

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Streptococcus spp.*  
EN MEDIOS DE CULTIVO ENRIQUECIDOS CON  
SANGRE LIOFILIZADA DE CARNERO Y  
ESTANDARIZACIÓN PREVIA DEL PROCESO DE  
LIOFILIZACIÓN**

**Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**ALICIA PAULINA CHICAIZA MARTÍNEZ**

**SANGOLQUÍ, JUNIO de 2013**

## RESUMEN

La sangre desfibrinada de carnero es un importante suplemento de medios de cultivo de uso clínico que garantiza el crecimiento de *Streptococcus spp.* entre los que se destaca *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticas del grupo A y del grupo B; *Streptococcus viridans* y *Streptococcus milleri*. El objetivo de esta investigación fue evaluar el crecimiento de dichos microorganismos utilizando sangre liofilizada como suplemento. El liofilizado se obtuvo modificando el tipo y tiempo de congelación (hielo seco o nitrógeno líquido en 2h o 4h), tipo y concentración de solución crio-conservadora (Glucosa o Fructosa; 2M o 3M). Se estableció un protocolo de rehidratación cada 72 h en un período de 12 días con almacenamiento a temperatura ambiente. Los resultados demostraron que el mejor tratamiento de liofilización fue la aplicación de Fructosa 2M y congelación con nitrógeno líquido por 4 horas, dando lugar a los mejores parámetros hematológicos. Los medios suplementados con el liofilizado presentaron aspecto transparente. Se estableció la viabilidad comparable del crecimiento y hemólisis de los microorganismos sembrados. El tamaño y forma de las colonias fueron inferiores a los observados en las muestras de sangre fresca. El liofilizado con el que se observó mejores resultados de crecimiento microbiano fue el obtenido con Fructosa 3M y congelación en nitrógeno líquido por 4h. En conclusión, es viable obtener un suplemento de eritrocitos liofilizados de carnero para medios de cultivo utilizados en el crecimiento e identificación de *Streptococcus spp.*, sin embargo es importante ensayar nuevos parámetros y condiciones fisicoquímicas de la liofilización en miras de optimizar el proceso.

## ABSTRACT

Defibrinated sheep blood is an important supplement of culture media in medical use. It guaranties the normal growing of *Streptococcus spp. such as Streptococcus*  $\beta$ -hemolytic of A and B group; *Streptococcus viridans* and *Streptococcus milleri*. The goal of this research was to evaluate the growing of those microorganisms using freeze-dry blood as supplement. The freeze-dry product was obtained by the modifications of conditions like: type and time of freezing (dry ice or liquid nitrogen for 2h or 4h); type and concentration of cryo-preservation solution (glucose or fructose with 2M or 3M). The samples were rehydrated each 72h for a period of time of 12 days with room temperature storage. The results showed that the best lyophilization treatment was 2M Fructose applying liquid nitrogen and freezing for 4 hours, it demonstrated the best hematological parameters. The media supplemented with freeze-dry product showed transparent appearance. It was determined the viability of growing and hemolysis of microorganisms. The size and shape of the colonies were lower than those was observed in fresh blood samples. The freeze-dry product with the best result in microbial growth was obtained using 3M Fructose and freezing with liquid nitrogen for 4h. In conclusion, it is feasible to get a supplement for sheep lyophilized erythrocytes culture media used in the growth and identification of *Streptococcus spp*; however it is important to test new physicochemical parameters and lyophilization conditions in order to optimize the process.

## CERTIFICACIÓN

MSc. María Fernanda Loayza Villa

MSc. Jaime Francisco Gía Bustamante

### **Certifican:**

Que el trabajo titulado “Evaluación del crecimiento de *Streptococcus spp.* en medios de cultivo enriquecidos con sangre liofilizada de carnero y estandarización previa del proceso de liofilización”, realizado por Alicia Paulina Chicaiza Martínez, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que el presente proyecto corresponde a un trabajo piloto en cuanto a la liofilización de eritrocitos de carnero y se requiere realizar posteriores ensayos que permitan optimizar su producción. No recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Alicia Paulina Chicaiza Martínez que lo entregue a la Ing. Tatiana Páez, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 17 de junio del 2013

---

**MSc. María Fernanda Loayza Villa**  
DIRECTOR

---

**MSc. Jaime Francisco Gía Bustamante**  
CODIRECTOR

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

Alicia Paulina Chicaiza Martínez

### **Declaro que:**

El proyecto de grado denominado “**Evaluación del crecimiento de *Streptococcus spp.* en medios de cultivo enriquecidos con sangre liofilizada de carnero y estandarización previa del proceso de liofilización**”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 17 de junio de 2013

---

**Alicia Paulina Chicaiza Martínez**

## AUTORIZACIÓN

Yo, Alicia Paulina Chicaiza Martínez

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **“Evaluación del crecimiento de *Streptococcus spp.* en medios de cultivo enriquecidos con sangre liofilizada de carnero y estandarización previa del proceso de liofilización”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 17 de junio de 2013

---

**Alicia Paulina Chicaiza Martínez**

## **DEDICATORIA**

*A Dios.*

*A mis padres, Edgar y Alicia.*

*A mis hermanas María Esther y Diana.*

*A Sebastián.*

**Alicia Paulina Chicaiza Martínez**

## **AGRADECIMIENTO**

Doy gracias a Dios quien con su infinita sabiduría puso en mi camino las bendiciones y retos que me permitieron llegar a culminar esta meta.

Agradezco a mis padres por su gran amor, por sus palabras de aliento y por su apoyo incondicional; pues siempre me brindaron su ayuda en más de una forma a lo largo de este proyecto. A mis hermanas que con su alegría me brindaron la energía para no desistir.

A Sebastián por su amor, su comprensión y por su gran apoyo a lo largo de este trabajo.

A la Escuela Politécnica del Ejército por el financiamiento otorgado al presente proyecto y a las autoridades de IASA I quienes me facilitaron el uso de laboratorios y el acceso a la granja integral.

A Fernanda Loayza por sus enseñanzas, su guía, sus consejos, su dedicación y paciencia que permitieron concretar la realización de este trabajo. Y a Jaime Gía por su colaboración y consejos en la realización de este proyecto.

A la Ingeniera Daysi Muñoz, al Doctor Juan Carlos Giacometti del Laboratorio de Recursos Bioacuáticos y Acuicultura IASA I por sus aportes y consejos y, a la Ingeniera Jackeline Torres por sus aportes en el manejo ovino.

A los responsables de la granja integral del IASA I: Sra. Guadalupe y el Sargento Tapia por su colaboración y apoyo.

Al Doctor César Falconí por su colaboración y por permitirme utilizar el equipo de liofilización.

Al personal del Laboratorio clínico del Hospital Carlos Andrade Marín, quienes facilitaron parte de las cepas del estudio.

Al Lic. Jorge García del Laboratorio clínico del Hospital Metropolitano quien facilitó parte de las cepas del estudio.

**Alicia Paulina Chicaiza Martínez**

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>CERTIFICACIÓN</b> .....	iv
<b>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD</b> .....	v
<b>AUTORIZACIÓN</b> .....	vi
<b>DEDICATORIA</b> .....	vii
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	xvi
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Formulación del Problema.....	1
1.2. Justificación del Problema .....	2
1.3. Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos .....	3
1.4 Marco Teórico.....	4
1.4.1 Liofilización.....	4
1.4.2 Ovinos .....	16
1.4.3 Sangre de Carnero.....	17
1.4.4 Diagnóstico clínico .....	19
1.4.5 Liofilización de sangre.....	21
1.5 Hipótesis .....	22
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.1 Participantes.....	23
2.2 Zona de Estudio .....	23
2.3 Procedimiento .....	23
2.3.1 Fase Inicial.....	23
2.3.2 Fase Experimental.....	24
2.4 Diseño Experimental.....	28

2.4.1 Liofilización.....	28
2.4.2 Almacenamiento .....	31
2.4.3 Evaluación medio de cultivo.....	32
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS</b>	
3.1 Liofilización y almacenamiento.....	35
3.1.1 Porcentaje de humedad .....	39
3.1.2 Hemoglobina.....	39
3.1.3 Hematocrito .....	41
3.1.4 Conteo de eritrocitos .....	41
3.1.5 Forma de eritrocitos .....	43
3.1.6 Tamaño de eritrocitos .....	45
3.2 Elaboración medios de cultivo.....	47
3.2.1 Concentración de sangre .....	47
3.3 Crecimiento de <i>Streptococcus</i> .....	49
3.3.1 Hemólisis .....	50
3.3.2 Viabilidad.....	51
3.3.3 Tamaño colonias .....	52
3.3.4 Forma colonias.....	53
3.3.5 Observaciones .....	55
3.4 Viabilidad de eritrocitos en el período de rehidratación.....	57
3.5 Percepción de los usuarios frente al uso de sangre liofilizada de carnero .....	58
3.6 Estimación de producción de sangre desfibrinada liofilizada .....	59
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN</b> .....	62
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES</b> .....	71
<b>CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES</b> .....	73
<b>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA</b> .....	74
<b>ANEXOS</b> .....	81
<b>BIOGRAFÍA</b> .....	101
<b>HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS</b> .....	102

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1. Requerimientos establecidos para la extracción de sangre.....	19
Tabla 2. 1. Diseño factorial 2x2x2x2.....	30
Tabla 3. 1. Descripción de los diferentes tratamientos a los cuales fueron sometidas las muestras de sangre de carnero. ....	35
Tabla 3. 2. Descripción del costo de producción de sangre liofilizada de carnero.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1. 1. Liofilizador escala de laboratorio.....	7
Fig.1. 2. Liofilizador escala piloto.....	6
Fig.1. 3. Liofilizador de escala industrial. ....	7
Fig.1. 4. Características de funcionamiento de los liofilizadores de acuerdo a su escala. 7	
Fig.1. 5. Esquema general de un sistema de liofilización (Ramírez Navas, 2006).....	8
Fig.1. 6. El diagrama muestra en los puntos ABCD la diferencia en la formación de cristales de acuerdo al tiempo de congelación. En la parte izquierda se puede observar que la congelación rápida dará lugar a la formación de cristales grandes, en la parte derecha se puede observar que la congelación lenta (Oliva y Herrera, 2010).....	9
Fig.1. 7. Influencia de la velocidad de congelamiento en el proceso de liofilización (Oliva y Herrera, 2010).....	10
Fig.1. 8. Diagrama del punto triple del agua (Oliva y Herrera, 2010).....	11
Fig.1. 9. Representación de los frentes de sublimación y la transferencia de calor en un proceso de liofilización (ITESCAM, 2007).....	13
Fig.1. 10. Oveja <i>Ovis aries</i> . ....	17
Fig.1. 11. Comparación entre eritrocitos de carnero, eritrocitos humanos, y eritrocitos expirados de un banco de sangre después de 45 días de almacenamiento (Yeh, Pinsky, Banaei, y Baron, 2009). Los eritrocitos de carnero (A) presentan menor tamaño con respecto a los eritrocitos humanos (B), los eritrocitos expirados (C), presentan equinocitos. ....	18
Fig.1. 12. Representación de los diferentes tipos de hemólisis. ....	19
Fig.2. 1. Localización geográfica de la Hacienda El Prado (IASA I). Fuente:Google Maps.....	23
Fig.3. 1. Muestras liofilizadas. A. muestra rojo brillante de aspecto esponjoso, B. muestra rojo claro de aspecto compacto, C. muestra rojo tinto de aspecto compacto, D. muestra rojo tinto de aspecto pegajoso. ....	36
Fig.3. 2. Color de las muestras liofilizadas en relación a los diferentes tratamientos evaluados. En la escala, 1 representa rojo brillante, 2 representa rojo claro, 3 representa rojo tinto.....	36
Fig.3. 3. Evaluación del color de las muestras liofilizadas según (A) Tipo de congelación, (B) Tiempo de congelación, (C) Tipo de solución crio-preservadora y (D)	

