas accidentadas.

En 1975 Steer y Colin-Jones describieron a la bacteria sobre la superficie luminal de las células epiteliales de pacientes con úlcera gástrica.

El crédito del redescubrimiento de este microorganismo y subsecuentes eventos son atribuidos a Marshall y Warren quienes lograron por primera vez el aislamiento de *H. pylori* y publicaron en 1983, un trabajo en donde se ponía atención a la estrecha relación entre *H. pylori* la gastritis y úlcera duodenal⁴⁵.

En 1989, *Campylobacter pylori* (antes *C. pyloridis*) fue reclasificado en un nuevo género como *Helicobacter pylori*. Desde 1983, se ha dedicado un considerable interés al *Helicobacter pylori*, que se ha observado sobre la superficie del epitelio antral gástrico en pacientes con gastritis crónica activa³⁴

2.2.1. Morfología y fisiología

En los cortes de tejidos, los microorganismos pueden verse más fácilmente con una tinción con plata, pero en muchos casos también se les puede demostrar de forma directa en los frotis de tejidos teñidos con la tinción de Gram.

Aparecen estrechamente asociados con las superficie de las células epiteliales y en la luz, debajo de la capa mucosa. En los tejidos, los microorganismos son curvos y Gram negativos, mientras que en los cultivos a menudo tienen forma más forma de bastón y se observan células grotescas en forma de U y circulares.

Las cepas de *H. pylori* tienen cierto número de características que las diferencian de las especies del género *Campylobacter*: las *campilobacterias* tienen un solo flagelo polar, mientras que el *H. pylori* tiene un ramillete de flagelos polares que están envainados, no se observan filamentos axiales. La movilidad óptima, que es de naturaleza en sacacorchos o espiral, aparece en los medios altamente viscosos, como la capa mucosa gástrica.

2.2.2. Epidemiología

En 1994, la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de su Agencia para la Investigación en Cáncer (IARC) consideró que *H. pylori* era un agente carcinógeno del grupo 1 para el hombre¹.

Se ha encontrado en diferentes estudios que la prevalencia de infección por *H. pylori* en personas asintomáticas aumentan la prevalencia de gastritis que a su vez se aumenta a medida en que avanza la edad. La

prevalecía de *H. pylori* depende en gran parte del nivel socio-económico, la raza y condiciones higiénico-sanitarias.

Se ha sugerido que la manipulación de secreciones del conducto digestivo superior puede ser un mecanismo de transmisión persona a persona. Se menciona también la posibilidad de transmisión intrafamiliar persona a persona y por especies distintas a la humana es decir una posible zoonosis.

El reservorio de *H. pylori* aun se desconoce aun cuando se ha demostrado la viabilidad del microorganismo durante largo tiempo en el agua⁴⁷.

El estado socioeconómico pobre es un factor de riesgo importante para la enfermedad péptica de la úlcera. El trabajo vigoroso puede aumentar el riesgo de esta enfermedad con la infección de *H. pylori* y los factores genéticos no influyen el riesgo en adultos⁴⁸.

El reciente interés en *H. pylori* fue suscitado por los estudios de muestras de biopsia gástrica procedentes de pacientes con gastritis aguda y crónica, úlceras gástricas y duodenales y otras afecciones gastrointestinales. Desde 1982, cuando el *H. pylori* se aisló por primera vez de material de biopsias, se ha demostrado en reiteradas ocasiones la asociación de este microorganismo con la gastritis antral y de la gastritis antral con las úlceras gástricas y duodenales³⁴.

2.2.3. Patogenia

Helicobacter pylori crece óptimamente en pH de 6 a 7 y muere o no se desarrolla, en el pH de la luz gástrica. El moco del lado luminal tiene pH bajo de 1 a 2, en el lado epitelial el pH es de casi 7.4. *H. pylori* se sitúa profundamente en la capa mucosa cerca de la superficie epitelial donde el pH es fisiológico.

H. pylori muestra una potente actividad ureasa que genera la producción de amonio y amortigua adicionalmente el ácido. El *H. pylori* es muy móvil aun en el moco y es capaz de desplazarse hacia la superficie epitelial⁴⁰.

Los microorganismos son sensibles al ácido y parecen residir como una capa profunda en el revestimiento mucoso de estómago.

Son muy móviles y se asocian estrechamente con las células gástricas que secretan moco. Parecen invadir la mucosa gástrica en las regiones de las uniones intercelulares y producir gran cantidad de iones amonio y dióxido de carbono a partir de la urea presente en el lugar.

La presencia de los microorganismos sobre la superficie, entre los enterocitos, en la profundidad de las glándulas antrales y dentro de los enterocitos da como resultado una respuesta inflamatoria que incluye leucocitos polimorfonucleares. En algunos pacientes con gastritis crónica se produce la pérdida de las microvellosidades en las regiones parasitadas³⁴.

2.2.4. Identificación en el laboratorio y conservación

Cuando se incuba a 37°C en un ambiente microaerófilico crece de 3 a 6 días, los medios para aislamiento primario incluyen el medio de Skirrow con vancomicina, polimixina B y trimetoprim, el medio de chocolate y otros medios selectivos con antibióticos (vancomicina, ácido nalidíxico, anfotericina)⁴⁰.

H. pylori es un microorganismo microaerófilico y, si la humedad es elevada, puede proliferar a 37°C en incubadoras con CO₂ estándar que contenga 10% de CO₂. Prolifera con los medios que contienen sangre entera o lisada y produce colonias circulares, translúcidas y no pigmentadas. No metaboliza ninguna azúcar³⁴.

Las colonias son traslúcidas de 1 a 2 mm de diámetro, es oxidasa y catalasa positiva y es un fuerte productor de ureasa⁴⁹.

Se ha observado que *Helicobacter pylori* es una bacteria frágil al almacenarse a temperaturas bajas y ultra bajas en comparación con otras bacterias intestinales; se observó que en suspensiones bacterianas de solución salina, *Escherichia coli* y *Bacteroides*, se conservaron a 4°C, – 20°C y – 80°C por tres semanas; *Escherichia coli* y *Bacteroides* fueron recuperados, y *Helicobacter pylori* no se recuperó⁵⁰.

En algunos estudios realizados para la preservación de *Helicobacter pylori* se ha encontrado que puede ser conservado en nitrógeno líquido en un medio de caldo BHI con glicerol al 20%, a – 70°C, en agua peptonada al 1% con glicerol al 25%⁴⁹.

También se ha observado que se tiene una buena recuperación en medios con leche descremada-glicerol 17%, caldo brucela-glicerol 20% y cistina-albúmina-glicerol 20%, con una mejor recuperación a – 70°C que a – 20°C⁵¹.

El caldo brucela-sangre caballo 2%-glicerol 17%-mucina 10% a – 70°C es otro medio eficaz para la conservación de *Helicobacter pylori* hasta por 9 meses⁵².

Se ha observado también que en sangre de oveja, caballo, suero de caballo con/sin glicerol o medios con / sin aceite mineral el *Helicobacter pylori* puede ser conservado a – 70°C y en nitrógeno líquido, con una recuperación de 87.5% por dos años⁵³.

Helicobacter pylori liofilizado se observó que puede sobrevivir en un soporte de caldo inositol 5%-glucosa 25% pH 7 con una disminución de

3.5 logaritmos después de ser liofilizado, con una congelación rápida o lenta⁵⁴.

2.2.5. Manifestaciones clínicas

Características de la infección por *Helicobacter pylori* en niños.

El dolor abdominal ya sea de localización epigástrica o periumbilical constituye el motivo de consulta habitual, acompañado en aproximadamente la tercera parte de los niños con vómitos y en menor proporción de anorexia con pérdida de peso.

La gastritis antral se asocia en menor medida en adultos a úlcera duodenal y gástrica. La aparición de úlcera y cáncer gástrico se ha asociado en adultos.

Ocasionalmente la infección por *H. pylori* en niños es la causa de aparición de enteropatía y en otras ocasiones puede conducir a retraso ponderoestatural y diarrea crónica en un cuadro clínicamente compatible con síndrome de malabsorción. La infección se ha relacionado también con talla baja y retraso puberal en niñas preadolescentes y con anemia ferropénica de causa no explicada¹.

2.3.0. *Haemophilus influenzae*

El género *Haemophilus* comprende un grupo de bacilos Gram negativos pequeños y pleomórficos con requerimientos exigentes para la proliferación. El nombre del género proviene del requerimiento de estos microorganismos para su proliferación, de factores accesorios que se encuentran en la sangre, es decir, *haemo* del griego sangre y *philos* amor, amistad.

Los miembros del género son parásitos obligados para el ser humano y otros vertebrados. Poseen una marcada especificidad por el huésped y con muy pocas excepciones, cada especie se asocia de manera exclusiva con un huésped específico. En el ser humano casi todas las especies de *Haemophilus* son miembros de la flora nativa del conducto respiratorio superior. Como causa de infección humana, el *Haemophilus influenzae* es la especie más importante del grupo. En los lactantes y en los niños pequeños produce meningitis bacteriana aguda y varias otras enfermedades pediátricas graves. En los adultos se asocia con la enfermedad pulmonar crónica.

El microorganismo fue aislado por primera vez por Pfeiffer durante la pandemia de influenza de 1892. La frecuencia de su presencia en la nasofaringe de los pacientes con influenza y en los cultivos de pulmón post mortem condujo a la suposición errónea de que era el agente etiológico de la influenza de donde proviene la designación de bacilo de la influenza, como se demostró más adelante la influenza es causada por un virus. El papel del *H. influenzae* durante las pandemias de 1892 y 1918 al parecer fue el de un invasor secundario.

Las cepas de *H. influenzae* que causan meningitis y otras infecciones agudas se diferencian de las que se encuentran en el conducto

respiratorio de las personas sanas en que estas cepas poseen cápsulas. Esta importante observación efectuada por Pittman proporcionó la base para el conocimiento actual de la enfermedad causada por *H. influenzae*.

Estudios realizados revelaron que de los seis serotipos capsulares demostrados por Pittman, los microorganismos del tipo b son responsables de casi todas las infecciones agudas causadas por *H. influenzae*. El *H. influenzae* del tipo b es la causa más común de meningitis bacteriana aguda en la lactancia y la primera infancia, también es la causa de enfermedades invasoras tales como la celulitis, la neumonía y la epiglotitis aguda³⁴.

2.3.1. Morfología y fisiología

Haemophilus influenzae, es pleomórfico es un cocobacilo de 0.2 a 0.3 por 0.5 a 0.8 μm . Puede haber cápsulas refráctiles débiles demostrables por la reacción de Quellung con antisueros específicos para el tipo de *H. influenzae*, es Gram negativo.

Los microorganismos no encapsulados frecuentes del esputo o de las aspiraciones del oído a menudo son más alargados que los microorganismos encapsulados y pueden presentar una coloración bipolar con la tinción de gram. Los microorganismos de las colonias rugosas son muy pleomórficos y a menudo tienen el aspecto de hebras largas y filamentos

2.3.2. Epidemiología

Muchas infecciones ocurren en niños entre los 3 meses y 5 años de edad, la mayor parte de las infecciones sistémicas son con el tipo b. Se sabe que niveles inadecuados de anticuerpos anticapsulares bactericidas

protectores a esta edad desempeñan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.

Es probable que la inmunidad en el neonato sea adquirida por medio de anticuerpos transplacentarios que se pierden en los primeros meses de vida. Estos anticuerpos en general, reaparecen más tarde, luego de la exposición al microorganismo tipo b o a otros antígenos microbianos que generan anticuerpos con reacciones cruzadas³².

2.3.3. Patogenia

Las especies de *Haemophilus* no encapsulado, colonizan el conducto respiratorio superior de casi todos los individuos durante los primeros meses de vida, estos microorganismo se pueden diseminar localmente y producir enfermedad del oído (otitis media), senos (sinusitis) y conducto respiratorio inferior (bronquitis, neumonía); no obstante, la enfermedad diseminada es relativamente rara.

Por el contrario, *H. influenzae* encapsulado (en particular el subgrupo b) rara vez se encuentra en el conducto respiratorio superior, aunque es la causa más frecuente de epiglotitis y meningitis en la población pediátrica. El microorganismo penetra a través de la mucosa nasofaríngea y pasa a la sangre. Si no se sintetizan anticuerpos opsonizantes específicos dirigidos frente a la cápsula polisacárida, se puede producir bacteriemia de alto grado con diseminación a las meninges y otros focos dístales.

El principal factor de virulencia de *H. influenzae* es la cápsula polisacárida antifagocítica, que contiene ribosa, ribitol y fosfatos. La fagocitosis y la eliminación de las bacterias se estimula en gran medida por los anticuerpos dirigidos contra la cápsula, que pueden producirse como

resultado de la infección natural, la transmisión pasiva de anticuerpos o la vacunación con preparados a partir de antígenos capsulares⁴⁶.

2.3.4. Identificación en el laboratorio y conservación

Usualmente el crecimiento es estimulado por una atmósfera con 5-10% de CO₂, por lo cual se recomienda su incubación en un frasco con vela o estufa con CO₂, por 24 horas, las colonias en agar chocolate son transparentes, húmedas, lisas, convexas, con un olor característico penetrante⁵⁵.

2.3.4.1. Características de su cultivo

El agar chocolate es el medio más utilizado para el aislamiento de especies de *H. influenzae*. Para su preparación se añade sangre a la base del agar y se la calienta a 80°C hasta que tome un color marrón. El calor leve libera los factores X y V de las células sanguíneas y también inactiva las enzimas que degradan el factor V sin destruir este factor.

Los medios de agar enriquecidos de Levinthal y Fildes también son útiles. Como el medio de Levinthal es transparente e incoloro resulta especialmente útil para la diferenciación de las cepas encapsuladas. Los medios de agar sangre comunes permiten su proliferación solo cuando la placa de agar se inocula de manera cruzada con un *Staphylococcus* u otro microorganismo que excrete el factor V.

Las colonias de tamaño apreciable aparecen como satélites en la vecindad de la cepa fuente. Sin embargo no se debe utilizar placas de agar con sangre humana fresca o de carnero, por que tiene inhibidores termolábiles del factor V. La máxima proliferación ocurre a 37°C y con un pH de 7.4 a 7.8, para el aislamiento primario se recomienda la incubación

en presencia de CO₂ al 10% por que tiene un efecto incrementador sobre la proliferación de algunas cepas.

La proliferación es evidente de 18 a 24 horas después de la inoculación, en general las colonias son muy pequeñas y similares a rocío y tienen una apariencia áspera o rugosa, tienen un diámetro de 0.5 a 1.5 mm. A las 48 horas de incubación se desarrolla una umbilicación central a causa de la excreción de un polímero capsular.

Las colonias mucoides a menudo se convierten espontáneamente en rugosas debido a la pérdida de la cápsula. Los cultivos de *H. influenzae* son difíciles de mantener en el laboratorio por su tendencia a la autólisis. Para mantener de forma apropiada los microorganismos virulentos viables se requieren transferencias frecuentes a medios de agar chocolate u otros medios enriquecidos³⁴.

2.3.4.2. Requerimientos nutricionales

Todas las especies de *Haemophilus* requieren uno o los dos factores de crecimiento presentes en la sangre denominados X y V. El factor X termoestable es la protoporfirina IX, el precursor de la hemina que es el grupo prostético en los citocromos y en enzimas del hemo como la catalasa y la peroxidasa.

Las especies hemina-independientes como *H. parainfluenzae* sintetizan la hemina por la vía común del trapirrol pero los microorganismos dependientes de la hemina han perdido la capacidad de convertir el ácido δ-aminolevulínico en protoporfirina. Al parecer las especies hemino-dependientes carecen de todas las enzimas para la síntesis del tetrapirrol con excepción de la ferroquetalasa o hemo-sintetasa que esta presente

de forma variable y que se cataliza la inserción final de Fe^{2+} o Fe^{3+} en el anillo de protoporfirina.

Cuando prolifera en anaerobiosis *H. influenzae*, cambia a un metabolismo anaerobio y no produce citocromos, por lo tanto, el requerimiento de hemina está muy reducido si no ausente por completo. El factor termolábil V es en grado mínimo un mononucleosido de nicotinamida, pero en general se le describe como nicotina adenina dinucleótido (NAD) o NAD fosfato que funcionan como coenzimas para las deshidrogenasas unidas a la piridina³⁴.

Las especies patógenas de *Haemophilus* son difíciles de mantener en estado viable por largos periodos tiempo en conservación a bajas temperaturas.

