



**UTPL**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD MAESTRÍA**

**EN ANÁLISIS BIOLÓGICO Y DIAGNOSTICO DE**

**LABORATORIO**

**Crioconservación y transporte de enterobacteriales  
productoras de betalactamasas de espectro extendido y  
carbapenemasas**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

**MAGISTER EN ANÁLISIS BIOLÓGICO Y DIAGNOSTICO**

**DE LABORATORIO**

**Autor:** Guillermo Quinde, Juan Israel

**Director:** Simaluiza Masabanda, Rosa Janneth

LOJA

2024



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2024

## **Aprobación del director del Trabajo de Titulación**

Loja, 08 de marzo de 2024

Magíster

Eliana Baculima Peña

**Director de la maestría en Análisis Biológico y Diagnostico de Laboratorio**

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Titulación denominado: Crioconservación y transporte de enterobacteriales productoras de betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas realizado por Juan Israel Guillermo Quinde ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Mgr. Rosa Janneth Simaluiza M.

**Director del Trabajo de Titulación.**

C.I.: 1900068915

Correo electrónico: [rjsimaluiza1@utpl.edu.ec](mailto:rjsimaluiza1@utpl.edu.ec)

### Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, BQF Juan Israel Guillermo Quinde, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor del Trabajo de Titulación denominado: **Crioconservación y transporte de Enterobacteriales productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido y Carbapenemasas**, de la maestría de Análisis Biológico y Diagnóstico de laboratorio, específicamente de los contenidos comprendidos en: (Resumen, Introducción, Capítulo 1. Marco Teórico, Capítulo 2. Metodología, Capítulo 3. Resultados y Discusión, Conclusiones, Recomendaciones, Referencia, siendo la Mgtr. Rosa Janneth Simaluiza M. director (a) del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Autor: Juan Israel Guillermo Quinde

C.I.: 0105469407

Correo electrónico: [jiguillermo@utpl.edu.ec](mailto:jiguillermo@utpl.edu.ec)

### **Dedicatoria**

A Dios, por darme la oportunidad y las fuerzas para seguir adelante.

A mis hijos, Santiago y Samantha por ser mi vida y mi cielo, por ser la razón para no rendirme.

A mis padres y hermanos por ser mi soporte y mi apoyo en cada etapa de mi vida.

## **Agradecimiento**

Agradezco a Dios, porque sin él no somos nada, porque sin él no hay conocimiento y por él encontramos una luz en los momentos más desafiantes de nuestras vidas.

A mis hijos, mis padres y hermanos, porque en ellos encontré cobijo y la fuerza que me impulsan a seguir adelante y que no hay barrera que no pueda superar si ellos están a mi lado.

A la Mgtr. Janneth por darme la oportunidad de formar parte de este gran equipo.

A mis amigos que supieron estar a mi lado y brindarme una mano cuando lo necesitaba.

Y a Christian Jumbo por formar un gran equipo de trabajo y por el apoyo prestado.

## Índice de contenido

|  |            |
|--|------------|
| <b>Aprobación del director del Trabajo de Titulación .....</b>         | <b>II</b>  |
| <b>Declaración de autoría y cesión de derechos.....</b>                | <b>III</b> |
| <b>Dedicatoria .....</b>   | <b>IV</b>  |
| <b>Agradecimiento.....</b>   | <b>V</b>   |
| <b>Resumen.....</b>  | <b>1</b>   |
| <b>Abstract .....</b>  | <b>2</b>   |
| <b>Introducción .....</b>  | <b>3</b>   |
| <b>Capítulo uno.....</b>   | <b>5</b>   |
| <b>Marco teórico .....</b>   | <b>5</b>   |
| <b>1.1. Microbiota intestinal.....</b>                                 | <b>5</b>   |
| <b>1.2. Métodos de conservación bacteriana .....</b>                   | <b>5</b>   |
| <b>1.3. Crioconservación .....</b>                                     | <b>6</b>   |
| <b>1.4. Almacenamiento y transporte de muestras biológicas. ....</b>   | <b>9</b>   |
| <b>Capítulo dos .....</b>  | <b>14</b>  |
| <b>Metodología.....</b>  | <b>14</b>  |
| <b>2.1. Objetivo General.....</b>                                      | <b>14</b>  |
| <b>2.1.1. Objetivos específicos.....</b>                               | <b>14</b>  |
| <b>2.2. Tipo de investigación .....</b>                                | <b>14</b>  |
| <b>2.2.1. <i>Diseño de investigación</i>.....</b>                      | <b>14</b>  |
| <b>2.3. Material biológico .....</b>                                   | <b>15</b>  |
| <b>2.4. Tiempo de evaluación .....</b>                                 | <b>15</b>  |
| <b>2.5. Congelación y descongelación de las cepas bacterianas.....</b> | <b>15</b>  |
| <b>2.6. Procedimiento.....</b>   | <b>16</b>  |

|  |  |    |
|--|--|----|
| 2.7.   | Determinación de producción de EBLEE y EPC .....             | 17 |
| 2.8.   | Diagrama del proceso .....                                   | 18 |
| Capítulo tres .....  |  | 19 |
| Resultados .....   |  | 19 |
| 3.1.   | Cepas productoras de EBLEE .....                             | 19 |
| 3.2.   | Resultados obtenidos para las cepas productoras de EPC ..... | 26 |
| Capítulo cuatro.....   |  | 30 |
| Discusión.....   |  | 30 |
| Conclusiones .....   |  | 33 |
| Recomendaciones .....  |  | 34 |
| Referencias .....  |  | 35 |
| Apéndice.....  |  | 39 |
| Apéndice A. Normativas de referencia para la importación y exportación de cepas bacterianas..... |  | 39 |
| Apéndice B. Protocolo de crioconservación .....  |  | 40 |
| 1.   | Recuperación de los microorganismos.....                     | 40 |
| 2.   | Control de identidad y pureza.....                           | 41 |
| 3.   | Crioconservación .....                                       | 41 |
| 4.   | Evaluación de las Muestra Post- Conservación.....            | 42 |
| 4.1.   | Descongelación y reactivación de cepas .....                 | 42 |
| 4.2.   | Control de pureza .....                                      | 42 |
| 4.3.   | Recuperación.....  | 42 |
| 4.4.   | Determinación del porcentaje de viabilidad .....             | 43 |

## Índice de Figuras

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1. Tipo de contenedor para muestras .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>Figura 2. Esquema del protocolo de crioconservación. ....</b>  | <b>18</b> |
| <b>Figura 3. Crecimiento bacteriano de Serratia liquefaciens. A. Medio de cultivo cromoagar. B. Medio de cultivo selectivo EMB. C. Tinción de Gram .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>Figura 4. Crecimiento bacteriano de Klebsiella oxytoca. A. Medio de cultivo cromoagar. B. Medio de cultivo selectivo EMB. C. Tinción de Gram.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>Figura 5. Klebsiella pneumoniae después de 23 días de crioconservación. A. Medio de cultivo cromoagar. B. Medio de cultivo selectivo EMB. C. Medio de cultivo Mueller Hilton .....</b>   | <b>20</b> |
| <b>Figura 6. Gráfico de la concentración inicial de las cepas bacterianas productoras EBLEE. ....</b>   | <b>22</b> |
| <b>Figura 7. Gráfico de la concentración intermedia de las cepas bacterianas productoras EBLEE.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>Figura 8. Gráfico de la concentración final de las cepas bacterianas productoras EBLEE. ....</b>   | <b>23</b> |
| <b>Figura 9. Diámetros en mm de los halos de ceftazidima 30ug producidos por EBLEE: A: Serratia liquefaciens; B: Proteus vulgaris; C: Klebsiella pneumoniae; D: Escherichia coli; E: Klebsiella ozaenae; F: Klebsiella oxytoca; G: Serratia odorífera; H: Escherichia coli inactiva; I: Citrobacter freundii; J: Enterococcus cloacae .....</b> | <b>24</b> |
| <b>Figura 10. Crecimiento bacteriano de Klebsiella oxytoca. A. Cultivo bacteriano al inicio del proyecto. B. Crecimiento bacteriano al finalizar el proyecto .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>Figura 11. Crecimiento bacteriano de Proteus vulgaris. A. Cultivo bacteriano al inicio del proyecto. B. Crecimiento bacteriano al finalizar el proyecto .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>Figura 12. Crecimiento bacteriano de Citrobacter freundii. A. Cultivo bacteriano al inicio del proyecto. B. Crecimiento bacteriano al finalizar el proyecto .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>Figura 13. Cultivo contaminado de Escherichia coli y Serratia liquefaciens.....</b>  | <b>27</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 14. Cultivo bacteriano: A: Escherichia colí - B: Serratia liquefaciens .....</b>                             | <b>27</b> |
| <b>Figura 15. Gráfico general de Unidad Formadora de colonias - UFC de las cepas bacterianas productoras EPC .....</b> | <b>28</b> |
| <b>Figura 16. Diámetros en mm de los halos de meropenem 10ug producidos por bacterias productoras de EPC.....</b>      | <b>29</b> |
| <b>Figura 17. Dimensiones del halo de Serratia liquefaciens frente al disco de meropenem 10 ug. ....</b>               | <b>29</b> |

### Índice de Tablas

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabla 1 Criterios de aceptación de muestras bacterianas .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>Tabla 2 Cepas EBLEE y EPC empleadas en el estudio. ....</b>  | <b>15</b> |
| <b>Tabla 3 Puntos de control para el halo de inhibición del antibiótico ceftazidima .....</b>                       | <b>17</b> |
| <b>Tabla 4 Puntos de control para el halo de inhibición del antibiótico meropenem .....</b>                         | <b>18</b> |
| <b>Tabla 5 Porcentaje de vitalidad de las cepas bacterianas productoras EBLEE .....</b>                             | <b>21</b> |
| <b>Tabla 6 Diámetros en mm de los halos de ceftazidima 30ug producidos por bacterias productoras de EBLEE .....</b> | <b>24</b> |
| <b>Tabla 7 Porcentaje de vitalidad de las cepas bacterianas productoras EPC.....</b>                                | <b>28</b> |
| <b>Tabla 8 Diámetros en mm de los halos de meropenem 10ug producidos por bacterias productoras de EPC.....</b>      | <b>29</b> |

## Resumen

La microbiota intestinal se encuentra constituida por microorganismos que desempeñan funciones importantes en el cuerpo humano, por lo tanto, una alteración en su composición (variabilidad morfológica, fisiológica, genética, etc.) conllevan a estados alterados de la salud, tal es el caso de las Enterobacterales que por el uso inadecuado de los antibióticos han logrado desarrollar la producción de betalactamasas de espectro extendido (EBLEE) y carbapenemasas (EPC), donde la crioconservación se convierte en una herramienta importante para estudiar a estas bacterias, sin embargo, las bacterias pierden la capacidad de producir estas enzimas en almacenamientos prolongados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por tal motivo, se pretende estandarizar protocolos de crioconservación y transporte que permitan mantener a las EBLEE y EPC activas, para lo cual se utilizaron cultivos crio conservados de bacterias identificadas y confirmadas con EBLEE y EPC, las cuales se sometieron a estrés con dosis de antibióticos empleados en la confirmación de la producción de dichas enzimas, se ultracongelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , realizando controles periódicos. Observándose que las Enterobacterales mejoraron la producción de las enzimas EBLEE y EPC, sin embargo, la vitalidad de las bacterias fue baja debido a múltiples factores.

*Palabras clave:* Crioconservación, Enterobacterales, Betalactamasas de Espectro Extendido

### Abstract

*The gut microbiota is made up of microorganisms that perform important functions in the human organism, so that an alteration in their composition (morphological, physiological, genetic variability, etc.) leads to altered health conditions. Such is the case of Enterobacteriaceae that due to the inappropriate use of antibiotics have developed the production of extended spectrum beta-lactamases (EBLEE) and carbapenemases (EPC), where cryopreservation becomes an important tool for the study of these bacteria, however, bacteria lose the ability to produce these enzymes in prolonged storage at -80 °C. For this reason, it is intended to standardize cryopreservation and transport protocols that allow maintaining active EBLEE and EPC, for which cryopreserved cultures of bacteria identified and confirmed with EBLEE and EPC were used, which were subjected to stress with doses of antibiotics used in the confirmation of the production of these enzymes, were ultrafrozen at -80 °C, performing periodic controls. It was observed that Enterobacteriaceae enhanced the production of EBLEE and EPC enzymes, however, the vitality of the bacteria was low due to multiple factors.*

Keywords: Cryopreservation, Enterobacterales, Extended Spectrum Beta-lactamases

## Introducción

El estudio de la microbiota del tracto gastrointestinal es de suma importancia, considerando que es un mecanismo de defensa contra invasores externos, la microbiota intestinal del colon tiene una amplia heterogeneidad de microorganismos, tales como bacterias, virus, hongos (Wu et al., 2023), siendo este el resultado de la coevolución con los seres humanos.

