

Artículo original

Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México

Javier Gutiérrez-Jiménez^{a,*}, Lorena Mercedes Luna-Cazárez^b, Mónica Ivonne Mendoza-Orozco^a, Gabriela de Jesús Díaz-Marina^a, Julio César Burguete-Gutiérrez^a, José Manuel Feliciano-Guzmán^c

^aLaboratorio de Biología Molecular y Genética, Instituto de Ciencias Biológicas. ^bLaboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas. ^cLaboratorio de Microbiología y Patología Clínica, Hospital de Especialidades Pediátricas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, México.

Recibido 29 de marzo de 2015; aceptado 22 de octubre de 2015

Resumen: Los ceparios o colecciones de microorganismos son fuentes de recursos genéticos cuyo propósito es la preservación de la diversidad biológica, garantizando su disponibilidad para actividades de docencia, investigación y comerciales. En este trabajo se verificó la viabilidad, pureza y características biológicas de las bacterias que conforman el cepario del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, y se organizó y estructuró la información obtenida en un portal virtual, para propiciar la cooperación académica. El cepario cuenta con 33 microorganismos, la mayoría del género *Streptococcus* y *Escherichia* (45,1 y 21,2%, respectivamente). Del primer género, se confirmó la identificación de *S. pyogenes* (40%), exhibiendo la mayoría genes que codifican para DNAsas. Con respecto al segundo género, un 58,3% de las bacterias fueron confirmadas taxonómicamente como *E. coli*. De esta especie, la colección cuenta con las cepas prototipo causantes de diarrea y que han preservado sus rasgos genéticos por más de cinco años. Dicho acervo ha impulsado actividades de docencia e investigación, a nivel local e internacional. Es importante que los ceparios sean fuentes sustentables de recursos biológicos, para la adquisición y suministro de especies bacterianas, con la finalidad de fomentar la interacción con la comunidad académica.

Palabras clave: organización, preservación, colección de cultivos bacterianos.

Organization, maintenance, and preservation of the Bacterial Culture Collection of the Biological Sciences Institute, University of Science and Arts of Chiapas (UNICACH), Mexico

Abstract: Strain collections or bacterial culture collections are genetic resources whose purpose is the preservation of biological diversity, ensuring their availability for teaching, research and trade activities. In this work viability, purity and biological characteristics of bacteria from the bacterial collection of the Institute of Biological Sciences, University of Science and Arts of Chiapas were studied. Information was structured and organized in a virtual site, to promote academic cooperation. The strain bank includes 33 microorganisms, most of the genus *Streptococcus* and *Escherichia* (45.1 and 21.2%, respectively). For *Streptococcus*, the identification of *S. pyogenes* (40%) was confirmed, by determination of most DNAses encoding genes. For *Escherichia* 58.3% were taxonomically confirmed as *E. coli*. For this species, the collection includes typical strains that produce diarrhea and their genetic traits have been preserved for more than five years. This bacterial culture collection has stimulated teaching and research activities at local and international levels. Strain collections are important sources of biological material which can provide bacterial species, in order to encourage interaction with the academic community.

Keywords: organization, preservation, bacterial culture collection.

* Correspondencia:
E-mail: javier.gutierrez@unicach.mx

Introducción

Las colecciones microbianas, que en este caso particular corresponde a bacterias, referidas también como “cepa-

rios”, son centros de recursos genéticos que preservan a los microorganismos, garantizando la disponibilidad de dicho material biológico para actividades de docencia, investigación científica y comerciales [1]. Las colecciones de mi-

croorganismos se desarrollaron a finales del siglo XIX, con el propósito de figurar como repositorios de los recursos biológicos para impulsar el desarrollo de las ciencias; la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) reconoce a este tipo de iniciativas como fuentes sustentables para acceder a dichas fuentes biológicas [2]. Además, en foros como la Convención sobre Diversidad Biológica, se ha reconocido que las colecciones microbianas deben preservar la diversidad biológica, facilitar el uso prolongado de sus componentes y distribuir equitativamente los beneficios obtenidos por usar dichos recursos. Sin embargo, estos centros son escasos y los pioneros se encuentran en Europa y Asia. Así, es deseable que aquellas instituciones que se dediquen a la investigación, promuevan el acopio y la preservación de los materiales biológicos [1,2].

Los ceparios son el sitio de depósito no solo de cepas de referencia, sino también de microorganismos aislados, caracterizados e identificados a partir de muestras de origen humano, obtenidas de investigaciones realizadas en diferentes periodos de tiempo, habilitando así su categoría como cepas de referencia. La preservación de los microorganismos de la colección debe garantizar su viabilidad en estado inactivo, puro y homogéneo, bajo condiciones que aseguren la estabilidad microscópica, macroscópica, bioquímica, fisiológica y genética, es decir, sin variaciones fenotípicas ni mutaciones con respecto a las condiciones originales [3,4].