Por lo cual se han realizado estudios para la conservación de este microorganismo y se observado la viabilidad en diferentes medios por ejemplo; a $-70^{\circ}C$; el medio LSPQ (glucosa 5 g, carbón activado 0.6 g, leche descremada 3 g, gelatina 10 g en 100 mL de agua) en el cual se observaron perdidas significativas a los 5 meses; en TSBG (caldo soya tripticaseina 10%, glicerol 40% y suero de caballo) es un medio efectivo para la conservación a $-70^{\circ}C$ hasta por un año, medio LB (caldo BHI 3.7g/100 mL de agua, sangre de caballo 7% y 6 mL de levadura al 3%) es efectivo hasta por dos años⁵⁶.

Otros medios también eficaces para la conservación de *Haemophilus influenzae* a $-20^{\circ}C$ y a $-70^{\circ}C$ hasta 6 meses son los siguientes: BHI-lactosa 6%-glicerol 25%, BHI-sacarosa 10%-glicerol 25%, BHI-leche 4%-glicerol 25%, BHI-glicerol 25%, BHI-lactosa 6%, CST(caldo soya tripticaseina)-sacarosa 10%-glicerol 25%, CST-leche 4%-glicerol 25%, CST-glicerol 25%, CST-lactosa 6%, CST-sacarosa 10%, y leche descremada 10%-glucosa 1%-extracto de levadura 0.5%-glicerol 10%,

con una recuperación de 83, 72, 75, 90, 60, 80, 72, 70, 64, 35 y 93% respectivamente⁵.

También se puede utilizar suero de caballo con glucosa 7.5% para liofilizar y suero de caballo y glicerol 25% a – 70°C³.

2.3.5. Manifestaciones clínicas

Desde los 3 meses hasta los 5 años el agente que con mayor frecuencia ocasiona meningitis es *Haemophilus influenzae*, las manifestaciones clínicas de la meningitis varían según la edad del paciente.

En recién nacidos los datos de “meningitis” a esta edad suelen ser muy inespecíficos y difíciles de diferenciar de aquellos de la sepsis neonatal, los síntomas son fiebre o hipotermia, irritabilidad, rechazo a consumir alimentos por vía oral, vómito, diarrea, convulsiones⁵⁷.

La epiglotis se caracteriza por celulitis e hinchazón del tejido supraglótico, la enfermedad es máxima en niños de entre 2 a 4 años, los niños presentan faringitis, fiebre y dificultad respiratoria que progresan rápidamente hasta la completa obstrucción de las vías aéreas y la muerte. La celulitis se observa en niños de muy corta edad, los pacientes presentan un color rojo azulado de las mejillas o zonas periorales. La artritis es secundaria a la diseminación por *Haemophilus influenzae*, tipo b, es la forma más común en niños menores de 2 años⁴⁶.

Haemophilus influenzae es el agente etiológico importante de infecciones en el conducto respiratorio inferior, especialmente en ancianos o en personas con fibrosis quística⁵⁵.

2.4.0. *Neisseria gonorrhoeae*

El término gonorrea, que significa flujo de simiente, fue introducido por Galeno alrededor del año 130 d.C. Si bien los escritos antiguos se refieren a un estado clínico caracterizado por flujo uretral, no fue sino hasta el siglo XIII que los médicos aplicaron de manera definitiva este término a una enfermedad de transmisión sexual.

A menudo la sífilis y la gonorrea se adquirían de forma simultánea y por eso las descripciones de las dos enfermedades se mezclaron. En 1767, el famoso médico John Hunter adquirió sífilis y gonorrea durante una autoinoculación experimental en la cual utilizó el exudado uretral de un paciente que se pensaba padecía solo gonorrea. Hunter atribuyó sus síntomas sífilíticos posteriores a la gonorrea y como resultado de esto, la confusión de las dos enfermedades fue total.

Hasta mediados del siglo XIII no se les diferenció de manera efectiva. Descubierta en 1885 por Neisser, de quien toma su nombre el género, la *N. gonorrhoeae* es el agente etiológico de la gonorrea, la más frecuentes de las enfermedades por transmisión sexual³⁴.

Es un patógeno obligado del humano, coloniza el epitelio mucoso del conducto genital inferior, en el cérvix, como sitio primario en mujeres y la uretra en hombres, la colonización primaria en el recto ocurre en hombres homosexuales y en la faringe en hombres o mujeres que practican el sexo oral³⁷.

2.4.1. Morfología y fisiología

Las *Neisseria* son cocos gram negativos de 0.6 a 1 μm de diámetro, por lo general se las ve en pares con sus lados adyacentes aplanados. La

estructura de las *Neisseria* es muy parecida a la de otras bacterias gram negativas, la estructura del citoplasma y de la pared celular del meningococo y del gonococo son muy similares. La envoltura celular está compuesta por tres elementos principales: la membrana citoplasmática, la capa rígida de peptidoglicana y la membrana externa que contiene lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas que son importantes desde el punto de vista inmunológico.

Estos microorganismos se inhiben por los ácidos grasos y los restos de metales presentes en los hidrolizados de peptona y agar de otros medios de cultivos, son sensibles a la desecación y requieren una atmósfera con CO₂ al 5% y una temperatura de 35 a 37°C.

La identificación se basa en la morfología típica, en la presencia de citocromo oxidasa y en el metabolismo oxidativo de la glucosa, pero no de otros carbohidratos⁴⁶.

2.4.2. Patogenia

El lugar de entrada habitual del gonococo en el cuerpo es la vagina, la mucosa uretral del pene, pero ciertas prácticas sexuales pueden conducir a depósito de microorganismos en la faringe o la mucosa rectal.

Mecanismos de adherencia especiales unen a las bacterias a las células mucosas y evitan que sean eliminadas por el flujo de orina o exudado vaginal.

Después de adherirse, los gonococos se multiplican con rapidez y se extienden por el cérvix en la mujer y hasta la uretra en el varón. La diseminación es facilitada por varios factores de virulencia, aunque el patógeno no posee flagelos y no es móvil.

La producción de una proteasa IgA ayuda a protegerlos frente a los anticuerpos secretores del huésped. Los gonococos invaden las células epiteliales no ciliadas que internalizan a la bacteria y le permiten multiplicarse dentro de las vacuolas intracelulares, protegida de los fagocitos y los anticuerpos. Esas vacuolas descienden por la célula y se funden con la membrana basal, descargando el contenido bacteriano en el tejido conectivo subepitelial.

La lesión del huésped se debe a las respuestas inflamatorias provocadas por el patógeno. La infección persistente no tratada puede dar lugar a inflamación crónica y fibrosis. La infección suele ser localizada pero las bacterias pueden invadir el torrente sanguíneo y diseminarse a otras partes del cuerpo, las cepas de *N. gonorrhoeae* asociadas con enfermedad diseminada tienen características particulares como la resistencia a la acción bactericida del suero³⁹.

Los gonococos se fijan a las células de las mucosas, penetran en ellas y se multiplica, pasando después al espacio subepitelial, donde se establece la infección, la presencia de pili es esencial para su fijación inicial. La endotoxina gonocócica es responsable de la destrucción tisular celular. La inflamación crónica y la fibrosis de la infección persistente, pueden producir esterilidad, ceguera o artritis con destrucción articular⁴⁶.

2.4.3. Epidemiología

La enfermedad gonocócica es una enfermedad específica humana, no se conoce ningún otro reservorio animal. La transmisión de *N. gonorrhoeae* se produce por contacto sexual por lo tanto la afección no tiene límites sociales o geográficos. Si bien la enfermedad puede involucrar las mucosas del cérvix uterino o la uretra puede haber desarrollo de

salpingitis y bartolinitis en mujeres o epididimitis y abscesos periuretrales en hombres por diseminación local de las bacterias³².

El riesgo de infección en las mujeres después de una relación única con un varón infectado es del 80%, en el caso contrario, el riesgo para el varón es del 20%. La incidencia de la infección aumenta cuando se mantienen relaciones sexuales múltiples, también es muy común entre los varones homosexuales y bisexuales que en los heterosexuales^{39, 46}.

Resistencia a la infección gonocócica

Tanto factores específicos como inespecíficos desempeñan un papel importante en la defensa del huésped contra la infección gonocócica.

Entre los mecanismos que han sido implicados en las mujeres se encuentran los cambios cíclicos en los niveles hormonales y en el pH genital asociados con el ciclo menstrual. La infección gonocócica diseminada ocurre con más frecuencia durante el período perimenstrual.

Las variaciones del pH la osmolaridad y las concentraciones de urea en la orina también parecen ser importantes y podrían explicar por que algunos hombres no se infectan después de la exposición.

La presencia de anticuerpos naturales derivados de las bacterias gram negativas con antígenos que reaccionan de forma cruzada con los antígenos gonocócicos sin lugar a dudas son muy importantes en la resistencia natural a la infección en el caso de algunas personas.

Las defensas específicas del huésped que tienen mayor importancia en la infección gonocócica son las del sistema inmune humoral. Los anticuerpos de las superficies mucosas constituyen la primera línea de defensa y consisten sobre todo en IgA e IgG.

La inmunidad sistémica constituye una línea de defensa secundaria importante contra la infección gonocócica. La actividad del complemento por vía clásica parece ser más importante que la actividad por la vía alterna. En presencia de anticuerpos y complemento los gonococos serosensibles son destruidos.

La opsonización mediada por anticuerpo y complemento, la fagocitosis y la destrucción por los leucocitos polimorfonucleares (PMN) son componentes importantes de la respuesta del huésped a la infección gonocócica, en especial en las infecciones gonocócicas de las mucosas o en otras localizaciones. Se ven grandes cantidades de PMN en los exudados uretrales o endocervicales de los pacientes, atraídos al sitio de la infección por agentes quimiotácticos, tales como el lipopolisacárido gonocócico y productos de degradación del complemento. Algunos de los PMN contienen una gran cantidad de microorganismos supuestamente como consecuencia de la opsonización y la fagocitosis³⁴.

2.4.4. Identificación en el laboratorio y conservación

Luego de 24 a 48 horas de incubación *N. gonorrhoeae* forma colonias pequeñas (0.5-2 mm), translúcidas, grisáceas, convexas, brillantes con bordes lisos. Con frecuencia se despegarán completamente de la superficie del agar y pueden ser mucoides o gomosas.

Como los microorganismos poseen una enzima autolítica activa no deben ser expuestas a la atmósfera ambiental durante mucho tiempo. Estos cocos se desarrollan mejor en un medio enriquecido con atmósfera de 5 a 10% de CO₂, en atmósfera humidificada a 37°C, en medios de cultivo como Thayer-Martin, agar chocolate enriquecido con suplementos y con colistina (para inhibir bacilos Gram negativos), nistatina (para inhibir levaduras) y vancomicina (para inhibir bacterias Gram positivas).

Las modificaciones de este medio incluyen el agregado de lactato de trimetroprima para inhibir el desarrollo invasor de *Proteus* (Thayer-Martin modificado)⁵⁵.

La utilización de carbohidratos por *N. gonorrhoeae* por el método de agar triptosa cistina (CTA) es el medio basal más comúnmente empleado para la determinación de los carbohidratos; glucosa (+), maltosa (-) lactosa (-) y sacarosa (-)³².

Las especies patógenas de *Neisseria* son notoriamente difíciles de mantener en estado viable por largos periodos de tiempo. Por lo cual se han realizado estudios para la conservación de este microorganismo, Riou y cols no recomiendan la conservación a – 20°C, ya que no inhibe las exopeptidasas del espacio periplásmico, que juega un papel en la autólisis del gonococo.

El medio TC (Nitrato ferrico 0.01 g, L-glutamina 10 g, bicarbonato de sodio 0.75 g, cloruro de sodio 3 g, cloruro de calcio 0.1 g, cloruro de magnesio 0.1 g, ácido tioglicólico 1 g, agar noble 3 g, carbón 10 g, almidón soluble 5 g, gelatina 10 g, MOPS 20.92 g, agua destilada 1000 mL), mantiene con una viabilidad del 71.4% a *Neisseria meningitidis* por 22 meses, a temperatura ambiente².

Para explorar la posibilidad de preservar *Neisseria gonorrhoeae* a – 20°C se estudió la viabilidad en medio base de gelatina usado principalmente para preparar discos de gelatina seca versión simplificada LSPQ (glucosa 5 g, carbón activado 0.6 g, leche descremada 3 g y gelatina 10 g en 100 mL de agua) y caldo soya tripticaseina con glicerol al 10%, en donde se observó que el medio LSPQ es un buen método de conservación para periodos menores de un año, mientras que en el medio de caldo soya tripticaseina con glicerol al 10% se observaron pérdidas significativas

después de 2 meses. En 1979, Yamai describió un medio usado para la preservación de *Neisseria gonorrhoeae* sobre discos de gelatina seca (medio Yamai: A: glucosa 5%, leche descremada 3%, carbón activado 0.6%; B: L-ascorbato de sodio 5%; C: solución de gelatina 20%; en proporción de 1: 0.2: 1 de las soluciones A: B: C) y observó que a -20°C la bacteria permanece viable por seis meses.⁵⁸

También se puede utilizar suero de caballo-glucosa 7.5%, una solución de albúmina con sacarosa que puede o no llevar peptona de caseína para liofilizar y a -70°C suero de caballo-glicerol 25%³.

2.4.5. Manifestaciones clínicas

En comparación con muchas otras enfermedades, la gonorrea no es muy contagiosa.

Un hombre sin protección tiene cerca de un 20% de posibilidades de adquirir la gonorrea a través de la relación sexual con una mujer infectada y el riesgo se reduce de manera considerable con el uso de un preservativo.

La gonorrea aguda en el hombre tiene un periodo de incubación de 2 a 8 días y la mayor parte de los casos ocurre dentro de cuatro días posteriores a la infección. El paciente se presenta con un ardor al orinar y una secreción purulenta por la uretra que significa uretritis anterior aguda. Puede tener fiebre y leucocitosis, pero en general, no presenta signos sistémicos, la infección es asintomática en un 10% de los casos, pero el paciente conserva la capacidad de transmitir la infección³⁴.

Los signos de enfermedad en las mujeres que presentan síntomas incluyen ardor con la micción o poliuria, flujo vaginal, fiebre y dolor abdominal. La complicación más importante de la gonorrea en las mujeres

es el desarrollo de la enfermedad inflamatoria pélvica por infección gonocócica de las trompas de Falopio. Esta enfermedad afecta alrededor del 15% de las mujeres con gonorrea y tiene dos consecuencias importantes: la enfermedad inflamatoria pélvica gonocócica es la causa principal de esterilidad y embarazos ectópicos por que las cicatrices de la infección pueden bloquear el pasaje del óvulo a través de las trompas de Falopio.

La formación de escaras también bloquea el flujo normal del líquido a través de las trompas de Falopio. En las zonas donde se acumula el líquido puede producirse la infección por otras bacterias, en especial microorganismos anaerobios. Esto conduce a la enfermedad inflamatoria pélvica crónica, una dolencia debilitante y dolorosa para la cual no existen formas satisfactorias de tratamiento.

Otras complicaciones que se encuentran de manera ocasional son la perihepatitis infecciosa y la peritonitis generalizada. Alrededor del 50% de las mujeres con gonorrea presenta colonización rectal concomitante y veces produce una proctitis, en un 10% de las mujeres el recto es la única región colonizada.

Otro sitio de colonización extragenital tanto en varones como en mujeres, es la faringe, que no suele producir síntomas³⁴.

La infección genital en los varones se suele limitar a la uretra. Tras un período de incubación aproximado de 2 a 7 días aparece un exudado uretral purulento y disuria. El 95% de los infectados presentan sintomatología aguda. Aunque las complicaciones son raras, puede producirse epididimitis, prostatitis y abscesos periuretrales.

La localización primaria de la infección femenina es la cérvix, aunque los gonococos pueden aislarse en la vagina, y el recto. Las pacientes sintomáticas suelen referir la presencia de exudado vaginal, disuria y dolor

abdominal. Un 10 – 20% de los casos presentan infección genital ascendente, con salpingitis, abscesos tuboovaricos y enfermedad pélvica inflamatoria^{39, 46}.

3.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para el trabajo de desarrollo de todos los laboratorios de microbiología, es fundamental disponer de cepas que se puedan usar en el momento requerido, por lo que es importante, que éstas se encuentren vivas, puras y mantengan sus características fisiológicas, esto se puede lograr conservándolas por un método apropiado.

En el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, se empleó una combinación o mezcla de sustancias usadas como crioprotectores en dos métodos de conservación a largo plazo para microorganismos de difícil mantenimiento y conservación, con el fin de buscar en cual de ellos se obtiene el mayor porcentaje posible de sobrevivencia y donde se mantengan todas sus características fisiológicas.

