

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Efectos de la Criopreservación sobre algunas Cepas Bacterianas  
con Nitrógeno Líquido.

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

JOSE MANUEL LOPEZ GUTIERREZ

GUADALAJARA, JALISCO 1976

EFFECTOS DE LA CRIOPRESERVACION SOBRE ALGUNAS CEPAS  
BACTERIANAS CON NITROGENO LIQUIDO

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A  
JOSE MANUEL LOPEZ GUTIERREZ

A MIS PADRES

A MI ESPOSA E HIJOS

A MIS HERMANAS

AL FUNDADOR DE LA FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DR. RAMON FERNANDEZ DE CEVALLOS

CON RESPETO Y ADMIRACION  
A MI DIRECTOR DE TESIS  
M.V.Z. ENEAS W. RENDON RUIZ

A MIS AMIGOS

## C O N T E N I D O

- I INTRODUCCION
- II MATERIAL Y METODOS
- III RESULTADOS
- IV DISCUSION
- V CONCLUSIONES
- VI REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

## I.- INTRODUCCION

La conservación de colecciones de cepas bacterianas sin que éstas sufran modificaciones constituye un gran problema para muchos laboratorios que utilizan los métodos convencionales. Bayardo, 1973 (1), Wellman, 1973 (19).

La importancia de conservar cepas sin que sufran alteraciones se demuestra en los siguientes casos:

### 1.- PRUEBAS SEROLOGICAS

Es indispensable tener diferentes antígenos con el fin de buscar anticuerpos séricos para el diagnóstico, pronóstico y análisis del tratamiento en numerosas enfermedades. Un ejemplo concreto de este uso sería la prueba de Huddleson ó reacción de aglutinación que utiliza antígenos de Brucella, Jawetz, 1958 (7).

### 2.- INOCULACION EXPERIMENTAL

#### A. PRUEBAS DE MEDICAMENTOS

Frecuentemente es necesario hacer pruebas " in vitro " e " in vivo " de medicamentos en animales que han sido inoculados para este fin, por lo cual es necesario tener los cultivos bacterianos lo más estable posible.

B. Postulados de Koch

En estos postulados se menciona la necesidad de aislar, cultivar e inocular una cepa para comprobar que esta cepa es la causante de una enfermedad determinada. Por lo tanto, aquí también se demuestra la importancia de mantener esa cepa viable y sin alteraciones.

3.- PRUEBAS COMPARATIVAS ENTRE DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS:

Entre estas pruebas se puede mencionar las

- A. Bioquímicas
- B. Antigénicas
- C. Patogénicas

4.- FINES INDUSTRIALES

- A. Cerveza
- B. Vinos

5.- UTILIZACION CLINICA

- A. Antibióticos
- B. Vacunas

Las vacunas vivas atenuadas son uno de los métodos profilácticos más eficaces que se han desarrollado. Pero su uso implica numerosos problemas para la conservación de un solo tipo antigénico y para evitar dificultades de virulencia. Algunos ejemplos de vacunas atenuadas vivas pudieran mencionarse como la de la Fiebre carbonosa, Brucelosis, Pasteurellosis, etc.

6.- REFERENCIA CIENTIFICA.

7.- ENSEÑANZA:

Así como es importante tener un zooterio para fines pedagógicos, para que el neófito aprenda a distinguir y caracterizar diferentes especies, el " cepario " bacteriano es esencial para estos mismos fines.

Todo organismo vivo empieza a envejecer tan pronto nacen, sus procesos metabólicos sufren modificaciones en el curso de su desarrollo y eventualmente se detienen y el organismo muere. La única forma objetiva de que disponemos, capaz de prolongar la vida, es la reducción de las funciones metabólicas. La naturaleza de por sí nos ofrece un " experimento modelo" al respecto y la frase " redúzcase la temperatura y se reducirá el metabolismo " bien puede aplicarse a los animales hibernantes.

Glaxo (6).

Los principales métodos hipotérmicos usados hasta ahora para la conservación de bacterias son:

I.- CONSERVACION DE 4 A 7° C

en un medio nutritivo: los inconvenientes de este método son que implican resiembras periódicas debido al deterioro del medio de cultivo por: deshidratación del medio y pérdida de sus cualidades nutritivas.



