

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Ligia Denise Torres Higuera¹, Diego Ortiz Ortega², José Luis Rodríguez Bautista³, Rocio Esperanza Patiño Burbano⁴

Comparison of three methods for the cryopreservation of *Leptospira* strains in Liquid Nitrogen

ABSTRACT

Traditional methods for preservation of bacteria belonging to the genus *Leptospira*, by frequent passages in culture media, are expensive, time consuming and may cause losses in genetic characteristics of the strains. In the present study a cryoprotective technique in liquid nitrogen was standardized for six serovars of *Leptospira* (Pomona, Hardjoprajitno, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa and Bratislava), by using as agent cryopreservative a 2% Dimethyl Sulfoxide (final concentration) solution in a 1°C/min rate of cooling, which was compared with 0.2% and 10% glycerol solutions (final concentrations). All three cryopreservative methods were evaluated by the determination of the bacterial viability pre and post freezing. In 0, 30, 90, 180, 270 and 360 days bacterial counting was done using a counting chamber. Analysis of variance (ANOVA) and the Bonferroni method were used for the analysis of the results. A final concentration of 10% Glycerol in the cryopreservative reduced the viability of the serovars. The liquid nitrogen cryopreservation technique either with 2% Dimethyl Sulfoxide or 0.2% (final concentrations) glycerol, allowed the successful preservation of all six serovars of *Leptospira* during a year. The cryopreservative method ensured the conservation of the bacterial viability and was less expensive and less time consuming. Additionally, this method is a better method of long term conservation when compared with the traditional maintenance by serial subcultivation.

Keywords: Bacteria, glycerol, deep freezing, viability, chamber.

Radicado: 29 de octubre de 2008
Aceptado: 9 de diciembre de 2008

¹ Investigadora. Corpoica, Ceisa, Bogotá. ltorres@corpoica.org.co

² Investigador. Corpoica, Ceisa, Bogotá. dortiz@corpoica.org.co

³ Investigador. Corpoica, Ceisa, Bogotá. jlrodriguez@corpoica.org.co

⁴ Investigadora. Corpoica, Ceisa, Bogotá. rpatino@corpoica.org.co

Comparación de tres tratamientos para la crioconservación de serovares de *Leptospira* en nitrógeno líquido

RESUMEN

La preservación de bacterias pertenecientes al género *Leptospira* por métodos tradicionales -repiques frecuentes del cultivo- es costosa, dispendiosa y puede generar pérdidas de las características genéticas del cultivo. En el presente estudio se estandarizó una técnica de crioconservación en nitrógeno líquido para seis serovares de *Leptospira* -Pomona, Hardjoprajitno, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa y Bratislava-, usando como agente crioprotector el dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final de 2% y una tasa de enfriamiento de 1°C/min y se comparó con el uso de glicerol a concentraciones finales de 0,2% y 10%. Los tres métodos se evaluaron mediante la determinación de la viabilidad bacteriana antes y después de la congelación (a 0, 30, 90, 180, 270 y 360 días) por recuento bacteriano en cámara. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación por parejas usando la prueba de Bonferroni. La presencia de glicerol al 10% (concentración final) en el medio crioconservante disminuyó la viabilidad de los serovares. La técnica de criopreservación en nitrógeno líquido con DMSO al 2% y glicerol al 0,2% (concentraciones finales) permitió la exitosa conservación de los seis serovares de *Leptospira*. El método de criopreservación aseguró una alta viabilidad, lo que disminuyó costos y tiempo en su ejecución y demostró ser un mejor método de conservación a largo plazo en relación con el mantenimiento tradicional por subcultivos periódicos.

Palabras clave: bacterias, glicerol, ultracongelación, viabilidad, cámara.