4.0. OBJETIVO

Evaluar dos métodos de conservación a largo plazo: congelación a -70°C y liofilización, para cuatro especies bacterianas con requerimientos nutricionales especiales (*Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*) empleando diferentes agentes protectores.

abdominal. Un 10 – 20% de los casos presentan infección genital ascendente, con salpingitis, abscesos tuboovaricos y enfermedad pélvica inflamatoria^{39, 46}.

3.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para el trabajo de desarrollo de todos los laboratorios de microbiología, es fundamental disponer de cepas que se puedan usar en el momento requerido, por lo que es importante, que éstas se encuentren vivas, puras y mantengan sus características fisiológicas, esto se puede lograr conservándolas por un método apropiado.

En el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, se empleó una combinación o mezcla de sustancias usadas como crioprotectores en dos métodos de conservación a largo plazo para microorganismos de difícil mantenimiento y conservación, con el fin de buscar en cual de ellos se obtiene el mayor porcentaje posible de sobrevivencia y donde se mantengan todas sus características fisiológicas.

4.0. OBJETIVO

Evaluar dos métodos de conservación a largo plazo: congelación a -70°C y liofilización, para cuatro especies bacterianas con requerimientos nutricionales especiales (*Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*) empleando diferentes agentes protectores.

5.0. HIPÓTESIS

Si se emplean mezclas de diferentes sustancias como agentes crioprotectores para conservar y recuperar microorganismos de difícil mantenimiento, por congelación a -70°C y liofilización, se obtendrá una recuperación mayor al 90% de sobrevivencia durante un periodo de observación de 180 días.

6.0. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se estudiaron cuatro cepas de referencia *Campylobacter jejuni* (ENCB0476), *Haemophilus influenzae* (ENCB0185), *Helicobacter pylori* (ENCB0477), *Neisseria gonorrhoeae* (ENCB0450 y ENCB0447) del cepario del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

7.0. MATERIAL

Cajas de petri.

Jarras para anaerobiosis.

Sobres de generadores de CO_2 (CO_2 System BBL GasPak) Becton, Dickinson and Company.

Tubos de ensaye

Criotubos de 3 mL.

Frascos de vidrio de 10 mL de boca ancha (viales)

Pipeta semiautomática de 10 a 100 μL .

Puntas de plástico para micropipeta.

Matraz Erlenmeyer.

Mecheros.
Gradillas.
Pinzas.
Portaobjetos.
Algodón.
Porta filtros.
Membranas 0.22 μ . (MF- Millipore MCE Membrane)
Pipetas Pasteur.
Jeringas de diferentes volúmenes.
Asas bacteriológicas

7.1. Equipo

Liofilizadora (USIFROID SMH 50-584.11)
Congelador REVCO a -70°C
Incubadoras para 37°C .
Balanza granataria
Microscopio óptico
Autoclave
Lámpara de Tesser para verificar vacío.

7.2. Medios de cultivo y reactivos

Base agar Casman (DIBICO S.A de C.V.).
Caldo tiglicolato (Merck).
Skim Milk (Difco).
Sangre de Carnero Desfibrinada estéril (ERIKAR).
Suero de Caballo estéril (HEMOPROVEDORES).
Albúmina Bovina Fracción V (SIGMA).
Mio-inositol (SIGMA).
Glicerol Anhidro (JT Baker).

Medio GC (DIBICO S.A de C.V.).
Discos de tetrametil p-fenilendiamina. (BIOXON)
Peroxido de hidrogeno.
Discos de Cefalotina. (BIOXON)
Discos de ácido nalidixico. (BIOXON)
Hipurato de sodio (REASOL)
Ninhidrina (Merck).
Acetona (REASOL)
Butanol. (BIOXON)
Discos factor V y X. (BIOXON)⁵⁹
Caldo tioglicolato + urea 1% + rojo de fenol
Carbohidratos glucosa (DIBICO), manosa (DIBICO), lactosa (DIBICO)
sacarosa (DIBICO) en base de CTA (DIBICO) + suero 1%.⁵⁹
Reactivos para tinción de Gram:⁵⁹
Cristal violeta (TECSIQUIM S.A de C.V)
Lugol (TECSIQUIM S.A de C.V)
Alcohol – acetona (1:1) (TECSIQUIM S.A de C.V)
Safranina. (TECSIQUIM S.A de C.V).

8.0. MÉTODO

8.1. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, y *Neisseria gonorrhoeae* fueron desarrolladas sobre medio de agar casman con sangre desfibrinada de carnero estéril al 5% y medio de Levinthal para *Haemophilus influenzae*. Las cepas de, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* fueron incubadas por 24 horas a 37°C, *Campylobacter jejuni* a 42°C en condiciones microaerófilas y *Helicobacter pylori* por 3 a 6 días a 37°C en condiciones microaerófilas.

Medio GC (DIBICO S.A de C.V.).
Discos de tetrametil p-fenilendiamina. (BIOXON)
Peroxido de hidrogeno.
Discos de Cefalotina. (BIOXON)
Discos de ácido nalidixico. (BIOXON)
Hipurato de sodio (REASOL)
Ninhidrina (Merck).
Acetona (REASOL)
Butanol. (BIOXON)
Discos factor V y X. (BIOXON)⁵⁹
Caldo tioglicolato + urea 1% + rojo de fenol
Carbohidratos glucosa (DIBICO), manosa (DIBICO), lactosa (DIBICO)
sacarosa (DIBICO) en base de CTA (DIBICO) + suero 1%.⁵⁹
Reactivos para tinción de Gram:⁵⁹
Cristal violeta (TECSIQUIM S.A de C.V)
Lugol (TECSIQUIM S.A de C.V)
Alcohol – acetona (1:1) (TECSIQUIM S.A de C.V)
Safranina. (TECSIQUIM S.A de C.V).

8.0. MÉTODO

8.1. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, y *Neisseria gonorrhoeae* fueron desarrolladas sobre medio de agar casman con sangre desfibrinada de carnero estéril al 5% y medio de Levinthal para *Haemophilus influenzae*. Las cepas de, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* fueron incubadas por 24 horas a 37°C, *Campylobacter jejuni* a 42°C en condiciones microaerofílicas y *Helicobacter pylori* por 3 a 6 días a 37°C en condiciones microaerofílicas.

8.2. Caracterización de las cepas de referencia

En el diagrama 1 se muestran las diferentes pruebas que se llevaron a cabo para cada una de las bacterias.

Prueba de oxidasa.

Se realizó prueba de oxidasa en discos de tetrametil p-fenilendiamina; con un aplicador de madera se tomó cuidadosamente una colonia y se impregnó sobre el disco. (se observa un cambio de color de blanco a morado después de aproximadamente 1 minuto).

Prueba de catalasa.

Con un aplicador de madera se colocó una parte de la colonia sobre una gota de peróxido de hidrógeno en un porta objetos. (se observa burbujeo).

Pruebas específicas para *Campylobacter jejuni*.

Se sembraron 2 cajas de agar sangre al 5%, con la cepa de *Campylobacter jejuni* ENCB 0476, por estria cruzada y se incubaron por 24 horas a 42°C en condiciones microaerófilas. Pasadas las 24 horas se observó morfología colonial característica, morfología microscópica con una tinción de Gram, observándose bacilos Gram negativos curvos, como alas de gaviota. Para la prueba de hidrólisis de hipurato, se hizo una suspensión gruesa de cultivo de *Campylobacter jejuni* en un tubo con solución salina estéril de hipurato al 1% (0.3 MI) y se incubó a 37°C durante 3 a 4 horas, transcurrido este tiempo se agregó 2 gotas de ninhidrina se agitó y en 10 segundos se observó (cambio de color de blanquecino a violeta). Para la susceptibilidad a la cefalotina y al ácido nalídixico, se sembró en forma masiva y se colocó con una pinza estéril los discos y se incubaron a 42°C por 24 horas en condiciones microaerófilas, después de este tiempo se observó inhibición a ácido nalídixico y resistencia a cefalotina.

Pruebas específicas para *Helicobacter pylori*.

Se sembraron 2 cajas de agar sangre al 5%, con la cepa de *Helicobacter pylori* ENCB 0477 por estria cruzada y se incubaron por 6 días a 37°C en condiciones microaerofílicas. Trascorrido este tiempo se observó morfología colonial característica, morfología microscópica con una tinción de Gram, observándose bacilos Gram negativo curvos, en forma de coma. Se realizó la prueba de hidrólisis de la urea en tubos con caldo tioglicolato con urea al 1%, en donde se realizó una suspensión de *Helicobacter pylori* en donde se observó un cambio de color (de amarillo a rosa intenso) en 10 segundos. Para la susceptibilidad a la cefalotina y al ácido nalídixico, se sembró en forma masiva y se colocó con una pinza estéril los discos y se incubaron a 37°C por 6 días en condiciones microaerofílicas, después de este tiempo se observó resistencia a ácido nalídixico e inhibición a cefalotina.

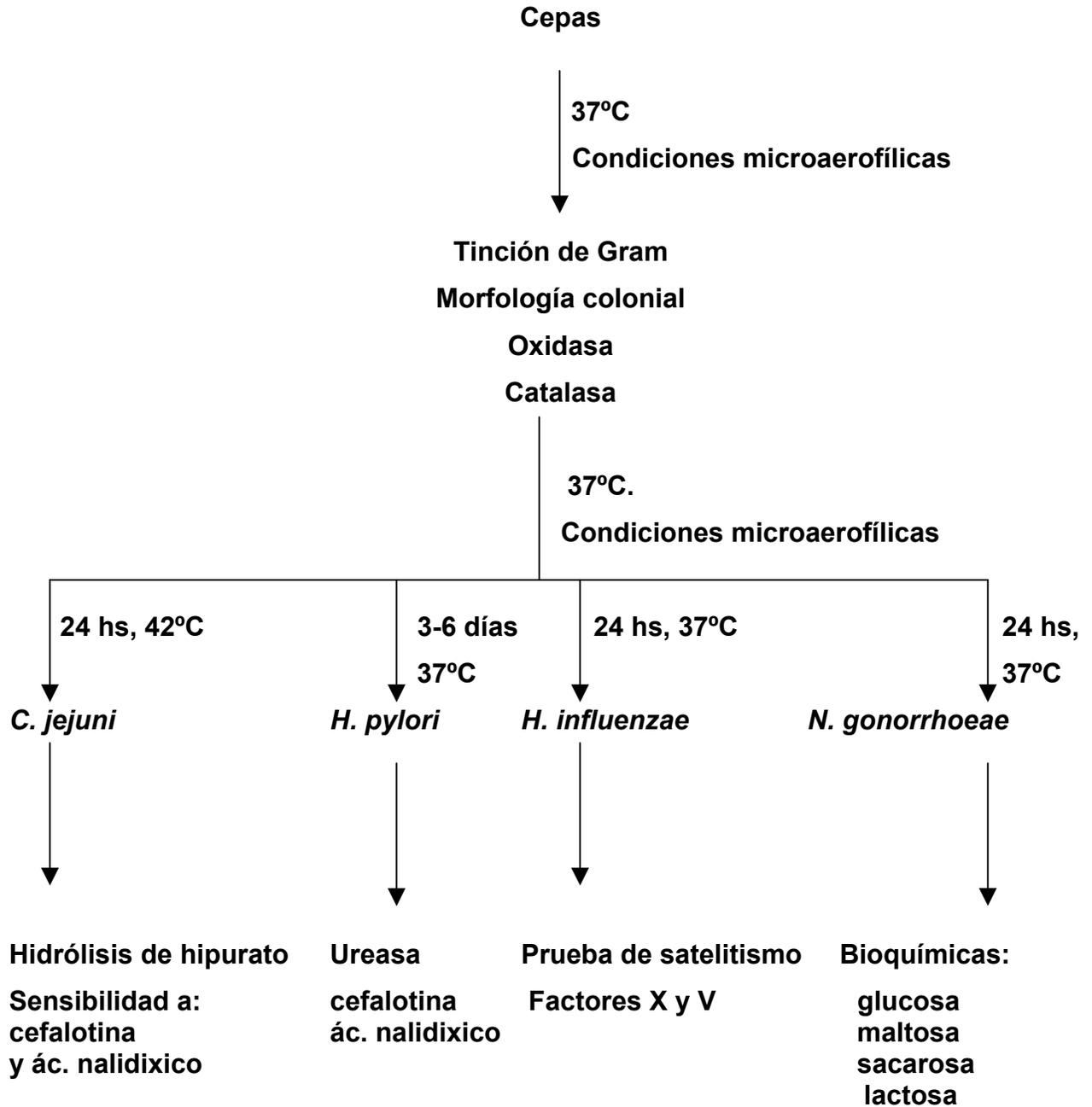
Pruebas específicas para *Haemophilus influenzae*.

Se sembraron 2 cajas de agar Levinthal, con la cepa de *Haemophilus influenzae* ENCB 0185, por estria cruzada y se incubaron por 24 horas a 37°C en condiciones microaerofílicas. Pasadas las 24 horas se observó morfología colonial característica, morfología microscópica con una tinción de Gram, observándose cocobacilos Gram negativos pleomorficos. En una caja de agar sangre sin polienriquesimiento se sembró en forma masiva a *Haemophilus influenzae* y una estria a lo largo de la caja de *Staphylococcus aureus* y en otra caja de agar soya tripticaseina se inoculo con una suspensión de *Haemophilus influenzae* al 0.5 del nefelómetro de Mcfarlan, se colocó un disco impregnado con el factor V y otro disco con el factor X, a una distancia de 1 cm. se separación, se incubaron por 24 horas a 37°C en condiciones microaerofílicas, y transcurrido este tiempo, en la caja de agar sangre se observó el fenómeno de satelitismo y en la caja de agar soya tripticaseina el crecimiento solo en medio de los discos con los factores V y X requerimiento.

Pruebas específicas para *Neisseria gonorrhoeae*.

Se sembraron 2 cajas de agar sangre al 5%, con la cepa de *Neisseria gonorrhoeae* ENCB 0450 y ENCB0477, por estria cruzada y se incubaron por 24 horas a 37°C en condiciones microaerofílicas. Pasadas las 24 horas se observó morfología colonial característica, morfología microscópica con una tinción de Gram, observándose diplococos Gram negativos. Con un aplicador de madera se colocó una parte de la colonia sobre una gota de peróxido de hidrógeno (30%) en un porta objetos. Se prepararon pruebas bioquímicas con los siguientes carbohidratos glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa en base de CTA + suero 1%. Se hizo una suspensión gruesa de *Neisseria gonorrhoeae* en caldo tioglicolato sin glucosa ni indicador y se agregaron 3 gotas a cada tubo de los carbohidratos correspondientes y se incubaron a 37°C por 24.

Diagrama 1: Caracterización de las cepas



8.3. Preparación de los soportes y suspensiones bacterianas

8.3.1. Congelación. Preparación de las mezclas crioprotectoras.

En el diagrama 2 se muestra el método general de preparación de material para llevar a cabo el proceso de congelación.