Existen diversos métodos para la preservación microbiana. Los criterios a ser considerados para la selección del método son la viabilidad, pureza, costos del proceso, cantidad de cultivo y frecuencia de uso [5]. Según el periodo de tiempo, los métodos pueden ser de corto y largo plazo. Entre los primeros destacan el cultivo continuo, que consiste en realizar subcultivos periódicos a medios frescos. Esta operación de transferencia es imperativa, dado que al mantenerse las células activas, se van acumulando productos tóxicos del metabolismo, lo que causa envejecimiento y muerte celular. Además, en cada transferencia se incrementan: 1) la probabilidad de mutaciones, lo que ocasiona cambios fenotípicos y 2) la pérdida de la calidad axénica de estos cultivos, por el manejo sostenido. Otro inconveniente es el espacio requerido, ya que dependerá de la cantidad de cepas a preservar [6]. También están las técnicas de inmersión en aceite, el congelamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, la deshidratación (para bacterias formadoras de esporas y mohos) y la conservación en agua destilada. La conservación de microorganismos mediante ultracongelación y liofilización son métodos para preservación a largo plazo, también conocidos como métodos de elección. Con éstos se consigue interrumpir el crecimiento microbiano, pero manteniendo su viabilidad y estabilidad genética. Para conservar grupos de microorganismos no susceptibles de mantenerse con los métodos descritos anteriormente, están los métodos restringidos, basados en la eliminación del agua de las células, entre los que se pueden citar la desecación en papel filtro, en suelo, arena, sílicagel, en esferas de alginato o sal [1,6].

La Federación Mundial de Colecciones de Cultivo recomienda crear un duplicado de la colección de microorganismos y almacenarla en un lugar diferente, en caso de que dichas colecciones puedan perderse por exposición a riesgos como incendios, inundaciones, terremotos y guerras [7]. Aunado a ello, esta federación y la OCDE establecen que los microorganismos deben conservarse usando dos métodos, combinando algunos de los descritos anteriormente [2].

Dada la importancia de las colecciones microbianas, y su carácter sustentable para el fortalecimiento del quehacer científico en todos los ámbitos geográficos, el propósito de este trabajo fue verificar la viabilidad, pureza y características fenotípicas de cepas de la colección bacteriana de la UNICACH, así como corroborar el mantenimiento de genes de virulencia en algunas de ellas, organizarlas sistemáticamente y colocarlas en un portal virtual para su difusión entre la comunidad científica, con la finalidad de propiciar el intercambio.

Materiales y métodos

Características del cepario bacteriano de la UNICACH: El cepario del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH alberga actualmente 33 especies bacterianas (Tabla 1), agrupadas en ocho géneros y cinco familias (Streptococcaceae, Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae, Bacillaceae y Pseudomonaceae). La mayor parte de la colección está constituida por los géneros *Streptococcus* y *Escherichia* (45,5 y 21,2%, respectivamente), seguidos de *Staphylococcus* (9%), *Bacillus*, *Shigella* y *Salmonella* (6,1% por género), *Klebsiella* y *Pseudomonas* (3% por género). El cepario surgió en 1998, con el propósito de contar con microorganismos de referencia para las prácticas de docencia y el desarrollo de proyectos de investigación. Las cepas proceden de donaciones realizadas por instituciones mexicanas como la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN) y del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN. Otras cepas se adquirieron comercialmente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, American Type Culture Collection), o fueron aisladas de muestras clínicas procedentes del Hospital de Especialidades Pediátricas (HEP) de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. De 1998 al 2003 las cepas bacterianas se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caldo Luria Bertani (LB) y glicerol como agente crioprotector. A partir del 2004, el método de preservación usado fue la ultracongelación a $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$, usando glicerol o leche descremada como crioprotectores; los repiques se realizaron una vez al año. La reactivación de las cepas se hizo transfiriendo asépticamente 2-3 escarchas de hielo de los cultivos congelados en caldo LB e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 h; posteriormente, se sembraron mediante estría cruzada en medios enriquecidos y diferenciales/selectivos e incubaron a las condiciones mencionadas anteriormente.

Pruebas fenotípicas y genotípicas: La viabilidad y pureza

Tabla 1. Colección de cultivos bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH.