INTRODUCCIÓN

CORPOICA, en las instalaciones del Centro de Investigación Ceisa, tiene a su cargo el mantenimiento y conservación del subsistema Banco de Germoplasma de Microorganismos de Interés en Salud Animal Bacterias y Virus BGMSA-BV, el cual cuenta entre otros microorganismos con el cepario de *Leptospira*. La conservación de estos serovares requiere, para su mantenimiento, pases seriados en medios de cultivo, incluyendo varias réplicas por cepa, en cortos periodos de tiempo (Myers, 1985; Levett, 2003; Bharti *et al.*, 2003). Los subcultivos seriados de un gran número de cepas presentan entre otros inconvenientes el riesgo de contaminación cruzada entre los diferentes cultivos o pérdida de la viabilidad de la cepa; por lo tanto, con el fin de evitar su pérdida ya sea por contaminación o deshidratación del cultivo es necesario verificar periódicamente cada serovar (Levett, 2001; Bomfim *et al.*, 2007 y OIE, 2008). Este sistema de conservación es el que tradicionalmente se ha utilizado en Colombia; sin embargo, es un método costoso, dispendioso, que demanda tiempo y puede ocasionar pérdida de la

cepa por contaminación o alteración de sus características genéticas (Coghlan, 1967). La adecuada conservación de los microorganismos implica mantener la cepa viva, en estado puro y genéticamente estable (Shung-Chang Jong, 1989; Bajaj, 1995).

Investigaciones realizadas por Linscott y Boack (1960) y Coghlan (1967) demuestran que a pesar de haberse logrado preservar leptospiras a bajas temperaturas (-70°C) utilizando como crioprotector el glicerol, se afectó la viabilidad de los microorganismos. Sin embargo, varios investigadores (Stalheim, 1971; Alexander *et al.*, 1972; Palit *et al.*, 1986 y Reed *et al.*, 2000) crioconservaron leptospiras en nitrógeno líquido (-196°C), por un largo periodo, manteniendo la viabilidad y las características genéticas de estos microorganismos.

El objetivo principal de este trabajo fue estandarizar una metodología para la adecuada conservación en nitrógeno líquido de serovares de *Leptospira* pertenecientes al Banco de Germoplasma de Microorganismos de Interés en Salud Animal Bacterias y Virus (BGMSA-BV),

como sistema de conservación a largo plazo. Así mismo, se evaluó el efecto crioprotector de dos concentraciones finales de glicerol (0,2% y 10%) y una de DMSO (2%), mediante el recuento en cámara Kova Glasstic® (Hycor Biomedical Inc, Estados Unidos), de leptospiras móviles por microscopía de campo oscuro, estableciendo la concentración de leptospiras antes y después de la congelación en nitrógeno líquido, durante un año de seguimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Serovares

Para la evaluación cuantitativa de la viabilidad de los microorganismos después de diferentes periodos de conservación en nitrógeno líquido, se utilizaron seis serovares de *Leptospira* pertenecientes al BGMSA-BV. Los serovares utilizados fueron: Pomona (Lep 025), Hardjoprajitno (Lep 016), Canicola (Lep 009), Icterohaemorrhagiae (Lep 018), Grypothyphosa (Lep 014), Bratislava (Lep007).

Cultivos bacterianos

Los serovares de *Leptospira* se inocularon en 35 mL de medio líquido EMJH Difco Bacto™ (New Jersey, USA) (Meiwan, 2007) y se incubaron de 7 a 9 días a una temperatura de 30°C, en oscuridad y agitación continua (150 rpm) hasta obtener una concentración de por lo menos 10⁸ cel/mL (Faine *et al.*, 1999). Un número alto de células en pre congelación garantiza un mayor porcentaje de recuperación (Heckly, 1978). Cultivos jóvenes, activamente móviles, con la concentración anterior se consideraron adecuados para ser criopreservados. La pureza de cada cultivo se estableció sobre caldo de infusión de cerebro y corazón (brain heart infusion -BHI), agar triptosa, agar sangre y agar saboureaud.