Concentración de solución crio-preservadora. En la escala 1 representa rojo brillante, 2 representa rojo claro y 3 representa rojo tinto. ....	37
Fig.3. 4. Textura de las muestras liofilizadas en relación a los diferentes tratamientos evaluados. En la escala, 1 representa quebradizo, 2 representa compacto, 3 representa pegajoso. ....	38
Fig.3. 5. Evaluación de la textura de las muestras liofilizadas según (A) Tipo de congelación, (B) Tiempo de congelación, (C) Tipo de solución crio-preservadora y (D) Concentración de solución crio-preservadora. * Presentan variación estadística significativa. ....	38
Fig.3. 6. Porcentaje de humedad presente en las muestras liofilizadas con relación a los diferentes tratamientos. ....	39
Fig.3. 7. Variación de hemoglobina con relación a los diferentes tratamientos. ....	40
Fig.3. 8. Evaluación de hemoglobina según (A) Tipo de congelación, (B) Tiempo de congelación, (C) Tipo de solución crio-preservadora y (D) Concentración de solución crio-preservadora. En los que no se encontraron diferencias estadísticas significativas. ....	40
Fig.3. 9. . Comparación de valores de hematocrito en sangre fresca de carnero (izquierda) y sangre liofilizada de carnero (derecha). Las flechas señalan los respectivos meniscos. ....	41
Fig.3. 10. Variación del número de eritrocitos después de someterse a un proceso de liofilización con relación a los diferentes tratamientos. ....	42
Fig.3. 11. Evaluación del número de eritrocitos según (A) Tipo de congelación, (B) Tiempo de congelación, (C) Tipo de solución crio-preservadora y (D) Concentración de solución crio-preservadora. * Presentan variación estadística significativa. ....	43
Fig.3. 12. Comparación de eritrocitos presentes en sangre fresca de carnero (izquierda) y sangre liofilizada de carnero (derecha). ....	44
Fig.3. 13. Variación del número de eritrocitos bicóncavos con relación a los diferentes tratamientos. ....	44
Fig.3. 14. Variación del número de eritrocitos crenados con relación a los diferentes tratamientos. ....	45
Fig.3. 15. Variación del número de sombras con relación a los diferentes tratamientos. ....	45
Fig.3. 16. Variación del tamaño de eritrocitos con relación a los diferentes tratamientos. ....	46

Fig.3. 17. Evaluación del tamaño de eritrocitos según (A) Tipo de congelación, (B) Tiempo de congelación, (C) Tipo de solución crio-preservadora y (D) Concentración de solución crio-preservadora. * Presentan variación estadística significativa. ....	46
Fig.3. 18. Medios elaborados a base de sangre liofilizada: rojo brillante (A), rojo opaco (B), rojo tinto (C), café (D). ....	47
Fig.3. 19. Color del medio con respecto a los diferentes tratamientos. En la escala, 1 representa medios de color rojo brillante, 2 representa medios de color rojo opaco, 3 representa medios rojo tinto y 4 representa medios de color café. ....	48
Fig.3. 20. Concentración de sangre liofilizada de carnero en relación al color de los medios. ....	48
Fig.3. 21. <i>Streptococcus</i> $\beta$ - hemolíticos (A) S. grupo A, (B) S. grupo B, (C) <i>Streptococcus viridans</i> y (D) <i>Streptococcus milleri</i> en agar sangre fresca de carnero. ...	49
Fig.3. 22. Evaluación del crecimiento de <i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolíticos en agar sangre liofilizada de carnero. A. color inicial del medio (rojo opaco) previo a la siembra, vista anterior. B. color inicial del medio (rojo opaco) previo a la siembra, vista posterior. ...	50
Fig.3. 23. Evaluación del crecimiento de <i>Streptococcus</i> $\alpha$ -hemolíticos en agar sangre liofilizada de carnero. A. color inicial del medio rojo opaco previo a la siembra, B. crecimiento de colonias <i>Streptococcus</i> $\alpha$ -hemolíticos <i>viridans</i> a las 48 h de incubación. C. color inicial del medio rojo opaco previo a la siembra. D. <i>Streptococcus</i> $\alpha$ -hemolíticos <i>milleri</i> a las 48 h de incubación. ....	50
Fig.3. 24. Halos hemolíticos presentes en las diferentes cepas de <i>Streptococcus</i> sembradas en medios de cultivo enriquecidos con sangre liofilizada con relación a los tratamientos. ....	51
Fig.3. 25. Halos hemolíticos presentes en las diferentes cepas de <i>Streptococcus</i> sembradas en medios de cultivo enriquecidos con sangre liofilizada de carnero. ....	51
Fig.3. 26. Viabilidad de crecimiento de <i>Streptococcus</i> con relación a los diferentes tratamientos. En la escala 0 representa ausencia de bacterias, 1 representa crecimiento bacteriano. ....	52
Fig.3. 27. Viabilidad de crecimiento de <i>Streptococcus</i> con relación a las diferentes cepas. En la escala 0 representa ausencia de bacterias, 1 representa crecimiento bacteriano. ....	52
Fig.3. 28. Tamaño de colonias en relación a los diferentes tratamientos evaluados. En la escala 1 representa la ausencia de bacterias, 2 representa colonias muy pequeñas, 3 colonias pequeñas. ....	53

Fig.3. 29. Tamaño de colonias en relación al tipo de cepa evaluado. En la escala 1 representa la ausencia de bacterias, 2 representa colonias muy pequeñas, 3 colonias pequeñas.....	53
Fig.3. 30. Forma de colonias presentes en los diferentes tratamientos evaluados. En la escala, 1 representa colonias no definidas, 2 representa colonias ligeramente definidas; 3 representa colonias definidas. ....	54
Fig.3. 31. Forma de colonias de acuerdo al tipo de cepa de <i>Streptococcus</i> . En la escala, 1 representa colonias no definidas, 2 representa colonias ligeramente definidas; 3 representa colonias definidas. ....	55
Fig.3. 32. Observaciones de crecimiento bacteriano presente en los diferentes tratamientos. En la escala, 1 representa medio sin alteración de color, 2 representa zona de punción obscurecida, 3 representa zona de punción aclarada, 4 representa zona de punción obscurecida y zona de crecimiento aclarada. ....	56
Fig.3. 33. Observaciones de crecimiento bacteriano de acuerdo a las diferentes cepas de <i>Streptococcus</i> . En la escala, 1 representa medio sin alteración de color, 2 representa zona de punción obscurecida, 3 representa zona de punción aclarada, 4 representa zona de punción obscurecida y zona de crecimiento aclarada. ....	56
Fig.3. 34. Recuperación del recuento de los eritrocitos del liofilizado recuperado respecto al recuento inicial de la muestra de sangre fresca de carnero (Delta: Número de eritrocitos final/Número de eritrocitos inicial). Los resultados muestran el promedio de la variación para cada tratamiento. ....	57
Fig.3. 35. Variación del recuento de eritrocitos (número de eritrocitos inicial – número de eritrocitos final) contados cada 72h en un frasco rehidratado nuevo para cada determinación en un período de 12 días. Liofilizado obtenido en A. tratamiento 3. B. tratamiento 8. C. tratamiento 12. D. tratamiento 15 y E. tratamiento 16.....	58

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Descripción estadística del color de las muestras liofilizadas de acuerdo a los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.....	81
Anexo 2. Descripción estadística del color de las muestras liofilizadas de acuerdo al tipo de congelación según un modelo general lineal y mixto. ....	81
Anexo 3. Descripción estadística del color de las muestras liofilizadas de acuerdo al tiempo de congelación según un modelo general lineal y mixto. ....	81
Anexo 4. Descripción estadística del color de las muestras liofilizadas de acuerdo al tipo de solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto.....	82
Anexo 5. Descripción estadística del color de las muestras liofilizadas de acuerdo a la concentración de solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto.	82
Anexo 6. Descripción estadística de la textura de las muestras liofilizadas de acuerdo a los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto. ....	82
Anexo 7. Descripción estadística de la textura de las muestras liofilizadas de acuerdo al tipo de congelación según un modelo general lineal y mixto. ....	83
Anexo 8. Descripción estadística de la textura de las muestras liofilizadas de acuerdo al tiempo de congelación según un modelo general lineal y mixto. ....	83
Anexo 9. Descripción estadística de la textura de las muestras liofilizadas de acuerdo al tipo de solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto. ....	83
Anexo 10. Descripción estadística de la textura de las muestras liofilizadas de acuerdo a la concentración de solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto. ....	83
Anexo 11. Descripción estadística de la variación del valor de hemoglobina presente en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto. ....	84
Anexo 12. Descripción estadística de la variación del valor de hemoglobina de acuerdo al tipo de congelación según un modelo general lineal y mixto. ....	84
Anexo 13. Descripción estadística de la variación del valor de hemoglobina de acuerdo al tiempo de congelación según un modelo general lineal y mixto. ....	84
Anexo 14. Descripción estadística de la variación del valor de hemoglobina de acuerdo a la sustancia crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto.....	85

Anexo 15. Descripción estadística de la variación del valor de hemoglobina de acuerdo a la concentración de sustancia crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto. ....	85
Anexo 16. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos presentes en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto. ....	85
Anexo 17. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos de acuerdo al tipo de congelación según un modelo general lineal y mixto. ....	86
Anexo 18. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos de acuerdo al tiempo de congelación según un modelo general lineal y mixto. ....	86
Anexo 19. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos de acuerdo al tipo de congelación según un modelo general lineal y mixto. ....	86
Anexo 20. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos de acuerdo a la concentración de solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto. ....	86
Anexo 21. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos bicóncavos presentes en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto. ....	87
Anexo 22. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos crenados presentes en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto. ....	87
Anexo 23. Descripción estadística de la variación del número de sombras presentes en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto. ....	88
Anexo 24. Descripción estadística de la variación del tamaño de eritrocitos presentes en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto. ....	88
Anexo 25. Descripción estadística de la variación del tamaño de eritrocitos de acuerdo a los tipos de congelación según un modelo general lineal y mixto. ....	89
Anexo 26. Descripción estadística de la variación del tamaño de eritrocitos de acuerdo al tiempo de congelación según un modelo general lineal y mixto. ....	89
Anexo 27. Descripción estadística de la variación del tamaño de eritrocitos presentes de acuerdo a la solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto. ....	89
Anexo 28. Descripción estadística de la variación del tamaño de eritrocitos de acuerdo a la concentración de solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto. ....	89
Anexo 29. Descripción estadística del color de los medios en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto. ....	89

Anexo 30. Descripción estadística de la concentración de sangre liofilizada de carnero en relación al color de los medios según un modelo general lineal y mixto. ....	90
Anexo 31. Evaluación del crecimiento de <i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolíticos en agar sangre liofilizada de carnero, posterior a incubación por 48 h. A. <i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolíticos del grupo B. B. <i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolíticos del grupo A. Vista anterior. ....	91
Anexo 32. Evaluación del crecimiento de <i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolíticos en agar sangre liofilizada de carnero, posterior a incubación por 48 h. A. <i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolíticos del grupo B. B. <i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolíticos del grupo A. Vista posterior.....	91
Anexo 33. Evaluación del crecimiento de <i>Streptococcus viridans</i> en agar sangre liofilizada de carnero, posterior a incubación por 48 h.....	92
Anexo 34. Evaluación del crecimiento de <i>Streptococcus milleri</i> en agar sangre liofilizada de carnero, posterior a incubación por 48 h.....	92
Anexo 35. Descripción estadística de la actividad hemolítica presente en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto. ....	93
Anexo 36. Descripción estadística de la actividad hemolítica presente en las cepas de <i>Streptococcus</i> evaluadas según un modelo general lineal y mixto. ....	93
Anexo 37. Descripción estadística de la viabilidad de <i>Streptococcus</i> presente en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.....	94
Anexo 38. Descripción estadística de la viabilidad de <i>Streptococcus</i> con respecto al tipo de cepa según un modelo general lineal y mixto. ....	94
Anexo 39. Descripción estadística del tamaño de <i>Streptococcus</i> en relación a los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.....	95
Anexo 40. Descripción estadística del tamaño de <i>Streptococcus</i> según el tipo de cepa según un modelo general lineal y mixto. ....	95
Anexo 41. Descripción estadística de la forma de colonias en relación a los tratamientos según un modelo general lineal y mixto. ....	96
Anexo 42. Descripción estadística de la forma de colonias en relación a las cepas de <i>Streptococcus</i> según un modelo general lineal y mixto.....	96
Anexo 43. Descripción estadística de las observaciones de crecimiento bacteriano según las diferentes cepas de <i>Streptococcus</i> . ....	97
Anexo 44. Descripción estadística de las observaciones de crecimiento bacteriano según las diferentes cepas de <i>Streptococcus</i> . ....	97
Anexo 45. Encuesta .....	98
Anexo 46. Cuestionario.....	100

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del Problema

Años atrás, los laboratorios de diagnóstico clínico mantenían carneros en los alrededores de sus instalaciones, lo que les permitía extraer sangre fresca, para su posterior uso en la elaboración de medios de cultivo, debido a los beneficios que plantea el uso de sangre de carnero como suplemento. Sin embargo en la actualidad, según la norma ISO 14001:2004 se prohíbe este tipo de prácticas. Por lo que, en el Ecuador, muchas instituciones se ven en la necesidad de importar sangre desfibrinada de carnero.