Estas resiembras a su vez ocasionan:

- a.- riesgos de contaminación
- b.- mutaciones
- c.- pérdida por lisis
- d.- exposición frecuente del laboratorista
- e.- pérdida repentina de la viabilidad
- f.- costos elevados por concepto de mano de obra y medios de cultivo. Wellman, 1973 (19).

## II. LIOFILIZACION

La liofilización, un proceso de disecación y congelación, Cantarow, 1967 (2), ha sido hasta ahora el método más útil para la conservación de bacterias, más no puede utilizarse en ciertos microorganismos. En una investigación por B. Ray, 1971 (13) sobre la disecación - congelación de *Salmonella anatum*, reporta un 70-90% de daño celular, aunque hubo cierta recuperación a la rehidratación. En la preservación de levaduras se han reportado resultados pobres, Wellman, 1973 (19). Además se ha determinado que hay cambios genéticos, Wellman, 1973 (19), cambios genéticos en términos de cambios en resistencia a antibióticos, Kim, 1973 (8), disminución en la viabilidad, Kim, 1973 (8) y cambios en la inmunogenicidad, Kim, 1973 (8). Por otra parte, este método es inaccesible para muchos laboratorios por los altos costos del equipo especial requerido.

## III.- CONGELACION MEDIANTE PRODUCTOS QUIMICOS

- a.- Con CO<sub>2</sub> y acetona ( que se encuentran a temperaturas entre - 56° a -76°):

Aunque es un método eficaz para la conservación de cultivos bacterianos, resulta demasiado costoso por la pérdida constante del producto.

b.- Con Nitrógeno Líquido:

El nitrógeno líquido que tiene una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ , puede ser almacenado en termos especiales, lo que reduce las pérdidas y resulta más económico y más práctico que el  $\text{CO}_2$ , Kim, 1973 (8) Smith 1973 (18). Es un método sencillo y reproducible en el cual se han encontrado cultivos estables a través de largos períodos ( en algunos hasta 3 años ) y una viabilidad alta, Wellman, 1973 (19).

OBJETIVO DE LA TESIS

El objetivo de realizar el presente trabajo ha sido el de evaluar el método de congelación con nitrógeno líquido de 5 diferentes cepas bacterianas, con el fin de analizar sus ventajas y desventajas y así poderlo aplicar a algunas cepas bacterianas de interés en la Medicina Veterinaria.



OFICINA DE  
DIFUSION CIENTIFICA

## II.- MATERIAL Y METODOS

### MATERIAL

#### Biológico:

- a.- Staphylococcus aureus
- b.- Escherichia coli
- c.- Salmonella typhosa
- d.- Pasteurella multocida
- e.- Clostridium chauvoei

#### Medios:

Caldo soya tripticase

Agar tripticase

Mueller Hinton

Triple Azúcar Hierro

leche tornasolada

sorbitol

Gelosa sangre

gelatina nutritiva

caldo rojo fenol adicionado de manitol

Medio de Sim

Citrato de Simons

Material de Vidrio:

pipetas de 1 ml.  
matraz de 50 y 100 ml. Erlenmayer  
tubos de ensayo con tapón de rosca  
cajas de petri  
frascos de 5 ml. criogénicos  
vasos de precipitado de 500 ml.

Soluciones:

polivinilpirrolidona al 20%  
glicerol al 5%  
solución Buffer pH 7.2  
agua destilada

Varios:

incubadora 35-37° C  
autoclave  
mechero Bunsen  
asa bacteriológica  
tanque criogénico Mod. LR-30  
nitrógeno líquido  
microscopio  
portaobjetos  
gradillas  
etiquetas engomadas  
masking tape  
bolsas de papel  
pinzas  
crayón  
cuenta colonias  
agitador de Mazzini

Sensidiscos:

Virginiamicina 20 mcg.  
Oxitetraciclina 10 mcg.  
Terramicina 10 mcg.  
Bacitracina 5 unidades  
Aureomicina 10 mcg.  
Lincomicina 2 mcg.  
( Laboratorios Difco )