Recuento de leptospiras en cámara

La concentración de leptospiras en los cultivos, antes y después de la congelación en nitrógeno líquido se estableció mediante recuento por microscopía de campo oscuro, usando la cámara de recuento Kova Glasstic® (Hycor Biomedical Inc, Estados Unidos) (Gallego, 2001). Los cultivos de leptospiras de 7 a 10 días

de crecimiento se colocaron a 4°C durante 12 horas con el fin de disminuir el movimiento activo y facilitar el conteo (Turner, 1970). Al cabo de este tiempo se estableció la dilución hasta obtener de 20 a 30 leptospiras por campo, se contaron 10 campos y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Cel / mL} = \frac{\text{Células contadas}}{\text{Campos observados (10)}} \times 90 (\text{factor de multiplicación}) \times \text{Dilución} \times 1000$$

Técnica de congelación

Cada cultivo con un recuento de por lo menos 10⁸ cel/mL se mezcló con DMSO estéril (Sigma Aldrich St. Louis USA) para una concentración final de 2%, y con glicerol (Sigma Aldrich St. Louis USA) en cantidad suficiente para concentraciones de 0,2% y de 10%. De cada mezcla, se dispensó 1 mL en crioviales de 2 mL (20 viales por cada concentración de criopreservante). Las mezclas se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos (Simione, 1998), al cabo de los cuales se congelaron gradualmente a -70°C durante cuatro horas en isopropanol puro, utilizando el recipiente para congelación (Nalgene Nunc International Corporation New Jersey USA), sistema que permite obtener un ritmo de congelación controlado de 1°C/min; finalmente se transfirieron a los tanques de nitrógeno líquido a -196°C.

Prueba de viabilidad

De cada cepa se extrajeron del tanque de nitrógeno tres viales por cada concentración de crioprotector y se sometieron a descongelamiento rápido a 37°C en baño de agua con agitación. De cada vial descongelado se colocaron rápidamente 0,5 mL en 4,5 mL de medio EMJH para minimizar la exposición al agente crioprotector, sin necesidad de hacer diluciones (Simione, 1998). Los medios con cada cepa se incubaron a 30°C de 1 a 3 semanas. La concentración de leptospiras viables se determinó por conteo microscópico en cámara, antes y luego sobre los cultivos criopreservados a intervalos de 30, 90, 180, 270 y 360 días; sólo se contaron organismos móviles (Alexander *et al.*, 1972).

Tratamiento estadístico

Los datos obtenidos sobre la viabilidad de los serovares de *Leptospira* duran-

te un año de seguimiento con los tres tratamientos (DMSO al 2%, glicerol al 0,2% y glicerol al 10% como concentraciones finales) se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y se les realizó la comparación por parejas utilizando la prueba de Bonferroni mediante el paquete estadístico XLSTAT®.

RESULTADOS

Los resultados demostraron que con el uso de DMSO al 2% como crioprotector, después de un año en criopreservación, se mantuvo la viabilidad de los seis serovares de *Leptospira* incluidos en el estudio. El glicerol a una concentración de 0,2%, mantuvo la viabilidad de cinco de los serovares utilizados; el serovar Bratislava presentó un menor porcentaje de viabilidad cuando se usó el glicerol a esta concentración, comportamiento diferente al resto de los serovares evaluados. El menor porcentaje de viabilidad se observó en términos generales cuando se usó como crioprotector el glicerol a una concentración final del 10%, con una viabilidad cercana al 55%. En la figura 1 se observa porcentaje de recuperación de cada serovar después del proceso de congelación, utilizando los tres tratamientos (DMSO al 2%, glicerol al 0,2% y glicerol al 10%).