Se esterilizó el caldo tioglicolato más el glicerol al 30% 15 minutos-15 lb.-121°C, se preparó una solución de albúmina bovina al 1% y se esterilizó por filtración (filtro de 0.22 μ). Una vez preparadas y esterilizadas las soluciones se dejaron a prueba de esterilidad junto con la sangre de carnero desfibrinada estéril, por 24 y 48 horas, después fueron mezcladas en condiciones asépticas para tener las siguientes concentraciones finales:

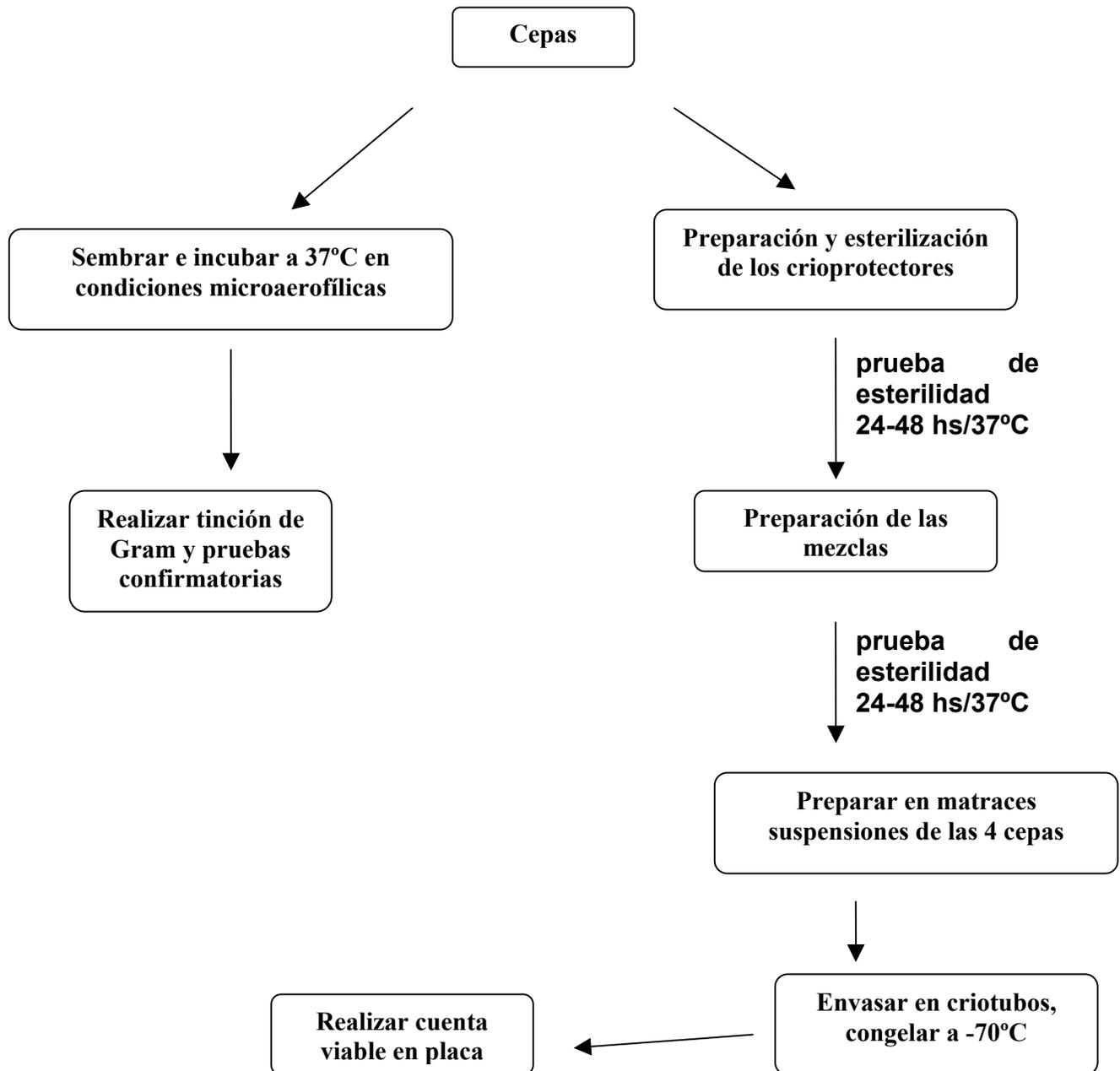
Clave

- 1C Caldo tioglicolato–glicerol 15 %–sangre de carnero desfibrinada 50%.
- 2C Caldo tioglicolato – glicerol 15 % – albúmina bovina 0.5 %.
- 3C Caldo tioglicolato – glicerol 15 %.

Estas mezclas también fueron dejadas a prueba de esterilidad. Se esterizaron los criotubos por 30 minutos-15 lb.-121°C, después fueron etiquetados con los nombres de las cepas y la clave de la mezcla crioprotectora correspondiente.

Se realizó para cada una de las cepas una suspensión en diferentes matraces erlenmeyer de 100 mL etiquetados con la clave respectiva de la mezcla crioprotectora y el nombre de la cepa. En condiciones de esterilidad se envasaron en los criotubos de a 1 mL por cada una de las tres mezclas realizadas, e inmediatamente se colocaron a -70°C y se realizó una cuenta viable para conocer la concentración inicial.

Diagrama 2: Método por congelación a -70°C



8.3.2. Liofilización. Preparación de los soportes.

En el diagrama 3 se muestra el método general de preparación de material para llevar a cabo el proceso de liofilización.

Se realizó una solución de leche descremada al 10% y se esterilizó por 15 minutos-15lb.-121°C, se preparo una solución de m-inositol al 10% y se esterilizó por filtración (filtro de 0.22 μ). Se filtró el suero de caballo estéril. Una vez preparadas y esterilizadas las soluciones se dejaron a prueba de esterilidad junto con la sangre de carnero desfibrinada estéril, por 24 y 48 horas, después fueron mezcladas en condiciones asépticas para tener las siguientes concentraciones finales:

Clave

1L Suero de caballo – m-inositol 5% – sangre de carnero desfibrinada 0.5%.

2L Leche descremada 5% – m-inositol 5% – sangre de carnero desfibrinada 0.5%.

Estos soportes también fueron dejados a prueba de esterilidad. Se esterilizaron frascos o viales de vidrio de un volumen de 10 mL, de boca ancha, en el cual se les colocó una etiqueta de papel en el interior con la clave del soporte y nombre de la cepa por 30 minutos-15 lb.-121°C, junto con sus tapones de plástico.

En matraces erlenmeyer de 100 mL con la clave del soporte y nombre de la cepa, en condiciones de esterilidad se realizarón las suspensiones en cada uno de los soportes para cada una de las cepas y fueron envasadas en los viales de vidrio a un volumen de 2 mL por cada vial y semitapados e inmediatamente llevados a liofilizar, en las siguientes condiciones de liofilización:

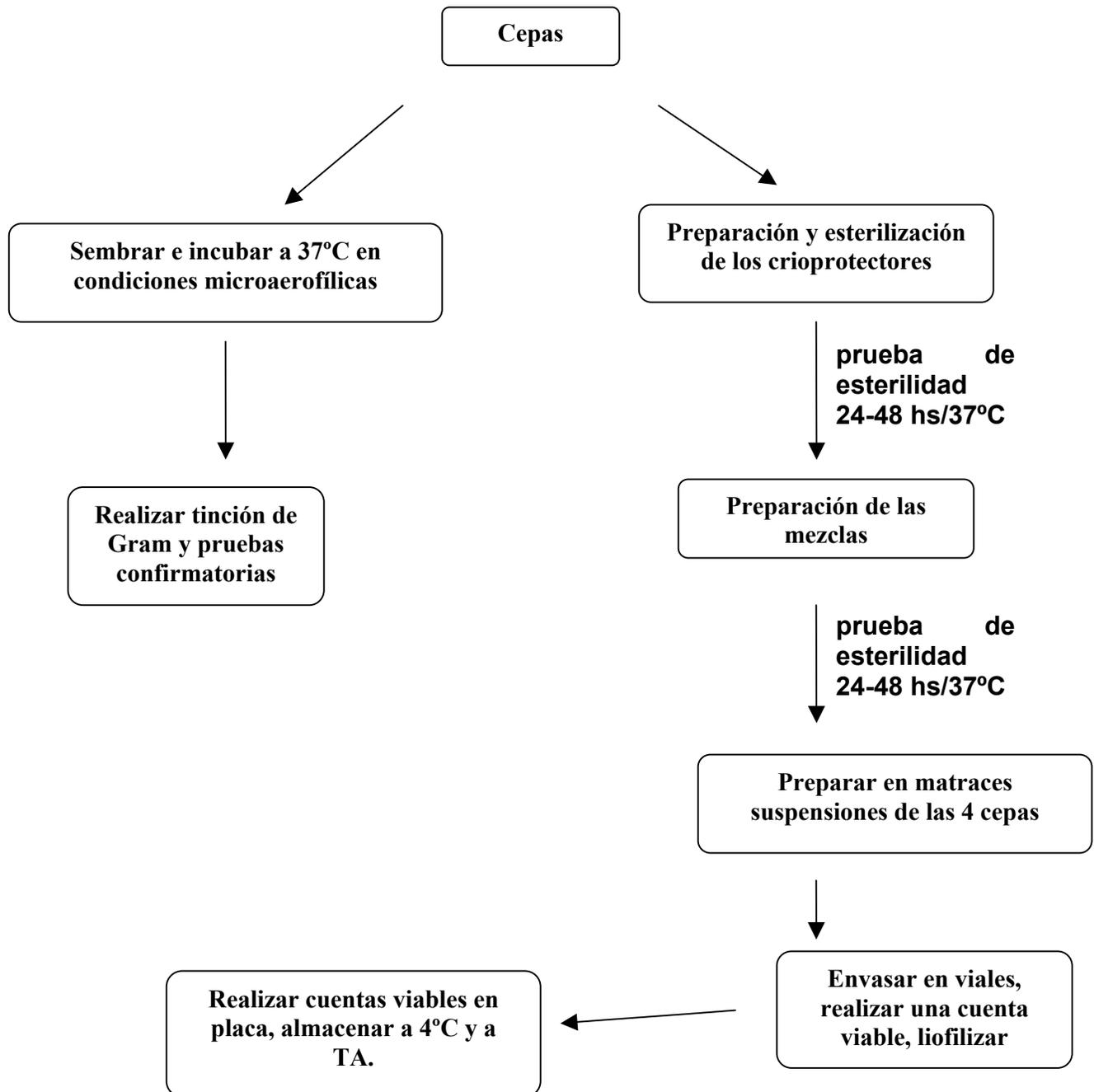
Condiciones del proceso de liofilización.

- Congelación: – 42°C / 14 horas.
- Secado primario: – 15°C / 12 horas, 0°C / 6 horas.
- Secado secundario: 20°C / 9.5 horas.
- Vacío promedio: 30 micrones.
- Temperatura de condensación: – 50°C.
- Humedad residual: < 3%.

También se realizó una cuenta viable antes del procesó de liofilización y otra inmediatamente después de liofilizar.

Una vez terminado el proceso de liofilización los viales fueron sellados con una segunda tapa de aluminio para conservar el vacío en el interior del vial para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del vial. El lote liofilizado fue dividido por la mitad para cada una de las cepas de sus respectivos soportes para ser almacenadas a 4°C y a temperatura ambiente.

Diagrama 3: Método por liofilización



8.4. Recuento de viables en superficie. Método de Miles y Misra^{31,60}

En la figura 1 se presenta como se llevo a cabo el método de Miles y Misra.

1. A las placas de agar sangre, con un marcador indeleble, se les dividió en 8 sectores, en la parte inferior de la placa y se anoto en cada sector la dilución correspondiente de 10^{-1} a 10^{-8} .
2. Con una pipeta semiautomática de 10 – 100 μL , con puntas de plástico estériles, se colocaron 90 μL de caldo tioglicolato estéril a cada uno de los 8 tubos de vidrio estériles marcados con la dilución correspondiente de 10^{-1} a 10^{-8} .
3. Con otra punta de plástico estéril se colocó en el tubo 1 (10^{-1}) 10 μL de la suspensión bacteriana correspondiente, (previamente descongelada o rehidratada con caldo tioglicolato)
4. Se homogeneizó 10 veces, sin formar burbujas de aire, se tomaron 10 μL y se pasaron al siguiente tubo, se homogeneizó nuevamente sin formar burbujas, se tomaron nuevamente 10 μL y así consecutivamente hasta la dilución 10^{-8} y de este tubo se desecharon 10 μL .
5. Con otra punta estéril se tomaron 10 μL , comenzando por la dilución 10^{-8} y se colocaron en la placa de agar sangre en el sector correspondiente a esa dilución y después la de 10^{-7} y así hasta 10^{-1} .
6. No se movieron las placas hasta que el medio absorbió las gotas.
7. Se incubaron por 48 horas en condiciones microaerofílicas a 37°C .
8. Se contaron las colonias.
9. Se realizarón los cálculos para obtener UFC/mL.

$$\frac{(\text{factor de dilución}) (\# \text{ de colonias contadas})}{0.01\text{mL}} = \text{UFC/mL.}$$

0.01mL

10. Una vez calculadas las UFC/mL se realizó el calculo del porcentaje de viabilidad:

$$\frac{(\text{UFC}_{t=n}) (100\%)}{\text{UFC}_{t=0}} = \% \text{ en el tiempo n.}$$

$$\text{UFC}_{t=0}$$

Donde:

UFC: unidades formadoras de colonias

mL: mililitro

t = 0: tiempo cero

t = n: tiempo a los 15, 30, 45.....X días.

11. Criterios tomados para la realización de la cuenta viable para el método de conservación por liofilización.

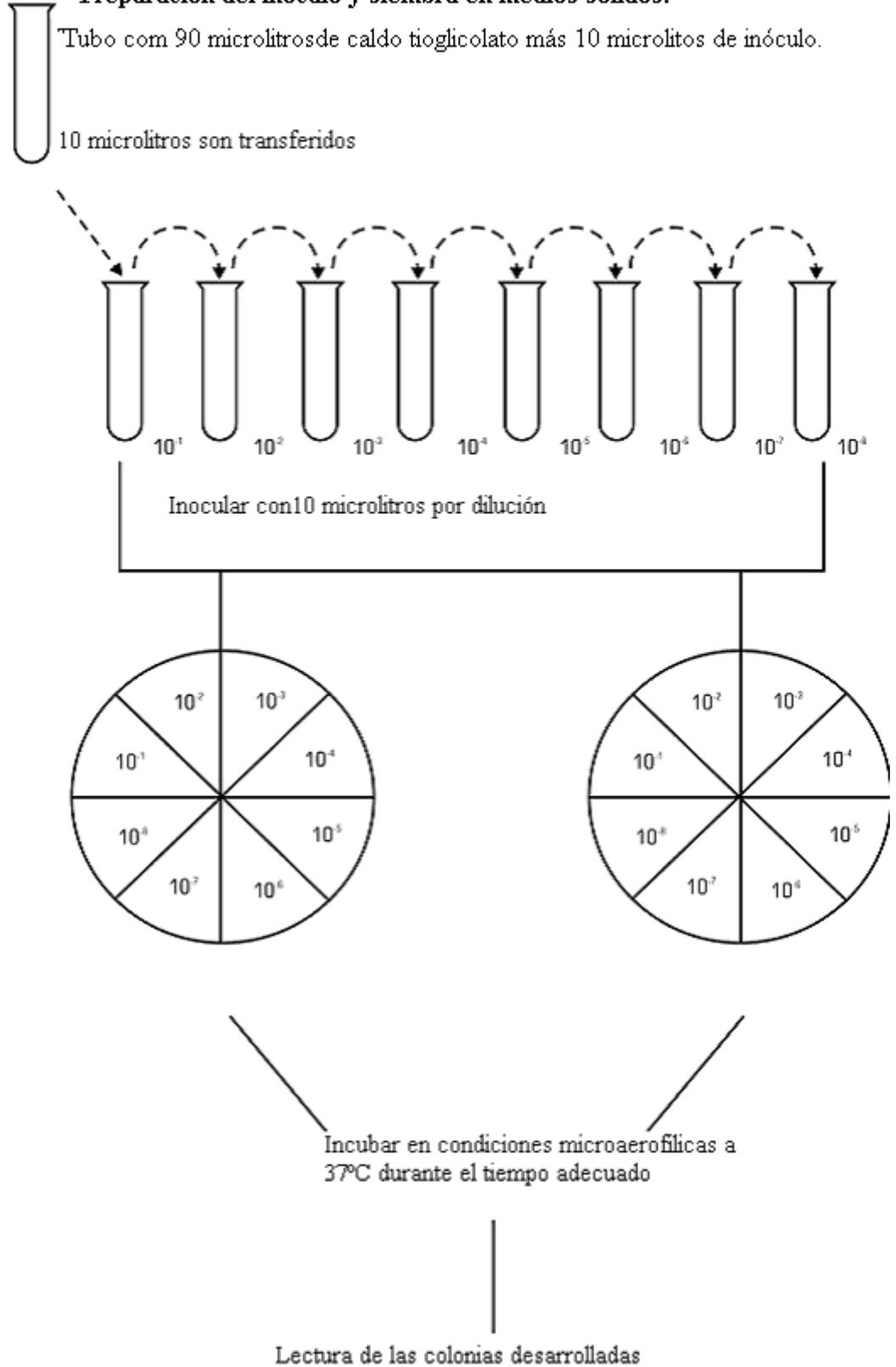
11.1. Una vez realizada la suspensión bacteriana se tomó con pipeta estéril una alícuota y se realizó una cuenta viable por el método de Miles y Misra, antes de liofilizar. Esto se realizó con el fin de conocer la concentración inicial bacteriana antes de liofilizar, para conocer la protección que proporcionaría el soporte durante el proceso de liofilización.

11.2. Inmediatamente después de liofilizadas las cepas bacterianas se realizó la cuenta viable por el método de Miles y Misra, para conocer cuentas bacterias habían sobrevivido al proceso de liofilización y a partir de esta cuenta, la cual se tomó como

t = 0, se almacenarán a 4°C a temperatura ambiente y se realizarán cuentas viables cada 15 días, hasta los 180 días, para conocer el efecto de la temperatura de almacenaje.