La adquisición de sangre desfibrinada de carnero como producto de importación, implica al mismo tiempo un incremento en los costos asociados a la preparación de medios de cultivo, la posibilidad de contaminación y la generación de desperdicios con riesgo biológico considerando que el volumen del producto supera mucho lo requerido para cada lote de medio de cultivo a preparar, y si la sangre no es utilizada debe descartarse.

El almacenamiento de la sangre puede conducir a que los glóbulos rojos sufran cambios morfológicos y bioquímicos entre los que destacan daños oxidativos que afectan a las proteínas y lípidos de la membrana, disminución del pH, depleción de ATP, pérdida de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG), e incremento de potasio debido al mal funcionamiento de la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$  (Yigit y Aktas, 2009).

Una alternativa de uso frecuente es la sangre humana, sin embargo su composición proteica incluye anticuerpos que pueden interferir con el normal crecimiento y desarrollo de cepas bacterianas; además de la alta incidencia de accidentes laborales (contagios de hepatitis, VIH, entre otros) lo que constituye un riesgo significativo para el personal encargado de la elaboración de medios de cultivo (Chávez Castillo, y otros, 2007).

Otra de las alternativas para el diagnóstico clínico es la utilización de sangre liofilizada de carnero, lo que permitiría disponer de la misma cuando se requiriese, dejando atrás los problemas de contaminación y estabilidad de almacenamiento. Este estudio estableció un protocolo inicial de liofilización de eritrocitos de carnero como estrategia alternativa de preservación y almacenamiento de este suplemento.

## 1.2 Justificación del Problema

El establecimiento de nuevas herramientas, resulta una alternativa para la conservación de la sangre de carnero como suplemento del medio de cultivo. La liofilización es una técnica que busca conservar la estructura y viabilidad de las células. Existen investigaciones que aseguran que los eritrocitos son células que pueden ser deshidratadas por este método conservando sus propiedades y la función de la hemoglobina que es la proteína más importante en este tipo de estructura celular (Goodrich y Williams, 1989).

El proceso de liofilización consiste en la deshidratación de un producto termolábil mediante condiciones de baja temperatura y alta presión, y siendo los eritrocitos de carnero un suplemento requerido en los laboratorios de diagnóstico, por lo que es necesario estandarizar un proceso de liofilización de estas células para generar un producto eficiente como suplemento de los medios de cultivo para el desarrollo de microorganismos fastidiosos.

La sangre de carnero es el suplemento ideal de medios de cultivo elaborados para el crecimiento de microorganismos exigentes como son los *Streptococcus spp.* Esta bacteria es un agente patógeno causante de una variedad de infecciones en la piel e incluso sistémicas y su identificación inicial se basa en la forma de sus colonias y su capacidad hemolítica. De ahí la importancia de desarrollar medios de cultivo alternativos que permitan identificar estas mismas características (Lang, Xue, Guo, y Palmer, 2007).

Esta investigación tuvo como objetivo establecer un protocolo de liofilización de glóbulos rojos de carnero como una estrategia factible de este suplemento. A partir de este producto, es posible evaluar características físicas y microbiológicas de su utilización en medios de cultivo, con una estabilidad mayor de almacenamiento y sin alteración en sus propiedades físico-químicas.

Una vez establecido un protocolo eficiente de liofilización de sangre desfibrinada de carnero, la comercialización del producto resultante beneficiaría a los laboratorios de diagnóstico clínico y sociedad en general, garantizando un mejor diagnóstico de infecciones causadas por *Streptococcus spp.*; por la accesibilidad del

producto, sin la necesidad de mantener los carneros en los alrededores de los hospitales o la importación de la misma.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Evaluar el crecimiento de *Streptococcus spp.* en medios de cultivo enriquecidos con sangre liofilizada de carnero y estandarización previa del proceso de liofilización.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Establecer las condiciones óptimas para la liofilización de eritrocitos de carnero.
- Evaluar el tiempo de vida útil de la sangre liofilizada de carnero para usarse como suplemento en medios de cultivo.
- Evaluar la temperatura de conservación de la sangre liofilizada de carnero como un suplemento alternativo del medio de cultivo para el aislamiento de *Streptococcus spp.*
- Comparar el rendimiento y efectividad del suplemento alternativo frente al suplemento tradicional en el aislamiento de microorganismos del género *Streptococcus*.
- Establecer el costo beneficio de la utilización de sangre liofilizada de carnero como suplemento del agar sangre utilizado en los laboratorios clínicos.
- Describir la percepción de los usuarios frente a la posibilidad de utilizar sangre liofilizada de carnero como suplemento de los medios de cultivo.

## **1.4 Marco Teórico**

### **1.4.1 Liofilización**

#### **1.4.1.1 Reseña histórica de la liofilización**

Según Alvarado, (1979), el frío ha sido utilizado desde tiempos remotos como un medio para conservar los alimentos. Posteriormente el proceso de conservación buscó generar perdurabilidad de la viabilidad celular de procariotas y eucariotas en viales con volúmenes reducidos, para de esta forma ser transportados con facilidad, por lo que se estableció la cadena de frío; lo que significó un aporte a la conservación de material biológico, ya que el frío disminuye la actividad celular.

Wilhelm Oetjen, (2008), menciona que para congelar una sustancia, esta debe ser enfriada a una temperatura a la cual tanto el agua como el sólido se encuentren totalmente cristalizados. Menciona además que durante el proceso, la zona de congelamiento crece primero. Otra consideración es que el material sólido que sufre un proceso de congelación más lento, puede también ocasionar una alteración de su potencial de hidrógeno. La cristalización depende de varios factores como velocidad de enfriamiento, concentración inicial y temperatura final de enfriamiento. Todos estos parámetros deben considerarse durante el proceso de liofilización, de forma que la sustancia o célula objeto de este proceso no sufra alteración estructural o química.

Fleming en el año 1943, propuso formalmente el término liofilización, palabra proveniente de dos vocablos griegos “Luen”= solvente y “Phileo”= amigo. La liofilización se define entonces como un proceso de conservación a partir de sublimación. Su aplicación más importante es la conservación de productos biológicos sin la pérdida de componentes volátiles o termo-sensibles (Ramírez Navas, 2006).

Los datos históricos refieren que los Incas (200 a.C) utilizaban un proceso rudimentario de liofilización para conservar chuno (papa) y charqui (carne de llama), así evitaban la putrefacción de los alimentos. Dichos alimentos eran almacenados en lo alto de las montañas, donde las bajas temperaturas congelaban el alimento y el agua del interior se evaporaba lentamente por las altas presiones del aire; estudios realizados a esos alimentos señalan que presentan un tiempo de consumo óptimo de 4 años. Se conoce también que los vikingos utilizaban la congelación para conservar el pescado

arenque en invierno, aprovechando las bajas temperaturas y la presión del aire en las montañas, sin embargo los alimentos conservados perecían rápidamente debido a que las montañas escandinavas presentan menor altura que las montañas de los Andes (Ramírez Navas, 2006) .

Debido a los estudios metódicos de la naturaleza del material virulento, Pasteur y otros investigadores, observaron la necesidad de aplicar técnicas de secado de dicho material sin la necesidad de destruirlo; así como también desarrollar medios que retarden las reacciones químicas, asegurando así una menor interferencia en sus investigaciones (Negroni, 2009).

A partir de la década de 1930, los componentes liofilizados, tuvieron una producción significativa; pero no fue sino hasta después de la segunda guerra mundial donde Greaves, Henaff y Flosdorf (1930) realizaron trabajos aplicando el concepto de liofilización para la conservación de plasma, convirtiéndose en la primera aplicación comercial de la liofilización; otra de las aplicaciones comerciales de importancia fue la penicilina liofilizada obtenida por Chain (1945, Premio Nobel) (Pharmaceutical Technology, 2004).

E. Flosdorf y S. Mudd en el año de 1935, publicaron algunos artículos sobre aspectos del proceso de liofilización y sus mejoras. En el año de 1953 se utilizó el proceso de liofilización para comercialización de unos pocos alimentos como la leche, sopas, huevos, levadura, zumos de frutas y café; ya que era una técnica costosa. A partir de los años setenta más de 400 diferentes alimentos se liofilizan y comercializan (Kachhwaha, 2005).

#### **1.4.1.2 Características del proceso liofilización**

La liofilización es un proceso de estabilización en el cual el material es previamente congelado de forma que se facilite la concentración del solvente (generalmente agua) en el que el material a procesar está incluido, reduciéndolo mediante sublimación. Este proceso permite preservar alimentos y productos biológicos por períodos prolongados de tiempo, sus propiedades organolépticas, así como su calidad nutricional no se ven afectadas durante el proceso de conservación por liofilización comparado con otros tipos de conservación (Ramírez Navas, 2006).

Según Antón Fos, García Doménech, y Moreno Frigols, (2011), la liofilización proviene del griego (*hacer afín al disolvente*), es un método de desecación que permite eliminar el disolvente (generalmente agua), congelando el producto húmedo y posteriormente sometiéndolo a sublimación a baja presión; de esta forma se evita el paso por la fase líquida.

Al respecto de la liofilización Wilhelm Oetjen, (2008), menciona:

*“La liofilización es un proceso de secado en el cual el solvente o el medio en suspensión es cristalizado y posteriormente sublimado directamente del estado sólido a la fase de vapor”* (Wilhelm Oetjen, Freeze-Drying, 2008, pág. 1).

#### 1.4.1.3 Tipos de liofilizadores

De acuerdo a la forma, los liofilizadores se pueden clasificar en:

- Liofilizadores con recipientes rotatorios.- cuya función es secar líquidos.
- Liofilizadores múltiples.- convenientes para el secado de recipientes pequeños. El vacío en este tipo de liofilizadores se debe manejar con cuidado, ya que la ruptura de vacío en un recipiente puede romper el vacío en todos los recipientes.
- Liofilizadores de armario con estante.- más comúnmente utilizados, se aplican en una amplia gama de productos (Jácome, 2003).

De acuerdo a la escala a la que se va a deshidratar el producto, los liofilizadores pueden clasificarse en: liofilizador de escala de laboratorio (fig.1.1), liofilizador de escala piloto (fig.1.2) y liofilizador de escala industrial (fig.1.3) (Ramírez Navas, 2006).