Al comparar los tratamientos utilizados en este estudio (DMSO al 2%, glicerol al 0,2% y glicerol al 10%) por recuento en cámara de leptospiras, después de un año de seguimiento, se encontró diferencia significativa ($p < 0,001$) entre el DMSO a una concentración del 2% y glicerol al 10%. Entre el DMSO y el glicerol al 0,2% no se encontró diferencia significativa ($p > 0,05$); sin embargo, como se puede apreciar en la tabla 1 y figura 2, el DMSO es el tratamiento que mostró mejores porcentajes de supervivencia de estos microorganismos.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se describe un método simple para la conservación a largo plazo de serovares de *Leptospira*. Los resultados encontrados confirman los obtenidos por Stalheim (1971) y Palit y colaboradores (1986), quienes reportaron que las leptospiras pueden ser criopreser-

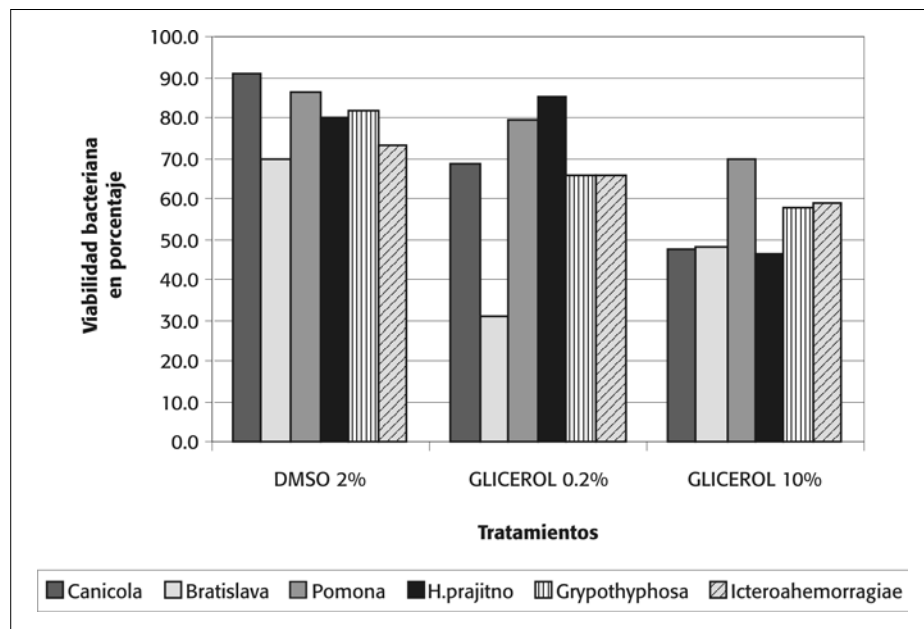


Figura 1. Porcentaje de viabilidad obtenido de seis serovares de *Leptospira*, utilizando como crioprotectores DMSO al 2%, glicerol al 0,2% y al 10% como concentración final

Tabla 1. Recuento de leptospiras antes y después de la congelación en nitrógeno líquido utilizando dimetil sulfóxido al 2%, glicerol al 0,2% y al 10%, al final de un año de seguimiento

Cepa	Recuento pre congelación/mL	Recuento pos congelación/mL 360 días		
		DMSO 2%	Glicerol 0,2%	Glicerol 10%
Pomona	$9,405 \times 10^8$	$7,74 \times 10^8$	$6,57 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$
Hardjoprajitno	$9,90 \times 10^8$	$6,75 \times 10^8$	$7,49 \times 10^8$	$2,40 \times 10^8$
Canicola	$8,6 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
Icterohaemorrhagiae	$1,3 \times 10^9$	$8,5 \times 10^8$	$6,9 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$
Gripotyphosa	$1,15 \times 10^9$	$8,9 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$
Bratislava	$9,3 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$	$9,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$