M E T O D O S

De la colección de bacterias mantenidas entre 4° y 8° C en caldo soya trypticase, se tomó una asada de cada una de las 5 cepas y se sembró por estría, Bayardo, 1973 (1) en placas de Agar Soya Trypticase con el objeto de obtener colonias aisladas. Se escogió este medio por su capacidad de permitir reparación rápida de bacterias dañadas, por ser un medio nutricionalmente rico y no selectivo, Ray, 1973 (14). El medio en todos los casos fué de la misma concentración y el mismo tipo. Se incubó de 35 - 37° C durante 24 horas. De cada cepa se tomó una colonia inoculándose con ella un volumen de 15 ml. de caldo soya trypticase estéril y se incubó durante 18 horas. Al cabo de este tiempo se observó abundante crecimiento y se procedió a agregar a cada matraz 12 ml. de glicerol al 5% ( suspendido en solución Buffer ); Smith, 1973 (18), se mantuvo en agitador de Mazzini durante 15 minutos. Se agregaron 3 ml. de polivinilpirrolidona ( PVP ) al 20% ( suspendido en solución Buffer ).

Nuevamente se dejó en el agitador durante 15 minutos; todo esto se llevó bajo condiciones de esterilidad. En seguida, se procedió a determinar el número de unidades formadoras de colonias por ml. de esta suspensión por el método de vaciado en placa, Bayardo, 1973 (1). Se hicieron diluciones progresivas de 1:10; 1:100; 1:1,000; 1:10,000; 1:100,000; 1:1,000,000; colocando inicialmente un ml. de la suspensión en 9 ml. de agua destilada estéril. Se sembró de la dilución de 1:1,000,000 en agar soya trypticase y se incubó durante 24 horas a 35-37° C. De la misma colonia que se tomó para preparar la suspensión se hicieron antibiogramas por sensibilizados usando el medio de Muller Hinton según la técnica de Kirby Bauer-Carter, 1975 (3) y Bayardo, 1973 (1) y se practicarón pruebas bioquímicas.

Una vez obtenida la porción de la muestra para efectuar las diluciones, el resto de cada una de las suspensiones bacteriológicas se dividió en frascos criogénicos en porciones de 4 ml., sellados con tapón de hule y rosca. Se sumergieron lentamente en el  $NL_2$  para evitar el burbujeo que provocaba el desprendimiento de la energía calorífica. Después de un mínimo de 15 minutos de estar en congelación se procedió a descongelarlas dejándolas a temperatura ambiente durante media hora. En total se congelaron y descongelaron los frascos por 5 veces consecutivas, determinando después de cada descongelación el número de unidades formadoras de colonias. Después de la quinta descongelación se determinó la susceptibilidad a los antibióticos por antibiogramas interpretando éstas de la siguiente forma.

Se midió el tamaño del halo de inhibición sin incluir el diámetro del disco, no como menciona Carter, 1975 (3) por una variación que hubo en tamaño de los discos de diferentes antibióticos. Además, se practicaron las siguientes pruebas bacteriológicas: bioquímicas y movilidad.

- 1) Cepa *S. aureus*  
Catalasa, Coagulasa, Hemólisis, Gelatinasa y Fermentación de Manitol.
- 2) Cepa *E. coli*  
Movilidad, Formación de Indol, Fermentación de Sorbitol, Lactasa y Glucosa.
- 3) Cepa *S. typhosa*  
Utilización de Citrato, Fermentación de Glucosa y Lactosa, Formación de Indol y Acido Sulfhídrico (  $H_2S$  ) y Movilidad.
- 4) Cepa *P. multocida*  
Formación de Indol y Acido Sulfhídrico y Fermentación de Lactosa.
- 5) Cepa *C. chauvoei*  
Fermentación de Glucosa, Maltosa, Sacarosa con producción de ácido y gas. Fermentación de Manitol y Salicina y producción de Indol.

T A B L A I

RESULTADOS PRE Y POST-CONGELACION EN UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

