

ARTÍCULO ORIGINAL

Criopreservación y almacenamiento de *Mycoplasma* spp.

Anisleidy Pérez Castillo^I, Arsenio Betancourt Bravo^{II}, Arianna Duque Ortiz^I, Evelyn Lobo Rivero^{I*}

^ILaboratorio de Diagnóstico de Micoplasmas (MYCOLAB). Departamento Microbiología-Epidemiología, Dirección de Salud Animal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. ^{II}Departamento de Gestión de la Calidad, Dirección General. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: aperez@censa.edu.cu.

RESUMEN: La criopreservación tiene como principio mantener la viabilidad y la funcionalidad celular a temperaturas bajas, por lo que entender y aplicar adecuadamente la criopreservación del material biológico es fundamental en laboratorios y bancos de células. En el caso de los micoplasmas, el mantenimiento de cultivos viables no es solo una cuestión operacional, sino que constituye un factor esencial en el buen desempeño del trabajo en el laboratorio. Por tal motivo, este trabajo tuvo como objetivo evaluar la viabilidad de cepas de micoplasmas conservadas, por congelación, en diferentes matrices y con varios agentes criopreservantes. Para el estudio se utilizó un cultivo de $5,1 \times 10^8$ UFC/ml de *Mycoplasma hyorhinitis* (seleccionado como cepa tipo), el cual se inoculó en matrices de cultivo celular y líquido ascítico. Ambos tipo de muestras se conservaron a -70°C y -20°C con o sin el empleo de agentes criopreservantes; en este caso, 5% de glicerol y 2.5% de dimetilsulfóxido. A los 3, 30, 60 y 90 días poscongelación se comprobó su viabilidad a través de la siembra en medio Hayflick líquido y sólido. Como resultado se obtuvo que en las matrices congeladas a -20°C y -70°C y con criopreservantes, *Mycoplasma hyorhinitis* se mantuvo viable por un periodo de 90 días, no así en las matrices que no contenían criopreservantes: el comportamiento fue variable en dependencia de la temperatura. Se concluye que la adición de agentes criopreservantes (5% de glicerol o 2.5% de dimetilsulfóxido) preserva la viabilidad de los micoplasmas en las matrices estudiadas durante la congelación y el posterior almacenamiento; también la temperatura de -20°C puede ser utilizada por aquellos laboratorios que carecen de equipamiento con -70°C para la conservación de muestras por un periodo de tres meses, tiempo diseñado para estudios interlaboratorios.

Palabras clave: micoplasmas, criopreservación, almacenamiento, calidad, diagnóstico.

Cryopreservation and storage of *Mycoplasma* spp.

ABSTRACT: Cryopreservation has as a principle to maintain cell viability and functionality at low temperatures; thus, to understand and properly implement cryopreservation of biological material is essential in laboratories and cell banks. In the case of mycoplasmas, maintenance of viable cultures is not only an operational issue, but also an essential factor in the good performance of the laboratory work. Therefore, this study aimed to assess the viability of mycoplasma strains preserved by freezing, in different matrices and several cryopreserving agents. For the study, it was used a culture of *Mycoplasma hyorhinitis* (selected as type strain) with $5,1 \times 10^8$ UFC/ml, which was inoculated into cell culture matrices and ascetic liquid. Both types of samples were stored at -70°C and -20°C by using or not cryopreserving agents; in this case, 5% glycerol and 2.5% dimethylsulfoxide were used. At 3, 30, 60 and 90 days postfreezing, mycoplasma viability was checked by growing them in liquid and solid Hayflick's media. As a result, it was found that in the matrices frozen at -20°C and -70°C and cryopreserving, *Mycoplasma hyorhinitis* remained viable for 90 days, but not in the matrices containing no cryopreserving, where the behavior was variable depending on the temperature. It was concluded that the addition of cryopreserving agents (5% glycerol or 2.5% dimethylsulfoxide) preserved the viability of mycoplasmas in the matrices studied during freezing and subsequent storage; also the temperature of -20°C can be used by those laboratories lacking equipment with -70°C to store samples for three months, period of time designed for interlaboratory studies.