El presente estudio se centrará en el grupo de Enterobacterales que forman parte de la microbiota intestinal, debido a que, en la actualidad, la microbiota bacteriana ha sufrido cambios significativos por factores como urbanización, procesos de industrialización, alimentación, estrés diario, uso de antibióticos, entre otros. Siendo el uso indiscriminado de los antibióticos uno de los factores más importantes que ha afectado a la población bacteriana intestinal, disminuyendo su diversidad, y alterando la estructura genética con el desarrollo de plásmidos de resistencia a los antibióticos (Smirnova et al., 2019; Wu et al., 2023).

La investigación de la microbiota bacteriana del colon, permite comprender su papel en la salud y las enfermedades humanas, además del impacto en la homeostasis del cuerpo humano (Smirnova et al., 2019a; Wu et al., 2023). Sin embargo, el número de estudios en esta área es limitado, afectando significativamente a la caracterización de la microbiota bacteriana y más aún, poder diferenciar cuando la microbiota intestinal se vuelve un riesgo para la salud de las personas.

La criopreservación de bacterias se convierte en una estrategia interesante para conservar y estudiar microorganismos, sin embargo, la alta heterogeneidad de la microbiota bacteriana, su variabilidad morfológica y fisiológica afectan la eficacia para preservar la diversidad y la funcionalidad de las comunidades microbianas (Grimalt-Alemany et al., 2020; Smirnova et al., 2019).

Las técnicas de criopreservación se fundamentan en la congelación ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) o congelación ultra baja ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), este proceso conlleva a la congelación del agua produciendo

cristales de hielo que perforan o separan las células, lesionando las células por acción mecánica, o que el daño sea por los cambios en la composición de la fase líquida. Para lo cual se adicionan los crioprotectores como el glicerol, el sulfóxido de dimetilo, el etanodiol y el propanodiol, cuya función es aumentar la concentración de los solutos, reducir la cantidad de hielo formado y que sean aceptables poder atravesar las células y poseer baja toxicidad (Chief et al., 2002).

Esta forma de conservar células permite almacenarlas para posteriores análisis, que estos sean precisos, significativos y clínicamente relevantes. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es estandarizar un protocolo de Crioconservación y transporte de **Enterobacteriales productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (EBLEE) y Carbapenemasas (EPC)** con el propósito de favorecer posteriores estudios de estas bacterias a nivel de laboratorio, ya que comprenden la fase preanalítica y el comienzo de la fase analítica de diversos estudios de investigación.

## Capítulo uno

### Marco teórico

#### 1.1. Microbiota intestinal

La microbiota del tracto gastro intestinal humana está conformada por un complejo ecosistema de microorganismos (bacterias, virus, hongos, u otras especies no catalogadas) que contribuyen a la fisiología humana tales como la fermentación alimentaria en compuestos absorbibles, eliminando toxinas, barrera biológica frente a patógenos externos, fortalecimiento del sistema inmunitario entre otros. (Heintz-Buschart y Wilmes, 2018). Las bacterias presentan una mayor variedad, por lo tanto, un estudio fenotípico de las especies bacterianas pueden ayudar en el desarrollo de fármacos (Brody, 2020). Se han identificado diez grupos bacterianos comunes en el tracto gastro intestinal entre ellos tenemos: “probióticos (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*), patógenos oportunistas (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Bacteroides* y *Atopobium*) y bacterias simbióticas (*Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*), *Clostridium butyricum* (*C. butyricum*), *Clostridium leptum* (*C. leptum*) y *Eubacterium rectale* (*E. rectale*)” (Wu et al., 2023b).

Desde el punto de vista científico se considera dos directrices para el estudio de la microbiota intestinal: 1) Desarrollo de métodos precisos y eficaces para la identificación de la comunidad microbiana y análisis funcional y 2) estudio correlacionales entre el equilibrio de la microbiota intestinal y las enfermedades humanas. En la actualidad el estilo de vida ha provocado una amplia diversidad en la microbiota intestinal debido a una respuesta de factores medioambientales, alimentarios, urbanización, industrialización, irradiación o uso de antibióticos, estrés, etc. Pudiendo provocar cambios en el tipo y funcionabilidad bacteriana (Smirnova et al., 2019).

#### 1.2. Métodos de conservación bacteriana

La crioconservación es un método de almacenar a microorganismos a bajas temperaturas, donde cualquier actividad enzimática o química que pudiera causar daño a los microorganismos es detenida de manera eficaz.

La preservación de las cepas bacterianas patógenas, oportunistas y simbióticas son de gran importancia para la investigación en el área de microbiología, el seleccionar los protocolos adecuados permitirá mantener una tasa de supervivencia y una estabilidad genética, en la actualidad existen varios tipos de métodos de conservación entre los cuales tenemos: subcultivos periódicos, secado, liofilizados y crioconservación (Kumar Bhatt et al., 2023).

### **1.2.1 Subcultivos periódicos**

Su periodo de conservación es corto, las cepas microbianas sufren mutaciones, es un método empleado para conservar microorganismos susceptibles a la congelación y secado.

### **1.2.2. La conservación en seco**

Es recomendable para ciertas especies bacterianas (*Anaeróbicas* y *Vibrio*), sin embargo, los microorganismos sufren degradación e incluso la muerte.

### **1.2.3. La liofilización**

Es el método de almacenamiento y conservación de los virus, hongos y bacterias por periodos prolongados con una baja tasa de mutación, sin embargo, sus procesos operativos son complicados, se requiere de equipos sofisticados y existe el riesgo biológico al generar aerosoles durante proceso de liofilización, por lo tanto, no todos los laboratorios son capaces de implementar este método de conservación.

### **1.2.4. La crioconservación**

Es el almacenamiento prolongado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , fácil de emplear y controlar en los laboratorios y una baja tasa de mutación biológica (Guo et al., 2020).

## **1.3. Crioconservación**

La crioconservación bacteriana permite conservar microorganismos viables por tiempos prolongados, el agua forma el microambiente, donde la bacteria debe adaptarse modificando su velocidad de su metabolismo, conservando su viabilidad y evitar que los cristales de hielo formados ocasionen lisis bacteriana. Entre estas adaptaciones tenemos: la producción de enzimas y sistemas de transporte resistentes a bajas temperaturas, incremento

de la concentración de ácidos grasos en la cadena de fosfolípidos de la membrana celular (Leal y Ramírez, 2005).

Existen factores críticos a considerar al momento de la adaptación bacteriana al proceso de criopreservación, entre ellos tenemos:

- **Microambiente:** Área o medio que envuelve a la bacteria.
- **Membrana bacteriana:** La membrana actúa como barrera esencial y separa el interior del exterior, sin embargo, la bacteria al encontrarse en medios hostiles la membrana y la pared bacteriana tratan de mantener la estructura celular. Por lo tanto, la integridad de la membrana permite llevar a cabo procesos metabólicos esenciales para la preservación de la viabilidad microbiana.
- **Estrés bacteriano:** El estrés es una situación que condiciona cambios de adaptación en la bacteria, normalmente este es un estado transitorio que le permite tener condiciones de resistencia a la hostilidad, uno de los mayores problemas a los que puede llevar este estrés es generarle cambios que pueden ser transitorios o permanentes en su actividad enzimática, capacidad antigénica o viabilidad (Leal y Ramírez, 2005).

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas (-80 °C), por lo tanto, es una excelente elección para la conservación de bacterias a largo plazo. Este método tiene algunos inconvenientes al requerir equipos especiales, adicionalmente existe la posibilidad de un fallo en el sistema eléctrico lo que produzca un incremento de la temperatura durante el almacenamiento.

### **1.3.1. Factores críticos de la criopreservación**

Existen cinco factores críticos que influyen en la vitalidad y estabilidad de las cepas bacterianas, las cuales son:

**1.3.1.1. Edad de las bacterias.** Es conviene utilizar bacterias al inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, donde se encuentran en su óptimo estado fisiológico.

**1.3.1.2. Velocidad en la congelación y descongelación.** El proceso de congelación principalmente es lenta, mientras que para descongelar conviene poner las bacterias a 37 °C durante 5 - 10 minutos.

**1.3.1.3. Temperatura de almacenamiento.** La temperatura debe ser inferior o igual a -80 °C, debido a que temperaturas más altas pueden llevar a la recristalización del agua y se pueden perder ciertos procesos bioquímicos (Smirnova et al., 2019).

**1.3.1.4. Composición del medio crioprotector.**

**1.3.1.5. El tipo y la contracción del crioprotector:** Los crioprotectores son aditivos que minimizan las lesiones celulares producidas por el descenso de la temperatura, entre ellos tenemos:

Aditivos crioprotectores penetrantes (CPA): Son sustancias no ionizables de bajo peso molecular que provocan solidificación amorfa y vítrea en lugar de cristalización para evitar la formación de zonas intracelulares con alta concentración de sales para evitar la deshidratación celular. El glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) son los más utilizados en una concentración entre 5 – 15 %.

Los crioprotectores no penetrantes tenemos a diferentes sacáridos como: trehalosa, sacarosa, inulina, gelatina, mucina, levan y polietilenglicol (PEG), estos reducen la formación de hielo, ayudan a estabilizar los lípidos de la membrana y son un apoyo nutricional para las bacterias (Leal y Ramírez, 2005; Smirnova et al., 2019).

Sustancias ricas en proteínas como la leche, suero, extracto de carne.

Proteínas purificadas como la albumina

Macromoléculas no proteicas como polivinilpirrolidona (PVP) y dextranos (Leal y Ramírez, 2005).

### **1.3.2. Desventajas y limitaciones de la crioconservación**

La crioconservación es un método dependiente de la temperatura, del correcto funcionamiento de los equipos y del suministro de luz. Por lo que el transporte de los microorganismos es crítico al tratar de mantener sus bajas temperaturas, cuando los trayectos son muy largos.

Una limitación es la necesidad de crio conservar varias alícuotas de una misma cepa bacteriana, debido a que la misma está sujeta a control periódico de vitalidad, estabilidad y pureza, dependiendo de las necesidades de docencia o investigación, por que no es recomendable congelar y descongelar un mismo cultivo bacteriano porque existe el riesgo de reducir su vitalidad, contaminación, o afectar la estabilidad genética. (Quintero Rodríguez et al., 2023)

Se han desarrollado múltiples protocolos para la crioconservación de las bacterias, considerando las características morfofuncionales como: forma, tamaño, densidad, contenido en agua, etc., y el uso de crioprotectores, donde el glicerol se emplea a una concentración del 10 %, siendo esta la concentración a utilizar en el presente proyecto al considerar su baja toxicidad (Smirnova et al., 2019).

### **1.4. Almacenamiento y transporte de muestras biológicas.**

Para el almacenamiento y transporte de las muestras biológicas se debe considerar las normativas nacionales como internacionales, para el caso del Ecuador el ente que establece los lineamientos para el almacenamiento y transporte de muestras biológicas a nivel nacional son: El Instituto de Investigación de Salud Pública – INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, el cual establece el “MANUAL PARA RECEPCIÓN, VERIFICACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS BIOLÓGICAS” y el Ministerio de Salud Pública en el Acuerdo Ministerial 84, Registro Oficial 34 de 12-julio – 2017 en el manual “LINEAMIENTOS TÉCNICOS PARA MANEJO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS” (Ministerio de Salud Pública, 2017; Uruchima et al., 2021).

Para la exportación de las muestras biológicas el ente que lo regula en el Ecuador es la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria – ARCSA, el mismo que establece el instructivo externo: “AUTORIZACIÓN DE IMPORTACIÓN Y EXPORTACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS PARA FINES DE INVESTIGACIÓN Y ATENCIÓN SANITARIA. Versión [3.0]”. (Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria – ARCSA, 2023).

Conjuntamente se debe considerar los requisitos de importación de muestras biológicas del país de destino, para el presente proyecto se plantea el envío de las cepas bacterianas a España, donde el ente que regula es MINISTERIO DE SANIDAD quien emite la Autorización sanitaria para la importación de muestras biológicas (Ministerio de Sanidad - Gobierno de España, 2024), como se observa en el Apéndice A.

#### **1.4.1. Almacenamiento y transporte de muestras biológicas a nivel nacional**

El sistema de embalaje que será **utilizado** para las sustancias biológicas patógenas o infecciosas son:

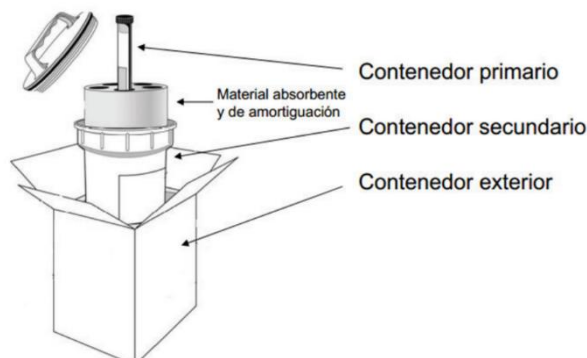
Recipiente primario: “Recipiente impermeable y estanco que contiene la muestra. El recipiente será envuelto en material absorbente suficiente para absorber todo el fluido en caso de rotura, Debe ser impermeable y hermético. Debe estar debidamente etiquetado en cuanto a su contenido”. Durante el proceso de crioconservación las cepas bacterianas serán almacenadas en crioviales sellados con papel Parafilm.