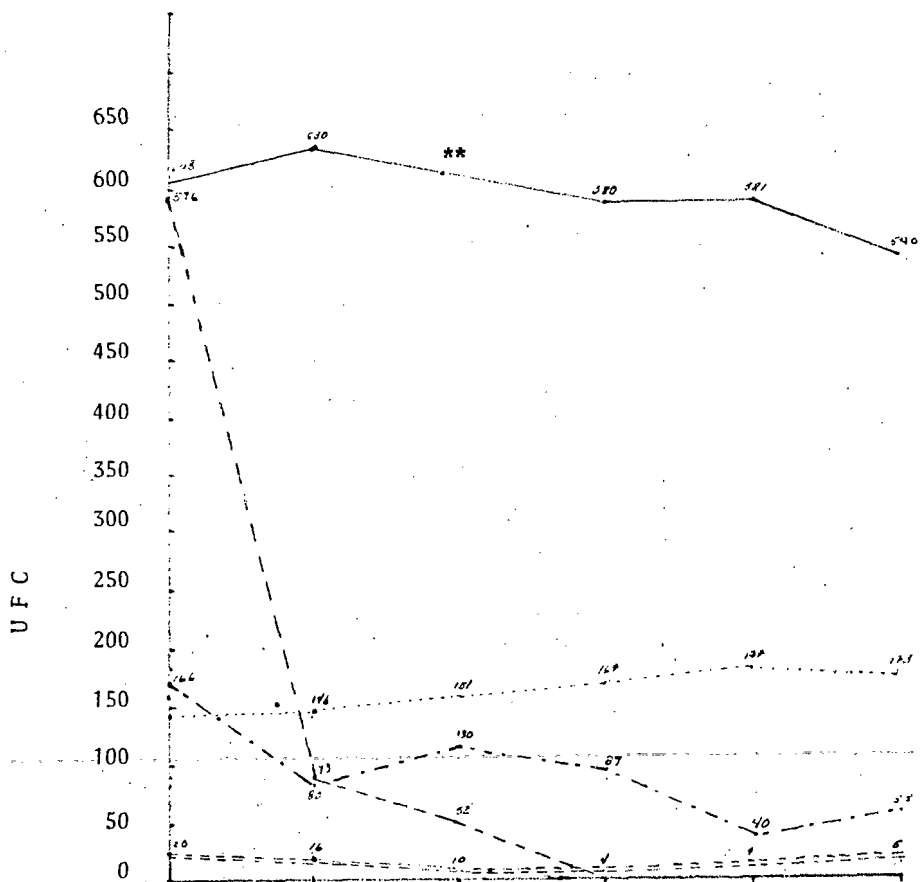
NOMBRE DE LA CEPA	NO. DE UFC PRE- CONGELACION	PRIMERA UFC X ML.	SEGUNDA UFC X ML.	TERCERA UFC X ML.	CUARTA UFC X ML.	QUINTA UFC X ML.
<i>P. multocida</i>	608	630	*	580	581	540
<i>C. chauvoei</i>	596	93	52	0	0	0
<i>S. typhosa</i>	166	80	130	89	40	53
<i>S. aureus</i>	145	146	151	167	177	173
<i>E. coli</i>	20	16	10	4	4	5

\* Muestra contaminada.



T A B L A II

RESULTADOS DE PRE Y POST-CONGELACION EN: " UNIDADES FORMADORES DE COLONIAS" ( UFC\* )



—	P. Multocida	Gram -	
- - -	C. chauvoei	" +	
.....	S. aureus	" +	
- . - . -	S. typhosa	" -	
.....	E. coli	" -	

\* Por ml. de dilución 10<sup>6</sup>

\*\* Muestra contaminada

T A B L A III

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS \*

	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	ESCHERICHIA COLI	CLOSTRIDIUM CHAUVOEI	PASTEURELLA MULTOCIDA	SALMONELLA TYPHOSA
SACAROSA			+		
MALTOSA			+		
SALICINA			-		
SORBITOL		+			
MOVILIDAD		+			+
MANITOL	+		-		
LACTOSA		+		+	-
INDOL PRODUCCION		+	-	-	-
HEMOLISIS B	+				
GLUCOSA FERMENTACION		AG	AG		AG
GELATINA	+				
COAGULASA	+				
CITRATO					-
CATALASA	+				
PRODUC. DE A. SUL- FHIDRICO.				+	+

\* No se encontraron cambios en ninguna de las 5 cepas trabajadas.

