

## UN METODO SENCILLO PARA PRESERVAR CEPAS DE HELICOBACTER Y CAMPYLOBACTER

Dagmar Utzinger\*, Patricia Rivera\*\* y Francisco Hemández\*

Key Words: *Helicobacter*, *Campylobacter*, preservación

### RESUMEN

Se evaluó un método para el almacenamiento de *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni* durante períodos largos. Las bacterias se resuspendieron en caldo nutritivo con 5 por ciento de dimetil sulfóxido y se pusieron en frascos plásticos, que se envolvieron en algodón y se guardaron en una caja termoaislante ("styrofoam") durante una semana a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Luego los frascos se extrajeron de la caja termoaislante y se dejaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 12 a 18 meses, haciendo subcultivos cada 4 a 6 meses. Todas las cepas han sobrevivido durante el período de estudio.

### INTRODUCCIÓN

Para el mantenimiento prolongado de bacterias, se recurre a la congelación a bajas temperaturas; práctica que se ha realizado desde 1900 (6). Las células congeladas mantienen su viabilidad si se guardan a bajas temperaturas, idealmente en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) o bien, en el caso de bacte-

rias,  $-70^{\circ}\text{C}$ . A temperaturas mayores, por ejemplo entre  $-10$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ , la viabilidad se mantiene por períodos máximos de dos meses (6), debido a recristalización del agua citoplasmática, lo que se conoce como calor de cristalización (5). No obstante, no todas las bacterias se comportan igual ante la congelación, encontrándose algunos grupos muy susceptibles, que representan verdaderos problemas de conservación.

Los dos principales obstáculos enfrentados en la congelación de células son la osmolaridad del medio y la cristalización del agua citoplasmática (6). En el primer caso, la osmolaridad del medio de la suspensión aumenta a medida que el agua cristaliza; sin embargo, si la tasa de enfriamiento es entre 10 y 20 grados por minuto, la célula puede adaptarse gracias a la pérdida de agua citoplasmática, con reducción del volumen y alteración en la permeabilidad de la membrana. Pero esa adaptación no se logra cuando la tasa de enfriamiento es de 50 grados por minuto o más (1). La cristalización intracitoplasmática provoca daño, que puede evaluarse por viabilidad o análisis ultraestructural (3, 8).

En contraposición a lo anterior, ambos problemas pueden evitarse si la congelación se realiza muy rápidamente, en el orden de milésimas de segundo y a temperaturas mínimas de  $-150^{\circ}\text{C}$ ;

\*Facultad de Microbiología, Departamento de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

\*\* Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Nacional de Niños, San José, Costa Rica.

Trabajo presentado en el VII Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica, Dic. 1989.

en este sentido, ni siquiera hay alteraciones ultraestructurales en la célula y se mantiene su viabilidad (4).

El uso de sustancias que evitan la cristalización del agua citoplasmática, conocidas como crioprotectores, aumentan la sobrevivencia de las células cuando se congelan. Entre los crioprotectores más comunes figuran las soluciones de sacarosa, dextran, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol, polivinil pirrolidona (7), o bien soluciones ricas en proteínas como leche, plasma, suero e incluso sangre hemolisada. En la preservación de bacterias rutinariamente se recurre a las suspensiones en líquidos ricos en proteínas; sin embargo, aún así se enfrentan problemas con *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni* debido a su alta susceptibilidad a la congelación (9). El objetivo de este informe es describir un método sencillo de criopreservación para estos dos agentes.

## MATERIAL Y METODOS

Se elevaron siete cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas de pollos y 12 cepas de *Helicobacter pylori*, aisladas de pacientes con patología gastroduodenal (2). Las bacterias fueron cultivadas en agar sangre (base de Tripticasa soya, BBL) e incubadas en microaerobiosis a 37 °C, recolectadas con una asa bacteriológica y resuspendidas en caldo nutritivo con 5 por ciento de DMSO.

De cada suspensión de bacterias se prepararon seis alícuotas de 1 ml y se depositaron en frascos de plástico (Wheaton<sup>®</sup>). Los frascos se envolvieron individualmente en algodón y se colocaron en una caja termoaislante ("styrofoam"), que fue guardada a -70 °C durante una semana, luego se desenvolvieron y se dejaron a -70 °C.