Figura 1. Método de Miles y Misra

Preparación del inóculo y siembra en medios sólidos.

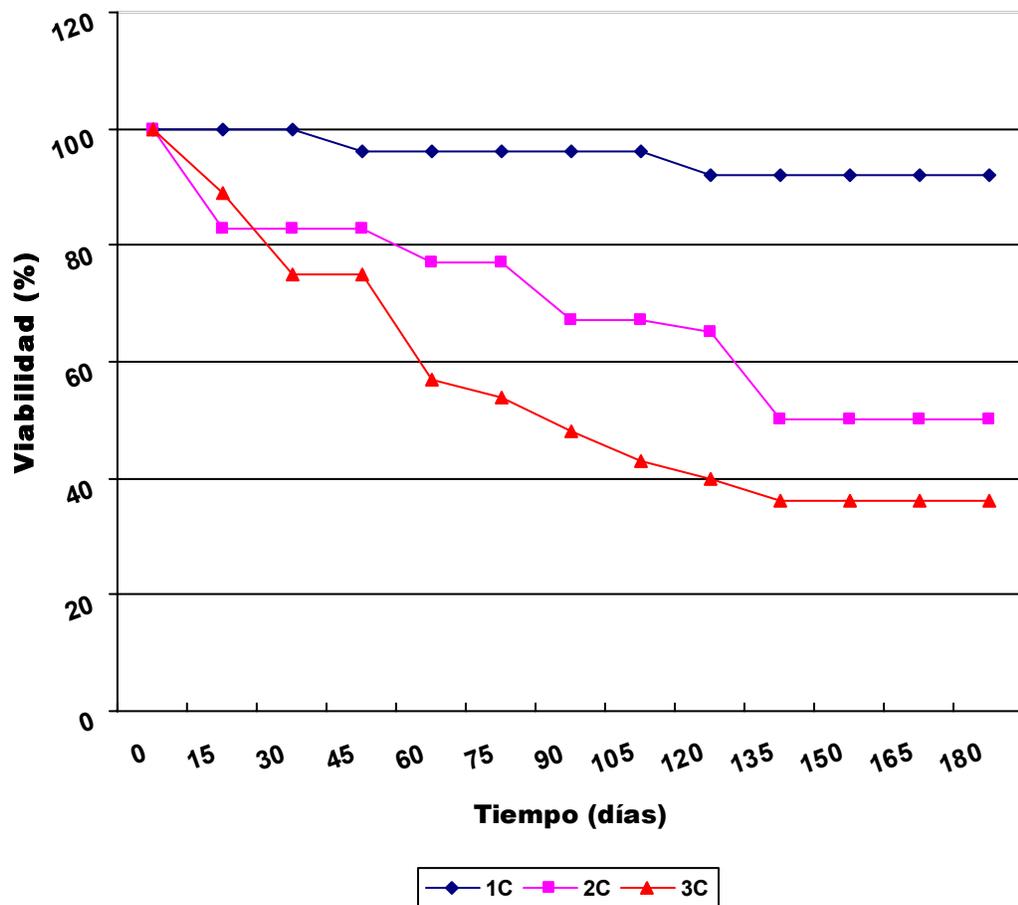


9.0. RESULTADOS

9.1. Método de congelación a -70°C .

9.1.1. *Campylobacter jejuni*

Como se puede observar en la gráfica 1, en el soporte 1C se obtuvo una viabilidad del 92% después de 180 días. En el soporte 2C fue de 50% y en 3C fue de 36%, en este último soporte puede observar una drástica disminución en su viabilidad de en comparación con el soporte 1C.

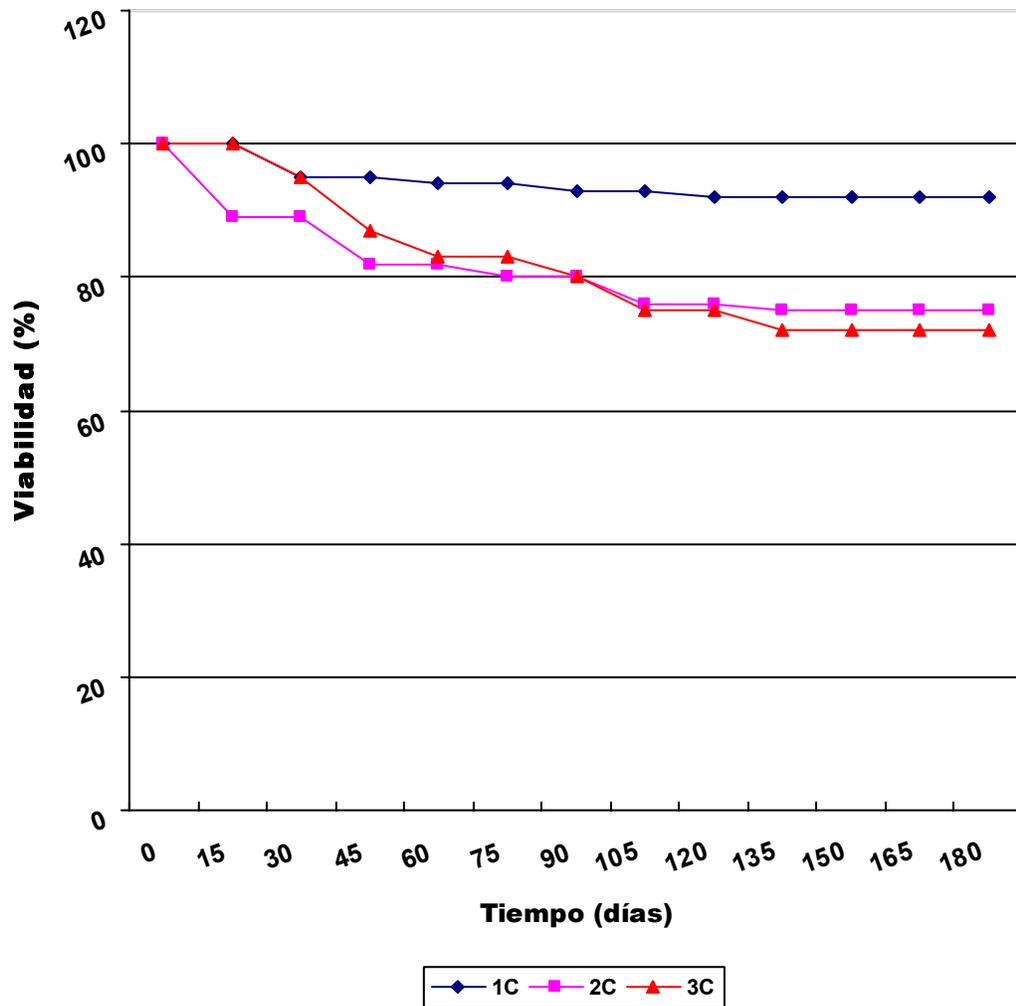


Gráfica 1. Viabilidad de *Campylobacter jejuni* a -70°C en:

- 1C Caldo tioglicolato – glicerol 15 % – sangre de carnero defibrinada 50 %.
- 2C Caldo tioglicolato – glicerol 15 % – albúmina bovina 0.5 %.
- 3C Caldo tioglicolato – glicerol 15 %.

9.1.2. *Neisseria gonorrhoeae*

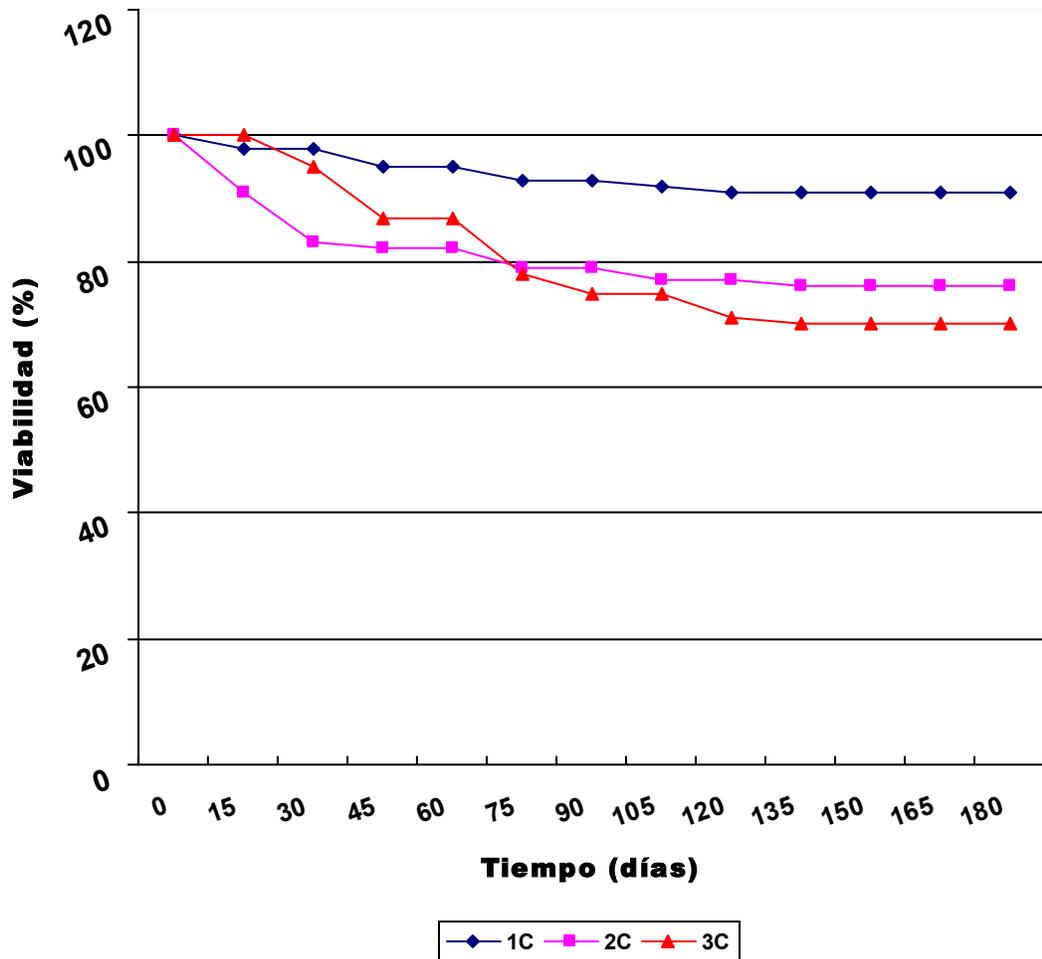
En la gráfica 2, se puede observar que en el soporte 1C se obtuvo una viabilidad del 92% después de 180 días. En el soporte 2C fue de 75% y en 3C fue de 72% para *N. gonorrhoeae* en donde se puede observar que la disminución de viabilidad con el soporte 3C no fue tan drástica para esta bacteria como lo fue para *C. jejuni*.



Gráfica 2. Viabilidad de *Neisseria gonorrhoeae* a -70°C en 1C, 2C y 3C.

9.1.3. *Haemophilus influenzae*.

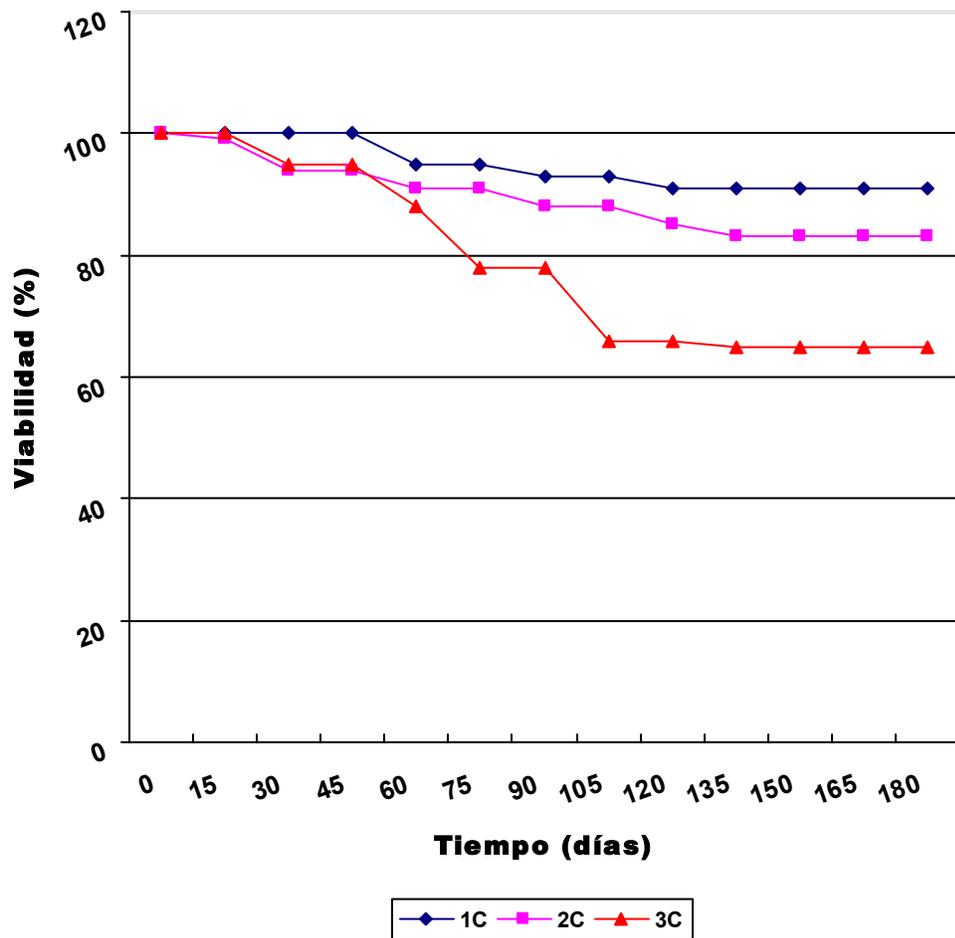
Se puede observar en la gráfica 3, que en el soporte 1C se obtuvo una viabilidad del 91% después de 180 días. En el soporte 2C fue de 76% y en 3C fue de 70% que como se puede observar no existe una diferencia muy marcada entre estos últimos dos soportes en la viabilidad de *H. influenzae*.



Gráfica 3. Viabilidad de *Haemophilus influenzae* a -70°C en 1C, 2C y 3C.

9.1.4. *Helicobacter pylori*.

Para este microorganismo se puede observar en la gráfica 4, que en el soporte 1C se obtuvo una viabilidad del 91% después de 180 días. En el soporte 2C fue de 83% y en 3C fue de 50%. Aquí se observa que la diferencia entre 1C y 2C no es muy marcada, pero para 3C se observó una disminución de viabilidad hasta de un 50% para *H. pylori*.

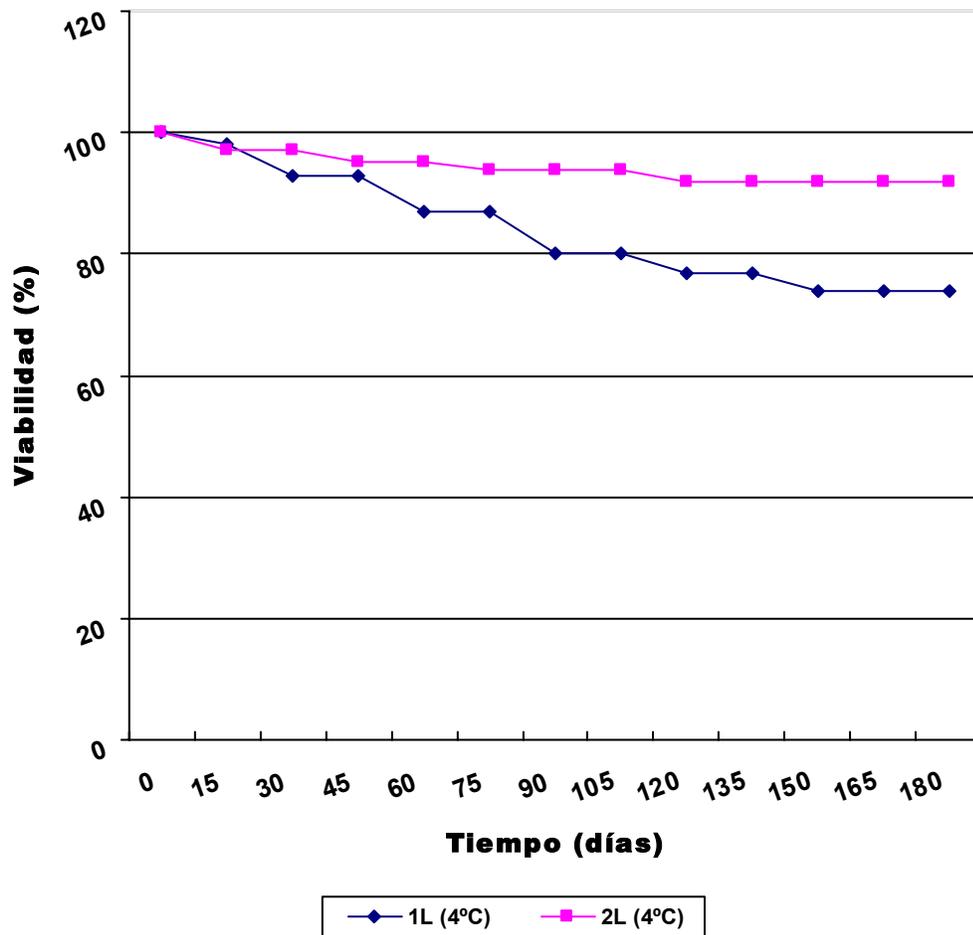


Gráfica 4. Viabilidad de *Helicobacter pylori* a -70°C en 1C, 2C y 3C.