T A B L A IV

PRIMER ANTIBIOGRAMA - RADIO DE LOS HALOS DE INHIBICION  
EN MM. ( SIN INCLUIR EL DISCO )

NOMBRE DE LA CEPA:	STAPHYLOCOCCUS AUREOS		ESCHERICHIA COLI		PASTEURELLA MULTOCIDA		SALMONELLA TYPHOSA	
	Pre-conge- lación	5°descon- gelación	Pre-conge- lación	5° descon- gelación	Pre-conge- lación	5° descon- gelación	Pre-conge- lación	5° descon- gelación
VIRGINIAMICINA	13	19	10	12	0	0	2	1
TETRACICLINA	11	12	9	10	0	0	6	12
AUREOMICINA	10	10	8	10	0	0	5	8
LINCOMICINA	9	16	7	8	0	0	0	0
BACITRACINA	1	16	5	8	0	0	0	7
TERRAMICINA	0	13	9	10	0	0	6	7

T A B L A V

SEGUNDO ANTIBIOGRAMA - RADIO DE LOS HALOS DE INHIBICION

EN MM. ( SIN INCLUIR EL DISCO )

NOMBRE DE LA CEPA:	STAPHYLOCOCCUS AUREOS		ESCHERICHIA COLI		PASTEURELLA MULTOCIDA		SALMONELLA TYPHOSA	
	Pre-congelación	5° descongelación	Pre-congelación	5° descongelación	Pre-congelación	5° descongelación	Pre-congelación	5° descongelación
VIRGINIAMICINA	13	19	10	12	0	3	2	1
TETRACICLINA	11	12	9	10	0	0	6	12
AUREOMICINA	10	10	9	10	0	0	5	8
LINCOMICINA	9	16	5	6	0	0	0	0
BACITRACINA	1	16	4	6	0	0	0	7
TERRAMICINA	0	13	9	11	0	0	6	7

T A B L A VI

RESULTADOS DE LAS REPLICAS DE P. MULTOCIDA Y S. TYPHOSA  
DE LA QUINTA DESCONGELACION CORRABORANDO LOS DATOS DE LA  
TABLA NO. IV

P. MULTOCIDA

	1a.	3	6a.	3
Virginiamicina	2a.	3	7a.	3
	3a.	3	8a.	3
	4a.	3	9a.	3
	5a.	3	10a.	2.5

S. TYPHOSA

	1a.	6	6a.	6
Bacitracina	2a.	6	7a.	6
	3a.	6	8a.	5
	4a.	6	9a.	6
	5a.	6	10a.	6

Radio del halo de inhibición en mm. sin incluir el disco.

T A B L A VII

RADIO DEL HALO DE INHIBICION DE SALMONELLA TYPHOSA EN MM  
( SIN INCLUIR EL DISCO )

ANTIBIOTICO	PRE-CONGE- LACION	PRIMERA DESCON- GELACION	SEGUNDA DESCON- GELACION	TERCERA DESCON- GELACION	CUARTA DESCON- GELACION	QUINTA DESCON- GELACION
VIRGINIAMICINA	3	2	2	1	2	1
TETRACICLINA	7	8	7	12	11	10
AUREOMICINA	4	6	6	10	9	11
LINCOMICINA	0	0	0	0	0	0
BACITRACINA	0	0	0	1	2	7
TERRAMICINA	5	8	8	12	11	10

T A B L A VIII

RADIO DEL HALO DE INHIBICION DE PAUSTERELLA MULTOCIDA EN MM  
( SIN INCLUIR EL DISCO )

ANTIBIOTICO	PRE-CONGE- LACION	PRIMERA DESCON- GELACION	SEGUNDA DESCON- GELACION	TERCERA DESCON- GELACION	CUARTA DESCON- GELACION	QUINTA DESCON- GELACION
VIRGINIAMICINA	1	9	0	10	10	3
TETRACICLINA	0	0	2	2	2	0
AUREOMICINA	0	2	3	2	2	0
LINCOMICINA	0	0	0	0	0	0
BACITRACINA	0	6	6	6	6	0
TERRAMICINA	0	0	0	0	0	0

## D I S C U S I O N

### Número de Unidades Formadoras de Colonias ( UFC )

No se vió afectada la viabilidad en el *Staphylococcus aureus* ( Tabla no. 1 y 2 ). Se observó un incremento en número que es de suponerse, debido al tiempo que transcurrió entre cada descongelación y congelación, por que las bacterias permanecieron a temperatura ambiente teniendo oportunidad de reproducirse.

En *Pasteurella multocida* ( Tabla no. 1 ) se consideró afectado ligeramente la viabilidad aunque también pudiera atribuirse a errores inherentes del método.

En *Salmonella typhosa* ( Tabla no. 1 ) se vió disminuída la viabilidad en un 69%; en *E. coli* ( Tabla no. 1 ) en un 75%; *Clostridium chauvoei* ( Tabla no. 1 ) presentó a partir de la tercera descongelación un 0% de supervivencia, ó sea disminuyó en un 100% su viabilidad.