Envase secundario: “Un embalaje / Envase estanco, impermeable y duradero que encierre y proteja el recipiente o recipientes primarios.

Embalaje/Envase exterior: “Los embalajes/envases secundarios se colocan en embalajes/envases exteriores de expedición con un material amortiguador adecuado. Los embalajes/envases exteriores protegen el contenido de los elementos exteriores, como daños físicos. Ninguna de las caras de embalaje/envase exterior tendrá dimensiones inferiores a 10 x 10 cm”. (Uruchima et al., 2021, p. 43).

**Figura 1**

*Tipo de contenedor para muestras*



*Nota.* Extraído de la guía Guía Técnica Para el Transporte de Sustancias Infecciosas hacia el Instituto de Salud Pública

**1.4.1.1. Etiquetado.** *Ministerio de Salud Pública (2017) menciona que para el envío y etiquetado de las muestras, la etiqueta deberá constar:*

Nombres y apellidos completos del paciente, número de cédula de identidad, nombre del establecimiento en el que fue tomada la muestra, tipo de evento.

Adicionalmente se puede incluir la información relevante de la muestra biológica como: Nombre del evento, tipo de muestra, tipo de paciente, momento de la toma de muestra, etc. (Ministerio de Salud Pública, 2017).

**1.4.1.2. Criterios de aceptación o rechazo de las muestras biológicas** *El personal técnico del laboratorio evaluará la viabilidad de la muestra según los siguientes parámetros:*

**Tabla 1**

*Criterios de aceptación de muestras bacterianas*

| <b>Criterios</b>   | <b>Parámetros</b>   |
|--------------------|---|
| <i>Temperatura</i> | <b>Cepas</b> y Hemocultivo: Temperatura ambiente<br>Suero: 2 - 8 °C.<br>Hisopado nasofaríngeo, faríngeo, rectal y Líquido cefalorraquídeo: T. ambiente.<br>Secreciones: Temperatura ambiente. |

|  |   |
|--|---|
| <i>Tiempo de llegada al Centro de Referencia</i> | <b>Cepas:</b> Hasta 72 h<br>Suero: Hasta 48 h<br>Hisopado nasofaríngeo, faríngeo y rectal: 24 — 48 horas.<br>Líquido cefalorraquídeo y Hemocultivo: Inmediatamente. Por situaciones de distancia y el tiempo de llegada al laboratorio se prologue, se aceptará, por tratarse de muestras de difícil obtención.<br>Secreciones: 24 - 72 horas.  |
| <i>Cantidad de muestra.</i>                      | <b>Cepas:</b> N/A.<br>Suero: 0.5 - 2mL, Líquido cefalorraquídeo: 0.5 mL<br>Hemocultivo: 0.5-1mL Recién Nacido; 1-3mL Niño, 5-10 mL Adulto<br>Hisopado de nasofaríngeo, amigdalítico ofaríngeo y rectal: N/A<br>Secreciones: N/A   |
| <i>Medio de transporte</i>                       | <b>Cepas:</b> Medio de cultivo Amies carbón, Agar chocolate suplementado, Agar sangre, Soya, infusión cerebro corazón (ICC) etc.<br>Hisopado amigdalítico o faríngeo: Amies carbón.<br>Hisopado rectal: Cary Blair, stuart, Amies carbón.<br>Hisopado de nasofaríngeo: Reagan Lowe.<br>Secreciones: Amies Carbón, Stuart o envase estéril transparente.<br>Suero y líquido cefalorraquídeo: Tubo estéril tapa rosca o de caucho, libre de aditivos. |
| <i>Tipo de muestra</i>                           | <b>Cepas:</b> N/A<br>Hemocultivo, Suero<br>Hisopado nasofaríngeo, rectal, líquido cefalorraquídeo.<br>Líquidos estériles.<br>Secreciones  |

*Nota.* Extraído de Uruchima et al., (2021)

#### **1.4.2. Almacenamiento y transporte de muestras biológicas a nivel internacional.**

Para el proceso de exportación de muestras biológicas hacia el exterior se debe de cumplir los requisitos legales - técnicos del país de origen y obtener los permisos de importación del país de destino, estos requisitos deben de ser cumplidos antes de iniciar el proceso exportación. Apéndice A.

**1.4.2.1. Exportación en país de origen.** La Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria – ARCSA, (2023) establece los lineamientos para el proceso de exportación de muestras biológicas en el punto 3.1.2. “ESTUDIOS OBSERVACIONALES O DE INTERVENCIÓN APROBADOS POR UN COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS (CEISH)”.

**1.4.2.2. Importación en país de destino** La Secretaría de Estado de Sanidad, (2024) en la Dirección General de Salud Pública y en la página gubernamental de Ministerio de Sanidad – “Sede Electrónica” establecen los lineamientos legales y técnicos para la importación de muestras biológicas. Apéndice A.

Es recomendable tener la aprobación sanitaria antes de realizar la importación de muestra biológicas a España.

## Capítulo dos

### Metodología

#### 2.1. Objetivo General

Estandarizar protocolos de crioconservación y transporte de Enterobacterales productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido y Carbapenemasas.

##### 2.1.1. *Objetivos específicos*

- Estandarizar un protocolo de crioconservación bacteriana para Enterobacterales.
- Verificar la eficiencia del método de crioconservación.
- Estandarizar un protocolo de transporte de muestras biológicas para su exportación.

#### 2.2. Tipo de investigación

Este trabajo investigativo es de tipo experimental el cual permite controlar, manipular y observar a las variables independientes, logrando así estandarizar los protocolos planteados, de acuerdo a Hernández et al. (2014) “son investigaciones donde se manipulan con tratamientos, estímulos las variables independientes para observar los efectos sobre las variables dependientes”. En nuestro estudio, a las cepas bacterianas se le aplicara un protocolo de crioconservación ajustando las características o requerimientos fisiológicos de las bacterias, a su vez también al uso y concentración del crioprotector.

##### 2.2.1. *Diseño de investigación*

Se realizó un estudio de tipo descriptivo que de acuerdo con Hernández y col. (2014), “son el tipo de investigaciones que describe las propiedades y características importantes de cualquier fenómeno que se analice”. En este estudio se verifica la eficacia del método de crioconservación.

### 2.3. Material biológico

Para el presente estudio se seleccionaron cepas bacterianas con resistencia a los antibióticos betalactámicos y carbapenémicos, estas bacterias fueron representativas de las Enterobacterales que se encuentran en el cepario del laboratorio de microbiología, las cuales se indica a continuación.

**Tabla 2**

*Cepas EBLEE y EPC empleadas en el estudio.*

| <b>CEPAS EBLEE</b>               | <b>CEPAS EPC</b>             |
|----------------------------------|------------------------------|
| <i>Serratia liquefaciens</i>     | <i>Serratia liquefaciens</i> |
| <i>Proteus vulgaris</i>          | <i>Escherichia coli</i>      |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>     |                              |
| <i>Escherichia coli</i>          |                              |
| <i>Klebsiella ozaenae</i>        |                              |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>        |                              |
| <i>Serratia odorifera</i>        |                              |
| <i>Escherichia coli inactiva</i> |                              |
| <i>Citrobacter freundii</i>      |                              |
| <i>Enterococcus cloacae</i>      |                              |

### 2.4. Tiempo de evaluación

Las cepas bacterianas productoras de EBLEE se evaluaron por un periodo de 30 días con controles cada 7 días.

Las cepas bacterianas productoras de EPC se evaluaron por un periodo de 21 días con controles cada 7 días.

En ambos controles se consideraron la vitalidad, el porcentaje de recuperación, pureza y el halo de inhibición bacteriana.

### 2.5. Congelación y descongelación de las cepas bacterianas

Se establece que la velocidad de enfriamiento debe ser controlada, donde el descenso de temperatura es alrededor de 1°C a 5°C por minuto (Jiménez, 2018). Las cepas bacterianas al ser recuperadas de los crio viales, deben descongelarse rápidamente a 37°C en baño maría

durante 5 minutos. En el presente trabajo se prepararon crioviales suficientes de cada cepa bacteriana en caldo de Lb con glicerol al 10 % y antibiótico ceftazidima y meropenem.

## **2.6. Procedimiento**

Para la estandarización del protocolo de crioconservación de EBLEE y EPC se analizarán varios factores como: la pureza, recuperación, vitalidad y producción enzimática BLEE y carbapenemasas del cultivo bacteriano tanto al inicio como al final del protocolo de crioconservación.

### **2.6.1. Recuperación de los microorganismos, control de identidad y pureza**

Para la recuperación de las cepas se siguió el procedimiento descrito por Tibaduiza et al., (2021) y Castañeda, (2015), descongelando el criovial por un tiempo aproximado de cinco (5) minutos a 37 °C. posteriormente se toma 100 ul de la suspensión bacteriana y se lo incuba en caldo Lb con el antibiótico a 35 °C ± 2 °C de 16-20 horas. Pasado el tiempo de incubación se verifica la identidad y pureza de la cepa bacteriana sembrando en los medios de cultivo LB, selectivos (EMB y cromo agar orientation) y realizando la tinción de gram, tal como se describe en el protocolo del Apéndice B.

### **2.6.2. Crioconservación**

Con un haza estéril se tomaron colonias del medio de cultivo LB para elaborar una suspensión bacteriana con una turbidez semejante a uno de la Escala de McFarland, se inoculo esta suspensión en un tubo de tapa rosca que contenía 10 mL de caldo LB con antibiótico e incubamos a 35 ° ± 2 °C por un tiempo de 8 – 10 horas, posteriormente centrifugamos los tubos y obtuvimos un botón de biomasa que fue reconstituido con caldo Lb sin antibiótico (Tibaduiza et al., 2021; Pérez y Sosa, 2010).

Finalmente se sembró en los medios de cultivo selectivos para confirmar la pureza de la cepa bacteriana, se realizó la siembra por dilución para calcular la concentración inicial de bacterias y se adiciono la glicerina (crioprotector) hasta una concentración del 10 % para posteriormente distribuir la suspensión bacteriana en crioviales y llevarlos a -80°C. Apéndice B.

### 2.6.3. Evaluación post- crioconservación

**2.6.3.1. Descongelación y reactivación de cepas.** *Los crioviales mantenidos a -80 °C y se descongelaron a 35°C por cinco minutos. Posteriormente con un asa calibrada estéril se sembró en estría por agotamiento en los medios de cultivo selectivos, para evaluar las características macroscópicas y microscópicas de cada cepa bacteriana, e incubamos los medios de cultivo a 35 ± 2 °C por 24 y 48 horas (Tibaduiza et al., 2021; Pérez y Sosa, 2010).*

**2.6.3.2. Control de pureza, recuperación y vitalidad.** Se evaluaron las características macroscópicas, microscópicas de las colonias de cada cepa bacteriana y se cuantificó su concentración bacteriana según lo indicado en el protocolo. Apéndice B.

### 2.7. Determinación de producción de EBLEE y EPC

Se evaluó la cantidad de producción de la enzima EBLEE y EPC comparando los halos de inhibición bacteriana con el disco de ceftazidima y meropenem, considerando los límites establecidos en el CLSI M100 ED32 del año 2022 que se representa en las siguientes tablas. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022).