9.2.Método de liofilización.

9.2.1. *Campylobacter jejuni* almacenado a 4°C

Para *C. jejuni* almacenado a 4°C durante 180 días se observó una viabilidad de 74% en el soporte 1L de 92% en el soporte 2L (ver gráfica 5).



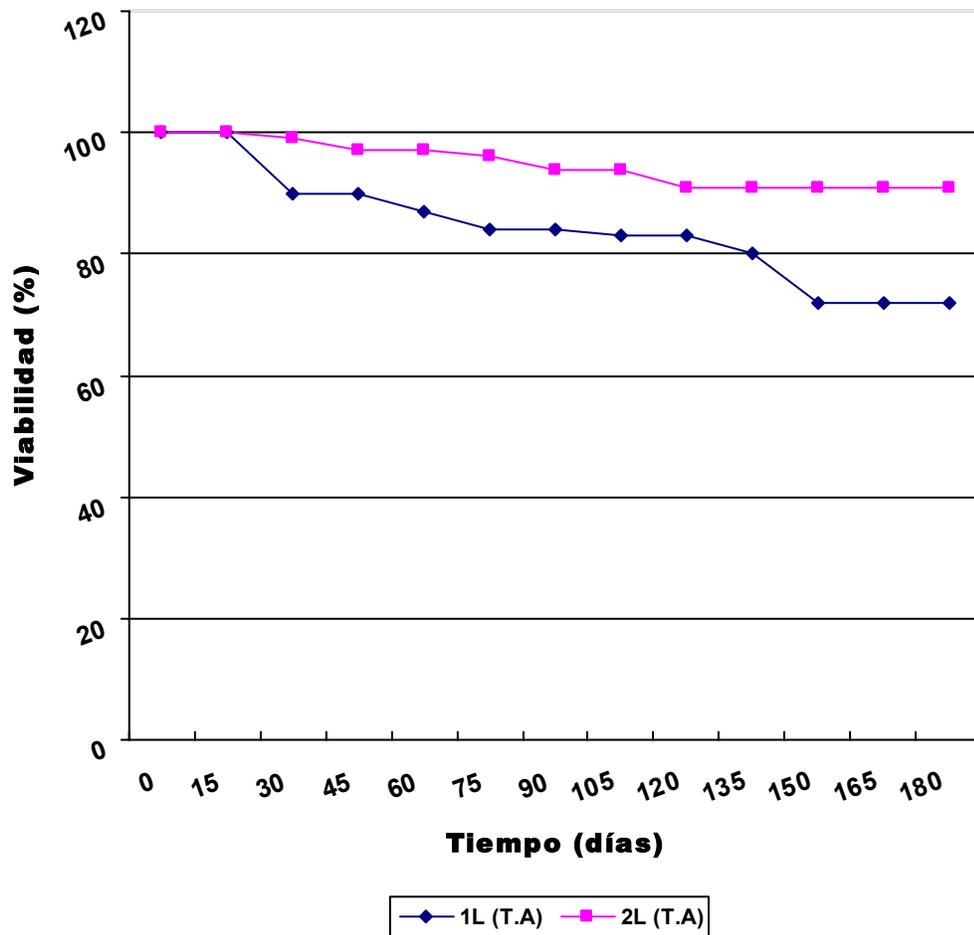
Gráfica 5. Viabilidad de *Campylobacter jejuni* liofilizado y almacenado a 4°C en:

1L Suero de caballo – m-inositol 5% – sangre de carnero desfibrinada 0.5%.

2L Leche desnatada 5% – m-inositol 5% – sangre de carnero desfibrinada 0.5%.

9.2.2. *Campylobacter jejuni* almacenado a temperatura ambiente.

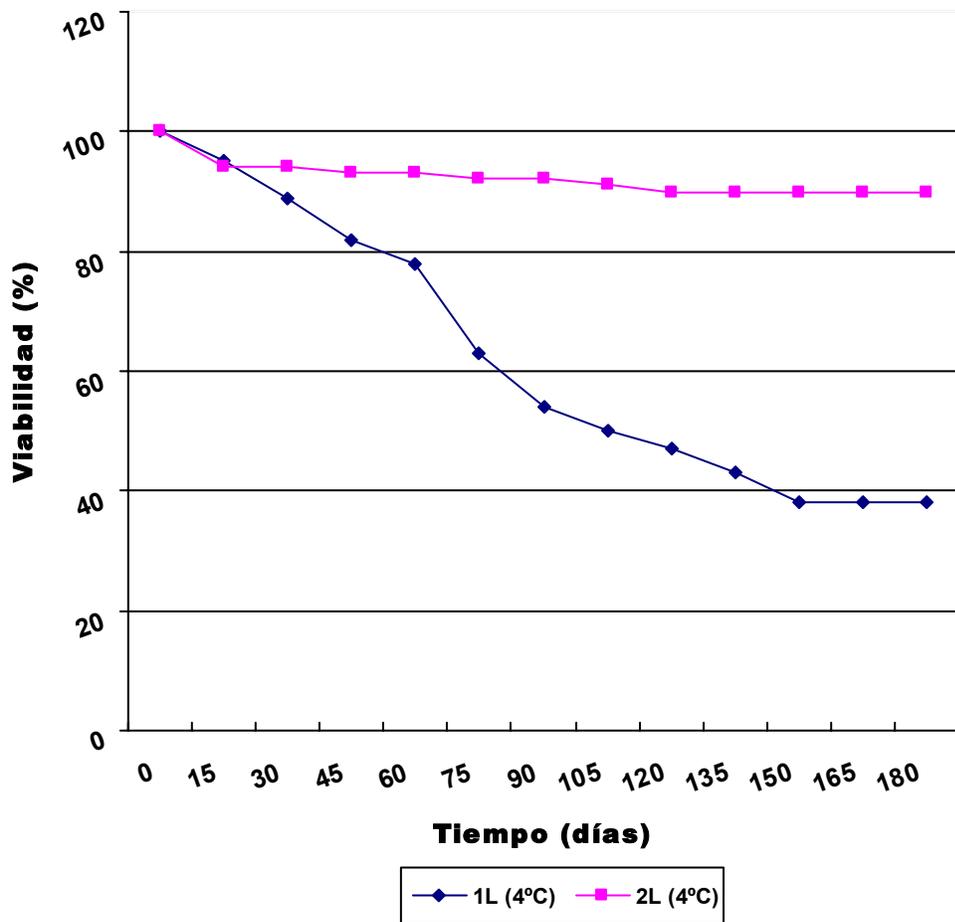
Como se puede observar en la gráfica 6, el soporte 1L almacenado a temperatura ambiente se obtuvo una viabilidad del 72% después de 180 días y en el soporte 2L fue de 91%.



Gráfica 6. Viabilidad de *Campylobacter jejuni* liofilizado y almacenado a temperatura ambiente en 1L y 2L.

9.2.3. *Haemophilus influenzae* almacenado a 4°C.

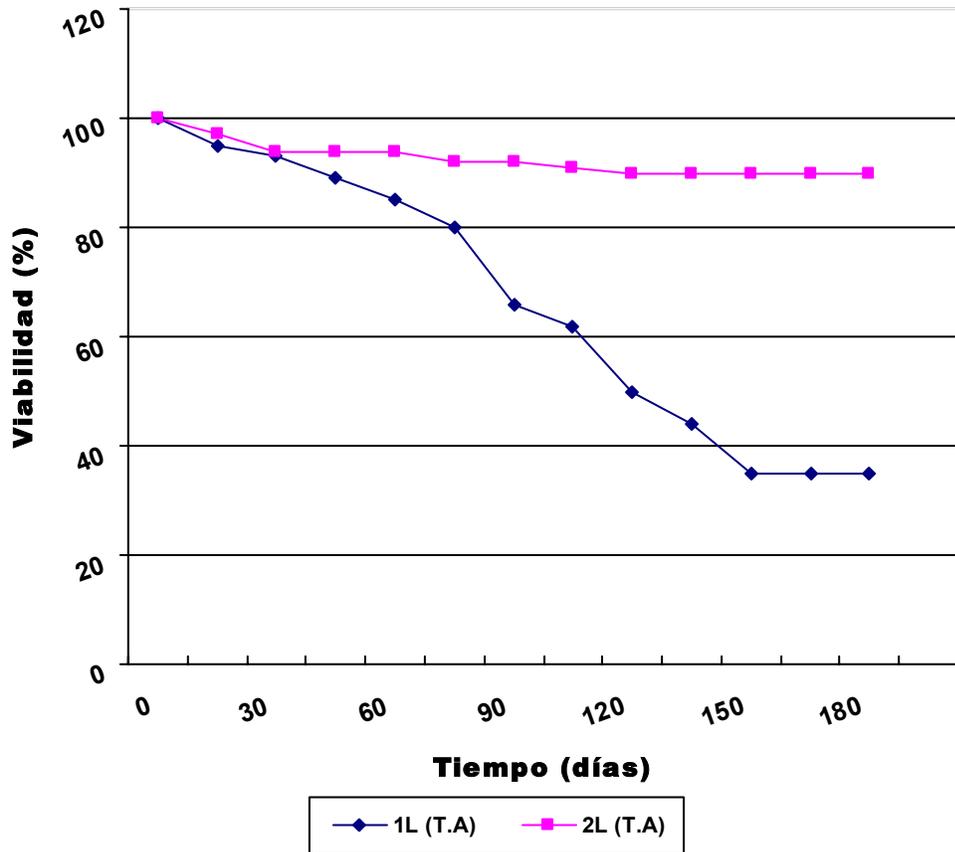
El soporte 2L presento un mejor porcentaje de viabilidad para *H. influenzae* almacenado a 4°C durante 180 días a diferencia del soporte 1L en el cual como se puede observar en la grafica 7 presento una importante disminución de viabilidad.



Gráfica 7. Viabilidad de *Haemophilus influenzae* liofilizado y almacenado a 4°C en 1L y 2L.

9.2.4. *Haemophilus influenzae* almacenado a temperatura ambiente.

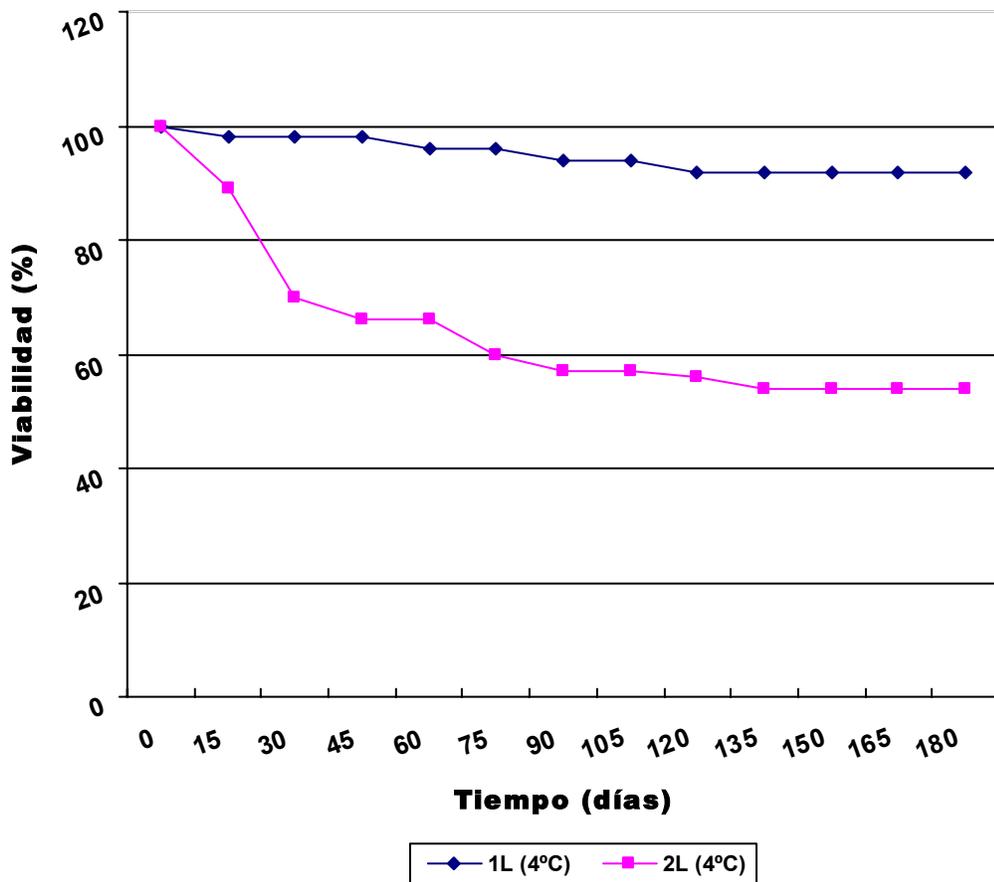
Como se puede observar en la gráfica 8, el soporte 1L almacenado a temperatura ambiente se obtuvo una viabilidad del 35% después de 180 días y en el soporte 2L fue de 90%, en este se observó una mejor viabilidad de *H. influenzae* en ambas temperaturas de almacenamiento.



Gráfica 8. Viabilidad de *Haemophilus influenzae* liofilizado y almacenado a temperatura ambiente en 1L y 2L.

9.2.5. *Neisseria gonorrhoeae* almacenada a 4°C.

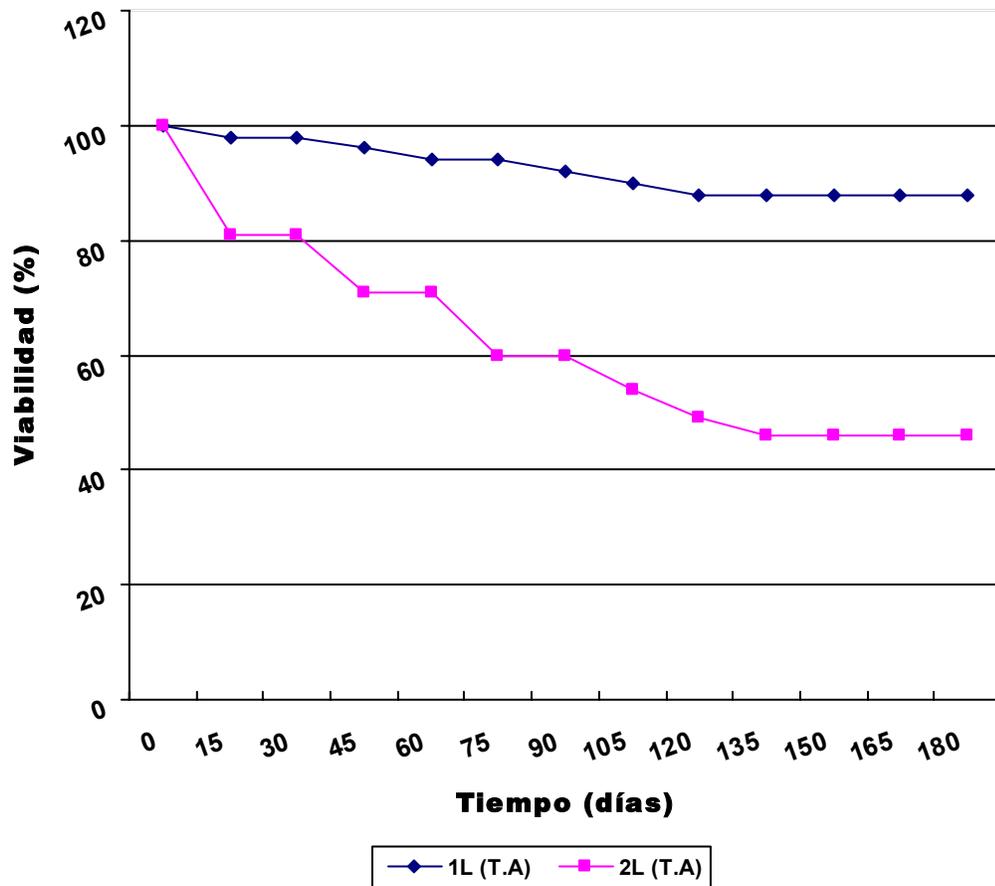
Como se puede observar en la gráfica en el soporte 1L almacenado a 4°C se obtuvo una viabilidad del 92% después de 180 días y en el soporte 2L fue de 54%, aquí se puede observar que el soporte 1L fue mejor para *N. gonorrhoeae* que el 2L como se observo con las anteriores bacterias.