Fig.1. 1. Liofilizador escala de laboratorio



Fig.1. 2. Liofilizador escala piloto



**Fig.1. 3. Liofilizador de escala industrial.**

De acuerdo al tipo de liofilizador que se va a emplear, se deben considerar las características de funcionamiento de los mismos (ver fig.1.4)

	Laboratorio	Piloto	Industrial
Bomba Vacío	6 m <sup>3</sup> /h	18-35 m <sup>3</sup> /h	
Capacidad condensador	6-10 Kg	15-30 Kg	30-300 Kg
Temperatura condensador	-50°C	-50°C a -80°C	-75°C
Superficie*(n° estantes)	0,33 m <sup>2</sup> *(3)	0,48-1,8 m <sup>2</sup> *(3-5)	2-12 m <sup>2</sup> *(5-8)
Capacidad viales 20 mm	850	1200-4500	4500-30000

**Fig.1. 4. Características de funcionamiento de los liofilizadores de acuerdo a su escala**

### **Esquema de un liofilizador**

En la Figura 1,5 se detalla un esquema de un liofilizador típico, el cual consta de tres componentes principales: la cámara de secado, el condensador y el sistema de vacío. La función principal del liofilizador es crear el entorno necesario para el proceso de liofilización. (T. A. Jennings, 1993 citado por Ramírez Navas, 2006).

Los equipos de pequeña escala, tipo planta piloto o de laboratorio constan de las mismas partes representadas en la fig.1.5, con la diferencia que se ha integrado todas estas en un solo equipo.

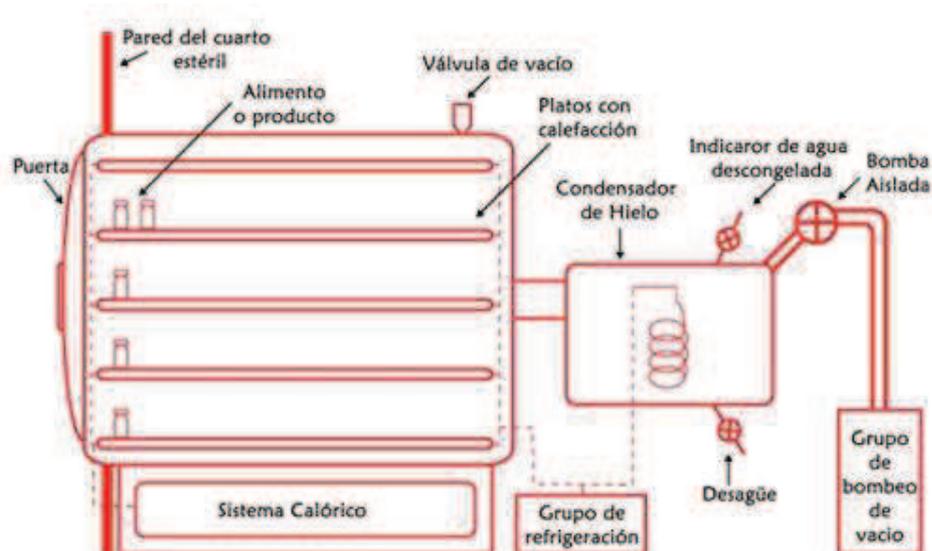


Fig.1. 5. Esquema general de un sistema de liofilización (Ramírez Navas, 2006).

### Cámara del liofilizador

La cámara del secador sirve al proceso de liofilización mediante las siguientes funciones:(a) proporcionar un entorno limpio y estéril para el proceso; (b) proporcionar las temperaturas y presiones necesarias para congelar y secar el producto.

### Condensador

El condensador elimina los vapores condensables antes de que estos entren en el sistema de bombeo de vacío.

### Sistema de vacío

Su función es proporcionar las presiones necesarias para las fases de desecado primario y secundario. Las consideraciones que se deben realizar para un sistema de vacío son: la tubería de comunicación con el condensador y la naturaleza de la bomba de vacío.

#### 1.4.1.4 Etapas de la liofilización

##### 1. Fase 1 o Congelación

Se refiere al enfriamiento de la muestra a presión constante por debajo de la temperatura de fusión del agua, es una operación previa y obligatoria (Antón Fos y otros, 2011).

Generalmente las temperaturas de congelación están entre  $-50$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ . La fase de congelación es la más crítica del proceso del liofilizado, debido a que el producto puede ser completamente inactivado si se realiza en forma inadecuada (Tecnovax S.A., 2006).

El período de congelación depende de la cantidad, concentración y naturaleza propia del producto. La buena calidad de un producto liofilizado (propiedades organolépticas conservadas) depende de una congelación adecuada (Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales; Wilhelm Oetjen, 2008).

- Velocidad de congelación

Este factor influye en la formación de cristales y poros durante el proceso, limitando la deshidratación del producto. Es importante ya que la mayor parte de agua congelada inicialmente equivale sólo al 25% del agua total cristalizada, en un rango de  $0$  a  $-30^{\circ}\text{C}$ . En el proceso de liofilización la diferencia entre  $0,15$  y  $0,7^{\circ}\text{C}/\text{min}$  puede influenciar significativamente en la estructura del producto (Wilhelm Oetjen, 2008) (Véase Fig.1.6).

Una velocidad muy alta da como resultado la formación de cristales pequeños que alteran las propiedades del producto entorpeciendo el proceso de liofilización (Labconco Corporation, 2010), (Véase Fig. 1.7).

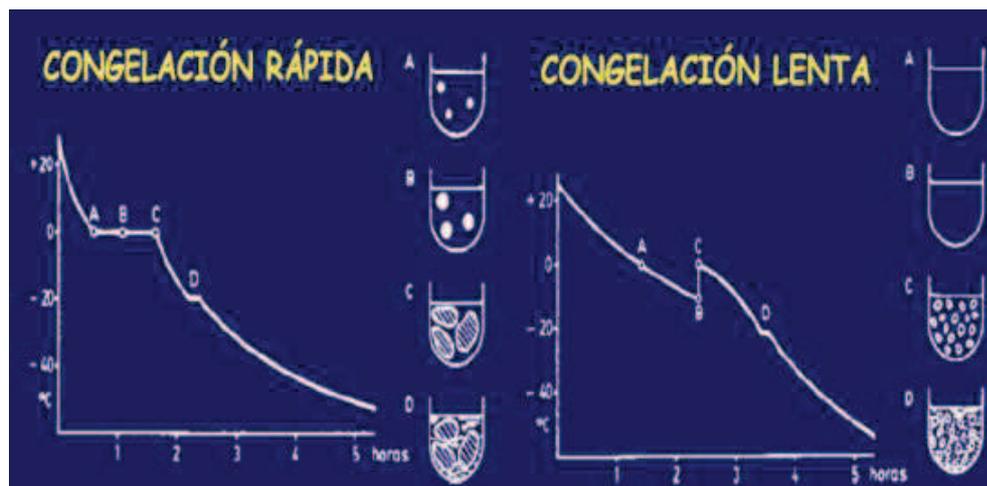


Fig.1. 6. El diagrama muestra en los puntos ABCD la diferencia en la formación de cristales de acuerdo al tiempo de congelación. En la parte izquierda se puede observar que la congelación rápida dará lugar a la formación de cristales grandes, en la parte derecha se puede observar que la congelación lenta (Oliva y Herrera, Liofilización, 2010).

	Velocidad congelación	Nº y tamaño cristales	Estructura material	Desecación primaria	Desecación secundaria
	<b>Rápida</b>	Pocos y grandes	Poros grandes	Más rápida	Más lenta
	<b>Lenta</b>	Numerosos y pequeños	Poros pequeños Mayor sup. específica	Más lenta	Más rápida

Fig.1. 7. Influencia de la velocidad de congelamiento en el proceso de liofilización (Oliva y Herrera, Liofilización, 2010).

- Temperatura mínima de fusión incipiente

Corresponde a la temperatura a la que la mezcla congelada, comienza a fundir, es decir, corresponde a la temperatura máxima a la que puede operar el liofilizador. Esta temperatura en combinación con una presión de vacío superior a 0.0005 mBar dará lugar a la ebullición de la fase líquida formada, ocasionando pérdida total de la calidad del producto (Universidad de Granada, 2008).

- Punto eutéctico

Es la temperatura más baja en la cual la fase sólida y líquida del material pueden coexistir. Para poder entender que es el punto eutéctico se debe mencionar al punto triple del agua, el cual puede ser apreciado en la fig.1.8



Fig.1. 8. Diagrama del punto triple del agua (Oliva y Herrera, Liofilización, 2010).

El diagrama permite deducir el cambio de los estados del agua, en donde el punto de equilibrio corresponde a las coordenadas de 0,008 grados centígrados y 6,118 mBar de presión que es donde coexisten las tres fases en equilibrio.

En la liofilización es importante el estudio de este diagrama, ya que en la primera fase el producto se congela, en una segunda fase el producto helado sublima gracias a la presencia de vacío y el vapor de agua emitido se solidifica en la pared del condensador, evitando así la fusión del producto.

El diagrama se cumple en agua pura, sin embargo deja de aplicarse cuando se trata de un sistema de más de un componente, en el que además de la presión y la temperatura interviene la concentración del soluto en relación con el solvente, de tal forma que el punto triple es desplazado a valores de temperatura y presión inferiores a los del agua pura a lo que se denomina punto eutéctico. Si en estas condiciones se aporta el calor latente de sublimación unos 2,84MJ/kg el hielo se transforma directamente en vapor.

- Temperatura en la que ocurre la máxima solidificación

Está se relaciona con el punto eutéctico y las desviaciones de conductividad eléctrica de un sistema, durante su congelación y descongelación, ya que la resistencia de una solución acuosa, cambia y aumenta a medida que la solución se va enfriando. Esto se refleja en la apariencia del producto, aún cuando este se observe en un estado

sólido, continúa subiendo la resistencia al bajar la temperatura, afectando la calidad del producto liofilizado (LC, 2010).

El producto ya congelado debe presentar una estructura sólida sin intersticios en los que se concentre líquido favoreciendo la sublimación. Estas últimas son propiciadas por la presencia de azúcares, alcoholes, cetonas, aldehídos y ácidos, así mismo como por las altas concentraciones de sólidos en el producto inicial (Orrego Alzate, 2003).

## **2. Sublimación o desecación primaria**

Gran parte del agua libre pasa a vapor. Los parámetros temperatura, presión y tiempo pueden ser modificados independientemente pero se encuentran muy relacionados, ya que no es posible modificar alguno, sin que se afecten los otros, por lo que en todo momento deben ser considerados y analizados en conjunto (Telstar; Orrego Alzate, 2003).

El proceso de sublimación es mucho más eficiente a presiones mínimas debido a que el agua se extrae por un impulso originado por el gradiente de presión total (Alvarado, 1979). El paso de hielo a vapor requiere gran cantidad de energía que se suministra en alto vacío pues la interfase de secado se mueve hacia el interior de la muestra y el calor tiene que atravesar capas congeladas (sistemas liofilizados en bandeja, sin granular) o secas (en granulados), generándose un considerable riesgo de fusión del material intersticial (Orrego Alzate, 2003).

## **3. Desorción o desecación secundaria**

En esta etapa se elimina el vapor de agua restante, mediante la evaporación del agua no congelada ligada al producto. Se lleva a cabo con una temperatura inferior a la de desnaturalización del producto y se logra una humedad final hasta valores inferiores al 1 % (Antón Fos, y otros 2011).