Fecha de ingreso	Acónimo	Nombre científico	Procedencia	Fuente de aislamiento	Aplicaciones
01/01/1998	CGEN001	<i>Staphylococcus aureus</i>	IPN	Piel	Evaluación de tinción de Gram, medios de cultivo, prueba de coagulasa, prueba de CAMP
01/01/1998	CGEN002	<i>Bacillus subtilis</i>	IPN	Polvo	Evaluación de la tinción de esporas, ensayos de degradación de almidón y gelatina
01/01/1998	CGEN003	<i>Bacillus megaterium</i>	IPN	Polvo	Evaluación de la tinción de esporas, ensayos de degradación de almidón y gelatina
01/01/1998	CGEN004	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	IPN	Piel	Evaluación de la tinción de Gram, medios de cultivo, prueba de coagulasa
01/01/1998	CGEN005	<i>Klebsiella oxytoca</i>	IPN	Aislado clínico	Evaluación de tinción de Gram, medios de cultivo
01/01/1998	CGEN006	<i>Shigella flexneri</i>	IPN	Heces	Evaluación de la tinción de Gram, medios de cultivo
01/01/2005	CGEN007	<i>Escherichia coli</i> HB101/pPic1	CINVESTAV	Clona recombinante	Cepa secretora de la proteína Pic
04/02/2005	CGEN008	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovar Typhi	ATCC (6539)	Heces	Evaluación de medios de cultivo, pruebas de sensibilidad a antibióticos, sistemas de identificación bioquímica
01/01/2005	CGEN009	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC) 042 (O44:H18)	CINVESTAV	Heces	Cepa control para la detección de genes AA Probe, <i>aggR</i> y <i>aap</i>
01/01/2005	CGEN010	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC) E2348/69 (O127:H6)	CINVESTAV	Heces	Cepa control para la detección de genes <i>bfpA</i> y <i>eaeA</i>
01/01/2008	CGEN011	<i>Escherichia coli</i> secretora de toxina Shiga (STEC) EDL933 O157:H7)	CINVESTAV	Heces	Cepa control para la detección de genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i>
01/01/2008	CGEN012	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC) E11 (O124 NM)	CINVESTAV	Heces	Cepa control para la detección del gen <i>ial</i>
01/01/2008	CGEN013	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC) H10407 (O78:H11)	CINVESTAV	Heces	Cepa control para la detección de los genes <i>st</i> y <i>lt</i>
01/01/2011	CGEN014	<i>Escherichia coli</i>	ATCC (25922)	Aislado clínico	Evaluación de medios de cultivo, pruebas de sensibilidad a antibióticos, sistemas de identificación bioquímica
01/01/2011	CGEN015	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC (25923)	Aislado clínico	Evaluación de tinción de Gram, medios de cultivo, prueba de coagulasa, prueba de CAMP
01/01/2011	CGEN016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (27853)	Hemocultivo	Evaluación de medios de cultivo, pruebas de sensibilidad a antibióticos
01/01/2013	CGEN017	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	IPN	Heces	Evaluación de medios de cultivo, pruebas de sensibilidad a antibióticos, sistemas de identificación bioquímica
10/06/2013	CGEN018	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Le Minor and Popof serovar Choleraesuis	ATCC (7001)	Heces	Evaluación de medios de cultivo, pruebas de sensibilidad a antibióticos, sistemas de identificación bioquímica
27/08/2013	CGEN019	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC (19615)	Faringe	Evaluación de medios de cultivo, antiserosos, prueba de sensibilidad a bacitracina
01/01/2014	CGEN020	<i>Streptococcus pyogenes</i> SP01	HEP	Aislado clínico	Investigación

01/01/2014	CGEN021	<i>Streptococcus pyogenes</i> SP02	HEP	Aislado clínico	Investigación
01/01/2014	CGEN022	<i>Streptococcus agalactiae</i> SP03	HEP	Aislado clínico	Investigación
01/01/2014	CGEN023	<i>Streptococcus pyogenes</i> SP04	HEP	Aislado clínico	Investigación
01/02/2014	CGEN024	<i>Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis</i> SP05	HEP	Aislado clínico	Investigación
01/02/2014	CGEN025	<i>Streptococcus pyogenes</i> SP06	HEP	Aislado clínico	Investigación
01/02/2014	CGEN026	<i>Streptococcus pyogenes</i> SP07	HEP	Aislado clínico	Investigación
01/02/2014	CGEN027	<i>Streptococcus agalactiae</i> SP08	HEP	Aislado clínico	Investigación
15/06/2014	CGEN028	<i>Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis</i> SP09	HEP	Aislado clínico	Investigación
15/08/2014	CGEN029	<i>Streptococcus constellatus ssp. pharyngis</i> SP10	HEP	Aislado clínico	Investigación
15/08/2014	CGEN030	<i>Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis</i> SP011	HEP	Aislado clínico	Investigación
15/09/2014	CGEN031	<i>Streptococcus agalactiae</i> SP12	HEP	Aislado clínico	Investigación
15/09/2014	CGEN032	<i>Streptococcus constellatus ssp. pharyngis</i> SP13	HEP	Aislado clínico	Investigación
15/09/2014	CGEN033	<i>Streptococcus agalactiae</i> SP14	HEP	Aislado clínico	Investigación