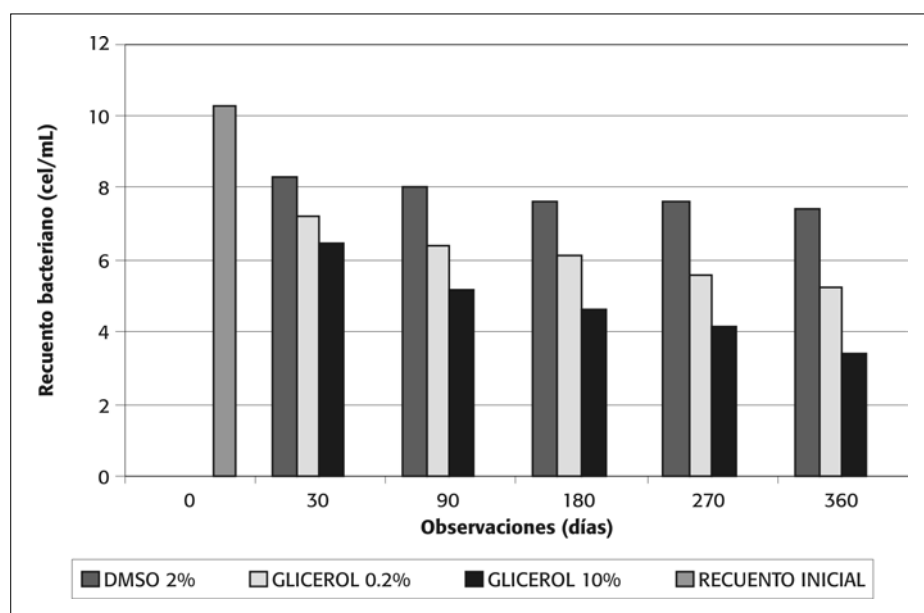


Figura 2. Efecto de los tres tratamientos (DMSO al 2%, glicerol al 0,2% y al 10%) sobre la viabilidad de seis serovares de *Leptospira* durante un año de seguimiento

vadas exitosamente por largos periodos de tiempo en nitrógeno líquido, usando como agente crioprotector DMSO en bajas concentraciones. El método se pudo aplicar a las seis cepas del estudio con resultados satisfactorios en cuanto al porcentaje de recuperación del microorganismo después de un año de seguimiento.

En este estudio se decidió probar como crioprotectores para la conservación de cepas de *Leptospira* el DMSO al 2% y el glicerol al 0,2% y al 10% (concentraciones finales) por dos razones principalmente: en primer lugar porque de acuerdo con Hubaleck (2003) son los dos agentes crioprotectores que han demostrado tener mayor éxito en la crioconservación de microorganismos (bacterias, virus, hongos, algas y protozoos); en segundo lugar, para verificar los resultados obtenidos por Palit en 1986, quien encontró que el DMSO al 2% era menos tóxico que el glicerol aun en concentraciones tan pequeñas como 0,2%.

Los resultados encontrados demostraron que el DMSO al 2% y el glicerol al 0,2% tuvieron un efecto crioprotector similar y que en términos generales el DMSO permitió un mayor porcentaje de recuperación posterior a la crioconservación en cinco de los seis serovares estudiados. Los resultados mencionados se debieron posiblemente a que el DMSO por ser un poderoso solvente tiene mayor capacidad de penetración pasando rápidamente a través de la membrana celular, ejerciendo su efecto crioprotector intracelular y extracelularmente, disminuyendo el efecto adverso que produce la concentración de solutos (Shung-Chang Jong, 1989). Otro factor que se controló fue permitir un periodo de equilibrio entre la suspensión celular y el crioprotector, con el fin de permitir que éste penetre en el interior de la célula por un periodo no mayor de 30 minutos para evitar efectos tóxicos del crioprotector (Hubaleck, 2003). Finalmente, porque al buscar la concentración óptima, se pretendió minimizar el potencial efecto tóxico que todo agente crioprotector ejerce sobre las células en altas concentraciones (Fahy, 1986).

Debido a que estudios preliminares indicaron que el congelamiento rápido colocando las cepas directamente en nitrógeno líquido no fue satisfactorio en

la conservación de cepas de *Leptospira* (Linscott y Boack, 1960; Stalheim, 1971 y Reed *et al.*, 2000), en este ensayo se utilizó un congelamiento lento y controlado (1°C/min). Este método de congelación ha mostrado resultados exitosos en la recuperación y viabilidad de la mayoría de los sistemas biológicos donde ha sido aplicado (Mazur, 1970), incluyendo la recuperación de serovares de *Leptospira*.