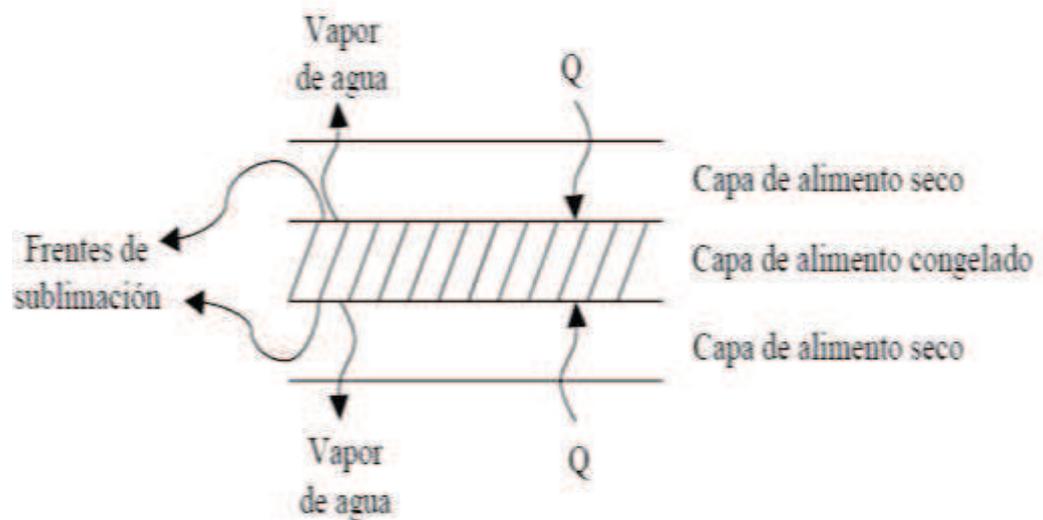
El paso de hielo a vapor requiere gran cantidad de energía que es suministrada en alto vacío, pues la interfase de secado se mueve hacia el interior de la muestra y el calor tiene que atravesar capas congeladas (sistemas liofilizados en bandeja, sin granular) o secas (en granulados), generándose un considerable riesgo de fusión del

material intersticial o quemar la superficie del producto que ya está seco (Oliva y Herrera, Liofilización, 2010).

Durante el proceso de liofilización ocurren dos procesos (ITESCAM, 2007):

- Transferencia de vapor de agua desde el frente de hielo a través de la capa seca hasta la zona calefactora por difusión.
- Transmisión del calor desde la zona calefactora a la superficie del hielo a través de la capa seca o liofilizada por conducción.

Por lo que existe transferencia simultánea de calor y de masa. Durante la etapa de liofilización coexisten dos capas bien diferenciadas en el producto sometido a secado: una capa congelada y con toda el agua inicial presente, y otra, ya deshidratada y separada de la anterior por la denominada superficie de sublimación del hielo. Esta superficie no está perfectamente definida, sino que es un frente difuso de sublimación (véase fig.1.9.) (ITESCAM, 2007).



**Fig.1. 9. Representación de los frentes de sublimación y la transferencia de calor en un proceso de liofilización (ITESCAM, 2007).**

La velocidad de transferencia de vapor a través de las capas liofilizadas cumple la ley de Darcy, es decir la velocidad de flujo es directamente proporcional a la caída de presión (ITESCAM, 2007):

$$\frac{dx}{dt} = b \cdot A \cdot \frac{(P_i - P_s)}{e}$$

donde,

$dx/dt$  es el flujo másico de vapor a través de la capa seca (kg vapor/s)

$b$  es la permeabilidad de la capa de alimento seco con respecto al transporte de vapor (kg/msPa)

$P_i$  es la presión de vapor en el frente de sublimación (Pa).

$P_s$  es la presión de vapor de agua en la superficie de la capa seca (Pa).

$e$  es el espesor de la capa seca (m).

$A$  es el área efectiva de sublimación (m<sup>2</sup>)

Por otra parte la velocidad de transferencia de calor es:

$$\frac{dQ}{dt} = K_d \cdot A \cdot \frac{(T_s - T_i)}{e}$$

donde,

$e$ , espesor de la capa seca (m)

$K_d$  conductividad térmica de la capa seca (J/smK)

$T_s$  es la temperatura de la superficie de la capa seca (°C)

$T_i$  es la temperatura del hielo en el frente de sublimación (°C).

#### 1.4.1.5 Ventajas de la liofilización

La temperatura a la cual es sometido el producto, hace que el mismo se mantenga estable, sin que se produzcan cambios químicos en su interior, o se vean afectados por degradación de microorganismos o de enzimas auto catalíticas. Debido a la baja temperatura en que se opera, aumenta la estabilidad del producto dado que la pérdida del constituyente volátil es mínima (es decir se mantienen las propiedades iniciales del producto como forma, olor, color), se reduce el peligro de contaminación debido a las condiciones de esterilidad con las que se opera, se eliminan los fenómenos de oxidación, dado que se opera y envasa a alto vacío (Krishna Prasad, 2010)

La gran porosidad del producto facilita con rapidez la reconstitución por la adición de agua o del solvente recomendado. Al ser despreciable la humedad ( $< 0.5\%$ ) remanente, es un proceso muy aplicado para deshidratar productos higroscópicos, además permite que el producto pueda ser almacenado en condiciones de fácil acceso por periodos prolongados (Antón Fos, y otros, 2011).

#### **1.4.1.6 Inconvenientes de la liofilización**

Entre los factores de mayor impacto en el proceso de liofilización se mencionan: la necesidad de recipientes definitivos de almacenamiento y sistemas de sellado hermético considerando la posibilidad de rehidratación del producto final, que en muchos casos depende las características iniciales del mismo (Aulton, 2004).

El proceso de liofilización es más lento que los procesos convencionales de secado por lo que requiere mayor consumo energético, lo que lo convierte en un proceso costoso (Aulton, 2004).

#### **1.4.1.7 Aplicaciones**

En la industria las empresas de producción de alimentos demandan con mayor frecuencia la aplicación de procesos de liofilización. Los productos más destacados son: café, sopas, alimentos instantáneos, ajo, leche, levadura, pulpa de frutas, entre otros (LC, 2010).

La industria farmacéutica lo aplica en medicamentos fáciles de rehidratar y asépticamente empacados, así como también para deshidratar antibióticos, productos inmunológicos, vacunas, sustancias derivadas de ingeniería genética, proteínas de alto peso molecular, plasma sanguíneo (PT, 2004).

En la industria cosmética ha aumentado el uso de liofilización para preparar finos maquillajes, tintes de cabello y bases sofisticadas para la elaboración de cremas faciales (PT, 2004).

La industria química está utilizando liofilización para preparar químicos refinados, catalizadores y filtros selectivos (PT, 2004).

Existen además muchas otras aplicaciones del proceso de liofilización en la que se incluyen, estabilización de material vivo como cultivos microbianos, preservación de especímenes animales completos para su exhibición en museos; restauración de libros que han sido dañados por agua y en procesamiento de muestras para microscopía electrónica (LC, 2010).

## **1.4.2 Ovinos**

### **1.4.2.1 Descripción**

La oveja domestica (*Ovis aries*) un mamífero ungulado, rumiante, posee patas acabadas en pezuñas, a diferencia de otros rumiantes como el rebeco y el ciervo, presentan una cornamenta permanente; puede soportar altas y bajas temperaturas pero no en lugares húmedos. De los ovinos puede obtenerse: leche, carne, lana y cuero (Coronel Castillo, 2007). A nivel de laboratorio el producto más apreciado de estos animales es su sangre.

### **1.4.2.2 Clasificación taxonómica**

Clase: Mamíferos (*Mammalia*)

Orden: Ungulado (*Ungulatus*)

Suborden: Artiodáctilos (*Artiodactyla*)

Familia: Bóvidos (*Bovidae*)

Subfamilia: Caprina (*Caprinae*)

Tribu: Caprinos (*Caprini*)

Género: Ovinos (*Ovis*)

Especie: Ovina (*Ovis Aries*)

Fuente: (Porras Pino, 1981)

### **1.4.2.3 Características anatómicas y fisiológicas de los ovinos**

La oveja doméstica presenta un cariotipo de 54 pares de cromosomas, una altura de 70 a 80 cm, cuerpo robusto cubierto de lana y no presentan barba. Poseen cola caída la cual es cortada a las pocas semanas de nacidos. Presentan un período de gestación de 150 días (Coronel Castillo, 2007).

Con respecto al sistema endócrino: presentan glándula interdigital, lacrimal y orificio lacrimal, no presentan glándula odorífera.

Se denomina oveja a la hembra adulta de los ovinos, carnero al macho adulto; las crías se denominan corderos y corderas hasta que cumplen un año de edad y se denominan borregos y borregas a los ovinos entre uno y dos años de edad (fig. 1.10) (Dickson U. & Muñoz Milano, 2005).



**Fig.1. 10. Oveja *Ovis aries*.**

### **1.4.3 Sangre de Carnero**

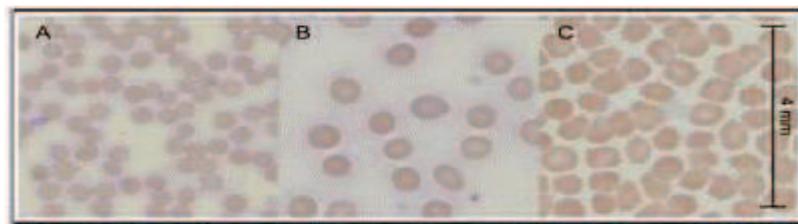
La sangre de carnero constituye un producto biológico de gran utilidad en métodos de diagnóstico clínico. Es utilizado como suplemento en la elaboración de medios de cultivo y en pruebas de fijación de complemento. Los medios nutritivos utilizados comúnmente, son de origen empírico y contienen materias orgánicas complejas; además el uso de sangre de carnero favorece la diferenciación de determinadas especies bacterianas, sobre todo del género *Streptococcus spp.* (Bencomo Fonte, y otros, 2008).

La sangre de carnero como suplemento de agar sangre permite una mejor visualización de la hemólisis en 24h, por una menor concentración de NAD libre. Es, por tanto, que se ha estandarizado la suplementación de los medios de cultivo con una concentración final del 5 al 10% de sangre fresca desfibrinada (Singleton, 2004). Las reacciones hemolíticas de *Streptococcus* son claramente identificadas al utilizar medios de cultivo con este suplemento (Bourne, Himmelreich, Sharma, Mountford, y Sorrell, 2001; Brizuela, 2007).

Comparando la efectividad de la sangre de carnero con sangre de otros animales, Chávez Castillo, y otros, (2007), mencionan que: los *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, presentan  $\beta$ -hemólisis en sangre de carnero, mientras que en raras ocasiones se produce este tipo de hemólisis en sangre de caballo, o se presentan como colonias no hemolíticas. La sangre bovina se deteriora rápidamente por auto-hemólisis, su uso no es extendido en la elaboración de medios de cultivo agar sangre.

Por la dificultad de la producción de medios de cultivo suplementados con sangre de carnero, en los laboratorios clínicos se ha optado por suplementar con sangre humana, sin embargo Yeh, Pinsky, Banaei, y Baron, (2009), aseguran:

“... la variación en la actividad hemolítica de cultivos de SGB en sangre animal, versus sangre humana se debe a diferencias en la morfología y a la composición de la membrana de los glóbulos rojos que afecta su susceptibilidad para ser lisados por las hemolisinas bacterianas” (Yeh, Pinsky, Banaei, y Baron, 2009, pág. 2). Véase fig. 1.11



**Fig.1. 11. Comparación entre eritrocitos de carnero, eritrocitos humanos, y eritrocitos expirados de un banco de sangre después de 45 días de almacenamiento (Yeh, Pinsky, Banaei, y Baron, 2009). Los eritrocitos de carnero (A) presentan menor tamaño con respecto a los eritrocitos humanos (B), los eritrocitos expirados (C), presentan equinocitos.**

Por otro lado Lang y otros, (2007); afirmaron:

“Los glóbulos rojos de oveja producen los mejores resultados en la prueba de CAMP debido a que contienen un 51% de esfingomielina, a diferencia de los glóbulos rojos humanos, que solo la contienen en un 26%” (Lang, y otros, 2007, pago 38167).

Durante el proceso de extracción de sangre, se debe considerar las características del animal como se describe en la Tabla 1.1.

Tabla 1. 1. Requerimientos establecidos para la extracción de sangre.