IPN: Instituto Politécnico Nacional; CINVESTAV: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN; ATCC: American Type of Culture Collection; HEP: Hospital de Especialidades Pediátricas de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

de las cepas se verificó mediante siembra por estría cruzada e incubación en aerobiosis a 37 °C, usando medios enriquecidos, selectivos y diferenciales como el agar nutritivo (Bioxon®), agar MacConkey (Bioxon®), agar de sal y manitol (Bioxon®), agar sangre de carnero (BBL®) y agar LB (Sigma®). Para los análisis microscópicos se emplearon la tinción de Gram y la tinción de esporas. Para confirmar la identificación taxonómica, se realizaron ensayos para la degradación de almidón, caseína y gelatina y la detección de las enzimas citocromo oxidasa, catalasa y coagulasa [8,9]; también se emplearon los equipos comerciales Api20E (bioMérieux®, Francia) y Vitek® 2 Compact (bioMérieux®, Francia). La identificación presuntiva de *S. pyogenes* se realizó con la prueba de sensibilidad a la bacitracina (0,04 U), en la que se colocó un disco de taxo A (BBL™) sobre el crecimiento bacteriano en agar sangre de carnero. Un halo de inhibición del crecimiento (de cualquier tamaño), al cabo de 18 h de incubación a 37 °C, indicó la susceptibilidad del microorganismo [8]. La serotipificación en grupos de Lancefield de las cepas de *Streptococcus* se realizó con el equipo comercial Pastorex™ Strep (Biorad®).

Con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex, se investigó la presencia de genes de virulencia que codifican DNAsas en las cepas clínicas de *Streptococcus pyogenes* recuperadas del HEP, conforme a lo reportado previamente [10]. Con la misma técnica molecular, se investigó la presencia de los genes de virulencia entre las variantes patógenas de *Escherichia coli*, en apego a las condiciones anteriormente reportadas [11,12], usando Taq DNA polimerasa (Invitrogen®) o GoTaq® Master Mix

(Promega®); todas las reacciones se ajustaron a un volumen final de 25 µL. El ADN de las cepas de *S. pyogenes*, se obtuvo usando un método basado en la extracción con fenol/cloroformo [13]; para las *E. coli* se obtuvo lisando las bacterias en un medio hipotónico y en baño María en ebullición [12]. Los cebadores empleados para los ensayos moleculares se muestran en la tabla 2. Se usó la escalera de 100 pares de bases (pb) como marcador de peso molecular (MPM) (Invitrogen®). La colección cuenta también con la cepa recombinante *E. coli* HB101/pPic1, clon secretor de la proteína Pic (proteína implicada en la colonización) de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) [14], que fue cultivada en medio LB con tetraciclina a 10 µg/mL. La secreción de esta proteína se corroboró mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% en condiciones desnaturizantes [15], usando un MPM de alto rango (New England Biolabs®, UK).

Conservación de microorganismos: La preservación de bacterias se realizó mediante siembra masiva en agar LB o agar sangre de carnero (BBL®), incubadas en aerobiosis a 37 °C durante 18 h. Posteriormente, todo el crecimiento bacteriano confluyente se cosechó en crioviales de 2 mL (Nalgene®) conteniendo 1,5 mL de caldo LB con glicerol al 10%; las cepas de *Streptococcus* se cosecharon en viales con caldo leche descremada (BD Difco®). No se determinaron las unidades formadoras de colonias para cada criovial. Finalmente, los crioviales se conservaron en un ultracongelador (Eppendorf® U410 Premium) a -80 °C.

Optimización de la organización del cepario: Los datos

Tabla 2. Iniciadores para amplificar factores de virulencia de *S. pyogenes* y *E. coli* [10-12].