Gráfica 9. Viabilidad de *Neisseria gonorrhoeae* liofilizada y almacenada a 4°C en 1L y 2L.

9.2.6. *Neisseria gonorrhoeae* almacenada a temperatura ambiente.

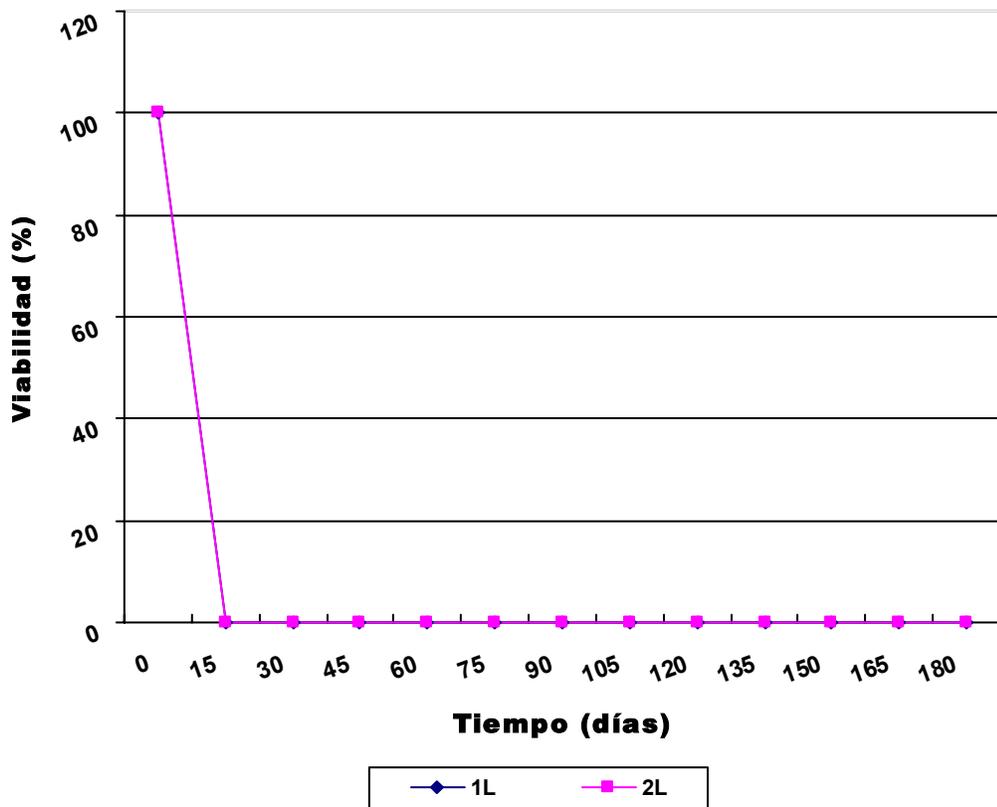
En este caso como se puede observar en la gráfica 10, en el soporte 1L almacenado a temperatura ambiente se obtuvo una viabilidad del 88% después de 180 días y en el soporte 2L fue de 46%, observándose que la temperatura de almacenaje para ambos soportes si influyo en el % de viabilidad, y por lo tanto se observo una ligera disminución.



Gráfica 10. Viabilidad de *Neisseria gonorrhoeae* liofilizada y almacenada a temperatura ambiente en 1L y 2L.

9.2.7. *Helicobacter pylori* liofilizado.

En la gráfica 11 se puede observar que *Helicobacter pylori* no se recuperó en ninguno de los dos soportes utilizados ni en ninguna de las dos temperaturas de almacenaje que se emplearon después de liofilizar.



Gráfica 11. Viabilidad de *Helicobacter pylori* liofilizado en 1L y 2L.

10.0. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Discusión de resultados para el método por congelación a – 70°C

En la literatura se reporta que la conservación a mediano y largo plazo por congelación a – 70°C ha resultado el mejor método, al disminuir el metabolismo de las células microbianas, además de que la viabilidad garantiza la estabilidad genética, evitando la aparición de generaciones variantes⁸.

En este método de conservación es fundamental evitar lesiones provocadas por la congelación como la formación de los cristales de hielo y un daño secundario provocado por el aumento en la concentración de solutos durante la formación progresiva de los cristales de hielo.⁶¹

Con base en lo anterior en la presente investigación se buscó una mezcla crioprotectora apropiada para la conservación y almacenamiento a – 70°C con cuatro microorganismos difíciles de mantener viables por largos periodos de tiempo, por sus características de desarrollo y requerimientos nutricionales muy exigentes.

En la mezcla constituida por caldo tioglicolato-glicerol 15%-sangre desfibrinada 50% (1C) se obtuvo un 92% de viabilidad para *Campylobacter jejuni* durante 180 días; mientras que con la mezcla formada por caldo tioglicolato-glicerol 15%-albúmina 0.5% (2C) bajó a 50% y la mezcla de caldo tioglicolato-glicerol 15% (3C) se obtuvo un 36% de viabilidad (Gráfica 1).

Los datos de la presente investigación muestran que el soporte 1C es una buena combinación de crioprotectores, pero también invitan a razonar sobre el porque de la alta recuperación de *Campylobacter jejuni*, como la

presencia de hierro de la sangre, el cual es necesario para la recuperación de esta bacteria, además de que la sangre puede contribuir en la amortiguación osmótica del medio⁶² y también puede funcionar impidiendo parcialmente la deshidratación celular por medio del incremento de la viscosidad de el medio extracelular.^{7,13} También la presencia de glicerol que penetra fácilmente en la membrana citoplasmática y pared celular de los microorganismos; lo cual le confiere protección desde adentro, de tal modo que disminuye la formación de cristales grandes durante la congelación.

Los estudios realizados por Wasfy M⁶² refieren que *Campylobacter jejuni* fue recuperado en mayor cantidad y por tiempo más prolongado con la adición de sangre-glicerol en un medio de conservación (caldo soya tripticaseína-glicerol 15% sangre de carnero) y/o de transporte como el Cary-Blair lo cual confirma en parte lo observado con el presente estudio.

Las observaciones de Escamilla G.A³³ respecto a la recuperación de *Campylobacter jejuni* en caldo Mueller-Hinton- glicerol al 30% y sangre a – 10°C durante un periodo de 30 días y a – 70°C durante 3 meses se complementan con lo afirmado en el presente estudio respecto a la importancia del uso de sangre y glicerol en la viabilidad de bacterias muy delicadas y exigentes.

Existen muchos estudios con diferentes crioprotectores y la similitud con el presente trabajo destaca el de Mills CK⁴⁵, quien usó caldo brucela-albúmina-glicerol al 10% y observó una baja viabilidad a – 65°C ; mientras que a – 20°C no fue recuperado después de un mes con lo cual se puede decir que *Campylobacter jejuni* requiere de una mayor concentración de albúmina; como lo menciona Nair GB⁶³ quien observó que la recuperación de *Campylobacter jejuni* a – 70°C disminuye gradualmente durante un periodo de 3 meses, por lo cual recomienda para su preservación un

medio a base de huevo (6 huevos) buffer de fosfatos (pH 7), caldo tioglicolato, 0.025% de sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio; con el cual logró una recuperación del 80% en 120 días a 4°C.

Vivanco VD ⁶⁴, observó que con albúmina a una concentración de 4% a – 60°C lo recuperó en un periodo de 17 meses, con lo cual se puede observar que tanto la temperatura y la concentración de albúmina tienen una función equivalente a la de la sangre y glicerol para una buena recuperación de *Campylobacter jejuni* y por lo tanto, se puede decir que el bajo rendimiento del soporte 2C quizás fue debido a la baja concentración de albúmina (0.5%).

En el caso de la mezcla crioprotectora 3C a – 70°C durante 180 días hubo una viabilidad del *Campylobacter jejuni* de un 36% debido a que en esta fórmula solamente se encuentra el glicerol sin otro crioprotector y aunque se ha dicho es un excelente agente crioprotector y que junto con el caldo tioglicolato el cual proporciona al microorganismo una protección extracelular^{13, 65} no brinda una protección a *Campylobacter jejuni*.

Saha SK⁴³ reportó una buena recuperación (5 meses) de *Campylobacter jejuni* en una fórmula con fosfato salino pH 6.7, carbón activado 0.0025%, FBP al 0.1% (sulfato ferroso, metabisulfito de sodio, piruvato de sodio), L-cistina y glicerol al 10% a – 10°C, en este estudio se observaron que el medio FBP a – 85°C se mantuvo una viabilidad del 100% y a – 20°C disminuyó a 80%, lo cual también muestra la importancia que tiene no solo el crioprotector sino lo esencial que resulta la presencia de reductores aunado a la temperatura.

El resultado obtenido en la viabilidad de *Neisseria gonorrhoeae* fue parecido al *Campylobacter*, es decir, con la fórmula 1C fue de 92%, 2C fue de 75% y 3C del 72% de viabilidad (Gráfica 2).

La variación de viabilidad cuando en lugar de la sangre desfibrinada se usó albúmina al 0.5% posiblemente se debió a que la albúmina es un agente crioprotector extracelular que estabiliza la solución y es un fuerte adherente sobre el agua, la cual al usarse como agente crioprotector que aún cuando no penetra en la célula, si puede proteger a los microorganismos contra los efectos nocivos en el momento de la congelación y la descongelación pero menos eficiente que la fórmula 1C.

Harbec PS⁵⁸ para conservar a *Neisseria gonorrhoeae* a – 20°C empleo el medio LSPQ (glucosa 5 g, carbón activado 0.6 g, leche descremada 3 g y gelatina 10 g en 100 mL de agua) y observo que es un buen método de conservación para un periodo menor a un año, mientras que en un medio formulado con caldo soya tripticaseína (CST) y glicerol observó significativas pérdidas después de 2 meses, otro medio también estudiado a – 20°C compuesto por glucosa, leche descremada, carbón activado, L-ascorbato de sodio y solución de gelatina, mantiene a *Neisseria gonorrhoeae* viable por 6 meses. Con lo cual se puede observar que con el presente trabajo, que los soportes 2C y 3C pueden ser utilizados pero con un bajo rendimiento en la conservación y recuperación de *Neisseria gonorrhoeae*.

Hernández y col.³ observaron que también se puede recuperar *Neisseria gonorrhoeae* a – 70°C en un medio compuesto por suero de caballo y glicerol al 25%, aquí también se observa que la concentración de glicerol y las proteínas presentes en el suero son factores importantes para una buena recuperación de *Neisseria gonorrhoeae* que comparado con los soportes 2C y 3C a – 70°C usados en el presente trabajo; por lo cual se tendría que modificar las concentraciones de los crioprotectores para obtener un mejor rendimiento de viabilidad para esta bacteria.

El comportamiento de *Haemophilus influenzae* según el resultado obtenido con la fórmula 1C fue de una viabilidad del 91%, con 2C fue del 76% y con 3C fue del 70% (Gráfica 3). En relación con otros estudios destaca el de Votava M⁵⁶ quien observó una buena recuperación con crioprotectores como sangre en LB compuesto por caldo BHI-sangre de caballo al 7%-levadura al 3% a – 70°C, también observó que en soportes en donde no se adiciona glicerol, las pérdidas son significativas como lo observo con el medio LSPQ (glucosa, carbón activado, leche descremada, gelatina). Esto también fue observado en este estudio y la efectividad del soporte 1C para recuperar *Haemophilus influenzae* es debida a la presencia del glicerol, sangre desfibrinada y caldo tioglicolato, que a diferencia del medio TSBG (caldo soya tripticaseína, glicerol 40%, suero de caballo), la concentración de glicerol es menor en el soporte 1C.

En otros estudios realizados por Aulet OC⁵ con *Haemophilus influenzae* a – 20°C y –70°C usando fórmulas con glicerol al 25% cuyos resultados fueron muy similares a los obtenidos con el soporte 2C; dichas fórmulas consistieron en: caldo BHI-lactosa 6%-glicerol 25%, caldo BHI-sacarosa 10%-glicerol 25%, caldo BHI-leche 4%-glicerol 25%, caldo soya tripticaseína-leche 4%-glicerol 25% las viabilidades obtenidas fueron 83%, 72%, 75% y 72%, respectivamente. En el presente estudio se obtuvo una viabilidad similar (76%) lo cual nos indica que la concentración de glicerol para este microorganismo es un factor importante en la viabilidad y mejora con la adición de otro agente crioprotector, como por ejemplo la sangre.

El resultado obtenido con la mezcla 1C para *Helicobacter pylori* fue de 91% de viabilidad y con 2C fue del 83%; mientras que con la mezcla 3C se obtuvo 50% (Gráfica 4). La disminución observada con la fórmula 3C tal vez se debió a que solo se utilizó un crioprotector, glicerol, (agente penetrante) y caldo tioglicolato, los cuales según referencia de estudios previos su eficiencia es menor que una mezcla de agentes crioprotectores

más compleja, como se observó en la presente investigación con una menor recuperación de *Helicobacter pylori* del cual se sabe es un microorganismo extremadamente sensible al frío y que además hubo menos componentes de crioprotección este microorganismo se vio más afectado en su sobrevivencia.

Shahamat M. observó que el uso de sangre de oveja o caballo con o sin glicerol o bien medios con aceite mineral o sin aceite mineral a -70°C brinda una viabilidad hasta de un 87.5% en dos años y que al agregar glicerol se aumenta el tiempo de recuperación. En los estudios realizados por Laiw SJ.⁵² con una fórmula compuesta por caldo brucela-sangre de caballo 2%-glicerol al 17% y mucina al 10% a -70°C se demostró su eficacia para la conservación de *Helicobacter pylori* hasta por 9 meses, con estos datos y con el presente estudio se observó que *Helicobacter pylori* puede ser bien conservado y recuperado con el soporte 1C sin la necesidad del uso de mucina.

Flamm R y col.⁵¹ observó buena recuperación de *Helicobacter pylori* con una fórmula compuesta por leche descremada-glicerol al 17% y caldo brucela a -20°C y -70°C con viabilidad del 100% en 12 semanas y en otro medio compuesto por cistina- caldo brucela-albúmina-glicerol al 20%, con las mismas condiciones y una viabilidad de 57%. En relación al presente estudio se observó que la concentración de glicerol y de los otros componentes, es mayor al utilizado en el soporte 2C y aun así se puede decir que en el soporte del presente estudio mostró una mejor recuperación de *Helicobacter pylori*.

Discusión de resultados para el método de liofilización

La liofilización o criodesecación es un método que se puede definir como la operación que consiste en secar una solución o un material impregnado de agua, manteniéndolo primero a una temperatura lo suficientemente baja como para que la mayor parte del agua que contiene se congele y se extraiga después por sublimación del hielo¹¹. Y además es uno de los mejores métodos de conservación a largo plazo, y en este estudio se buscó una mezcla de sustancias que ayudara a los cuatro microorganismos a sobrevivir durante el proceso de liofilización, y que ayudara a conservarlo durante el periodo de almacenamiento a 4°C y temperatura ambiente.

La viabilidad de *Campylobacter jejuni* en el soporte 1L almacenado a 4°C y a temperatura ambiente (T.A.), fueron de 74% y 72% respectivamente durante un periodo de almacenamiento de 180 días (ver Gráficas 5 y 6).

Los resultados obtenidos para el soporte 2L fueron del 92% a 4°C y 91% a T.A (ver Graficas 5 y 6). Estos resultados a diferencia con el soporte 1L, es que este soporte 2L brindo una mayor protección a *Campylobacter jejuni* durante el proceso de liofilización, así como a la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Este resultado esta de acuerdo con el trabajo hecho por Mill CK⁴⁵ en donde se observó que *Campylobacter jejuni* sobrevive al proceso de liofilización en leche descremada al 10%.