Peso promedio (Kg.)	Sangre a extraer (mL)	Frecuencia de extracción
20	200-250	Mensual
30	300-350	Mensual
40	400-450	Mensual
50	500 o más	Mensual
Fuente: PNT. No. 12. Dpto. Vivario. FCM. Pinar del Río		

#### 1.4.4 Diagnóstico clínico

##### 1.4.4.1 Hemólisis

El crecimiento de bacterias en medio de cultivo agar sangre puede desarrollar zonas ligeramente decoloradas alrededor de las colonias, esto se debe a que los eritrocitos han sido lisados (*halos*) o a la decoloración de la sangre. La lisis de los eritrocitos (*hemólisis*) se debe a la actividad de proteínas (*hemolisinas*) liberadas por cierto tipo de bacterias. Ciertas especies bacterianas presentan hemólisis transparente incolora contrastando con el color rojo opaco del medio, denominándose  $\beta$ -hemólisis, como es el caso de *Streptococcus aureus*; mientras que la hemólisis observada en *Streptococcus pneumoniae* presenta un halo verdoso  $\alpha$ - hemólisis (véase fig.1.12) (Singleton, 2004).



Fig.1. 12. Representación de los diferentes tipos de hemólisis. Fuente: (Diccionario Ilustrado de términos médicos)

Las cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* son generalmente  $\beta$ -hemolíticas y su aislamiento es particularmente evidente en agar sangre de carnero, ya que presentan halos transparentes alrededor de las colonias en crecimiento. Los *Enterococcus spp.*, en cambio pueden generar crecimientos con halos alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) o gama ( $\gamma$ ) hemolíticos alrededor debido a la producción de hemolisinas diferentes. Otras cepas de *Streptococcus spp.*, pueden ser  $\alpha$   $\beta$  hemolíticos, generalmente forman colonias

pequeñas. Las cepas productoras de gran cantidad de material capsular tienen un aspecto mucoso, mientras que las colonias de organismos no encapsulados se denominan brillantes (Bourne, y otros, 2001).

#### 1.4.4.2 *Streptococcus*

La clasificación de los *Streptococcus* en base a su capacidad hemolítica y los estudios posteriores para su completa identificación dependen entonces de la calidad del medio de cultivo en el que son aislados a partir de la muestra primaria. Considerando que este tipo de microorganismos se pueden encontrar de forma normal en la superficie de la piel y en las mucosas de los seres humanos, y que existen ciertas barreras primarias de defensa que evitan su invasión y la posterior colonización, es entonces de vital importancia contar con mecanismos y estrategias de cultivo que apoyen a los técnicos de laboratorio y a los microbiólogos a diferenciar las especies diversas de microorganismos asociados a una infección así como también aquellos que forman parte de la microbiota normal del hospedador (Valencia, Calderón, Callisaya, y Choque, 2010).

Los *Streptococcus* de aislamiento frecuente se han descrito por los antígenos de superficie o grupos de "Lancefield". Las técnicas de identificación de estos antígenos son extremadamente costosas y dependen del cultivo inicial del microorganismo. Es así que existen 7 tipificaciones comunes nominadas con letras del alfabeto desde la A hasta G (Rodríguez, 2002).

En el grupo A se clasifica el *Streptococcus pyogenes*, microorganismos  $\beta$ -hemolítico aislado principalmente en infecciones de tipo faríngea en los niños y asociado con complicaciones como la fiebre reumática, cardiopatías y la glomerulonefritis (Fitzpatrick, 2009).

El grupo B está representado por *Streptococcus agalactiae* colonizador de la mucosa genital y de vital importancia cuando existe inmunodepresión o en mujeres embarazadas, puesto que puede causar graves infecciones en los neonatos (Brizuela, 2007).

En el grupo C, se han descrito microorganismos asociados a la mucosa respiratoria de ganado bovino y equino. También son microorganismos  $\beta$ -hemolíticos.

Los *Enterococcus spp.* pertenecen al grupo D. En los grupos E-G se han clasificado microorganismos menos comunes, pero de igual relevancia en el aislamiento diagnóstico clínico (Rodríguez, 2002).

Los *Streptococcus spp.*  $\alpha$ -hemolíticos, son parte de la microbiota normal de boca y faringe, entre ellos se destacan *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* del grupo *viridans*. Sin embargo estos microorganismos pueden asociarse a infecciones graves como la neumonía en vías respiratorias bajas o problemas bucales como la gingivitis o las caries respectivamente (Tortora, Funke, y Case, 2007).

#### **1.4.5 Liofilización de sangre**

##### **Crio-protectores de células sanguíneas**

A menudo muchos de los productos a ser liofilizados presentan características físico-químicas adecuadas que permiten su deshidratación directamente, sin embargo los avances tecnológicos han permitido deshidratar productos termolábiles, mediante la adición de aditivos, crio-protectores, estabilizadores y otros (Wilhelm Oetjen, 2008).

Los crio-protectores son adicionados para prevenir la degradación del producto durante el proceso de secado y además confiere un ambiente estable durante el almacenamiento. Dentro de los crio-protectores se encuentran: dextranos, polivinilpirrolidonas, albúminas, óxido de polietileno, polietilenglicol, manitol, sorbitol entre otros (Day y McLellan, 2007).

En la crio-conservación de células sanguíneas se aplican carbohidratos, los cuales son biológicamente compatibles con las células rojas de la sangre (RBCs), no destruyen los eritrocitos y son capaces de atravesar la membrana de los mismos. Los carbohidratos pueden ser seleccionados entre monosacáridos, debido a que estos no atraviesan la membrana en una extensión importante. Se prefieren los monosacáridos pentosas y hexosas (xilosa, glucosa, ribosa, manosa y fructosa) en concentraciones de 0,5 a 4,0 molar, y de modo preferible aproximadamente dos molar (Goodrich y Williams, 1989).

La liofilización de RBCs en una solución de carbohidrato, mejora la recuperación de hasta al menos 50% de células intactas después de la liofilización, evitando la

condensación y destrucción de la membrana celular en soluciones acuosas sin el carbohidrato (Goodrich y Williams, 1989).

La adición a la solución de un polímero biológicamente compatible, soluble en agua, aumenta significativamente el porcentaje de hemoglobina biológicamente activa presente en las células y recuperado después de la reconstitución de células rojas de sangre después de liofilización. El polímero puede encontrarse presente en la solución en concentraciones desde 0,1 milimolar hasta saturación. Preferiblemente, el polímero tiene un peso molecular de al menos 10K. Entre los polímeros seleccionados constan: polivinilpirrolidona (PVP), derivados de polivinilpirrolidona, dextrano y derivados de dextrano. El uso de la solución de carbohidrato - polímero en la liofilización de células rojas de sangre, permite la recuperación de células intactas, un porcentaje importante de las cuáles contiene hemoglobina biológicamente activa (Goodrich y Williams, 1989).

### **1.5 Hipótesis**

Los *Streptococcus spp.* crecen en medios de cultivo enriquecidos con sangre liofilizada de carnero obtenida con un proceso estandarizado de liofilización.

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Participantes

El presente proyecto autoría de Alicia Paulina Chicaiza Martínez contó con la participación de los docentes de la carrera de Biotecnología de la ESPE, Fernanda Loayza MSc. como tutora y Jaime Gía MSc. como cotutor. Durante la ejecución de la investigación también se contó con el aporte técnico del Dr. Juan Giacometti, la Ing. Daysi Muñoz y Sebastián Recalde del Laboratorio de recursos Bioacuáticos y Acuicultura.

### 2.2. Zona de Estudio

El presente proyecto fue ejecutado en el Laboratorio de recursos Bioacuáticos de la Hacienda El Prado (IASA I) localizada en el cantón Rumiñahui de la provincia de Pichincha cuyas coordenadas geográficas son: latitud  $0^{\circ}22'42,76''S$ ; longitud  $78^{\circ}24'58,93''$  (fig.2.1).



Fig.2. 1. Localización geográfica de la Hacienda El Prado (IASA I). Fuente: Google Maps.

### 2.3 Procedimientos

#### 2.3.1 Fase Inicial

El proyecto de investigación propuesto se llevó a cabo a partir de un diseño de corte cuanti – cualitativo en el cual se generó un instrumento de apoyo para la investigación de campo, basado en una encuesta formal aplicada a un grupo de posibles

beneficiarios del producto final de esta investigación. Con este instrumento se establecieron las técnicas utilizadas actualmente en el aislamiento de *Streptococcus spp.*, así como también las ventajas y desventajas que estas herramientas tienen en su aplicación y la percepción que los microbiólogos tienen respecto a las mismas. La encuesta (Anexo 45) fue validada con la utilización un modelo estadístico basado en la prueba de Alfa de Cronbach.

El análisis de los datos reportados en la encuesta guió la justificación de la necesidad de establecer procesos eficientes de utilización de sangre de carnero como suplemento efectivo de los medios de cultivo utilizados comúnmente en el aislamiento de microorganismos fastidiosos de tipo *Streptococcus spp.*, así como también la viabilidad del proceso de liofilización de la sangre de carnero en cuanto a la perspectiva que tienen los usuarios futuros de este producto y a la base bibliográfica que respalda la posibilidad del proceso de liofilización eficiente de los eritrocitos.

### **2.3.2 Fase Experimental**

#### **2.3.2.1 Animales**

Los carneros que se utilizaron durante el desarrollo de la investigación fueron provistos por la granja integral de la Hacienda el Prado del Instituto Agropecuario Superior Andino (IASA I). Los animales fueron registrados en los formularios diseñados para el efecto, donde se establecieron los períodos en los cuales se tomaron muestras sanguíneas en condiciones de asepsia, así como también los períodos de desparasitación y tratamiento.

Después del protocolo de desinfección con solución yodada, las muestras sanguíneas fueron tomadas por venopunción yugular con una aguja de calibre 16 conectada a un matraz estéril con perlas de vidrio en una concentración de 2 unidades por mL de sangre a extraer (Bencomo Fonte, y otros, 2008).

#### **2.3.2.2 Desfibrinación de Sangre de Carnero**

Se inmovilizó al animal (carnero sano) mediante la utilización de una cuerda, después de esquilarse la zona lateral izquierda del cuello con tijera, se desinfectó con una cantidad considerable de alcohol yodado. Se identificó la localización de la vena yugular y se introdujo el bisel de la aguja número 16 (Bencomo Fonte, y otros, 2008).

Una vez que se observó que la sangre fluía a través de la manguera, se recolectó en el matraz en un volumen aproximado de 200mL. Durante la extracción el matraz fue agitado con movimientos rotatorios.

Para liberar los componentes celulares del coágulo que se forman naturalmente, la desfibrinación completa se dio después de 10 minutos de agitación constante con movimientos circulares a una velocidad de 120 rpm. Las perlas de vidrio captaron los restos de fibrina en el fondo del matraz. La sangre así desfibrinada, se transfirió a recipientes estériles para su debido procesamiento (OMS, 2003) <sup>1</sup>.

### **2.3.2.3 Liofilización**

En base a la bibliografía se estableció un protocolo de liofilización prototipo, se generaron puntos críticos del proceso los cuales fueron modificados a partir de la evaluación del producto liofilizado hasta que se consiguió establecer un protocolo fijo y reproducible. Los puntos críticos fueron la temperatura y el tiempo de congelación ya que de estos dependió la eficiencia del proceso. Se analizó la utilización de fructosa y glucosa como sustancias crio-preservadoras que fueron utilizadas sin alterar las características iniciales del producto.

#### **Liofilización de sangre de carnero**

Se colocó la sangre desfibrinada de carnero en soluciones de 2M y 3M de glucosa en una solución de PBS a pH 7,2 y 6mM de PVP 40K (muestras 1 y 3), paralelamente se colocó la sangre desfibrinada de carnero en soluciones de 2M y 3M de fructuosa en una solución de PBS a pH 7,2 y 6mM de PVP 40K (muestras 2 y 4). Se colocaron las muestras en viales de liofilización y se procedió a congelar parte de las muestras por sumergimiento en nitrógeno líquido por 2 y 4 horas. La otra parte se congeló a -70°C por inmersión en hielo seco de 2 y 4 h.