Bacteria	Gen	Factor de virulencia	Iniciador (Directo) 3' – 5'	Iniciador (Reverso) 5' - 3'	Tamaño del producto (pb)
<i>S. pyogenes</i>	<i>spd3</i>	DNasa	ATCGTCGTA CTTGGCAAGGTT	GCCGCTTCTTCAAAC TCTTCG	784
	<i>sdc</i>	DNasa	AAGCTTAGAAACTCTCTCGCCA	AGTTCCAGTAATAGCGT TTTTCCGT	600
	<i>sdaB</i>	DNasa	TATAGCGCATGCCGCCTTTT	TGATGGCGCAAGCAAGTACC	440
	<i>sdaD</i>	DNasa	TTTACGCTGAATCGGGCACT	GGCTCTGGTTTGCTTTCCCA	295
	<i>aap</i>	Dispersina	CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG	AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC	310
EAEC	<i>aggR</i>	Activador transcripcional	CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA	AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG	457
	<i>AA Probe</i>	Marcador plasmídico	CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT	CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T	629
ETEC	<i>lt</i>	Toxina termolábil	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC	CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT	450
	<i>st</i>	Toxina termoestable	ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T	ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T	190
EPEC	<i>bfpA</i>	Pelo formador de penachos	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC	GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	324
	<i>eaeA</i>	Intimina	GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC	CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG	384
STEC	<i>stx1</i>	Toxina Shiga 1	CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G	AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	150
	<i>stx2</i>	Toxina Shiga 2	GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC	TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	255
EIEC	<i>ial</i>	Locus asociado a invasión	GGT ATG ATGATGATG AGT CCA	GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC	650

pb = pares de bases.

del cepario de la UNICACH se han mantenido en registros escritos o bitácoras, así como en archivos electrónicos en el programa Excel® de Microsoft Office®, registrando algunos de los campos señalados por el catálogo global de microorganismos [16], tales como: número de ingreso, acrónimo de identificación de la cepa, nombre científico (género y epíteto específico), procedencia de la cepa (persona o institución que la aisló), fecha de ingreso, fuente de aislamiento (sustrato o huésped de donde proviene la cepa), características biológicas, medios de cultivo usados para el aislamiento, medios de cultivo para la preservación y condiciones, existencia de duplicado, aplicaciones (dependiendo de sus características y propiedades) y literatura (publicaciones donde se describe el uso de la cepa). La documentación fotográfica de las placas de Petri con los cultivos se realizó con una cámara tipo réflex (Canon®); las imágenes microscópicas se documentaron con un microscopio vertical con cámara (Leica® y ZEISS®).

Disposición pública del cepario: La información obtenida de las 33 cepas, compilada en el archivo electrónico en Excel®, se dispuso en un blog titulado “Cepario UNICACH”, empleando la plataforma virtual WordPress (<https://es.wordpress.com/>), que admite la creación de estos sitios en línea, de forma gratuita y optimizados para buscadores virtuales como Google o Yahoo. La dirección electrónica de este cepario es: <https://cepariounicach.wordpress.com/>

[wordpress.com/](https://es.wordpress.com/)

Resultados y discusión

El propósito principal de una colección de microorganismos es el de preservar su viabilidad, además de sus rasgos bioquímicos, inmunológicos y genéticos [17]. Es pertinente también que la comunidad científica tenga acceso a dichas colecciones y obtenga los beneficios de usar estos recursos biológicos [2]. Con estos objetivos, surgió el cepario o colección de bacterias del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH, entidad educativa y de investigación en el sureste mexicano.

Del género *Streptococcus*, mayoritario en la colección, se confirmó la identificación de *S. pyogenes* en el 40% de las cepas, seguido de *S. agalactiae* (26,7%), *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* (20%) y *S. constellatus* ssp. *pharyngis* (13,3%). Todas las cepas de *S. pyogenes* fueron sensibles a la bacitracina y se agruparon dentro del grupo A de Lancefield. Esta especie se caracteriza por tener en su pared celular el antígeno del grupo A de Lancefield [18]; sin embargo otras, como *S. dysgalactiae* o *S. anginosus* también pueden exhibirlo. Los ensayos preliminares con las cepas de *S. pyogenes* mostraron la presencia de genes que codifican para las DNAsas *sdaB* y *sdaD* (Figura 1A). Matsumoto *et al* reportaron que la proteína *sdaB* tiene un papel importante en la proliferación de *S. pyogenes* en tejidos de los pacientes