Key words: mycoplasmas, cryopreservation, storage, quality, diagnosis.

*Autor para la correspondencia: Evelyn Lobo Rivero. Correo electrónico: elobo@censa.edu.cu.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico en los laboratorios microbiológicos está sometido a varias fuentes de error; estas pueden evitarse o no y en su conjunto determinan la calidad de un ensayo (1). Un paso fundamental para el desarrollo exitoso lo comprende la conservación de muestras sin que esto afecte su viabilidad cuando estas se cultivan (2). Existen diferentes métodos que se utilizan en la conservación de un cultivo, entre los que se encuentran la criopreservación y la liofilización (3).

La criobiología se refiere a entender los efectos de las bajas temperaturas sobre los sistemas celulares, donde el tiempo biológico es una consecuencia de reacciones bioquímicas y el frío prolonga este tiempo, ya que enlentece dichas reacciones (4). Sin embargo, esto no es un proceso exento de problemas porque puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas que pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar (5). Es importante mencionar que la criopreservación tiene como objetivo mantener la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas (6).

Tanto las variaciones drásticas de temperatura como la congelación lenta resultan una pérdida significativa de la viabilidad celular; ambos procesos conllevan a la formación de cristales de hielo que destruyen las células de forma masiva, por lo que es aconsejable utilizar métodos de congelación rápida o la adición de sustancias criopreservantes o crioprotectoras (7). Estas son sustancias hidrosolubles, de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, lo que implica que se alcance una concentración determinada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor (8).

Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de criopreservantes: los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa) y el dimetilsulfóxido. De igual manera, pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular (9).

La obtención de un protocolo ideal para criopreservar es dependiente del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la célula y el tejido, ya que este proceso está afectado por diferentes variables como especie, tipo y estadio de la célula a congelar (3). Las células tienen diferente tamaño y presentan distinta composición de solutos; en general, el éxito de la criopreservación

es inversamente correlacionado con la complejidad de los sistemas biológicos congelados (7).

En el caso de los micoplasmas, el mantenimiento de los cultivos no es solo una cuestión operacional, sino que constituye un factor esencial en el buen desempeño del trabajo de laboratorio (10). Estos microorganismos presentan una fragilidad fisiológica extrema ante los cambios drásticos de temperatura, pH y concentraciones iónicas del ambiente; por tanto, su mantenimiento se hace difícil en comparación con otros grupos microbianos (11).

Dada la importancia de disponer de cepas viables, identificadas y caracterizadas que nos permita realizar controles de calidad a los procedimientos de detección, aislamiento e identificación que se realizan en el laboratorio, ya sean con fines diagnósticos o con fines investigativos (12), se hace necesario contar con métodos sencillos y seguros que nos permitan mantener viables los cultivos de micoplasmas por tiempos cortos, a largo plazo o de forma indefinida. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de cepas de micoplasmas conservadas por congelación en diferentes matrices, con distintos agentes criopreservantes y a temperaturas inferiores a 0°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa tipo: se trabajó con un cultivo de *Mycoplasma hyorhinis* (NCTC 10130) con una concentración de $5,1 \times 10^8$ UFC/ml. El criterio de selección de esta cepa se basó en su capacidad de citoadsorción a las células, según se refiere en la Farmacopea Europea (13).

Matrices: se utilizaron cultivos celulares y líquido ascítico. Para su selección se tuvo en cuenta el programa de ensayos de aptitud que realiza MYCOLAB (Laboratorio de Referencia de la Organización Mundial de Sanidad Animal para el diagnóstico de la micoplasmosis) y la representatividad de estas matrices entre las muestras que se reciben en el laboratorio (14). En el caso de los cultivos celulares representan el 52.5% y el líquido ascítico el 4,02% de las muestras que se analizan en un año.