Se llevaron las muestras pre-congeladas al liofilizador bajo condiciones de: -100 micrómetros de Hg y -56°C, se dejó secar a fondo por un período de 24 h (LC, 2010).

---

<sup>1</sup> El tiempo estimado de viabilidad de la sangre desfibrinada de carnero a -4°C es de aproximadamente 15 días.

Una vez obtenido el producto liofilizado, se procedió a rehidratar con una solución salina de 0,85% a 37°C. Se realizaron las pruebas de control y viabilidad del producto liofilizado rehidratado.

### **Evaluación**

Una vez definidos los parámetros adecuados para establecer el protocolo de liofilización, se procedió a evaluar la humedad del producto final, el hematocrito y recuento de eritrocitos viables al ser rehidratados. El producto final fue almacenado en frasco de vidrio con tapa hermética. El tiempo de vida útil del producto liofilizado se evaluó con un diseño experimental completamente al azar.

### **Determinación del hematocrito**

Se colocó la muestra de sangre en tubos capilares hasta una altura de un centímetro del borde, se tapó con plastilina; se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y se midió el porcentaje de hematocrito con ayuda de la regla. (Mitchell Lewis, Bain, y Bates, 2008)

### **Determinación de hemoglobina**

Se Colocó 20  $\mu$ L de sangre en un tubo de ensayo con 5 mL de ferrocianuro de potasio, se dejó reposar el tubo en posición vertical por 10 min, se ajustó el equipo a factor 39 y 546 nm y se calibró con agua destilada. Se añadió la muestra a la celdilla, se registró el valor obtenido y se comparó con los parámetros normales (San Miguel y Sánchez Guijo, 2009).

### **Fórmula leucocitaria**

Se realizó un frotis de la muestra a analizar, se colocaron unas gotas de reactivo de Wright en las placas y se esperó 5 minutos, se añadió unas gotas de agua destilada y después de 10 minutos se lavó la placa; se analizó la forma mediante el conteo de 100 eritrocitos de cada muestra y rehidratación; el tamaño de los eritrocitos se evaluó en 20 eritrocitos de cada muestra y rehidratación mediante lente microscópico previamente calibrado (Mitchell Lewis, y otros, 2008).

### **Conteo de glóbulos rojos**

Se Colocó 20  $\mu$ L de sangre en un tubo de ensayo con 4 mL de solución salina, se agitó suavemente y se dejó reposar unos minutos, se descargó de 4 a 5 gotas y se colocó una gota en el borde de la cámara para que por capilaridad se llene. Se observó al microscopio en lentes de 10x y luego 40x sobre el cuadrado central grande (San Miguel y Sánchez Guijo, 2009).

Se contó los eritrocitos en los objetivos centrales (5 cuadrados pequeños uno central y cuatro angulares- 80 cuadritos en total).

#### **2.3.2.4 Medios de Cultivo**

Posteriormente se organizó las herramientas y procesos necesarios para la elaboración de medios de cultivo suplementados con sangre liofilizada de carnero utilizando agar base de sangre como medio de cultivo inicial diluido y autoclavado como especifica la casa comercial. La suplementación se generó a un porcentaje de sangre liofilizada correspondiente al 5 y 10% del volumen total del medio de cultivo, siguiendo las técnicas estándar de laboratorio de microbiología.

Finalmente se aplicaron métodos comparativos para determinar la eficiencia del medio de cultivo suplementado con sangre liofilizada de carnero, sembrando cepas de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico del grupo A, B, *Streptococcus viridans* y *Streptococcus milleri*; las cuales fueron aisladas e identificadas en laboratorios clínicos de referencia. Se evaluó el crecimiento, la morfología de las colonias de microorganismos así como también el color y diámetro de los halos de hemólisis generados en medios suplementados con sangre fresca y sangre liofilizada de carnero.

#### **2.3.2.5 Evaluación costo beneficio**

Para la determinación del costo requerido para la producción del suplemento liofilizado de sangre de carnero, se elaboró un registro de datos provenientes de las proformas de los materiales y reactivos a utilizados durante la ejecución del proyecto, así como también se elaboró una estimación de la depreciación de los instrumentos y equipos a utilizar. El precio final del diagnóstico dependió de los mejores resultados obtenidos a partir de la fase experimental.

## 2.4 Diseño Experimental

### 2.4.1 Liofilización

#### 2.4.1.1 Fase de laboratorio

A partir de un diseño factorial se estableció las mejores condiciones de congelación en el proceso de liofilización donde fue importante considerar la temperatura de congelación, el tiempo de congelación y el tipo de sustancia crio preservadora utilizada. Estos parámetros consistieron en los factores del diseño factorial (2x2x2x2) con cinco repeticiones. En el diseño factorial propuesto, se contaron con 80 experimentos en total.

Según Mendenhall, y otros, (1997) la relación causa-efecto se explica con el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + C_k + D_m(ABCD)_{ijkl} + \varepsilon_{ijklm}$$

Donde:

$\mu$  es la medida de las poblaciones de todos los tratamientos

A es el factor TEMPERATURA DE CONGELACIÓN

$i$  representa tres niveles de temperatura de congelación (-76 y -196 °C)

B es el factor TIEMPO DE CONGELACIÓN

$j$  representa dos niveles (2 y 4 h.)

C es el factor SUSTANCIA CRIO PRESERVADORA

$k$  representa dos niveles (glucosa y fructosa)

D es la CONCENTRACIÓN DE LAS SUSTANCIAS

$l$  representa dos niveles (2 y 3 M)

$m$  número de repeticiones

#### 2.4.1.2 Experimento:

Durante el proceso de congelación de los eritrocitos de carnero, previo a la liofilización, se varió la temperatura de congelación y el tiempo de congelación, posteriormente se midió la influencia de los factores antes mencionados sobre la variable de respuesta la apariencia del producto final, el hematocrito y el recuento de

glóbulos rojos. De esta manera se establecieron los mejores parámetros para la congelación inicial en el proceso de liofilización.

#### **2.4.1.3 Unidad experimental**

Las unidades experimentales fueron los viales de liofilización de 20 mL de capacidad nominal con 5 mL de sangre desfibrinada de carnero que fueron previamente pesados para luego ser sometidos al proceso de congelación y posterior liofilización.

#### **2.4.1.4 Variables de respuesta**

Las variables de respuesta se evaluaron en la apariencia del producto liofilizado, la humedad, el recuento de eritrocitos por mililitro de solución rehidratada y el hematocrito final en porcentaje. Con los resultados arrojados por estas variables se estableció el proceso más eficiente de congelación.

#### **2.4.1.5 Factores controlables**

Los factores controlables fueron la temperatura de congelación, el tiempo de congelación, la concentración de la solución crio preservadora, el tiempo en el protocolo final de liofilización.

#### **2.4.1.6 Factores no controlables o de ruido**

Las pérdidas ocasionales de energía eléctrica, las condiciones ambientales, y el hematocrito inicial de los animales que se utilizaron en la provisión de sangre.

#### **2.4.1.7 Factores estudiados**

El hematocrito, el recuento de glóbulos rojos, la humedad y apariencia del producto liofilizado fueron los factores estudiados en la etapa de liofilización.

#### **2.4.1.8 Niveles y tratamientos**

Cada factor se compuso de dos niveles como sigue: dos niveles de temperatura de congelación, correspondientes a  $-76^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$ , dos niveles de tiempo de

congelación correspondientes a 2 y 4 h, dos sustancias crio preservadoras correspondientes a glucosa y fructosa y 2 niveles correspondientes a la concentración de las soluciones 2M y 3M. De esta manera se generaron 16 tratamientos de los cuales se establecieron cinco repeticiones por cada uno como se muestra en la Tabla 2.1.

**Tabla 2. 1.Diseño factorial 2x2x2x2.**

de	Tiempo de congelación		Crio preservante
	B1	B2	
Temperatura congelación	A1	A1, B1, C1, D1	A1, B2, C1, D2 C1
		A1, B1, C2, D1	A1, B2, C2, D2 C2
	A2	A2, B1, C1, D1	A2, B2, C1, D2 C1
		A2, B1, C2, D1	A2, B2, C2, D2 C2
		D1	D2
		Concentración de soluciones	

#### 2.4.1.9 Planeación y realización

En esta parte se delimitó el problema de investigación a partir de la preparación de los protocolos de trabajo en cuanto a la técnica de liofilización a seguir, la preparación inicial del instrumento y los parámetros operacionales a considerar antes de la puesta en marcha de la experimentación.

#### 2.4.1.10 Análisis

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el paquete estadístico INFOSTAT versión 2011, a partir de un análisis de varianzas ANOVA con pruebas de Tukey y Scheffé. Las pruebas llevadas a cabo se basaron en la distribución de los datos, considerando los supuestos estadísticos para análisis con estadística paramétrica.

#### 2.4.1.11 Interpretación

Una vez verificados los supuestos, se eligió el protocolo de congelación que presentó mejores resultados en el proceso de liofilización. En caso de que no se cumpla los supuestos de normalidad, de la varianza constante e independencia de los residuos en el diseño factorial, se empleará estadística no paramétrica.

## **2.4.2 Almacenamiento**

### **2.4.2.1 Fase de laboratorio**

En esta fase se evaluó el tiempo de vida útil del producto liofilizado, evaluando el recuento de eritrocitos y hematocrito en un período de 72 horas consecutivas hasta completar 12 días de almacenamiento. Se estableció las características del liofilizado inicialmente obtenido y la concentración de eritrocitos recuperados comparados 5 repeticiones por cada nivel.

### **2.4.2.2 Experimento**

Para establecer las mejores condiciones de almacenamiento del producto liofilizado se tomó en cuenta la variable tiempo de almacenamiento. Así se seleccionaron las mejores condiciones de acuerdo a los resultados que se obtuvieron en esta etapa.

### **2.4.2.3 Unidad experimental**

Para las pruebas de almacenamiento y preservación del suplemento liofilizado, la unidad experimental se definió como un frasco conteniendo un volumen aproximado de 3mL de eritrocitos liofilizados, que se almacenarán a la temperatura ambiente distribuidos al azar.

### **2.4.2.4 Variables de respuesta**

En el experimento de preservación las variables de respuesta (recuento de eritrocitos y hematocrito) se mantuvieron.

### **2.4.2.5 Factores controlables**

El factor controlable fue el período de almacenamiento del producto liofilizado.

### **2.4.2.6 Factores no controlables o de ruido**

Las pérdidas ocasionales de energía eléctrica, las condiciones ambientales.

#### **2.4.2.7 Factores estudiados**

Se estudió la estabilidad del producto liofilizado.

#### **2.4.2.8 Niveles y tratamientos**

Se tomó en cuenta el tiempo en el cual se almacenó el producto a temperatura ambiente. Con estos valores se describió una curva que describió el cambio de las variables de respuesta (recuento de eritrocitos y hematocrito) en el tiempo.

#### **2.4.2.9 Planeación y realización**

En esta parte se delimitó el problema de investigación a partir de la preparación de los protocolos de trabajo en cuanto a la técnica de liofilización, la preparación inicial del instrumento y los parámetros operacionales considerados antes de la puesta en marcha de la experimentación.

#### **2.4.2.10 Análisis**

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el paquete estadístico INFOSTAT versión 2011, a partir de un análisis de varianzas ANOVA con pruebas de Tukey y Scheffé. Las pruebas llevadas a cabo se basaron en la distribución de los datos, considerando los supuestos estadísticos para análisis con estadística paramétrica.

#### **2.4.2.11 Interpretación**

En cuanto al período y temperatura de almacenamiento, los resultados experimentales permitieron establecer las mejores condiciones en las que el producto pudo mantenerse y el tiempo de vida útil del mismo.