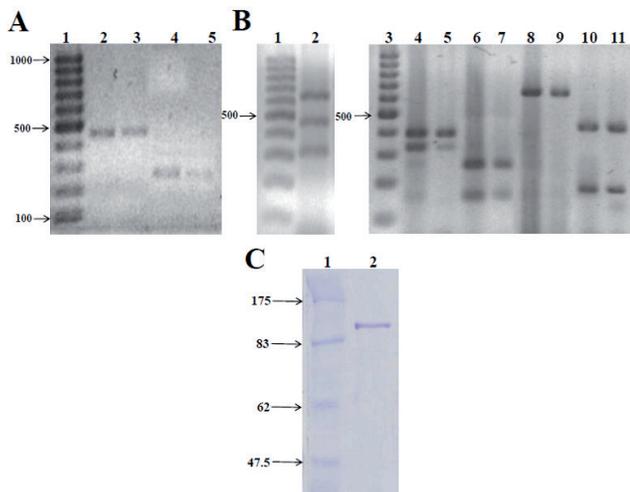


Figura 1. Genes de virulencia expresados por *S. pyogenes* y *E. coli* causantes de diarrea. (A) Carril 1: MPM; Carriles 2-3: gen *sdaB* (440 pb) en las cepas de *S. pyogenes* SP01 y SP02; Carriles 4-5: gen *sdaD* (295 pb) en las cepas *S. pyogenes* SP06 y SP07. (B) Carriles 1 y 3: MPM; Carril 2: genes *AA Probe*, *aggR* y *aap* (629, 457 y 310 pb, respectivamente) de EAEC; Carriles 4-5: genes *eaeA* y *bfpA* de EPEC (384 y 324 pb, respectivamente); Carriles 6-7: genes *stx2* y *stx1* de STEC (255 y 150 pb, respectivamente); Carriles 8-9: gen *ial* de EIEC (650 pb); Carriles 10-11: genes *lt* y *st* de ETEC (450 y 190 pb, respectivamente). (C) Carril 1: MPM; Carril 2: proteína Pic recombinante (109 kDa). Los amplicones mostrados en los carriles 4, 6, 8 y 10 de la figura 2B se obtuvieron con GoTaq® Green Master Mix (Promega®); los demás se amplificaron con Taq ADN polimerasa (Invitrogen®).

afectados [19]. Otros grupos de Lancefield determinados fueron el B y el G (26,7 y 20%, respectivamente). Una cepa de *S. constellatus* no fue agrupable con los antisueros del esquema de Lancefield. De manera preliminar, los análisis moleculares revelaron que, la mayoría de *S. pyogenes* (80%) recuperados de muestras clínicas, exhibieron los genes *sdaB* o *sdaD* que codifican DNAsas (Figura 1A). En relación a la cepa de *S. constellatus* no agrupable reportada en esta colección, algunos autores señalaron en esta especie heterogeneidad serológica y hemolítica, pudiendo encontrar cepas carentes de antígenos detectados con el esquema de Lancefield, o bien con hemólisis alfa o gamma [20].

Todas estas especies se han conservado viables a -80°C en leche descremada al 10%. Aunque es corto el tiempo para evaluar la efectividad de este método, se ha reportado como el de elección para conservar esta bacteria, además de otras como *Campylobacter jejuni*, *Borrelia burgdorferi*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *P. aeruginosa* y *E. coli* [21]. Es importante hacer notar que un duplicado de las cepas de *Streptococcus* descritas aquí, se mantienen conservadas también bajo ultracongelación en el Hospital de Especialidades Pediátricas de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, para evitar la pérdida de estos acervos [2]. Otras alternativas de conservación a largo plazo para *S. pyogenes* son la ultracongelación en medio Todd-Hewitt enriquecido con extracto de levadura (0,2%) y glicerol como crioprotector (20%) [22] o usando partículas de arena recubiertas de *S. pyogenes* en caldo Todd-Hewitt enriquecido con sangre de carnero [23].

En cuanto a los géneros de la familia Enterobacteriaceae,

la mayoría se confirmó taxonómicamente como *E. coli* (58,3%), seguido de las especies *S. enterica* subespecie *enterica* serovar Typhi, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis, *S. flexneri* y *S. sonnei*. Todos los miembros del género *Escherichia* fermentaron la lactosa en el agar MacConkey. La colección cuenta con las cepas prototipo de *E. coli* causantes de diarrea: *E. coli* enteroagregativa (EAEC) 042 (O44:H18), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) E11 (O124:NM), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) H10407 (O78:H11), *E. coli* enteropatógena (EPEC) E2348/69 (O127:H6) y *E. coli* secretora de toxina Shiga (STEC) EDL933 (O157:H7), todas con más de cinco años de viabilidad y con sus genes distintivos preservados (Figura 1B). El clon recombinante de *E. coli* HB101/pPic1 exhibió la secreción de la proteína Pic (Figura 1C).