El congelamiento lento aumenta la deshidratación celular, impide la formación de cristales de hielo intracelular -que pueden provocar graves daños en la membrana celular- e incrementa la concentración de solutos en el espacio intracelular. Para retrasar el congelamiento intracelular y minimizar el efecto de los solutos se usa el DMSO, el cual tiene gran capacidad de penetración celular (Simione, 1998). Es importante tener en cuenta que la tasa de congelación depende del volumen de la suspensión celular en el vial; la cantidad suficiente para la preservación de una cepa bacteriana es de 0,5 a 1 mL en 99% de los casos (Donev, 2002), razón por la cual se almacenó 1,0 mL de cultivo, para asegurar que el proceso de congelación fuese uniforme.

Estudios recientes han demostrado que un congelamiento excesivamente rápido (vitrificación) permite un alto porcentaje de recuperación de la viabilidad de varios sistemas biológicos, similar al obtenido con un congelamiento lento y controlado (Dumont *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta que este tipo de estudios no se han realizado con cepas de *Leptospira*, sería interesante llevarlos a cabo. En general, los mejores resultados en la supervivencia y recuperación de muchos cultivos de bacterias se han obtenido usando congelamiento lento y descongelamiento rápido (37°C) (Shung-Chang Jong, 1989). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los de Reed y colaboradores (2000), quienes encontraron que las óptimas condiciones de criopreservación se consiguieron con un congelamiento lento y utilizando glicerol o DMSO en concentraciones menores al 5%.

Las muestras se almacenaron en la fase líquida del tanque de nitrógeno (-196°C), puesto que a más baja temperatura, mayor es el tiempo que pueden durar almacena-

das; además, la estabilidad de las células congeladas no se puede asegurar a menos que el material sea mantenido por debajo de los -130°C (Mazur, 1984).

Aunque el efecto de la edad de los cultivos sobre la viabilidad de las cepas de *Leptospira* durante el proceso de criopreservación no fue determinado, la edad de los cultivos utilizados en este estudio fue de 7 a 9 días. En cultivos de más edad (final de la fase logarítmica y comienzos de la fase estacionaria) la lisis celular puede aumentar debido a la actividad de las lipasas generadas durante el crecimiento, las cuales pueden generar lípidos tóxicos (Faine *et al.*, 1999).

Otro factor crítico que se incluyó en este estudio fue la concentración celular. Las seis cepas de este estudio se congelaron con un recuento inicial de 10⁹ cel /mL, ya que generalmente a mayor número de células presentes antes de la congelación, mayor será el porcentaje de recuperación. Para la mayoría de las bacterias una concentración aproximada entre 10⁷ y 10⁸ cel/mL es suficiente para una adecuada recuperación (Simione, 1998). En resumen, para este estudio, se consideraron aptos para crioconservar en nitrógeno líquido cultivos jóvenes de *Leptospira*, activamente móviles con una concentración de 10⁹ cel/mL.

CONCLUSIONES

El propósito de este trabajo fue estandarizar una técnica sencilla y eficaz para la conservación a largo plazo de serovares de *Leptospira*, que permita el mantenimiento de la viabilidad y pureza de estas cepas, así como la preservación de sus características genéticas.

Los resultados de viabilidad obtenidos en este estudio, mediante la estandarización de conteo de población en cámara Kova Glasstic® (Hubaleck, 2003) muestran que esta técnica de crioconservación usando DMSO en bajas concentraciones es un método confiable en la conservación de estas cepas, lo cual sugiere que podría ser aplicable a todos los serovares de *Leptospira* capaces de crecer en condiciones de laboratorio.

Este método de crioconservación con DMSO permite solucionar el problema del

mantenimiento tradicional de los ceparios de *Leptospira*, el cual se hace rutinariamente por pases seriados, labor bastante dispendiosa y costosa debido al gran número de serovares existentes y al alto costo de los medios de cultivo. De acuerdo con los resultados obtenidos, este método de crioconservación puede ser aplicado en cualquier laboratorio que maneje este tipo microorganismos exigentes en su conservación y servir de modelo para la crioconservación de otras colecciones.