A los 6,8,10,12 y 18 meses se evaluó la sobrevivencia de las bacterias, inoculando uno de los frascos de cada cepa en un plato de agar sangre, e incubándoles a 37 °C bajo microaerobiosis.

Inicialmente la inoculación se hizo con asa bacteriológica, pero luego se cambió la metodología, inoculando las placas con unas cuantas gotas del inóculo colocadas con pipeta Pasteur. El objetivo del cambio fue aumentar la proporción de bacterias por plato. Las colonias obtenidas se identificaron mediante tinción de Gram y pruebas de oxidasa, catalasa, además de ureasa en el caso de *H. pylori*.

## RESULTADOS

Las cepas de *C. jejuni* y 6 de las cepas de *H. pylori* se recuperaron en cada período, incluyendo a los 18 meses. El resto de las cepas de *H. pylori* han cumplido 12 meses y su sobrevivencia ha sido del 100 por ciento. No obstante, 3 de esas cepas no crecieron a partir del frasco correspondiente a 10 meses, lo cual pudo deberse a una pobre inoculación de las placas de agar sangre, pues fueron inoculadas con asa bacteriológica; por lo que posteriormente se cambió al método de goteo.

## DISCUSION

El método de congelación lenta es utilizado en virología para el almacenamiento de células eucariotas. En nuestro caso, ese procedimiento resultó satisfactorio para la preservación de bacterias sensibles a la congelación, como *Campylobacter* y *Helicobacter*. El método es simple y no requiere de equipos o reactivos costosos, por lo que puede emplearse rutinariamente en laboratorios que tan solo cuenten con congeladores de -70 °C.

## AGRADECIMIENTO

Este estudio fue realizado gracias al apoyo de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. Adicionalmente, queremos expresar nuestro agradecimiento a la Dra. Florencia Antillón, de la Facultad de Microbiología, por suministrarnos las cepas de *Campylobacter jejuni* y a los doctores Manuel Sigarán, Jorge Miranda, Manuel Aguilar Ortiz y en general al personal del Servicio de Gastroscofia del Hospital México por su apoyo y colaboración.

## ABSTRACT

*An easy method for long term maintenance of Campylobacter jejuni and Helicobacter pylori strains was tested. Bacterial suspensions in nutritive broth with 5 percent dimetilsulfoxide were frozen in plastic vials, which were wrapped with cotton and kept in a styrofoam box at -70 °C. Seven days later the vials were taken from the box and kept in the freezer for 18 months. Every 4 to 6 months a vial from each strain was cultured. All the strains survived the test period.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Coulson, G.E., Morris, G.J. y Smith, D: A

cryomicroscopic study of *Penicillium expansum* hyphae during freezing and thawing. *J. Gen. Microbiol.* 1986; 132: 183-190.

2. Hernández, F., Rivera, P., Sigarán, M., Aguilar-Ortiz, M., Miranda, J., Rodríguez-Jenkins, O. y Murillo, M.: The first cases of *Helicobacter pylori* reported from Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 1990; en prensa.
3. Mazur, P.: The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology.* 1977; 14: 251-272.
4. Moor, H., Muhlethaler, K., Waldner, H. y FreyWyssling, A: A new freezing-ultramicrotome. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961; 10: 1-13.
5. Niedermeyer, W.: Freeze-etching. *Biologie in unserer zeit.* 1977; 6: 1-10.
6. Porter, J. R.: the effects of physical agents on bacteria. *Bacterial chemistry and physiology.* 5 ed. John Wiley and Son, USA. 1950; 144-223.
7. Smith, D.: Cryoprotectants and the cryopreservation of fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1983; 80; 360-364.
8. Smith, D., Coulsion, G. E. y Morris, G. J.: A comparative study of the morphology and viability of hyphae of *Penicillium expansum* and *Phytophthora nicotianae* during freezing and thawing. *J. Gen Microbiol.* 1986; 132: 2013-2021.
9. Westbolm, T.U., Barthel, J. S., Havey, A. D., González, F. E., Tarka, E. F. y Everett, E. Letter. *J. Clin. Pathol.* 1987; 40: 353.