Los miembros del género *Escherichia* de esta colección se han preservado desde el 2005 a largo plazo también con el método de ultracongelación, manteniendo sus características genotípicas (Figura 1B). Adicionalmente, se ha reportado la utilidad del medio de huevo de Dorset a 4°C y la ultracongelación en caldo soya tripticasa caseína con glicerol al 20%, para preservar la variante patógena ETEC, sin pérdida de la secreción de la toxina termolábil [24]. Por ejemplo, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, Bogotá, Colombia, se han preservado enterobacterias mediante las técnicas de papel filtro y criopreservación a -70°C [3]. Una alternativa de conservación reportada para *Shigella* spp. es la técnica de secado en perlas de vidrio, con la que se pudo mantener viable por cuatro años [25]. Otros investigadores reportaron la utilidad de un método de bajo costo como el método de siembra en agua estéril o en regulador salino de fosfatos, que pudo mantener viables enterobacterias hasta por 16 años [26]. Con el método de conservación usado al comenzar el cepario de la UNICACH (congelación a -20°C), la mayor parte de las cepas bacterianas se han preservado sin alteraciones fenotípicas; sin embargo, algunas de ellas no se mantuvieron viables o se contaminaron. Por ello, se adoptó el método de ultracongelación a -80°C , dado que es una de las técnicas óptimas para garantizar la estabilidad genética, la viabilidad y pureza de las cepas [6]. Por esta razón los miembros de la familia Enterobacteriaceae tienen una elevada representación en otras colecciones microbianas, probablemente debido a su versatilidad metabólica [1].

A la fecha, el acervo biológico del cepario de la UNICACH ha posibilitado la publicación de materiales didácticos y de investigación, por ejemplo, usando las cepas prototipos de *E. coli* causantes de diarrea como organismos control [27-29]. Las bacterias resguardadas en este cepario, se han ajustado a los lineamientos e información que deben figurar para cada microorganismo depositado en estos centros de recursos biológicos [2]. Aunado a ello, la información de dichas cepas se difunde y comparte con la comunidad académica a través de un blog, sitios basados en la Web que posibilitan la publicación gratuita y rápida en línea [30,31]. Esta herramienta virtual de difusión, ha posibilitado la cooperación con otros colegas locales y recientemente

te, con un profesor de un centro de investigación francés, a quien se enviaron cepas prototipo de *E. coli* causantes de diarrea, usando el método de desecación en papel filtro. De manera similar, la Universidad de Antioquía de Colombia, dispone información mediante un blog, sobre un cepario de bacterias ácido lácticas (<https://lineabiotecnologiatpmedellin.wordpress.com/cepario-de-bacterias-lacticas-bioali/>).

Independientemente de las técnicas usadas de preservación, debe realizarse un control de calidad que incluya la evaluación de la viabilidad, la pureza y las propiedades bioquímicas y moleculares de las cepas; estas evaluaciones deben realizarse al recibir un nuevo microorganismo, después de la conservación del primer lote de muestras, así como después de cada evento de conservación subsecuente [2]. La custodia de los microorganismos en un cepario, contribuye no sólo a mantener un banco de células microbianas de apoyo a las tareas de docencia e investigación, tanto en instituciones educativas como de salud pública, sino también a que estas colecciones representen una fuente de suministro de cultivos, adquisición de nuevas especies e interacción con otros investigadores, como son los propósitos del cepario de la UNICACH.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Químico Bacteriólogo Parasitólogo (QBP) Everardo Escamilla Avilés (†) de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, por las cepas proporcionadas. Asimismo, a la Dra. María Teresa Estrada-García y al Dr. Fernando Navarro-García del CINVESTAV, por la provisión de las cepas prototipo de *E. coli* causantes de diarrea y el clon recombinante de *E. coli*. Se reconoce también la participación entusiasta de los biólogos Alejandra Vicente Serrano, Hugo Arturo Moreno Rivero, Mirna Cecilia Escobar Álvarez, Janner Alexis Pérez Gallegos y Carolina Cruz Cruz. El financiamiento de este trabajo contó con los apoyos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), en el marco del proyecto “Apoyo al fortalecimiento y desarrollo de la infraestructura científica y tecnológica 2014 (fondo 000000000226293)”, así como de la dirección de Investigación y Posgrado y el Departamento de Extensión Universitaria de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Referencias