**Tabla 3**

*Puntos de control para el halo de inhibición del antibiótico ceftazidima*

| Cepas bacterianas                | Ceftazidima 30µg |          |         |
|----------------------------------|------------------|----------|---------|
|                                  | S                | I        | R       |
| <i>Serratia liquefaciens</i>     |                  |          |         |
| <i>Proteus vulgaris</i>          |                  |          |         |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>     |                  |          |         |
| <i>Escherichia Colí</i>          |                  |          |         |
| <i>Klebsiella ozaenae</i>        | ≥ 21 mm          | 18-20 mm | ≤ 17 mm |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>        |                  |          |         |
| <i>Serratia odorifera</i>        |                  |          |         |
| <i>Escherichia colí inactiva</i> |                  |          |         |
| <i>Citrobacter freundii</i>      |                  |          |         |
| <i>Enterococcus cloacae</i>      |                  |          |         |

*Nota:* Extraído de Clinical and Laboratory Standards Institute, (2022)

**Tabla 4.**

*Puntos de control para el halo de inhibición del antibiótico meropenem*

| Cepas bacterianas            | Meropenem 10 $\mu$ g |          |              |
|------------------------------|----------------------|----------|--------------|
|                              | S                    | I        | R            |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | $\geq 23$ mm         | 20-22 mm | $\leq 19$ mm |
| <i>Escherichia coli</i>      |                      |          |              |

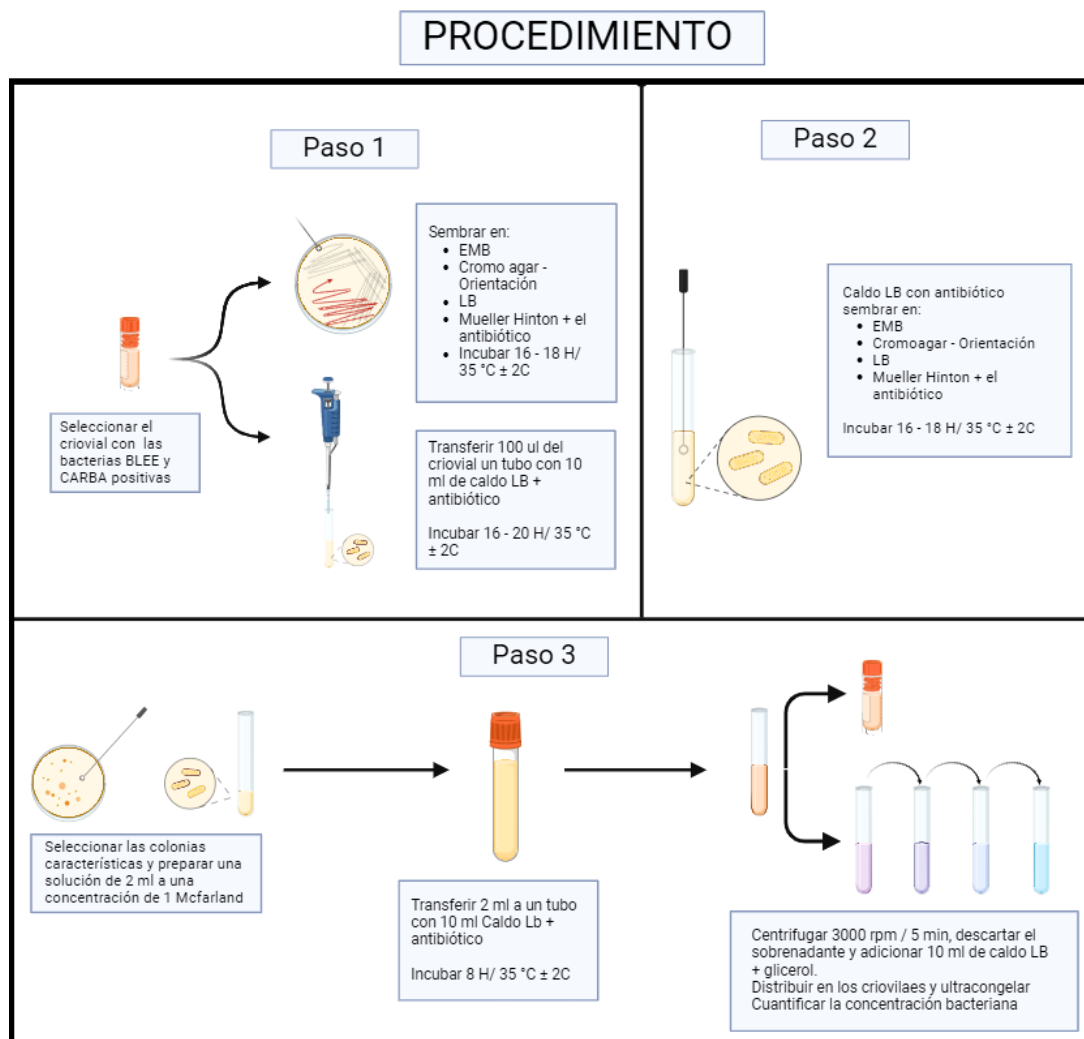
*Nota:* Extraído de Clinical and Laboratory Standards Institute, (2022)

## 2.8. Diagrama del proceso

La presente imagen indica de manera general el protocolo para la criopreservación de las cepas bacterianas.

**Figura 2**

*Esquema del protocolo de criopreservación.*



## Capítulo tres

### Resultados

Los cultivos primarios fueron aislados de muestras de heces e hisopados rectales, posteriormente fueron identificados y ultracongelados, estos cultivos primarios fueron analizados en el presente proyecto obteniendo los siguientes resultados.

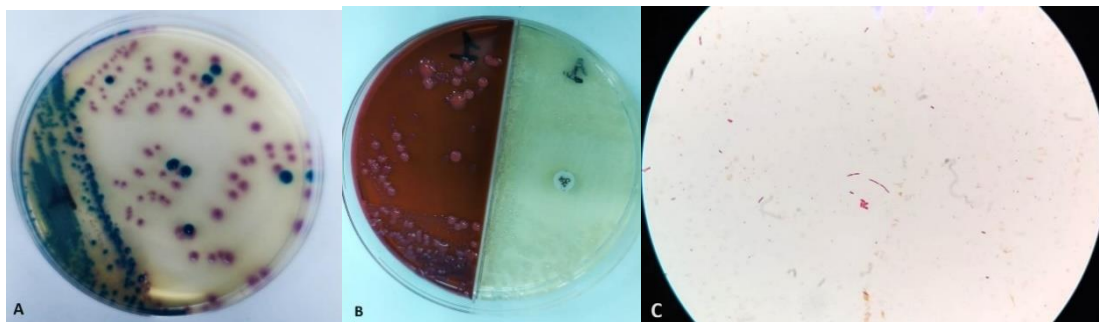
#### 3.1. Cepas productoras de *EBLEE*

##### 3.1.1. Pureza del cultivo, características macroscópicas y microscópicas.

Siete de los diez cultivos primarios presentaron una contaminación bacteriana (*Serratia liquefaciens*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella ozaenae*, *Escherichia coli* inactiva, *Citrobacter freundii*), como por ejemplo tenemos al cultivo bacteriano de *S. liquefaciens*, figura 2. Al realizar la tinción del Gram se pudo observar bacilos gran negativos de diferente forma y tamaño, de la misma manera se observaron diferentes colonias en los medios de cultivo selectivos (cromo agar y EMB).

#### Figura 3

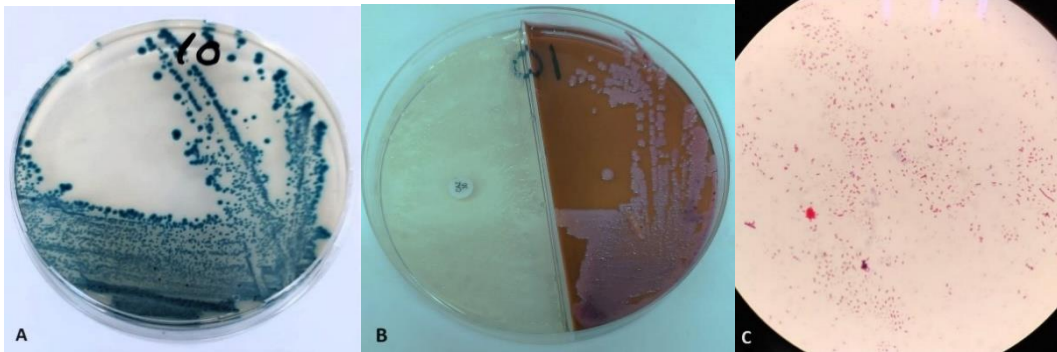
Crecimiento bacteriano de *Serratia liquefaciens*. A. Medio de cultivo cromoagar. B. Medio de cultivo selectivo EMB. C. Tinción de Gram



Sin embargo, los cultivos bacterianos de *Klebsiella oxytoca*, *Serratia odorifera* y *Enterococcus cloacae*, no presentaron contaminación como lo demuestra el cultivo de *K. oxytoca*, observando en la tinción de gram un solo tipo de bacilo gram negativo y en los medios de cultivo sólido una sola colonia con estructuras macroscópicas características en el cromo agar como EMB.

#### Figura 4

Crecimiento bacteriano de *Klebsiella oxytoca*. A. Medio de cultivo cromoagar. B. Medio de cultivo selectivo EMB. C. Tinción de Gram

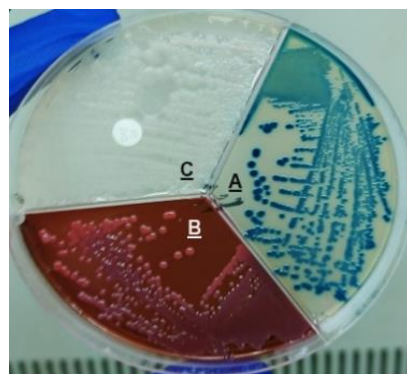


Al inicio del proyecto, en todos los cultivos bacterianos se pudo observar el crecimiento de colonias con morfologías aberrantes y coloraciones atípicas, posiblemente producidas por el primer proceso de ultracongelación.

Para el proceso de crioconservación se emplearon cultivos bacterianos puros, por lo tanto, para el caso de los cultivos bacterianos contaminados se realizó un aislamiento e identificación (Medios de cultivo selectivos, **Enterosystems 18R**) previo al inicio del estudio. En los controles posteriores a la crioconservación se pudo evidenciar la pureza y características microscópicas y macroscópicas de las colonias en los diferentes medios de cultivo, como se puede evidenciar en el cultivo bacteriano de *K. pneumoniae*, en el control a los 23 días.

#### Figura 5

*Klebsiella pneumoniae* después de 23 días de crioconservación. A. Medio de cultivo cromoagar. B. Medio de cultivo selectivo EMB. C. Medio de cultivo Mueller Hilton.



De igual forma no se observó crecimiento en los controles negativos indicando la pureza del proceso.

### 3.1.2. Vitalidad de las cepas bacterianas

Después de realizar el procedimiento de ultracongelación, se evaluó la vitalidad como se muestra en la tabla 5. El porcentaje de recuperación de las bacterias varía para cada especie bacteriana. Para el caso de *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *P. vulgaris* y *E. coli* tuvieron una baja tasa de recuperación siendo estos del 2.00%, 8.33%, 10.00% y 10.00 % respectivamente.

Para las cepas bacterianas *E. cloacae*, *S. odorífera*, *K. ozaenae* y *K. pneumoniae* tuvieron un porcentaje moderado de recuperación siendo del 12.00 %, 20.00 %, 20.00 % y 21.82 % respectivamente. Mientras que para *K. oxytoca* y *E. coli* inactiva tuvieron una alta tasa de recuperación de 63.53 % y 40.00%.

**Tabla 5**

*Porcentaje de vitalidad de las cepas bacterianas productoras EBLEE*

| N  | Especie                          | 24/11/2023 | 2/12/2023 | 23/12/2023 | Vitalidad % |
|----|----------------------------------|------------|-----------|------------|-------------|
| 1  | <i>Serratia liquefaciens</i>     | 5,00E+07   | 3,00E+06  | 1,00E+06   | 2,00%       |
| 2  | <i>Proteus vulgaris</i>          | 3,00E+07   | 1,20E+07  | 3,00E+06   | 10,00%      |
| 3  | <i>Klebsiella pneumoniae</i>     | 1,10E+08   | 1,05E+08  | 2,40E+07   | 21,82%      |
| 4  | <i>Escherichia coli</i>          | 1,00E+07   | 6,00E+06  | 1,00E+06   | 10,00%      |
| 5  | <i>Klebsiella ozaenae</i>        | 1,00E+07   | 1,00E+06  | 2,00E+06   | 20,00%      |
| 6  | <i>Klebsiella oxytoca</i>        | 1,70E+08   | 2,16E+08  | 1,08E+08   | 63,53%      |
| 7  | <i>Serratia odorífera</i>        | 2,00E+07   | 1,60E+07  | 4,00E+06   | 20,00%      |
| 8  | <i>Escherichia coli inactiva</i> | 1,00E+07   | 1,00E+06  | 4,00E+06   | 40,00%      |
| 9  | <i>Citrobacter freundii</i>      | 1,20E+08   | 6,00E+06  | 1,00E+07   | 8,33%       |
| 10 | <i>Enterococcus cloacae</i>      | 1,00E+08   | 3,20E+07  | 1,20E+07   | 12,00%      |

En las figuras 5, 6 y 7 podemos visualizar como ha ido descendiendo la cantidad de bacterias presentes en los crioviales, donde, *S. liquefaciens* parte con una concentración inicial de 5,00E+07 UFC y termina con 1,00E+06 UFC, lo que corresponde al 2 %.

Figura 6

Gráfico de la concentración inicial de las cepas bacterianas productoras EBLEE.