*Mycobacterium tuberculosis* se desarrolla normalmente en un medio que contenga glicerol al que metaboliza y transforma en aldehído. Cuando se le disecca por congelación este aldehído reacciona con las proteínas celulares provocando la muerte de numerosos bacilos. Wellman, 1973 (19) y Laboratorios Glaxo (6). Es probable que algo similar haya ocurrido con *Clostridium* es decir, posiblemente los crioprotectores no fueron adecuados. Wellman y Stewart, 1973 (19) reportan grandes diferencias en los resultados de viabilidad según el crioprotector utilizado, aunque trabajando con levaduras obtuvieron mayor éxito con glicerol al 10%. En cambio, para la preservación de *Toxoplasma gondii*, Smith, 1973 (18) encontró que el glicerol no funcionó como crioprotector en ninguna concentración; pero si obtuvo buenos resultados con suero de feto de becerro.

#### Reacciones bioquímicas.-

Al no haber ocurrido cambios antes y después de las congelaciones se puede decir que el metabolismo básico de las bacterias no se modificó ( Tabla no. 3 ).

#### Susceptibilidad a los Antibióticos.-

Se observó que después de la quinta descongelación aumentó la sensibilidad hacia los antibióticos utilizados ( Tabla no. 4 ).

por lo mismo quisimos averiguar en cual de las cinco descongelaciones ocurrió esta modificación ( Tabla no. 7 y 8 ). Es por esto que se procedió a descongelar por 5 veces consecutivas un frasco de la cepa de Pasteurella y otra de Salmonella que aún conservábamos sin descongelación alguna; del resto de las cepas ya no quedaba ningún frasco bajo estas condiciones. En ambas cepas anteriores se encontró que a partir de la primera descongelación había aumentado la susceptibilidad de las cepas hacia los antibióticos ( Tabla no. 7 y 8 ).

El siguiente paso sería comprobar si dicho cambio era solamente estructural con fractura de la pared celular. Ray, 1973 (14); para esto se resembraron los cultivos de la primera a la quinta descongelación por dos veces consecutivas y se volvieron a hacer los antibiogramas obteniéndose iguales resultados. ( Tabla no. 5 ), lo cual parece indicar que se trataba de una mutación genética. Carter, 1975 (13) y Wellman, 1973 (19). Simultáneamente se hicieron 10 réplicas utilizando bacitracina con la cepa de la quinta descongelación de Pasteurella y virginiamicina con la de Salmonella, y esto con el fin de determinar la variación aproximada que tenía el método ( ver Tabla no. 6 ). Se encontró que era mínimo.

Para buscar una explicación ó antecedentes de los cambios supuestamente genéticos que sufrierón las cepas experimentadas posterior a la

congelación con  $N_2$ , se revisó la literatura con relación a la adquisición y pérdida de resistencia bacteriana. Al parecer no se ha reportado este tipo de cambio genético en relación a resistencia bacteriana posterior a la congelación en  $N_2$ ; pero sí en otros parámetros como por ejemplo los mutantes respiratorio-deficientes en los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*. Wellman, 1973 (19). Por otra parte se han observado cambios genéticos cuando se cultivan las bacterias a temperaturas mas elevadas ( 30-43°C ) Frey, 1975 (5).

Hay diferentes interpretaciones de los mecanismos de resistencia microbiana. De estas las siguientes son posibles aunque no se han comprobado enteramente.

- 1) Destrucción aumentada del antibiótico por enzimas.
- 2) Permeabilidad disminuída del microorganismo al antibiótico.
- 3) Aumento en la formación de un metabolito con el cual compete el antibiótico por una enzima.
- 4) Síntesis aumentada de una enzima inhibida.
- 5) Desarrollo de una enzima alterada que puede seguir con su función metabólica, más no está afectada por el antibiótico.
- 6) Una estructura alterada de una proteína ribosomal.
- 7) Desarrollo de una vía metabólica nueva en la cual no interfiere el antibiótico. Meyers, 1972 (15).