Campylobacter jejuni liofilizado y almacenado a 4°C y a T.A. presentó una buena recuperación en el soporte 2L, con lo cual se puede decir que dicho soporte es un buen medio para recuperar a *Campylobacter jejuni*, sin la necesidad de refrigeración, lo cual significa una gran ventaja para su almacenamiento y transporte a otros sitio, diferencia del soporte 1L el en cual fue decreciendo la recuperación con el tiempo.

Para *Haemophilus influenzae* en el soporte 1L se observó una viabilidad de 38%. En este caso este soporte presentó menos protección para *Haemophilus influenzae* que para *Campylobacter jejuni* obteniéndose un bajo rendimiento en la recuperación de *Haemophilus influenzae* el cual fue disminuyendo con el tiempo de almacenaje hasta obtener una viabilidad de 38% hasta la última cuenta realizada (180 días) a 4°C y 35% a temperatura ambiente (ver Gráficas 7 y 8).

Esta disminución en la recuperación de *Haemophilus influenzae* puede ser debida a que en el momento de rehidratar las pastillas liofilizadas, el microorganismo, no resiste la tensión provocada por su reconstitución, por que los constituyentes de este soporte no tienen la concentración y elementos adecuados para proteger de los daños al microorganismo, ó también al tiempo y condiciones de almacenaje, que quizás no fueron las adecuadas.

Hernandez³ menciona que *Haemophilus influenzae* puede ser liofilizado en suero de caballo con glucosa al 7.5%, en donde tal vez la concentración de glucosa sea un factor que determine la sobrevivencia de este microorganismo.

La viabilidad de *Haemophilus influenzae* en el soporte 2L fue de un 90% (Gráficas 7 y 8) en ambas temperaturas de almacenamiento, con lo cual se observó para este soporte mayor eficacia que el anterior (1L), para *Haemophilus influenzae* durante los 180 días de observación y almacenaje; lo cual representa una buena alternativa para almacenar *Haemophilus influenzae* si no se cuenta con refrigerador y por lo tanto se tiene una buena ventaja para poder transportar este microorganismo a otros sitios; a diferencia del soporte 1L en el cual se observó una importante disminución conforme transcurría el tiempo.

En el caso de *Neisseria gonorrhoeae* en el soporte 1L se observó una mejor viabilidad en este soporte, en comparación con los otros dos microorganismos, a los 180 días, con una viabilidad de 90% de recuperación a 4°C y 88% a temperatura ambiente (ver Gráficas 9 y 10), las cuales son recuperaciones mayores en comparación con *Campylobacter jejuni* y *Haemophilus influenzae* para este soporte.

Aquí se observó que el suero proporcionó a *Neisseria gonorrhoeae* una mayor protección, tal vez debido a la alta concentración de proteínas presentes en el suero como lo es la albúmina, la cual pudo tener un papel importante por si solo o que en combinación con los otros compuestos se produjo un efecto aditivo que favoreció su recuperación, lo cual es mencionado también por Hernández³ que utilizando suero de caballo - glucosa 7.5%, o bien una solución de albúmina con sacarosa con o sin peptona de caseína para liofizar se puede recuperar a *Neisseria gonorrhoeae*.

En el caso del soporte 2L se observó un 54% a 4°C y un 43% a T.A (ver Gráficas 9 y 10), esto puede ser debido a la rehidratación de la pastilla liofilizada ya que en el momento de hidratar este soporte, puede ser que no ayude a soportar la tensión de la rehidratación por la baja concentración de leche descremada (lactosa –glucosa, galactosa-caseína, albúminas, globulinas, calcio.) y de m-inositol que son menores al 10% y por lo tanto dañan a *Neisseria gonorrhoeae*.

Neisseria gonorrhoeae presento una muy buena viabilidad en el soporte 1L almacenada a 4°C durante un periodo de observación de 180 días lo cual representa una buena alternativa para almacenar bien a *Neisseria gonorrhoeae*.

Helicobacter pylori no se recuperó en ninguno de los dos soportes utilizados (ver Gráfica 11), este resultado se puede atribuir a que el microorganismo es muy sensible al frío⁵⁰ así como a la desecación y la rehidratación, y tal vez la concentración de los componentes de los soportes no fue la adecuada para *Helicobacter pylori*.

Esto es que desde la etapa de congelación se afectó la viabilidad del mismo como se pudo observar en estudios realizados por Owen RJ⁵⁴ y col, en donde se obtuvo, que una causa de las pérdidas en la viabilidad ocurren en la etapa primaria del secado y una menor pérdida ocurre durante la congelación y el secado secundario. Ellos notaron que otros factores, como la edad del cultivo y el número de bacterias viables antes de secar la suspensión no tiene un efecto significativo sobre la sobrevivencia de *Helicobacter pylori* pero mencionan que uno de los factores más importantes, es la composición del medio de preservación, por lo cual, concluyeron que el medio de preservación compuesto por glucosa al 25% y caldo m – inositol al 5% pH 7 fue el mejor de todos los medios que utilizaron, debido a la alta concentración de azúcar, que protegió a *Helicobacter pylori* durante la rehidratación.

Por todo lo anterior, se puede decir entonces que posiblemente, las concentraciones utilizadas para los constituyentes de cada uno de los soportes (1L y 2L) usados para liofilizar *Helicobacter pylori* no fueron las adecuadas, también se puede hablar de otros factores como la desecación, la rehidratación, el secado 1º y 2º, factores por lo cuales no se recuperó *Helicobacter pylori* después de haber liofilizado. (Gráfica 11).

11.0. CONCLUSIONES

- La mezcla crioprotectora (soporte) compuesta por caldo tioglicolato – glicerol 15 % – sangre de carnero desfibrinada 50 %, es una buena alternativa para la conservación y recuperación de *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Helicobacter pylori* a – 70°C durante 180 días.
- El soporte constituido por leche descremada 5% – m-inositol 5% – sangre de carnero desfibrinada 0.5%, es una buena mezcla protectora durante el proceso de liofilización, así como para la conservación de *Campylobacter jejuni* y *Haemophilus influenzae*, almacenados a 4°C y a temperatura ambiente.
- El soporte formado por suero de caballo – m-inositol 5% – sangre de carnero desfibrinada 0.5%, es una buena mezcla protectora durante el proceso de liofilización, así como para la conservación de *Neisseria gonorrhoeae* almacenada a 4°C.
- Para *Helicobacter pylori* ninguno de los soportes utilizados para liofilizar fueron satisfactorios.

12.0. PROPUESTA

Para el caso del método por liofilización en donde se observó que *Helicobacter pylori* no sobrevivió al proceso de liofilización, utilizando los soportes 1L y 2L, este estudio podría seguirse realizando, modificando la concentración de los componentes o bien cambiando alguno de ellos, para ver si se logra obtener una buena recuperación.

REFERENCIAS

1. Fajardo A, Escarraman M. 1978. Compilación de datos sobre colecciones de cepas de microorganismos a nivel nacional. Tesis. Facultad de química. UNAM. México D.F.
2. Sotolongo PF. 1995. Aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. 3ª. Ed. Edit. Finlay. La Habana Cuba.
3. Hernández MJ, Castro EG, Aquino SC. 2000. Manual sobre conservación de microorganismos. México D.F.
4. Fahy GM. 1986. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, 23. 1 – 13.
5. Aulet SC, Castillo MC, Holgado R. O. 2001. A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 96(4):583-586.
6. Giono CS. 1979. Conservación y mantenimiento de microorganismos. *Bioquímica II* (14). México D.F.
7. Michel RW, Brown, Gilbert P. 1995. Microbiological quality assurance. A guide toward relevance and reproducibility of inocula. Edit. CRC press. New York. United States of America.
8. García LD, Uruburu FF. 2003. Colección española de cultivos tipo CECT. Universidad de Valencia. España.
9. Collins CH, Lyne MP. 1989. Métodos microbiológicos. Edit. Acribia S.A. Zaragoza España.
10. Silliker JH, Baird-Parker AC, Bryan FL. 1980. Ecología microbiana de los alimentos. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Vol. I. Edit. Acribia. Zaragoza. España.
11. Jeannin AM. 1986. Ingeniería farmacéutica. Edit. El manual moderno. México D.F.

12. Wiseman A. 1986. Principios de biotecnología. Edit. Acribia. Zaragoza España.
13. Zdenek H. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 46: 2005-229.
14. Joyce AS, Jan KE. 1987. Viability of lyophilized anaerobes in two media. *Cryobiology*. 24: 174-178.
15. Meléndez GA. 1991. Liofilización de productos biológicos. Ensayo bibliográfico. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México D.F.
16. Morales MJ. 1988. Extracción, esterilización y liofilización de leche humana materna. Tesis Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México D.F.
17. Day JG, McLellan MR. 1995. *Methods in molecular biology. Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Edit. Humana press. Totowa New Jersey.
18. Hernández RC. 1984. Evaluación de diferentes sustancias crioprotectoras (soportes) en la liofilización de toxóide tetánico. Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.
19. Kirsip BE, Snell JS. 1984. *Maintenance of microorganisms. A manual of laboratory methods*. Academic Press inc. Orlando Florida.
20. Leveau JY, Bouix M. 2000. *Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial*. Zaragoza España.
21. Fernández FB. 1998. Liofilización de productos farmacéuticos. Edit. UTEHA Noriega editores. México DF.
22. Ozuna ML. 2001. La liofilización como método de conservación de alimentos. Trabajo monográfico de actualización. Tesis. Facultad de Química UNAM. México D.F.
23. Kunz B. 1983. Cultivo de microorganismos para la conservación de alimentos. Edit. Acribia. Zaragoza España.
24. Pikal MJ, Roy MI, Shah S. 1984. Masa y traspaso térmico en la liofilización del frasco de productos farmacéuticos: Papel del frasco. *J. Pharm. Sci. Sep*; 73 (9): 1224-1237.

25. Brulls M, Rasmunson A. 2002. Traspaso térmico en la liofilización del frasco. *Internal. Pharm. Oct*; 246 (1-12): 1-16.
26. Pikal MJ, Rambhatla S. 2003. Heat and transferencia total scalan. *J. Pharm. Sci. Tech.* 4 (2).
27. Pikal MJ, Shah S. 1997. Distribución de la humedad dentro del vial durante la etapa de secado secundario de la liofilización. *J. Pharm. Sci. Techno.* Jan-Feb; 51 (1): 17-24.
28. Reed G. 1983. Prescott and Dunn's Industrial Microbiology. 4^a ed. Edit. AVI publishing company inc. United States of America.
29. Doyle PM, Beuchat RL, Montville JT. 1997. Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras. Edit. Acribia. Zaragoza. España.
30. Levett PN. 1991. Anaerobic microbiology. A practical approach. Edit. IRL press. New York.
31. Baker FJ, Breach MR. 1990. Manual de técnicas de microbiología médica. Edit. Acribia S.A. Zaragoza España.
32. Koneman WE, Stephen DA. 1988. Diagnostico microbiologico. Edit. Panamericana. Philadelphia Pennsylvania.
33. Escamilla G.A. 2003. Búsqueda y desarrollo de un medio cromogénico para el diagnostico de la campilobacteriosis. Tesis. ENCB. del IPN. México, D.F.
34. Wolfgang KJ, Willett HP. 1994. Microbilogía. 20^a ed. Edit. Panamericana. Buenos Aires Argentina
35. Adams MR, Moss. MO. 2000. Food microbiology. 2^aed. Edit. The royal society of chemistry. Cambridge.
36. Nicholson, A.M. Charlotte, M.P. 1995. Evaluation of disk method for hipurate hydrolysis by *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 33 (5): 1341-1343.
37. Woodford N, Johnson PA. 1998. Method in molecular medicine. Molecular bacteriology. Protocols and clinical applications. Edit. Humana Press. Totowa New Jersey.

38. James, M J. 1992. Microbiología moderna de los alimentos. 2ªed. Edit. Acribia. Zaragoza España.
39. Mins CA. 1995. Microbiología médica. Edit. Mosby-Doyma. España.
40. Brooks F, Stephen A. 1998. Microbiología médica de Jawetz. Melnick y Adelberg. 16ª. Ed. Edit. El manual moderno. México.
41. Dan M, Richardson J, Miliotis MD, Koornhof HJ. 1989. Comparison of preservation media and freezing conditions for storage of faeces. J. Med. Microbiol. Feb; 28 (2):151-154
42. Luechtefeld NW, Wang WL, Blaser MJ. 1981. Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from turkey cecal specimens. Journal of clinical microbiol. Mar. 13 (3): 438-443.
43. Saha SK. 1991. Better preservation of *Campylobacter jejuni* y *C. coli* in a defined medium. Indian J. Med. Res. (Enl); 93: 26-28.
44. Gorman R, Adley C. 2004. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of – 20°C and – 85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. Lett Appl. Microbiol. 38 (4): 306-310.
45. Mills CK, Gherna RL. 1988. Cryopreservation studies of *Campylobacter*. Cryobiology. 25. (Apr):148-152.
46. Murray PR, Lawrence D. 1992. Microbiología médica. Edit. Mosby. España.
47. Monzón BE. 1999. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana de cepas de *H. pylori* en niños y adultos con enfermedad ácido péptica utilizando prueba de sensibilidad E TEST. Tesis. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM. México D.F.
48. Rosenstock SJ, Jorgensen T, Scand J. 2004. Helicobacter pylori infection explain all socio-economic differences in peptic ulcer incidence? Genetic and psychosocial markers for incident peptic ulcer disease in a large cohort of Danish adults. Gastroenterol. Sep; 39 (9):823-829.

49. Mobley HL, Clayton C L. 1997. Methods in molecular medicine. *Helicobacter pylori* protocols. Edit. Humana Press. United States of America.
50. Ohkusa T, Miwa H, Endo S, Okayasu I, Sato N. 2004. *Helicobacter pylori* is fragile when stored at low and ultra-low temperatures. J. Gastroenterol Hepatol. Feb; 19 (2); 200-204.
51. Flamm R, Hachem CY, Kim HY, Clarridge JE. 1995. Transporte y almacenaje de *Helicobacter pylori* de aislamientos clínicos de biopsias de la mucosa gástrica. J. Clin. Infec. Dis. Microbiol. Apr; 14 (4): 349-352.
52. Liaw SJ, Teng LJ. 1998. Comparison of preservation mixtures for *Helicobacter pylori*. J. Microbiol. Immunol. Infect. Dec; 31 (4); 261-263.
53. Shahamat M, Pasko-Kolva C, Mai UE, Yamamoto H, Colwell R. 1992. Selected cryopreservatives for long term storage of *Helicobacter pylori* at low temperatures. J. Clin. Pathol. Aug; 45 (8): 735-736.
54. Owen RJ. 1989. The effect of cooling rate, freeze-drying suspending fluid and culture age on the preservation of *Campylobacter pylori*. Journal of Applied Bacteriology. 66, 331-337.
55. Bailey S. 1989. Diagnóstico microbiológico.7ª, Ed. Edit. Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
56. Votava M, Stríteká M. 2001. Preservation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* at – 70°C. Cryobiology 43, 85-87.
57. Alonso C, Arroyabelt M.C. 1998. Biología molecular en el diagnóstico clínico. Temas de pediatría asociación mexicana de pediatría. Edit. McGraw-Hill Interamericana. México D.F.
58. Harbec PS, Turcotte P. 1996. Preservation of *Neisseria gonorrhoeae* at – 20°C. Journal of Clinical Microbiology. (May): 1143-1146.
59. MacFaddin JF. 2000. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª Ed. Edit. Panamericana. United States of America.
60. Miles AA, Misra SS. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. J. Hyg. 38: 732-749.

61. Pegg DE. 2002. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med.* Feb;20 (1):5-13.
62. Wasfy M, Buhari O, Atef E, Churilla A. 1995. Comparison of preservation media for storage of stool samples. *Journal of clinical microbiology.* Aug. 33 (8):2176-2178.
63. Nair GB, Chowdhury S, Das P, Pal S. 1984. Improved preservation medium for *Campylobacter jejuni*. *Journal of clinical microbiology.* 19 (2):298-299.
64. Vivanco VD, Adam MM. 1983. Survival of *Campylobacter jejuni* in different media and faeces and different temperatures and times of preservation. *Acta Microbiol Hung.* 30 (1).69-74.
65. Delgado A. 1994. *Laboratorio clínico de microbiología.* McGraw-Hill. España.

Dirección electrónica:

- I. Recuperado de <http://www.Helicobacterspain.com>, enero de 2005.