Para el cultivo celular se utilizó células VERO, libres de micoplasmas, sembradas en frascos plásticos de 25cm². El medio de cultivo que se usó para el crecimiento de las células fue Medio DMEM (SIGMA, D-5648), libre de antibiótico y micoplasmas, al que se le adicionó suero fetal bovino (SIGMA F 046) al 10%. Cada frasco se sembró con una concentración de 4.5×10^5 células/ml en 10 ml del medio de cultivo. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. En el caso de la matriz de líquido ascítico se

utilizó la fracción LAN-PBS pH 8, que es la que llega a nuestro laboratorio.

Inoculación de *Mycoplasma hyorhinis*: el procedimiento que se siguió aparece descrito por Masover y Becker (15). La contaminación de las matrices se realizó con 0.5 ml de un cultivo de *Mycoplasma hyorhinis* a una concentración de 5.1×10^8 UFC/ml; posteriormente se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.

La observación diaria de las matrices se realizó durante 72 horas y, al término de este tiempo, se sembraron en Agar sangre para descartar posibles contaminaciones bacterianas y en medio Hayflick líquido y sólido para comprobar la viabilidad de la cepa según lo describe Poveda (16). La confección del medio de cultivo Hayflick y el Agar sangre se realizó como lo describe la Farmacopea Europea (13).

Criopreservantes: en el estudio se empleó glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO) en los por cientos referidos por Ávila-Portillo *et al.* (3).

Paneles de muestras:

Para el análisis de las diferentes combinaciones de matriz, criopreservante y temperatura de congelación se elaboraron seis paneles de trabajo. Cada panel contó con cinco alícuotas en viales Eppendorf (1.5 ml), para evitar así el deterioro de las muestras por las sucesivas descongelaciones. Una vez que se le adicionó el criopreservante, se homogenizó en vortex a 2800rpm, según lo recomienda Avila-Portillo (3) y divididas en partes iguales para ser conservadas a -20 °C y -70 °C. La constitución de los paneles quedó de la siguiente forma:

- a) Cultivo celular VERO + 5% de glicerol
- b) Cultivo celular VERO + 2.5% de DMSO
- c) Cultivo celular VERO sin criopreservante
- d) Líquido ascítico + 5% de glicerol
- e) Líquido ascítico + 2.5% de DMSO
- f) Líquido ascítico sin criopreservante

Estudios de viabilidad: se llevaron a cabo ensayos a distintos tiempos: 3, 30, 60 y 90 días. En cada tiempo, y por cada combinación de matriz, criopreservante y temperatura, se extrajo un vial. La descongelación se realizó a 37°C durante 30 minutos (3); luego de homogeneizar los viales, se sembró 0.3 mL de la muestra en 2.7 ml de medio caldo Hayflick y se incubó a 37°C por durante 21 días. Al unísono se sembró 0.1 ml de la muestra en medio sólido Hayflick; la muestra se distribuyó en la placa con una varilla de

cristal en «L» estéril, incubando en condiciones de microaerofilia (5% de CO₂) y anaerobiosis (10% de CO₂ y 90% de N₂) a 37°C durante 21 días. En todos los casos se utilizaron controles internos negativos y positivos, según lo describe Poveda (16).

Se evaluó el resultado de forma cualitativa mediante el examen visual; los cambios de color y el pH en los tubos se observaron cada 24 horas, mientras que el crecimiento de colonias típicas de micoplasmas en las placas se visualizaron en el microscopio óptico cada 48 horas, según lo referido en Protocols Mycoplasmas (17). En todos los casos, antes y después de la descongelación se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias para comprobar el comportamiento de la viabilidad y el recobrado de la cepa en estudio.