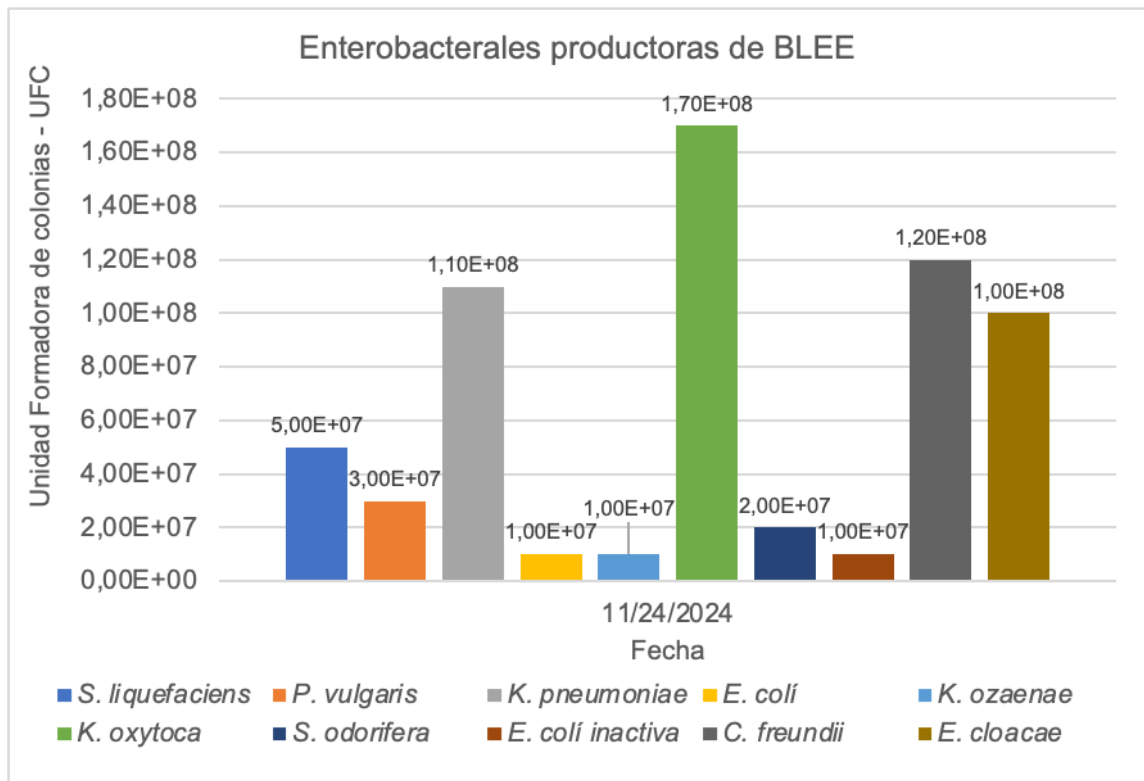
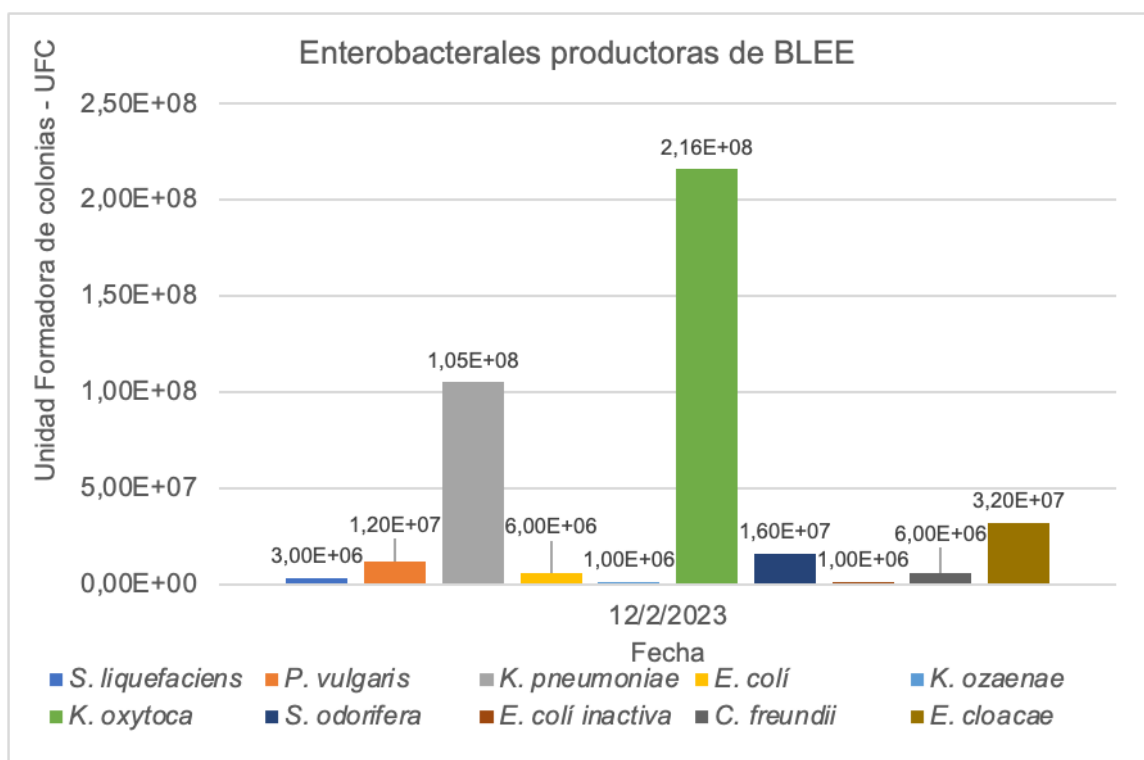


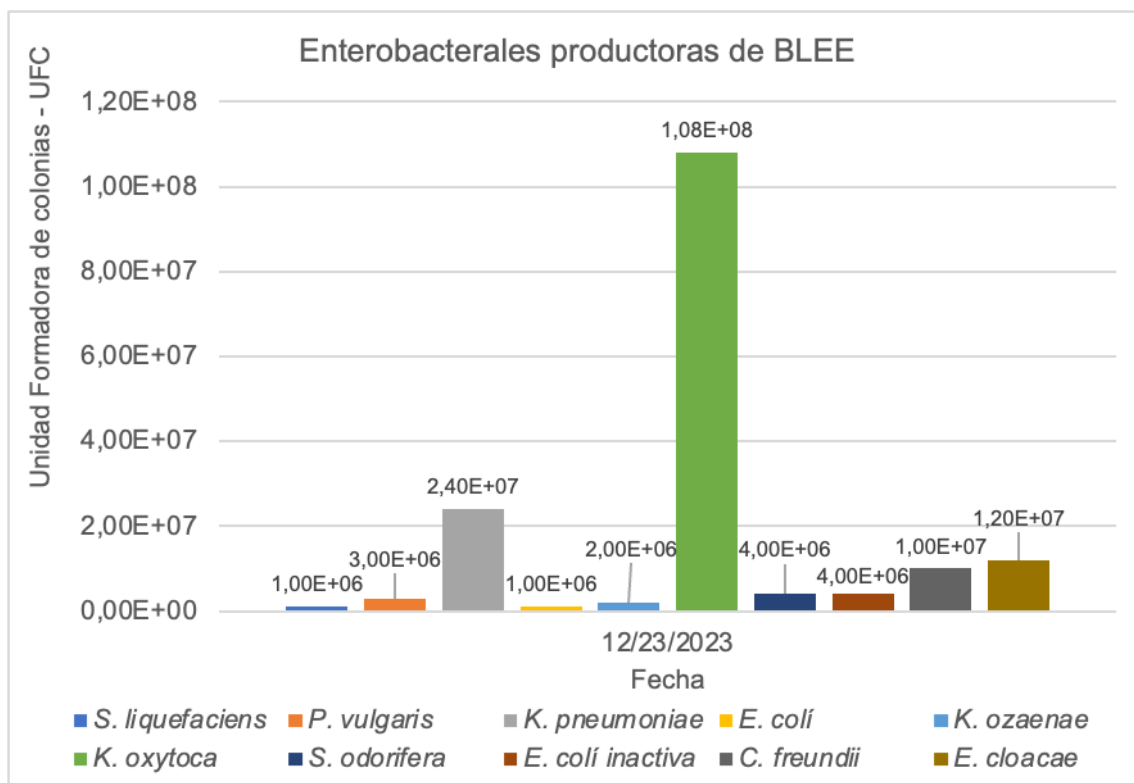
Figura 7

Gráfico de la concentración intermedia de las cepas bacterianas productoras EBLEE.



**Figura 8**

Gráfico de la concentración final de las cepas bacterianas productoras EBLEE.



### 3.1.3. Control de producción de las Betalactamasas

Se realizaron controles de los halos de inhibición del disco de ceftazidima 30 ug, en todas las bacterias se observó una disminución significativa en la medida del diámetro del halo, tal como se puede observar en la tabla 7 y figura 8.

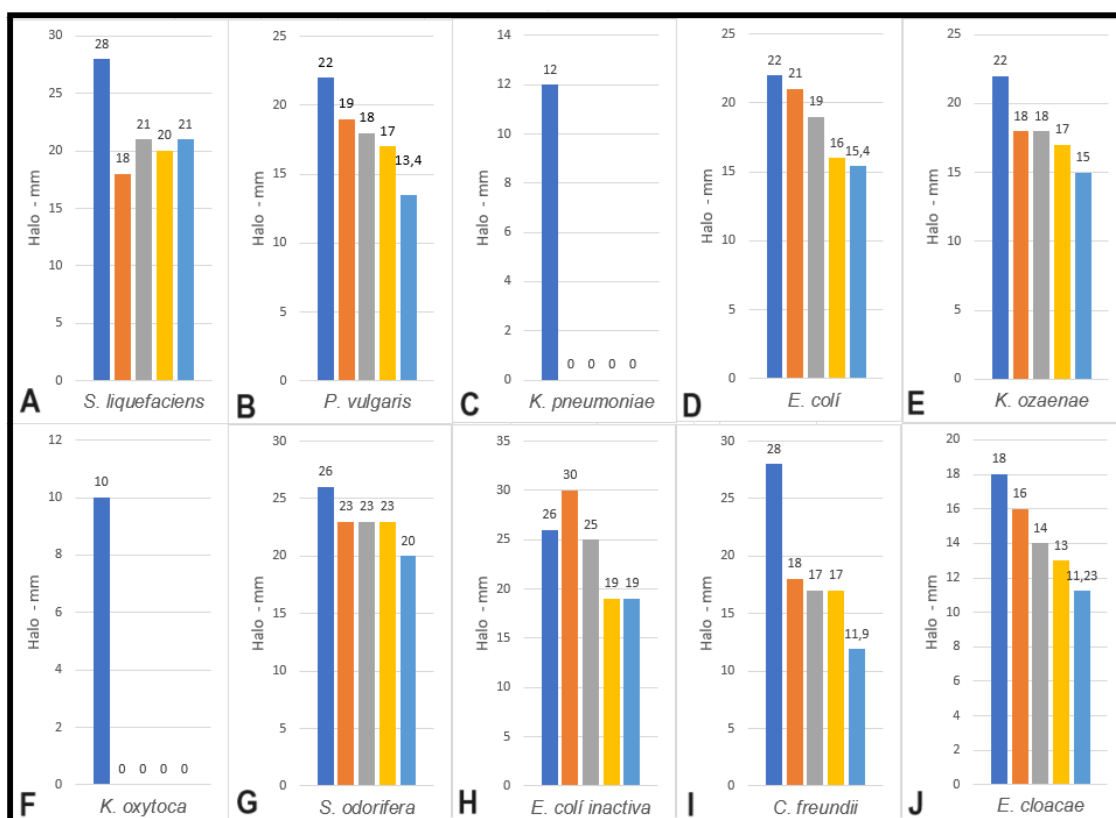
Tabla 6

Diámetros en mm de los halos de ceftazidima 30ug producidos por bacterias productoras de EBLEE

| N  | Especie                          | 24/11/2023 | 2/12/2023 | 11/12/2023 | 16/12/2023 | 23/12/2023 |
|----|----------------------------------|------------|-----------|------------|------------|------------|
| 1  | <i>Serratia liquefaciens</i>     | 28         | 18        | 21         | 20         | 21         |
| 2  | <i>Proteus vulgaris</i>          | 22         | 19        | 18         | 17         | 13,49      |
| 3  | <i>Klebsiella pneumoniae</i>     | 12         | 0         | 0          | 0          | 0          |
| 4  | <i>Escherichia coli</i>          | 22         | 21        | 19         | 16         | 15,4       |
| 5  | <i>Klebsiella ozaenae</i>        | 22         | 18        | 18         | 17         | 15         |
| 6  | <i>Klebsiella oxytoca</i>        | 10         | 0         | 0          | 0          | 0          |
| 7  | <i>Serratia odorifera</i>        | 26         | 23        | 23         | 23         | 20         |
| 8  | <i>Escherichia coli inactiva</i> | 26         | 30        | 25         | 19         | 19         |
| 9  | <i>Citrobacter freundii</i>      | 28         | 18        | 17         | 17         | 11,9       |
| 10 | <i>Enterococcus cloacae</i>      | 18         | 16        | 14         | 13         | 11,23      |