Al ser la resistencia bacteriana un fenómeno genético los mutantes que surgen espontáneamente se seleccionan y se favorecen en su sobrevivencia y proliferación en la presencia del antibiótico. Esta " presión selectiva " en presencia del antibiótico puede explicar la pérdida de resistencia en nuestras cepas. Es decir, al no estar en contacto con el antibiótico las cepas resistentes y sensibles tuvieron la misma oportunidad de proliferar. Meyers, 1972 (12).

Schneider y colaboradores, 1968 (15) reportan la retención de resistencia a los antipalúdicos posterior a la congelación en nitrógeno líquido mientras W. Trager y colaboradores, 1967 (15) en pases biológicos del mismo microorganismo observan pérdida de esta resistencia.

Se clasifica la resistencia bacteriana en dos grupos:

1.- Resistencia Cromosómico.- Esta fue la primera en descubrirse y se desarrolla a través de mutaciones del material cromosómico. Las bacterias que desarrollan resistencia cromosómico son incapaces de transferir esta resistencia a otros microorganismos; pero la pasan a las futuras generaciones a través de la división celular.

2.- Resistencia Transferible.- La segunda forma de resistencia a los medicamento, la resistencia transferible resulta de un elemento genético, el factor R ó de resistencia, encontrado en el citoplasma bacte-

riano. Un solo factor puede acarrear la resistencia simultáneamente a uno ó más antibióticos. Puede ser transferido este tipo de resistencia de una célula bacteriana a otra, mediante un proceso denominado " conjugación ". Las células involucradas en este proceso se ponen en contacto íntimo a través de un puente protoplasmico llamado el " pilus sexual ". El factor R pasa de la célula macho ó donadora a la hembra ó receptora mediante este pilus. Smith, Kline, French (17) y Royston C. Clowes (4).

Al observar los cambios en el antibiograma pre y post congelación también quisimos hacer una correlación entre los mecanismos de acción de los antibióticos utilizados y los cambios en la sensibilidad. Los tres tipos de tetraciclina ( Tetraciclina, Aureomicina y Terramicina ), la lincomicina y la virginiamicina actúan de un modo similar inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Kucers, 1975 (9).

La lincomicina, virginiamicina y bacitracina actúan contra los Gram positivos principalmente, mientras las tetraciclinas son de amplio espectro. Smith, Kline y French (17) y Kucers, 1975 (9).

Posiblemente este intento a correlacionar estos aspectos nos trajo mayor confusión, puesto que la bacitracina que actúa casi exclusivamente contra gram positivos resultó con un aumento en el halo de inhibición en *P. multocida* después de la congelación. Este fenómeno, aunque posiblemente se explicara por los cambios genéticos en resistencia des-

critos, todavía queda con signo interrogatorio.

Finalmente, el método de antibiograma siendo una prueba " in vitro " esta sujeto a numerosos factores físicos y químicos, además de la interacción entre antibiótico y el microorganismo. Jawetz, 1958 (7). Las pruebas de antibiogramas por difusión son pruebas gruesas " in vitro " sin correlación a los resultados " in vivo ". Sin embargo ayudan al clínico dando una orientación al respecto. Carter, 1975 (3).

Por otra parte, aunque en algunos casos aumentó el halo de inhibición es importante especificar que hay ciertos límites definidos que separa la interpretación de sensible, medianamente sensible y resistente. Por ejemplo, la lincomicina a 2 mcg. con un halo de 9 mm. ( incluyendo el disco de 6 mm. ó 3 mm. sin incluir el disco ) significa resistencia; de 6 a 8 mm. ( sin incluir el disco ) significa medianamente sensible; y 9 mm. ó más ( sin incluir el disco ) significa sensible. Carter, 1975 (3).

Por lo tanto, los aumentos pequeños en nuestros resultados no tuvieron gran significado, mientras sí hubo casos de grandes cambios, a los cuales sí se puede atribuir los cambios genéticos discutidos. Por ejemplo, la bacitracina y terramicina en el *Staphylococcus aureus* que aumentaron en sensibilidad grandemente ( Tabla no. 4 y 5 ).