Análisis estadístico: el porcentaje de viabilidad se calculó teniendo en cuenta las muestras viables del total de muestras trabajadas. Se realizó una comparación múltiple de proporciones con el software estadístico CompaProWin 2.0.s.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conocimiento de las características del cultivo es esencial en la elección del método de preservación del material biológico (18). La identidad del mismo puede conocerse sobre la base de sus condiciones de crecimiento en uno o más medios específicos, teniendo en cuenta las propiedades macro y microscópicas exhibidas, o sobre la base de una evaluación más exhaustiva con el empleo de ensayos bioquímicos, biológicos, inmunológicos y genéticos (2).

En el mantenimiento, tanto de las cepas bacterianas como de matrices biológicas, es necesario garantizar la pureza y, por tanto, evitar que se produzcan contaminaciones con otros microorganismos durante el proceso de conservación; de esta manera se garantiza la confiabilidad del resultado (18). En nuestro caso, los controles que se realizaron en Agar sangre fueron negativos en todos los pasos; esto evidenció que el 100% de las matrices estaban solamente contaminadas por micoplasmas y no por otro género bacteriano; resultado que refuerza la importancia de realizar los controles internos intermedios en cada proceso para garantizar la pureza de las matrices y los inóculos que se quieren conservar (2).

Como es conocido, los métodos de mantenimiento y conservación varían en dependencia del material biológico que se desee preservar (11). Entre estos sobresalen la liofilización y la criopreservación, a diferentes temperaturas con o sin agentes criopreservantes (ACP)

(2), donde el glicerol y el DMSO son los que más se emplean (3). En tal sentido, existen varios procedimientos descritos para el mantenimiento y la conservación de cepas de micoplasmas; sin embargo, no se tienen referencias sobre la criopreservación de matrices inoculadas con estos microorganismos (10).

En nuestro estudio, el mantenimiento y la conservación de las matrices con ACP, por un periodo de 90 días a -20°C y -70°C , no afectó la viabilidad de la cepa. Este resultado no coincide con lo descrito por Lin y Kleven (19), quienes observaron que la conservación de cepa F de *Mycoplasma gallisepticum* a -60°C y -20°C en medio líquido con ACP (10% de glicerol y 8% de dimetilsulfóxido) afectó su viabilidad. La diferencia entre estos resultados puede explicarse, en primer lugar, por los porcentajes de utilización de los ACP, pues se conoce que las concentraciones elevadas de estos agentes afectan drásticamente la supervivencia de las cepas por aumento de la osmolaridad del medio y, por consiguiente, la producción de un estrés osmótico sobre las células (20).

Un segundo análisis va dirigido al tipo de cepa que se seleccionó para estos estudios, pues algunos autores refieren que la capacidad de cada cepa de recobrase después de conservarlas con ACP depende de otras características individuales que aparentemente son independientes (20; 21); de igual manera, la exposición a las tensiones en frío, osmótica y otros puede aumentar la supervivencia a los ciclos de congelación-descongelación, presumiblemente debido a cambios en los niveles de determinadas proteínas o a otros componentes celulares que brindan tolerancia a cada cepa en particular (22).

En la Tabla 1 aparece el porcentaje de viabilidad de *M. hyorhinis* en las diferentes combinaciones de matrices y ACP a -20°C . Como se puede apreciar en las matrices donde no se utilizó ACP, la viabilidad de la cepa disminuyó rápidamente a partir del primer mes de conservada y se obtuvo una recuperación de $3,5 \times 10^5$ UFC/ml. Estos resultados se corresponden con los descritos por Amores *et al.* (23), quienes refieren una reducción considerable en la viabilidad de micoplasmas luego de congelar las muestras de leche por cuatro semanas a -20°C sin criopreservantes.

La posible explicación a este comportamiento está dada por la producción de la lesión celular crioinducida, debido a la formación de hielo intracelular y al estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación (3). Durante este proceso el volumen se reduce con relación al aumento de la osmolaridad extracelular, pues a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad, que afectarán con esto la viabilidad del microorganismo (22).