Figura 9

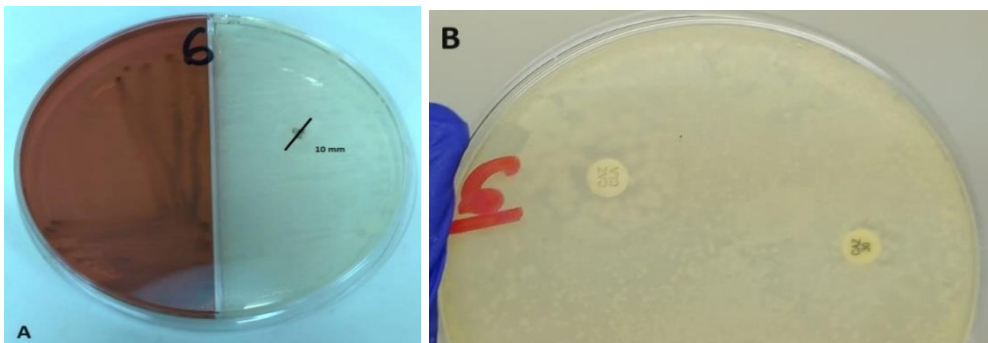
Diámetros en mm de los halos de ceftazidima 30ug producidos por EBLEE: A: *Serratia liquefaciens*; B: *Proteus vulgaris*; C: *Klebsiella pneumoniae*; D: *Escherichia coli*; E: *Klebsiella ozaenae*; F: *Klebsiella oxytoca*; G: *Serratia odorifera*; H: *Escherichia coli inactiva*; I: *Citrobacter freundii*; J: *Enterococcus cloacae*



Para el caso de las bacterias *K. oxytoca* (Figura 9) y *K. pneumoniae* al inicio del protocolo tuvieron halos de inhibición de 10 mm y 12 mm respectivamente, sin embargo, durante el desarrollo del protocolo y sus respectivos controles se evidenció que el antibiótico de ceftazidima no tenía ningún efecto sobre el crecimiento de estas bacterias.

### Figura 10

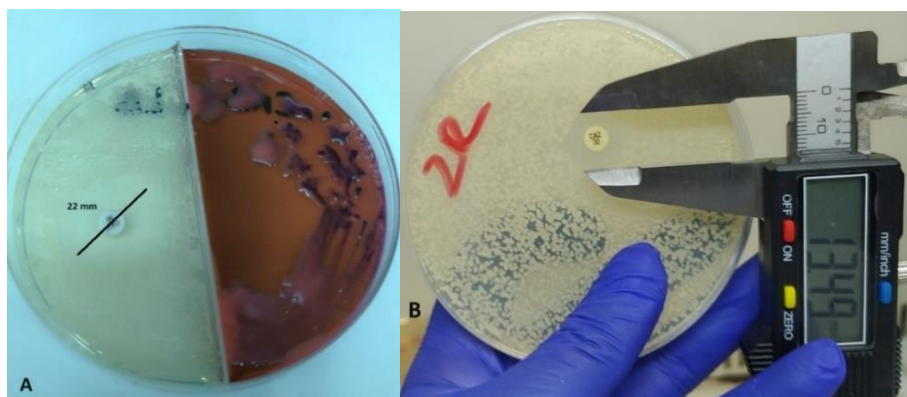
*Crecimiento bacteriano de Klebsiella oxytoca. A. Cultivo bacteriano al inicio del proyecto. B. Crecimiento bacteriano al finalizar el proyecto*



Las cepas bacterianas *Proteus vulgaris* (Figura 10), *E. Colí*, *K. ozaenae*, al inicio del proyecto sus halos fueron de 22 mm, mientras que para *E. cloacae* su halo fue de 18 mm, en estas bacterias se observaron un descenso significativo en la medida de los halos al finalizar el protocolo, siendo estos de 13.49 mm, 15.4 mm, 15mm y 11.9 mm respectivamente.

### Figura 11

*Crecimiento bacteriano de Proteus vulgaris. A. Cultivo bacteriano al inicio del proyecto. B. Crecimiento bacteriano al finalizar el proyecto*

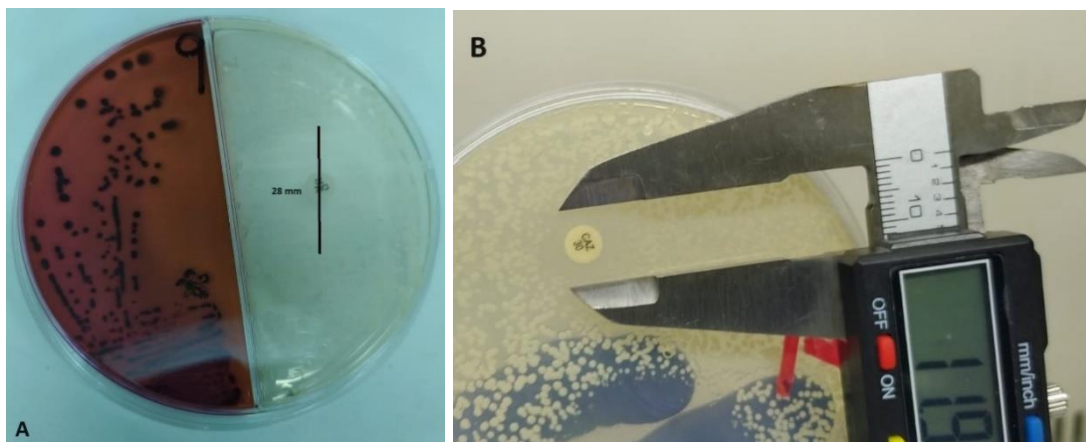


Las bacterias *C. freundii* (Figura 11), *S. liquefaciens* tuvieron halos de inhibición de 28 mm y para *E. colí inactiva*, *S. odorífera* los halos fueron 26 mm, posterior al protocolo se observó un descenso significativo en diámetro del halo de *C. freundii* a 11.9 mm, mientras que para las bacterias *E. colí*, *S. odorífera* y *S. liquefaciens* sus halos de inhibición fueron 19 mm, 20 mm y 21 mm respectivamente.

### Figura 12

*Crecimiento bacteriano de Citrobacter freundii*. A. Cultivo bacteriano al inicio del proyecto.

B. Crecimiento bacteriano al finalizar el proyecto



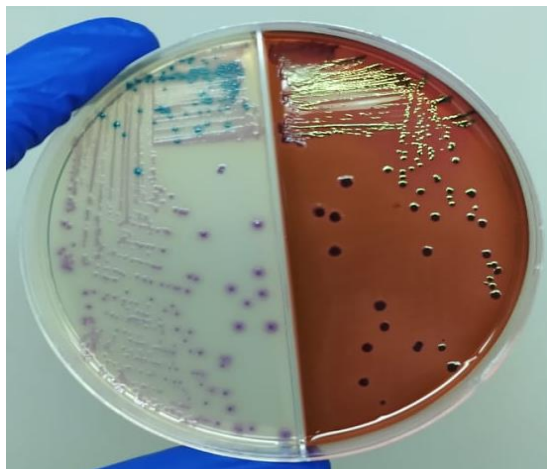
## 3.2. Resultados obtenidos para las cepas productoras de EPC

### 3.2.1. Pureza del cultivo, características macroscópicas y microscópicas.

Para el protocolo de EPC se partió de un cultivo primario que estaba identificado como *E. colí*, sin embargo, durante el desarrollo del protocolo se pudo evidenciar la presencia de la bacteria *S. liquefaciens*.

**Figura 13**

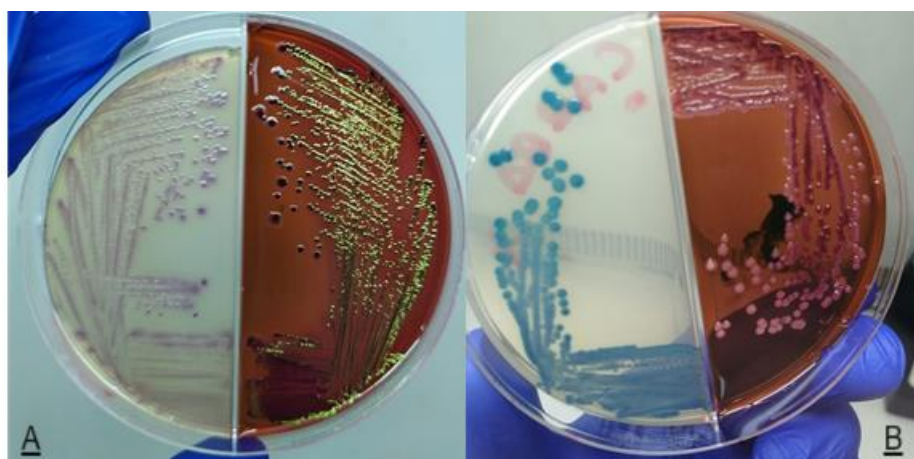
*Cultivo contaminado de Escherichia coli y Serratia liquefaciens*



Una vez purificadas y aisladas las cepas bacterianas se continuó con el protocolo, observándose las características típicas macroscópicas y microscópicas de cada bacteria, como se puede observar en la figura 13.

**Figura 14.**

*Cultivo bacteriano: A: Escherichia coli - B: Serratia liquefaciens*



### **3.2.2. Vitalidad de las cepas bacterianas**

Durante el protocolo para las bacterias productoras de EPC, se trabajaron con las dos bacterias encontradas en el cultivo primario, las cuales reaccionaron favorablemente teniéndose una tasa de recuperación del 60 % para *S. liquefaciens* y del 15.38 % para *E. coli*. Tal como se puede observar en la tabla 8 y en la figura 14.

Tabla 7

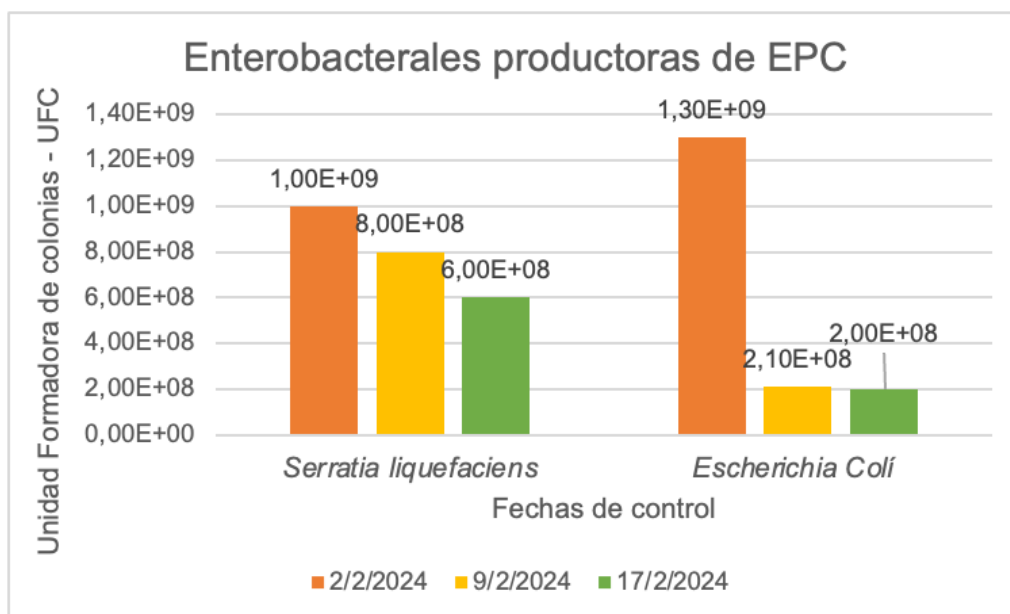
Porcentaje de vitalidad de las cepas bacterianas productoras EPC

| N | Especie                      | Unidad Formadora de colonias - UFC |          |           | %      |
|---|------------------------------|------------------------------------|----------|-----------|--------|
|   |                              | 2/2/2024                           | 9/2/2024 | 17/2/2024 |        |
| 1 | <i>Serratia liquefaciens</i> | 1,00E+09                           | 8,00E+08 | 6,00E+08  | 60,00% |
| 2 | <i>Escherichia coli</i>      | 1,30E+09                           | 2,10E+08 | 2,00E+08  | 15,38% |

Figura 15

Gráfico general de Unidad Formadora de colonias - UFC de las cepas bacterianas productoras

EPC



### 3.2.3. Control de producción de las EPC

Como se puede observar para la bacteria *S. liquefaciens* hubo una reducción en la dimensión del halo de manera significativa, donde el valor al inicio del protocolo fue de 17 mm, mientras en el último control fue de 10.36 mm tal como se puede observar en la figura 16. Sin embargo, para la bacteria *E. coli* hubo una disminución en la dimensión de sus halos, siendo estos de 19 mm a iniciar el protocolo y de 16.16 mm al finalizarlo.