## CONCLUSIONES

- 1.- El método de congelación de bacterias en nitrógeno líquido es útil y práctico en la mayor parte de los casos.
- 2.- En los casos en que no funciona el sistema de congelación en nitrógeno líquido, es posible que al experimentar con otros crioprotectores diferentes al usado por nosotros haya mayor éxito.
- 3.- No se han observado cambios en las propiedades bioquímicas. Por lo tanto, concluimos que el metabolismo bacteriano permanece estable con respecto a las pruebas utilizadas.
- 4.- Al observar los cambios en sensibilidad en algunos antibióticos, concluimos que estas alteraciones son de naturaleza genética.
- 5.- Por esta alteración genética que pudiera ocurrir en algunas cepas es de concluir que al utilizar este método las bacterias congeladas pueden servir como cepas de referencia, más no en cuanto a su sensibilidad ó resistencia a antibióticos.

6.- De las 5 cepas utilizadas, el mayor éxito en términos de estabilidad en viabilidad y propiedades metabólicas, se obtuvo en *Staphylococcus aureus* y *Pasteurella multocida*. En *E. coli* y *Salmonella typhosa* los resultados en viabilidad fueron regulares ( 75% y 69% respectivamente ) y en el *Clostridium*, a partir de la tercera descongelación la viabilidad fue nula.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Bayardo, B.- 1973  
Análisis Bacteriológicos y Bacteriología Determinativa.  
Universidad de Guadalajara
- 2.- Cantarow, Abraham - 1967  
Biochemistry. 4a. edición W.B. Saunders Co. Philadelphia  
E.E.U.U. p. 86
- 3.- Carter, G.R. - 1975  
Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology  
2a. edición p. 260-271
- 4.- Clowes, R.C.  
The molecule of infectious drug resistance.
- 5.- Frey, Terry - 1975  
Strain of Escherichia coli with a temperature sensitive  
mutation affecting ribosomal ribonucleic acid accumulation.  
Journal of Bacteriology May. Vol. 121 no. 3 p. 923-932.
- 6.- Glaxo Laboratories  
Hipotermia y Longevidad  
Vol. 23 p. 3-5

- 7.- Jawetz, Ernest O 1958  
Review of Medical Microbiology  
3a. edición. Lange Medical Publications  
Los Altos, Calif. E.E.U.U. p. 180
- 8.- Kim, Thomas H. y Kubica, George - 1973  
Mycobacteria: 100% Viability of Suspensions stored at 70° C  
Applied Microbiology, June Vol. V no. 6 p. 956-960
- 9.- Kucers y Bennett - 1975  
The Use of Antibiotics  
2a. edición. Philadelphia, J.B. Lippincott Co. p. 292, 241, 394
- 10.- Merck - 1976  
Manual de Microbiología  
Merck E. Darmstadt ( Rep. Federal de Alemania )
- 11.- Merchant, I.A.  
Bacteriología y Virología Veterinaria  
2a. edición Editorial Española p. 156
- 12.- Meyers, Frederick H. - 1972  
Review of Medical Pharmacology  
3a. edición. Lange Medical Publications  
Los Altos, Calif. E.E.U.U. p. 487-488
- 13.- Ray, B. - 1971  
Effect of Rehydration on Recovery, Repair, and Growth of  
Injured Freeze-Dried Salmonella anatum.  
Applied Microbiology Aug. Vol. 22 no. 2 p. 184-189

- 14.- Ray, B. y Speck, M.L. - 1973  
Enumeration of *Escherichia coli* in Frozen Samples after  
Recovery from Injury.  
Applied Microbiology Vol. 24 no. 4 p. 499-503
- 15.- Schneider, Morris D. - 1968  
Survival Time and Retention of Antimalarian Resistance of  
Malarial Parasites in Repository in Liquid Nitrogen.  
Applied Microbiology Vol. 16 no. 9 p. 1422-1423
- 16.- Smith, Beard y Willett - 1967  
Microbiología de Zinsser  
3a. edición Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana, México
- 17.- Smithe, Kline y French Laboratorios  
Manual de Virginiamicina p. 7-8
- 18.- Smith, R. - 1973  
Method for Storing *Toxoplasma gondii* ( R.M. Strain ) in  
Liquid Nitrogen.  
Applied Microbiology Vol. 26 no. 6 p. 1011-1012
- 19.- Wellman, A.M. y Stewart, G.G. - 1973  
Storage of Brewing Yeasts by Liquid Nitrogen Refrigeration.  
Applied Microbiology. Oct. Vol. 26 no. 4 p. 577-583
- 20.- Whittingham, D.G. - 1972  
Survival of Mouse Embryos Frozen to - 196° C - 269° C  
Science. Oct. vol. 178 no. 4059 p. 411-414