Pese a considerarse la criopreservación un método muy eficaz, se debe tener en cuenta que durante este proceso se producen fenómenos físico-químicos que pueden afectar la viabilidad de las cepas, por lo que se deben estabilizar los organoides para disminuir la posibilidad de muerte celular. De ahí la importancia del uso de crioprotectores para aumentar la resistencia de las bacterias al estrés sometido; además, la selección de los mismos depende de la cepa a conservar (3, 8).

TABLA 1. Porcentaje de viabilidad de *Mycoplasma hyorhinis* en las diferentes combinaciones de matrices y agentes criopreservantes a -20°C . / *Viability percentage of Mycoplasma hyorhinis* in different combinations of matrices and cryopreserving agents at -20°C .

Combinaciones	Tiempo de conservación (días)			
	3	30	60	90
Cultivo celular Vero + 5% de glicerol	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Cultivo celular Vero + 2.5% de DMSO	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Cultivo celular sin crioprotector	100 ^a	80 ^a	60 ^b	40 ^b
Líquido ascítico + 5% de glicerol	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Líquido ascítico + 2.5% de DMSO	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Líquido ascítico sin crioprotector	100 ^a	80 ^a	60 ^b	40 ^b

Nota: Letras diferentes, en una misma columna, indica diferencia significativa ($p \leq 0,05$)

En tal sentido, no existe un agente criopreservante universal, pues los ACP que pueden emplearse son variados. Hay pocos trabajos que exploren el uso adecuado de un criopreservante para una especie de microorganismo en específico; no obstante, numerosos datos provenientes de diversos laboratorios demuestran que los más usados son el glicerol y el dimetilsulfóxido (24).

En nuestro caso, en las matrices donde se utilizó 5% de glicerol y 2,5% DMSO no se afectó la viabilidad de la cepa ni se encontraron diferencias significativas ($p > 0.01$) entre las combinaciones de ACP y las matrices. Estos resultados coinciden con los expuestos por Amores *et al.* (25), quienes no hallaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la viabilidad de cepas de micoplasmas cuando se usaron métodos de conservación con el empleo de ACP.

Con relación al título del inóculo, este se determinó antes y después del periodo de almacenamiento. En las matrices congeladas a -70°C y a -20°C con criopreservantes, el título inicial del inóculo tuvo poca disminución al finalizar el ensayo de 5.1×10^8 a $2,8 \times 10^7$ UFC/ml. Similar resultado obtuvo Cheng *et al.* (26) durante el almacenamiento por ocho semanas a -30°C de micoplasmas viables, encontrando poca o ninguna reducción en los títulos del inóculo.

Este comportamiento se explica debido a que los ACP son moléculas que, en los por cientos adecuados, mejoran la estabilidad de las cepas al reducir al mínimo el contenido de agua intracelular, evitar la vitrificación y proteger las macromoléculas en el ambiente interno de la célula (20). Una vez que los crioprotectores ingresan al citoplasma en favor del

gradiente de concentración, el fluido intracelular puede ser superenfriado, sin que ocurra la formación de cristales de hielo, ya que estas sustancias disminuyen el punto de congelación por medio de la reducción en la interacción entre las moléculas de agua; a estos rangos de temperaturas los cristales de hielo comienzan a formarse en el medio externo (21).

Particularmente el glicerol se reporta como una de los mejores ACP, pues sus características moleculares le permiten simular una vitrificación alrededor de la bacteria, lo que impide que la formación de cristales de hielo lesione las membranas citoplasmáticas (27). El DMSO tiene la habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, así como la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana (3), su bajo peso molecular permite la entrada rápida a través de la membrana celular (9).

Como se menciona en aspectos anteriores, los niveles de la viabilidad después de la congelación pueden variar de acuerdo con numerosos factores, entre los que se incluyen la eficacia del agente crioprotector y las propiedades de la cepa y las matrices conservadas (20). La Tabla 2 muestra el comportamiento de la viabilidad de la cepa en las diferentes matrices con y sin ACP a -70°C . Como se puede apreciar no hubo diferencia entre las matrices de cultivo celular con y sin ACP, en relación con la sobrevivencia de *M. hyorhinis*.