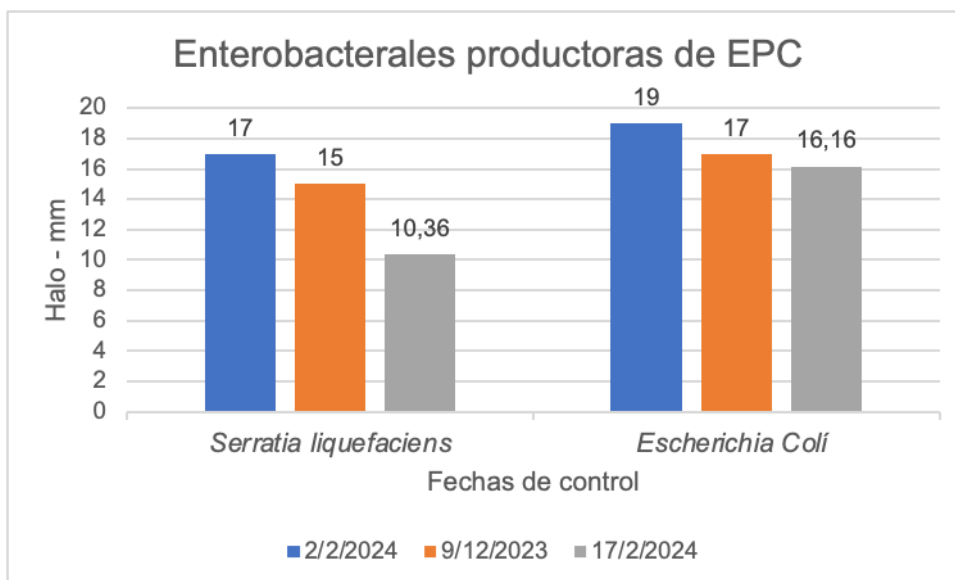
**Tabla 8**

Diámetros en milímetros (mm) de los halos de meropenem 10 $\mu$ g producidos por bacterias productoras de EPC

| Especie                      | 2/2/2024 | 9/12/2023 | 17/2/2024 |
|------------------------------|----------|-----------|-----------|
| <i>Serratia liquefaciens</i> | 17       | 15        | 10,36     |
| <i>Escherichia coli</i>      | 19       | 17        | 16,16     |

**Figura 16**

Diámetros en mm de los halos de meropenem 10 $\mu$ g producidos por bacterias productoras de EPC

**Figura 17**

Dimensiones del halo de *Serratia liquefaciens* frente al disco de meropenem 10  $\mu$ g.



## Capítulo cuatro

### Discusión

Ocares P., (2020) considera que el propósito de crio conservar bacterias es mantener su vitalidad, pureza, estabilidad morfológica y genética, Guo et al., (2020) describe los factores que afectan la crioconservación de cepas microbianas patógenas como son: la velocidad de congelación intermedia o lenta y la velocidad de descongelación lenta, entre otros, ,mientras que Gutiérrez-Jiménez et al., (2015) señala la importancia de tener acceso a estos cultivos bacterianos porque son un valioso recurso biológico que contribuye al área de investigación, sin embargo, todos los estudios resaltan la importancia de la vitalidad bacteriana, pero no establecen los mecanismos para mantener la actividad enzimática de las EBLEE y EPC.

Los resultados obtenidos permitieron recuperar cepas de EBLEE y EPC puras, sin embargo, el porcentaje de vitalidad fue bajo para la mayoría de las bacterias. Estudios similares como como el de Parra Huertas et al., (2006) y Pérez y Sosa, (2010) obtuvieron porcentajes mayores al 70% de vitalidad para *E. coli*, mientras que en el presente estudio la vitalidad fue para *E. coli* y *E.coli inactiva* productoras de BLEE del 10 y 40 % respectivamente y para *E. coli* productora de carbapenemasas del 15,38%, Si bien los protocolos tienen una base similar, en el presente estudio se estreso a la bacteria con antibiótico con el fin de estimular la producción de las enzimas BLEE y EPC.

Otros factores que afectan a la crioconservación lo describen Guo et al., (2020) y Bhatt et al., (2023) indicando las limitaciones de la crioconservación debido que no hay un método general para todas las bacterias por a su alta variabilidad morfológica, fisiológica, metabólica y la importancia de seleccionar el crioprotector (Glicerol, DMSO, etc.) con su concentración afectan de forma directa el porcentaje de vitalidad bacteriana, de la misma manera, varios autores indican que ciclos continuos de congelación y descongelación de un mismo cultivo bacteriano pueden ocasionar mutaciones en la membrana bacteriana, esto afecta la

estabilidad genética y provoca una fuerte disminución de la vitalidad del cultivo bacteriano (Guo et al., 2020; Kumar Bhatt et al., 2023; Quintero Rodríguez et al., 2023).

Por todo lo mencionado anteriormente, se puede presumir las razones del porque el porcentaje de recuperación fue bajo para las bacterias productoras de EBLEE en relación con las baterías productoras de EPC al comparar las tasas de vitalidad de *Escherichia coli* y *Serratia liquefaciens* EBLEE y EPC respectivamente. La primera es que durante el desarrollo del protocolo para EBLEE hubieron fallas energéticas en el laboratorio produciendo aumentos y decesos de temperatura en el ultracongelador, mientras que para el protocolo de EPC no se tuvo ese inconveniente, también debemos considerar la variabilidad metabólica y fisiológica de las baterías en relación con un sustrato, es decir, las bacterias *Escherichia coli* y *Serratia liquefaciens* EBLEE y EPC fueron expuestas a distintos antibióticos y diferentes concentraciones, por lo que el porcentaje de recuperación también se ve afectado por la concentración del soluto.

Se logro verificar la eficacia del protocolo al lograr reactivar a las baterías EBLEE y EPC, observándose una marcada disminución en la medida de los halos en relación con los antibióticos de ceftazidima y meropenem respectivamente, evidenciando así una mayor producción enzimática. De la misma manera se pudo recuperar colonias puras, con características macroscópicas, microscópicas típicas de cada bacteria, garantizando no solo la calidad de pureza de la colonia, sino también la presencia de una alta actividad enzimática.

Se pudo establecer los lineamientos para la exportación de las cepas bacterianas al exterior, por lo cual primero se debe de cumplir la normativa nacional, donde la Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria – ARCSA, (2023) en el apartado “3.1.2 EN ESTUDIOS OBSERVACIONALES O DE INTERVENCIÓN APROBADOS POR UN COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS (CEISH)” dicta los pasos a seguir para el proceso de desaduanización o la autorización de salida del país de las muestras biológicas, una vez aprobada la documentación técnica – legal por parte del ARCSA y aduana, y a su vez el procedimiento para los permisos de entrada al país de llegada que

en este caso es España, donde el Ministerio de Sanidad - Gobierno de España, (2024) indica las leyes, normativas y requisitos a seguir para el proceso de autorización ingreso de las muestras biológicas.

## Conclusiones

Los protocolos planteados para la reactivación de bacterias productoras de EBLEE y EPC dieron buenos resultados al permitir la recuperación de la actividad enzimática en las bacterias, sin embargo, estos protocolos solo deberían desarrollarse para el mantenimiento de bacterias que han sido identificadas y confirmadas como productoras de EBLEE y EPC.

Se deberán realizar estudios adicionales con el fin de establecer cuál es el mejor crioprotector y su concentración que se puede emplear para mejorar el porcentaje de vitalidad bacteriana, aclarando que se pueden emplear uno o más de un crioprotector considerando las características morfo-fisiológicas de cada bacteria.

Considero que estos protocolos van a ser de gran ayuda para el área de investigación ya que va a permitir mantener el linaje bacteriano y extender la vida útil de las cepas bacterias productoras de EBLEE y EPC.

Se establecieron los pasos a seguir para el proceso de exportación de muestras biológicas, es de suma importancia contar con todos los permisos tanto nacionales como internacionales con el fin de garantizar un correcto transporte de las muestras y evitar caer en multas, sanciones y destrucción del material biológico.

## Recomendaciones

Ampliar el estudio para eliminar el sesgo, optimizar el uso de la crioconservación con el fin de mejorar el porcentaje de recuperación bacteriana.

Utilizar este protocolo únicamente para el mantenimiento del cepario de bacterias productoras de EBLEE y EPC.

Los laboratorios deben de mantener un estricto control de normas bioseguridad nivel 2 para evitar la contaminación cruzada con el profesional de la salud.

El laboratorio debe de contar con los equipos, materiales, insumos y reactivos de uso exclusivo para el área de microbiología, de esta manera limitar la posible fuga los agentes biológicos.

El desarrollo del protocolo y manipulación de las EBLLE y EPC deber ser por personal especializado en el área de microbiología.

## Referencias

- Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria – ARCSA. (2023). Autorización de importación y exportación de muestras biológicas humanas para fines de investigación y atención sanitaria (3rd ed.). <https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2023/11/Anexo-7-IE-B.3.3.2-EC-01-Autorizacion-de-importacion-y-exportacion-de-MBH-V3.0.pdf>
- Anido, M. (2015). Puesta a punto de un protocolo de liofilización para la creación de bancos bacterianos [Universidad ORT Uruguay]. <https://rad.ort.edu.uy/server/api/core/bitstreams/a62fa677-0b47-4490-8202-6768905f9717/content>
- Bagatolli, C. (2017). Validación de un método alternativo para la conservación de bacterias [Universidad nacional de Cuyo ]. <https://core.ac.uk/download/pdf/80528464.pdf>
- Brody, H. (2020). The gut microbiome. *Nature*, 577(7792), S5–S5. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00194-2>
- CASTAÑEDA, A. (2015). Pruebas de viabilidad a cinco cepas bacterianas criopreservadas y estudio para la liofilización de las mismas, evaluando tres compuestos protectores, pertenecientes al banco genético del laboratorio de microbiología de la facultad del medio ambiente y recursos naturales de la universidad distrital francisco josé de caldas [proyecto curricular de licenciatura en biología Bogotá D.c., Universidad distrital Francisco José de Caldas]. [https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/2931/Casta%F1edaRangela\\_n;jsessionid=9C788A8332E46EDF2C5A30C6985358C6?sequence=1](https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/2931/Casta%F1edaRangela_n;jsessionid=9C788A8332E46EDF2C5A30C6985358C6?sequence=1)
- Chief, B. R., Carr, M. D., Guest Editors, S. L., Tan, M. D., Roger, G., Gosden, P. D., y Sc, D. (2002). The History and Principles of Cryopreservation. In *Seminars in Reproductive Medicine* (Vol. 20, Issue 1). <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2002-23515>

- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2022). CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M 100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 1. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/companion/using-m100/>
- Grimalt-Alemany, A., Łężyk, M., Asimakopoulou, K., Skiadas, I. V., y Gavala, H. N. (2020). Cryopreservation and fast recovery of enriched syngas-converting microbial communities. *Water Research*, 177, 115747. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2020.115747>
- Guo, N., Wei, Q., y Xu, Y. (2020). Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, 2(2), 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2020.11.003>
- Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cazás, L. M., Mendoza-Orozco, M. I., Díaz-Marina, G. de J., Burguete-Gutiérrez, J. C., y Feliciano-Guzmán, J. Manuel. (2015). 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. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35, 95–102. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562015000200007&ynrm=iso](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562015000200007&ynrm=iso)
- Heintz-Buschart, A., y Wilmes, P. (2018). Human Gut Microbiome: Function Matters. *Trends in Microbiology*, 26(7), 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.002>
- Hernández-Sampieri, R. y Mendoza, C (2018). Metodología de la investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta
- JIMÉNEZ, N. (2018). Mantenimiento y conservación de cepas de referencia para el control de calidad de los métodos de análisis del laboratorio de microbiología [facultad de ciencias básicas]. in Universidad de Pamplona facultad de ciencias básicas departamento de microbiología Pamplona. [http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/bitstream/20.500.12744/2428/1/Jim%C3%A9nez\\_Miranda\\_2018\\_TG.pdf](http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/bitstream/20.500.12744/2428/1/Jim%C3%A9nez_Miranda_2018_TG.pdf)