REFERENCIAS

- Alexander A, Lessel E, Green S. 1972. Preservation of Leptospiras by Liquid-Nitrogen refrigeration. *International Journal of Systematic Bacteriology* 22(3): 165-169.
- Bajaj Y. 1995. Capítulo 1: Cryopreservation of plant cell, Tissue, and organ culture for the conservation of Germplasm and Biodiversity. En Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 32. Berlin, Springer-Verlag, p. 3-18.
- Bharti A, Nallu J, Ricaldi J, Matthias M, Diaz M, Lovett M, Levett P, Gilman R, Willig M, Gotuzzo E, Vinetz J. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Disease* 3(12): 757-71.
- Bomfim M, Barbosa-Stancioli E, Cota M. 2007. Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *The Veterinary Journal*, 178(2):251- 256.
- Borrero R, González A, Sardiñas C, Batista N, Valdés Y. 2006. Conservación de cepas vacunales de *Leptospira* a -70°C. *Revista Cubana de Medicina Tropical*; 58(1):50-55.
- Coghlan D. 1967. Low-temperature preservation of *Leptospira*, preliminary communication. *J.Hyg.* (65):373-379.
- Donev T. 2002. A possibility for cryoconservation of microbiological specimens in minicycotubes. *Journal of Culture Collections* (3): 93-94.
- Dumont F, Marechal P, Gervais P. 2004. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Appl Environ Microbiol* 70(1): 268-72.
- Fahy G. 1986. The relevance of cryoprotectant "Toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* (23): 1-12.
- Faine B, Adler C, Bolin A, Perolat P. 1999. *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd Edition, Melbourne, MediSci, 272 p.
- Gallego-Beltran JF. 2002. Leptospirosis in Colombian dairy cattle: Microbiological, Serological and molecular aspects of the disease (tesis doctoral), Londres, University of London, The Royal Veterinary College.

- Heckly R. 1978. Preservation of Microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*. 24: 19-53.
- Hubalek Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46:205-29.
- Levett P. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (2): 296-326.
- Levett P. 2003. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clinical Infectious Disease* 36(4): 447-52.
- Linscott D, Boack A. 1960. Protective action of Glicerol in the Freezing of Leptospirae. *Applied Microbiol* (80):573-574.
- Mazur P. 1970. Cryobiology: The Freezing of Biological System. *Science* 168: 939-49.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, (247): 125-42.
- Meiwan P. 2007. Epidemiology of infection with *Leptospira* species in livestock in Papua New Guinea (tesis doctoral). Perth, Australia, The School of Biomedical and Veterinary Sciences Murdoch University.
- Myers M. 1985. Manual of Laboratory Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. Technical Note No. 30. Buenos Aires, Pan American Zoonoses Center. 46 p.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2008. Leptospirosis. En Capítulo 1.1.9. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. 251p.
- Palit A, Haylock L, Cox JC. 1986. Storage of pathogenic leptospire in liquid nitrogen. *Journal of Applied Bacteriology* (61): 407-11.
- Reed N, Goddard R, Wyeth P. 2000. The Maintenance of Challenge Strains Used in the Potency Test for Canine *Leptospira* Vaccines. *Biologicals* (28):25-8.
- Shung-Chang Jong. 1989. Capítulo 13: Biotic diversity and Germplasm preservation, global imperatives. En Knutson L, Stonner A (eds.). *Beltsville Symposia in Agricultural Research*, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp 241-271.
- Simione F. 1998. Cryopreservation Manual Nalgene Nunc International. En: Nalgene labware, <http://www.nalgenelabware.com/techdata/technical/cryo.pdf> 15 p. consulta: noviembre 2007.
- Stalheim O. 1971. Viable, A virulent *Leptospira interrogans* Serotype Pomona Vaccine: Preservation in Liquid Nitrogen. *Applied Microbiology* 22(4): 726-27.
- Turner L. 1970. Leptospirosis III: Mantenimiento, aislamiento y demostración de Leptospiras. Artículo especial. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 64(4): 623-46.