Este comportamiento puede explicarse por el efecto matriz, ya que la membrana plasmática de estas células tiene una estructura organizada según el modelo de mosaico fluido, donde los lípidos (colesterol y ácidos grasos), como componentes más abundantes

TABLA 2. Porcentaje de viabilidad de *Mycoplasma hyorhinis* frente a las diferentes combinaciones de matrices y agentes criopreservantes a -70°C / *Viability percentage of Mycoplasma hyorhinis in different combinations of matrices and cryopreserving agents at -70°C .*

Combinaciones	Tiempo de conservación (días)			
	3	30	60	90
Cultivo celular Vero + 5% de glicerol	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Cultivo celular Vero + 2.5% de DMSO	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Cultivo celular sin crioprotector	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Líquido ascítico + 5% de glicerol	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Líquido ascítico + 2.5% de DMSO	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Líquido ascítico sin crioprotector	100 ^a	100 ^a	80 ^a	80 ^a

Nota: Letras diferentes, en una misma columna, indica diferencia significativa ($p \leq 0,05$)

de la membrana plasmática, determinan la fluidez y la resistencia de la membrana durante los procesos de criopreservación (3), a esto se le une la capacidad de citoadsorción de *M. hyorhinis* a las células, lo que influye favorablemente en su viabilidad después de la descongelación.

Por otra parte, cuando se compara el por ciento de supervivencia de *M. hyorhinis* a -20°C y -70°C en matrices sin ACP, se observa una mayor viabilidad en aquellas conservadas a -70°C ; esto se puede deber al fenómeno de vitrificación, pues a esta temperatura las células responden con la formación de un sólido amorfo, en lugar de formar hielo intra y extracelular; la formación de este sólido, que se conoce como vítreo, evita la movilidad de las moléculas que provocan las reacciones metabólicas y con ello la muerte celular (28).

Los altos niveles de supervivencia de *M. hyorhinis* en matrices con ACP obtenidos en nuestro trabajo concuerdan con los descritos por Boonyayatra *et al.* (29), quienes al adicionar ACP a muestras de leche lograron recuperar especies de micoplasmas hasta un $0,4 \log_{10}/\text{UFC}/\text{ml}$. Aunque este resultado es importante, tanto desde el punto de vista biofísico como práctico, es necesario señalar que estos niveles de supervivencia varían entre las diferentes especies y géneros microbianos, por lo que el estudio de la estabilidad a la congelación es un paso obligado, en cada laboratorio, para la conservación de otras cepas bacterianas particulares (28).

Los resultados demuestran que la adición de 5% de glicerol y 2,5% de DMSO en las diferentes matrices estudiadas favorece la viabilidad de micoplasma a temperaturas de congelación, tanto de -20°C como de -70°C , con niveles de recobrado aceptables. Esto brinda la posibilidad para aquellos laboratorios que no cuentan con el equipamiento de conservación a -70°C , de conservar las matrices a -20°C y poder realizar estudios interlaboratorios como parte de la evaluación de su desempeño en la detección de micoplasmas basado en el método del cultivo microbiológico. A partir de estos resultados se recomienda ampliar el estudio a otras matrices y cepas de micoplasmas.