- Murray PR, Baron E, Tenover JC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington, DC, USA: ASM Press; 2003.
- Janssens D, Arahal DR, Bizet C, Garay E. The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research. *Res Microbiol*. 2010; 161:422-9.
- Huertas SLP, Casas MMP, Morales MB, Moreno ZS, Castaño DM. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *Nova*. 2006; 4:39-49.
- Tedeschi R, De Paoli P. Collection and preservation of frozen microorganisms. *Methods Mol Biol*. 2011; 675:313-26.
- Meza RA, Monroy AF, Mercado M, Poutou RA, Rodríguez P, Pedroza AM. Study of the stability in real time of cryopreserved strain banks. *Universitas Scientiarum*. 2004; 9:35-42.
- García López MD, Uruburu Fernández F. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*. 2000; 30:12-6.
- Stevenson RE, Jong SC. Application of good laboratory practice (GLP) to culture collections of microbial and cell cultures. *World J Microbiol Biotechnol*. 1992; 8:229-35.
- Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenkenberger PC, et al. *Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color*. 6ta ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2008.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic microbiology*. 11th ed. USA: Mosby; 2002.
- Borek AL, Obszańska K, Hryniewicz W, Sitkiewicz I. Detection of *Streptococcus pyogenes* virulence factors by multiplex PCR. *Virulence*. 2012; 3:529-33.
- Cerna JF, Nataro JP, Estrada-García T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:2138-40.
- López-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, et al. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9:127-31.
- Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol Lett*. 2006; 28:55-9.
- Henderson IR, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1999; 67:5587-96.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-5.
- Wu L, Sun Q, Sugawara H, Yang S, Zhou Y, McCluskey K, et al. Global catalogue of microorganisms (GCM): a comprehensive database and information retrieval, analysis, and visualization system for microbial resources. *BMC Genomics*. 2013; 14:1-10.
- Swift HF. A simple method for preserving bacterial cultures by freezing and drying. *J Bacteriol*. 1937; 33:411-21.
- Wong SSY, Yuen K-Y. *Streptococcus pyogenes* and re-emergence of scarlet fever as a public health problem. *Emerg Microbes Infect*. 2012; 1:e2. DOI:10.1038/

- emi.2012.9
19. Matsumoto M, Sakae K, Hashikawa S, Torii K, Hasegawa T, Horii T, *et al.* Close correlation of streptococcal DNase B (*sdaB*) alleles with *emm* genotypes in *Streptococcus pyogenes*. *Microbiol Immunol.* 2005; 49:925-9.
 20. Whiley RA, Fraser H, Hardie JM, Beighton D. Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* strains within the "Streptococcus milleri group". *J Clin Microbiol.* 1990; 28:1497-501.
 21. Cody WL, Wilson JW, Hendrixson DR, McIver KS, Hagman KE, Ott CM, *et al.* Skim milk enhances the preservation of thawed -80 °C bacterial stocks. *J Microbiol Methods.* 2008; 75:135-8.
 22. Gera K, McIver KS. Laboratory growth and maintenance of *Streptococcus pyogenes* (the Group A *Streptococcus*, GAS). *Curr Protoc Microbiol.* 2013; 30:1-14.
 23. Brahmadathan KN, Pandian R, Koshi G. Long-term preservation of streptococci. *Indian J Med Res.* 1995; 101:64-5.
 24. Yoh M, Narita I, Honda T, Miwatani T, Nishibuchi M. Comparison of preservation methods for enterotoxigenic *Escherichia coli* producing heat-labile enterotoxin. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:2326-8.
 25. Weng Alemán Z, Echevarría Aguinar Z, Maldonado Cantillo G, Álvarez Molina I, Rodríguez Menéndez M. Recobrado de *Shigella* spp. conservada por la técnica de secado en perlas de vidrio. *Rev Cub Hig Epidemiol.* 2013; 51:40-51.
 26. Liao CH, Shollenberger LM. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Lett Appl Microbiol.* 2003; 37:45-50.
 27. Gutiérrez-Jimenez J, Cassassuce F, Martínez-de la Cruz L, De Aquino-Lopez JA, Hernández-Shilon JA. Evaluation of a point-of use water purification system (Llaveoz) in a rural setting of Chiapas, Mexico. *J Microbiol Exp.* 2014; 1:00015. En: <http://medcraveonline.com/JMEN/JMEN-01-00015.pdf>. Acceso 6 de marzo 2015.
 28. Hernández-Tondopó CG. Actividad antibacteriana y grupos de metabolitos secundarios de *Parmentiera edulis* DC. (Bignoniaceae). Tesis de licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; 2014.
 29. Gutiérrez-Jiménez J, Schlie-Guzmán MA, Montejó-Alvarado EA, Cruz-Reyes A, Martínez-de la Cruz L, Herrera-Ovando MG. Diagnostic methods for the enteroaggregative *Escherichia coli* infection. Washington, DC, USA: American Society for Microbiology; 2012. En: www.microbelibrary.org. Acceso 6 de marzo 2015.
 30. Racaniello VR. Social media and microbiology education. *PLoS Pathog.* 2010; 6:1-3. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001095.
 31. Grajales III FJ, Sheps S, Ho K, Novak-Lauscher H, Eysenbach G. Social media: a review and tutorial of applications in medicine and health care. *J Med Internet Res.* 2014; 16:e13. DOI: 10.2196/jmir.2912.