- Kumar Bhatt, A., Kant Bhatia, R., y Chand Bhalla, T. (2023). Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship (L. Versteeg-Buschman, Ed.; 1st ed., Vol. 1). Stacy Masucci. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00005>
- Leal, L. S., y Ramírez, L. C. (2005). Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. NOVA, 3(3). <https://doi.org/10.22490/24629448.23>
- Ministerio de Salud Publica. (2017). Lineamientos técnicos para manejo de muestras biológicas y químicas. In Acuerdo Ministerial 84: Vol. Registro Oficial 34 (No. 0084-2017). <https://www.controlsanitario.gob.ec/wpontent/uploads/downloads/2017/11/Acuerdo-ministerial-84.pdf>
- Ministerio de Sanidad - Gobierno de España. (2024, February). Sede Electronica . <https://sede.msbs.gob.es/ciudadanos/procAdministrativos.do?tipo=detallarycod=990807>
- Ocares P., (2020). Preservación de microorganismos por congelación. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/67167>
- Pérez, D., y Sosa, A. (2010). Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de Escherichia coli K12 de uso frecuente en biotecnología. VacciMonitor, 19(2). <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v19n2/vac03210.pdf>
- Quintero Rodríguez, M. P., Montoya Arango, D., Restrepo Posada, D. C., y González Gil, D. M. (2023). Conservación de bacterias por liofilización en la Colección de Microorganismos CM-EM-UDEA, Medellín, Colombia. Biota Colombiana, 24(2), e1127. <https://doi.org/10.21068/2539200X.1127>
- Secretaría de Estado de Sanidad. (2024). Inventario del registro de actividades de tratamiento de datos personales. [https://www.sanidad.gob.es/servCiudadanos/proteccionDatos/docs/RAT\\_MS.pdf](https://www.sanidad.gob.es/servCiudadanos/proteccionDatos/docs/RAT_MS.pdf)
- Smirnova, D. V., Zalomova, L. V., Zagainova, A. V., Makarov, V. V., Mezhevnikina, L. M., Fesenko, E. E., y Yudin, S. M. (2019a). Cryopreservation of the human gut microbiota:

Current state and perspectives. *International Journal of Medical Microbiology*, 309(5), 259–269. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2019.06.001>

Smirnova, D. V., Zalomova, L. V., Zagainova, A. V., Makarov, V. V., Mezhevnikina, L. M., Fesenko, E. E., y Yudin, S. M. (2019b). Cryopreservation of the human gut microbiota: Current state and perspectives. *International Journal of Medical Microbiology*, 309(5), 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.06.001>

Tibaduiza, L., Ovalle, J., y Botero, L. (2021). Conservación y autenticación de cepas microbianas. In *CONSERVACIÓN Y MANEJO de la diversidad microbiana en los Bancos de Germoplasma para la Alimentación y la Agricultura en Colombia: Vol. Uno (Primera edición)*.

[https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/36935/Ver\\_Documento\\_36935.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/36935/Ver_Documento_36935.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Uruchima, S., Morales, D., y Patiño, L. (2021). Manual para Recepción, Verificación y Transporte de muestras biológicas. In Instituto de Investigación e Salud Pública – INSPI (M-RM-001). <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/intranet/manual-para-recepcion-verificacion-y-transporte-de-muestras-biologicas/>

Wu, Z., Pan, X., Yuan, Y., Lou, P., Gordejeva, L., Ni, S., Zhu, X., Liu, B., Wu, L., Li, L., y Li, B. (2023a). An Evaluation Method of Human Gut Microbial Homeostasis by Testing Specific Fecal Microbiota. *Engineering*. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2023.03.007>

Wu, Z., Pan, X., Yuan, Y., Lou, P., Gordejeva, L., Ni, S., Zhu, X., Liu, B., Wu, L., Li, L., y Li, B. (2023b). An Evaluation Method of Human Gut Microbial Homeostasis by Testing Specific Fecal Microbiota. *Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.03.007>

## Apéndice

### Apéndice A. Normativas de referencia para la importación y exportación de cepas bacterianas

Tabla A 1

*Lista de normativas empleadas para el almacenamiento y transporte de muestras biológicas*

| Nombre de la normativa  | Año de publicación | Página web  |
|---|--------------------|---|
| Ministerio de sanidad - inventario del registro de actividades de tratamiento de datos personales. España                                     | 2024               | <a href="https://www.sanidad.gob.es/servCiudadano/s/proteccionDatos/docs/RAT_MS.pdf">https://www.sanidad.gob.es/servCiudadano/s/proteccionDatos/docs/RAT_MS.pdf</a>   |
| Ministerio de sanidad – Sede Electrónica  | 2024               | <a href="https://sede.mscbs.gob.es/ciudadanos/procAdministrativos.do?tipo=detallarycod=990807">https://sede.mscbs.gob.es/ciudadanos/procAdministrativos.do?tipo=detallarycod=990807</a>   |
| Lineamientos técnicos para manejo de muestras biológicas y químicas   | 2017               | <a href="https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/11/Acuerdo-ministerial-84.pdf">https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/11/Acuerdo-ministerial-84.pdf</a>   |
| Instructivo externo autorización de importación y exportación de muestras biológicas humanas para fines de investigación y atención sanitaria | 2023               | <a href="https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2023/11/Anexo-7-IE-B.3.3.2-EC-01-Autorizacion-de-importacion-y-exportacion-de-MBH-V3.0.pdf">https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2023/11/Anexo-7-IE-B.3.3.2-EC-01-Autorizacion-de-importacion-y-exportacion-de-MBH-V3.0.pdf</a>   |
| NTP 628: Riesgo biológico en el transporte de muestras y materiales infecciosos - España  | 2003               | <a href="https://www.insst.es/documents/94886/193702/NTP+628+Riesgo+biol%C3%B3gico+en+el+transporte+de+muestras+y+materiales+infecciosos..pdf/9468af1e-80fe-4c59-bae2-305da131f4b9?version=1.0">https://www.insst.es/documents/94886/193702/NTP+628+Riesgo+biol%C3%B3gico+en+el+transporte+de+muestras+y+materiales+infecciosos..pdf/9468af1e-80fe-4c59-bae2-305da131f4b9?version=1.0</a> |
| Manual para Recepción, Verificación y Transporte de muestras biológicas   | 2021               | <a href="http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/intranet/manual-para-recepcion-verificacion-y-transporte-de-muestras-biologicas/">http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/intranet/manual-para-recepcion-verificacion-y-transporte-de-muestras-biologicas/</a>   |

## Apéndice B. Protocolo de crioconservación

El presente protocolo fue desarrollado para el mantenimiento de cepas bacterianas EBLEE + y EPC +.

**Tabla B 1**

*Equipos, materiales y medios de cultivo empleados en el protocolo*

| <b>EQUIPOS</b>                 | <b>MATERIALES</b>                            | <b>MEDIOS DE CULTIVO</b>                                   |
|--------------------------------|--|--|
| Centrifuga                     | Crioviales estériles.                        | Medio Luria-Bertani "Lb"                                   |
| Autoclave.                     | Matraz de 200 ml de capacidad.               | Caldo de cultivos "Lb"                                     |
| Balanza analítica electrónica. | y/o Micropipetas de 50 µl, 100 µl y 1000 µl. | Solución estéril de Glicerol al 10%.                       |
| Congelador - 80C.              | Guantes quirúrgicos estériles descartables.  | Chromo-agar  |
| Cámara de flujo laminar.       | Cajas Petri estériles                        | Enterosystems 18R  |
| Espectrofotómetro              | Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.              | Agar Mac Conkey.   |
| Vortex                         | Asa de siembra calibrada estéril.            | Reactivos de tinción de GRAM:                              |
|                                | Mechero bunsen                               | Solución de cristal violeta,                               |
|                                | Vaso de precipitado                          | Solución de Lugol, Alcohol etílico, Solución de safranina, |
|                                | Porta objetos y cubre objetos                | aceite de inmersión  |
|                                | Imipenem                                     |  |
|                                | Ceftacidime                                  |  |

### 1. Recuperación de los microorganismos.

Para la recuperación de las cepas bacterianas se tomó un criovial de cultivo primario, se colocó en baño maría a 37°C (Castañeda, 2015), por un tiempo aproximado de cinco (5) minutos.

De cada criovial se tomó 100 µl con micropipeta, previamente agitado con Vórtex a nivel 7 (≈2240rpm) por diez (10) segundos (Castañeda, 2015), colocándolos en un tubo con 10 ml de caldo de cultivo Lb, posteriormente se adicionó el antibiótico (ceftazidima a concentración de 6µg/ml o meropenem con una concentración de 4µg/ml) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022) y se incubó a 35°C ± 2°C de 16-20 horas, hasta alcanzar la fase logarítmica tardía o hasta el inicio de la fase estacionaria (Tibaduiza et al., 2021).

## 2. Control de identidad y pureza

Una vez pasado el tiempo de incubación en el caldo de cultivo, se realizó la tinción de Gram, se sembró en medios de cultivo selectivos (Cromoagar y EMB), y en medio de Lb y mueller hinton con los discos de antibiótico (ceftazidima y meropenem respectivamente) por un tiempo de 16 - 18 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Se compararon las características macroscópicas y microscópicas de las colonias con el fin de garantizar la identidad de la bacteria y su pureza.

## 3. Crioconservación

A partir de colonias aisladas en placas de medio Lb, se tomaron con un asa estéril y se suspendieron en un tubo de ensayo que contenía 2 ml solución salina hasta llegar a una turbidez semejante a uno de la Escala de McFarland, correspondiente a una densidad bacteriana de  $3 \times 10^8$  células (Tibaduiza et al., 2021), posteriormente se inocularon en tubos de tapa rosca que contenían 10 ml del caldo de cultivo Lb con antibiótico (ceftazidima y meropenem respectivamente a las concentraciones antes indicadas). Los cultivos se incubaron  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 8 – 10 horas. Después de este tiempo los tubos de tapa fueron incubados en hielo durante 10 minutos y se separó la biomasa por centrifugación a 3000 r.p.m x 5 minutos. Concluida la centrifugación los sobrenadantes fueron decantados en condiciones asépticas y los precipitados se re suspendieron con 10 mL de caldo de cultivo Lb, se deja incubar 30 – 40 minutos  $37^{\circ}\text{C}$  (Pérez y Sosa, 2010).

Posteriormente con un asa estéril se sembró en medios de cultivos selectivos y se calculó las UFC iniciales por el método de dilución bacteriana (100  $\mu\text{l}$  de la muestra y se colocó en 900  $\mu\text{l}$  de suero fisiológico, etc...). Finalmente, a los tubos de tapa rosca se añadió glicerol (concentración final del 10 %), se distribuyó en 10 crio viales a razón de 1 mL por vial y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . (Gutiérrez-Jiménez et al., 2015; Pérez y Sosa, 2010)

#### 4. Evaluación de las Muestra Post- Conservación

##### 4.1. Descongelación y reactivación de cepas

Se sacaron los crioviales mantenidos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se descongelaron rápidamente a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente con un asa calibrada estéril se sembró en estría por agotamiento en los medios de cultivo selectivos, para evaluar las características macroscópicas y microscópicas de cada cepa bacteriana, y los medios de cultivo Lb y Müller Hilton con el disco de antibiótico (ceftazidima y meropenem respectivamente), incubar todos los medios de cultivo a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 y 48 horas.

##### 4.2. Control de pureza

**Características macroscópicas:** Se observaron colonias procedentes de los medios de cultivos selectivos y diferenciales específicos para cada cepa bacteriana, considerando la forma y tamaño de la colonia, cambios en el color del medio, etc... (Bagatolli, 2017).

**Observación directa:** Se agregaron 2 a 3 gotas de suspensión bacteriana del crio vial en el porta objetos, se colocó el cubreobjeto y se observó al microscopio óptico con el aumento 40 X. Se evalúa la motilidad bacteriana (Bagatolli, 2017).

**Tinción de Gram:** Se realizó la tinción de Gram para verificar las características microscópicas (Gram positivas o negativas) y la homogeneidad de la cepa bacteriana.

##### 4.3. Recuperación

Se colocó 100  $\mu\text{l}$  de la muestra en 900  $\mu\text{l}$  de suero fisiológico (NaCl 0,9% en agua destilada, dilución  $10^{-1}$ ). Se realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$  y se sembró con un asa calibrada de 10  $\mu\text{l}$  en placa de Lb. Se incubó a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 16 – 18hr. Se seleccionaron las placas que presentaban entre 30-300 colonias y se calculó las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL) (Anido, 2015). Para el cálculo de la UFC se emplea la siguiente formula.

#### Figura B 1

*Fórmula para el cálculo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)*

$$\text{ufc/mL} = \text{n}^\circ \text{ de colonias en placa} \times \frac{1}{\text{dilución}} \times \frac{1}{\text{volumen de sembrado(mL)}}$$

#### 4.4. **Determinación del porcentaje de viabilidad**

Para el cálculo de la vitalidad se comparó la concentración inicial bacteriana antes del proceso de crío preservación contra la concentración bacteriana después de cada control, para lo cual se empleó la siguiente formula:

#### **Figura B 2**

*Fórmula para el cálculo del porcentaje de vitalidad*

$$\text{Viabilidad(\%)} = \frac{\frac{\text{ufc}}{\text{mL}} \text{ final}}{\frac{\text{ufc}}{\text{mL}} \text{ inicial}} \times 100$$