REFERENCIAS

1. Valdés O. Premisas para el establecimiento de un Sistema de Control de Calidad en laboratorios químicos. *Rev Cubana Normalización*. 1987;1:16.
2. García MD, Uruburu F. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*. 2000;30:6-12.
3. Ávila-portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, Delgado LG, Gómez C, Lozano JM, Reguero MT. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2006;57(4):291-300.
4. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*. 2000;53(1):59-72.
5. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 2004;48(2):146-156.
6. Boiso I. Principios básicos de Criobiología. *Revista Iberoamerica de Fertilidad*. 2001;18(4):20-22.
7. Loken SD, Demetrick DJ. A novel method for freezing and storing research tissue bank specimens. *Hum Pathol*. 2005;36(9):977-980.
8. Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser JK. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod*. 2000;15(2):335-343.
9. Devireddy RV, Swanlund DJ, Roberts KP, Pryor JL, Bischof JC. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Hum Reprod*. 2000;15(5):1125-1135.
10. Windsor D, Windsor H. Quality-control testing of mycoplasma medium. En: Miles RJ y Nicholas RA (ed). *Methods Mol Biol*. 2002;104:61-67.
11. Leach RH. Preservation of mycoplasma culture and culture collection. En: Razin, S y Tully JG (ed). 1983. *Methods in Mycoplasmaology*. pp.351-353.
12. Zamora LM. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. [Tesis de Doctorado]. Universitat de Girona: ISBN 84-689-3756-8 GI-1012-2005;2003.hh.25-36.
13. Farmacopea Europea. *Methods of analysis. Mycoplasmas*. 2014; Ed. 8.0, Appendix 2.6.7.

14. Manual de Calidad del Laboratorio de Diagnóstico de Micoplasmas (MYCOLAB). 2015. Ed 03 Versión 4. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba.
15. Masover GK, Becker FA. Detection of mycoplasmas in cell cultures by cultural methods. *Methods Mol Biol.* 1998;104:207-15.
16. Poveda JB. Biochemical Characteristic in *Mycoplasma* identification. In: Miles RJ, Nicholas RA, editors. *Methods in Molecular Biology. Mycoplasma Protocols.* New Jersey: Humana Press;1998. pp.69-79.
17. Masover GK, Becker FA. Detection of mycoplasmas in cell cultures by cultural methods. *Methods Mol Biol.* 1998;104:207-2 15.
18. Belmonte A, Noguera MG, Contigiani MB, Gandini V, Sutich EG. Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. *Bioquímica y Patología Clínica.* 2008;72(2):15-18.
19. Lin MY, Kleven SH. Viability of the F Strain of *Mycoplasma gallisepticum* after Storage in the Frozen or Lyophilized State. *Avian Dis.* 1982;26(2):426-430.
20. Pérez-reytor D, Sosa R. Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de *Escherichia coli* K12 de uso frecuente en biotecnología. *VacciMonitor.* 2010;19(2):11-17.
21. Robles M, Medina V, Velasco Y, Cruz P. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 2005;18(1):34-48.
22. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J Gen Appl Microbiol.* 2008;54(1):9-24.
23. Amores J, Sanchez A, Martin AG, Corrales JC, Contreras A, de la Fe C. Viability of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in goat milk samples stored under different conditions. *Vet Microbiol.* 2010;145(3-4):347-350.
24. Morales-García Y, Duque E, Rodríguez-Andrade O, De J, Martínez-Contreras R, Pérez-Terrón R, Muñoz Rojas J. Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. *BioTecnología.* 2010;14(2):11-29.
25. Amores J, de la Fe C, Gómez-Martín Á, Corrales JC, Contreras A, Sánchez A. Preserved goat milk as a valid sample for the PCR detection of *Mycoplasma agalactiae*. *Small Ruminant Res.* 2011;99(1):61-64.
26. Cheng H-S, Shen C-W, Wang S-R. Effect of Storage Conditions on Detection of *Mycoplasma* in Biopharmaceutical Products. *In Vitro Cell Dev An.* 2007;43(3/4):113-119.
27. Sánchez, Sánchez L, Corrales L. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *NOVA.* 2008;3(4):21-29.
28. Celestinos M, Gatica R. Vitricación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Arch Med Vet.* 2002;34(2):157-165.
29. Boonyayatra S, Fox LK, Besser TE, Sawant A, Gay JM. Effects of storage methods on the recovery of *Mycoplasma* species from milk samples. *Vet Microbiol.* 2010;144(1-2):210-213.

Recibido: 5-1-2016.

Aceptado: 9-5-2016.