### **2.4.3 Evaluación medio de cultivo**

#### **2.4.3.1 Fase de laboratorio**

En la última etapa del experimento se estableció la utilidad de la sangre liofilizada como suplemento de medios de cultivo para el desarrollo de microorganismos del género *Streptococcus spp.* Donde, un medio de agar base en un

volumen de 350 mL suplementado con 5% o 10% de eritrocitos liofilizados de carnero. Se vertió aproximadamente 20mL de medio en cada caja petri para la posterior siembra de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos del grupo A, B, y *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos especie *viridans*, *milleri*. La evaluación cualitativa del crecimiento y los halos hemolíticos se establecieron a partir del análisis microbiológico de un grupo de expertos.

#### **2.4.3.2 Experimento**

Se evaluó el crecimiento y desarrollo de cepas de *Streptococcus spp.*, se realizó también encuestas aplicadas a expertos en el área para establecer diferencias y similitudes.

#### **2.4.3.3 Unidad experimental**

Las pruebas de utilidad de la sangre de carnero como suplemento de medios de cultivo para crecimiento de microorganismos del género *Streptococcus spp.* contaron con una unidad experimental descrita como una caja petri con una siembra por agotamiento con colonias aisladas de un microorganismo cuyo crecimiento fue analizado por un microbiólogo experto.

#### **2.4.3.4 Variables de respuesta**

Para evaluar la utilidad de la sangre de carnero como suplemento del medio de cultivo, las variables de respuesta consistieron en la apariencia, color y forma de las colonias en estudio y el diámetro y característica de los halos de hemólisis que se observaron.

#### **2.4.3.5 Factores controlables**

Los factores controlados correspondieron a la concentración del suplemento en el medio de cultivo y a la especie de microorganismo sembrado en las placas Petri.

#### **2.4.3.6 Factores no controlables o de ruido**

Las pérdidas ocasionales de energía eléctrica, las condiciones ambientales.

#### **2.4.3.7 Factores estudiados**

Los factores estudiados correspondieron a la calidad del crecimiento microbiano y la nitidez de los halos de hemólisis generados en el medio de cultivo suplementado con sangre liofilizada de carnero.

#### **2.4.3.8 Niveles y tratamientos**

Se establecieron a partir de 2 niveles de concentración del suplemento (5 y 10%) La apariencia del medio de cultivo y del crecimiento microbiano será descrita de acuerdo al formulario correspondiente (ANEXO 46).

#### **2.4.3.9 Planeación y realización**

En esta parte se delimitó el problema de investigación a partir de la preparación de los protocolos de trabajo en cuanto a la técnica de liofilización, la preparación inicial del instrumento y los parámetros operacionales a considerar antes de la puesta en marcha de la experimentación.

#### **2.4.3.10 Análisis**

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el paquete estadístico INFOSTAT versión 2011, a partir de un análisis de varianzas ANOVA con pruebas de Tukey y Scheffé. Las pruebas llevadas a cabo se basaron en la distribución de los datos, considerando los supuestos estadísticos para análisis con estadística paramétrica.

#### **2.4.3.11 Interpretación**

Se realizó la evaluación del crecimiento de *Streptococcus spp.* en medios de cultivo enriquecidos con sangre liofilizada de carnero y estandarización previa del proceso de liofilización.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1 Liofilización y almacenamiento

De acuerdo al tipo de solución crio preservadora y su concentración, el tipo y tiempo de congelación se obtuvieron 16 tratamientos (véase tabla.3.1).

**Tabla 3. 1. Descripción de los diferentes tratamientos a los cuales fueron sometidas las muestras de sangre de carnero.**

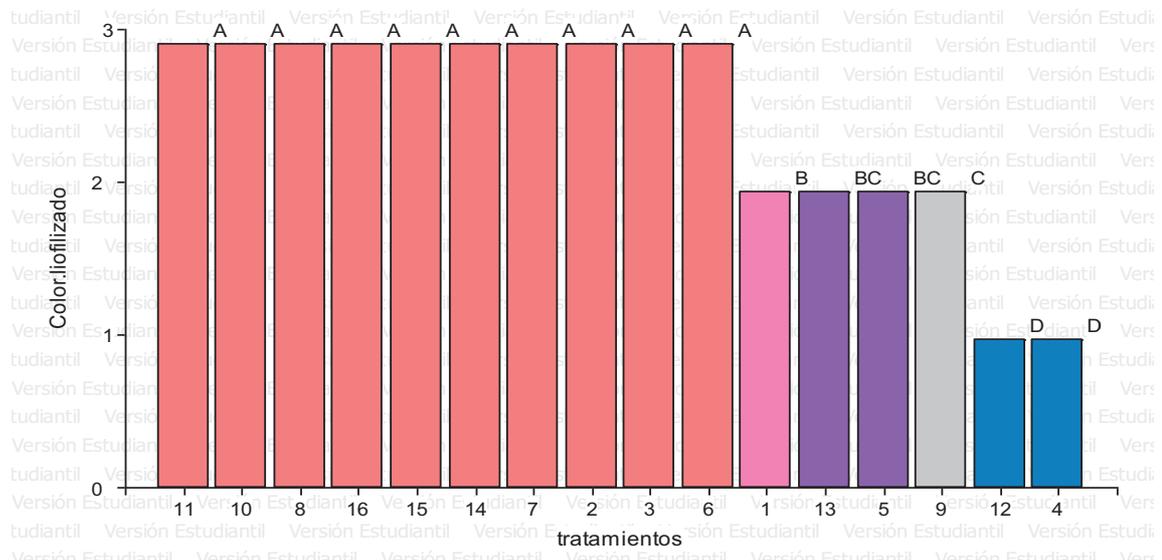
Tratamiento	Tipo de solución crio-preservadora	Concentración solución	Tipo de congelación	Tiempo de congelación
1	Glucosa	2 M	Hielo seco	2 h
2	Glucosa	2 M	Hielo seco	4 h
3	Glucosa	2 M	Nitrógeno líquido	2 h
4	Glucosa	2 M	Nitrógeno líquido	4 h
5	Glucosa	3 M	Hielo seco	2 h
6	Glucosa	3 M	Hielo seco	4 h
7	Glucosa	3 M	Nitrógeno líquido	2 h
8	Glucosa	3 M	Nitrógeno líquido	4 h
9	Fructosa	2 M	Hielo seco	2 h
10	Fructosa	2 M	Hielo seco	4 h
11	Fructosa	2 M	Nitrógeno líquido	2 h
12	Fructosa	2 M	Nitrógeno líquido	4 h
13	Fructosa	3 M	Hielo seco	2 h
14	Fructosa	3 M	Hielo seco	4 h
15	Fructosa	3 M	Nitrógeno líquido	2 h
16	Fructosa	3 M	Nitrógeno líquido	4 h

Se observó que las muestras liofilizadas presentaban un color rojo claro, rojo brillante o rojo tinto y aspecto compacto, esponjoso o pegajoso (véase fig.3.1). Las muestras liofilizadas fueron almacenadas a temperatura ambiente y fueron rehidratadas a los 0, 3, 6, 9 y 12 días.

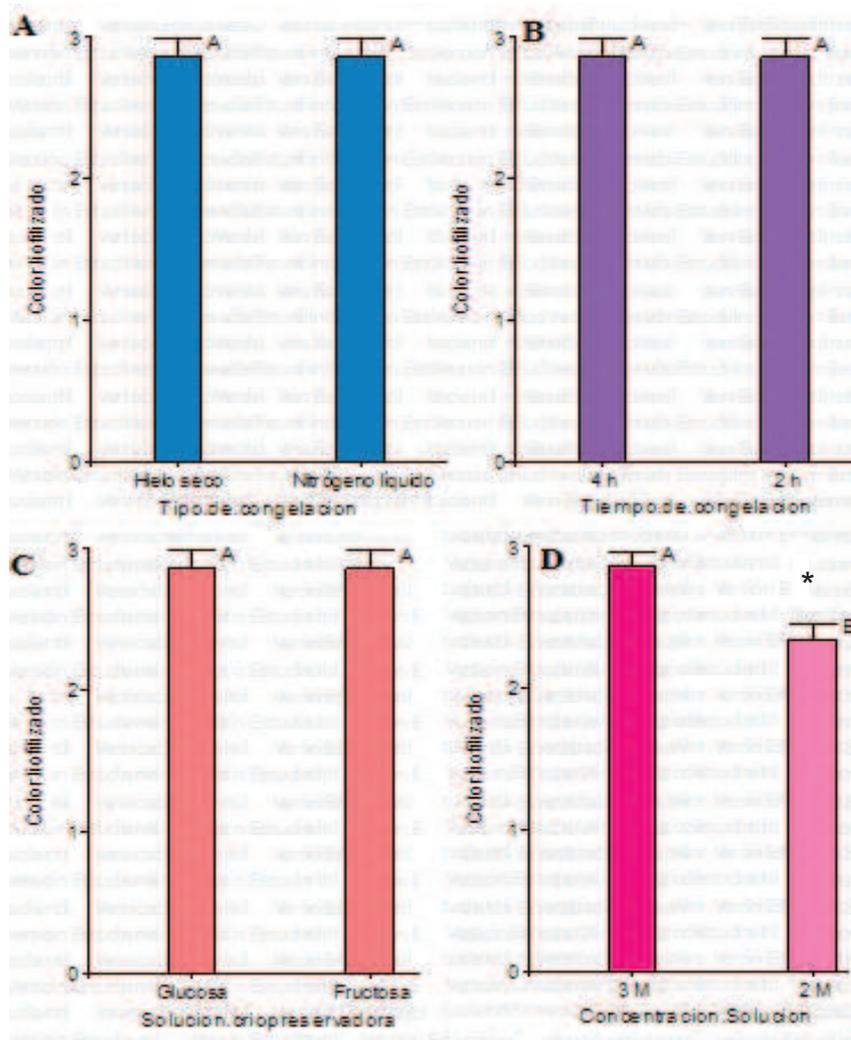


**Fig.3. 1. Muestras liofilizadas. A. muestra rojo brillante de aspecto esponjoso, B. muestra rojo claro de aspecto compacto, C. muestra rojo tinto de aspecto compacto, D. muestra rojo tinto de aspecto pegajoso.**

En cuanto al color de las muestras liofilizadas, la mayoría de tratamientos presentaron color rojo tinto, los tratamientos 9, 5, 13, 1 presentaron color rojo claro y los tratamientos 12, 4, presentaron color rojo brillante (véase fig.3.2 y anexo1 ). De igual manera se evaluó el color de las muestras de acuerdo el tipo de solución criopreservante, la concentración de la misma y el tipo de congelación; obteniéndose como resultado que no existen diferencias significativas. Por otra parte que las muestras sometidas a congelación por 4h presentaron coloración roja tinto, mientras que las muestras sometidas a congelación por 2h presentaron coloración roja clara o roja brillante (véase fig.3.3 y anexo 2,3,4,5).



**Fig.3. 2. Color de las muestras liofilizadas en relación a los diferentes tratamientos evaluados. En la escala, 1 representa rojo brillante, 2 representa rojo claro, 3 representa rojo tinto.**



**Fig.3. 3.** Evaluación del color de las muestras liofilizadas según (A) Tipo de congelación, (B) Tiempo de congelación, (C) Tipo de solución crio-preservadora y (D) Concentración de solución crio-preservadora. En la escala 1 representa rojo brillante, 2 representa rojo claro y 3 representa rojo tinto.

En cuanto a la textura de las muestras liofilizadas, la mayoría de tratamientos presentaron textura pegajosa, los tratamientos 4,12 presentaron textura compacta y los tratamientos 5, 9, 1, 13 presentaron textura quebradiza (véase fig.3.4 y anexo 6). De igual manera se evaluó la textura de las muestras de acuerdo el tipo de solución crio-preservante y la concentración de la misma obteniéndose como resultado que no existen diferencias significativas. Por otra parte las muestras sometidas a nitrógeno líquido y congelación de 4h presentaron textura pegajosa, mientras que las muestras sometidas a hielo seco y congelación de 2h presentaron textura compacta (véase fig.3.5 y anexos 7,8,9,10).

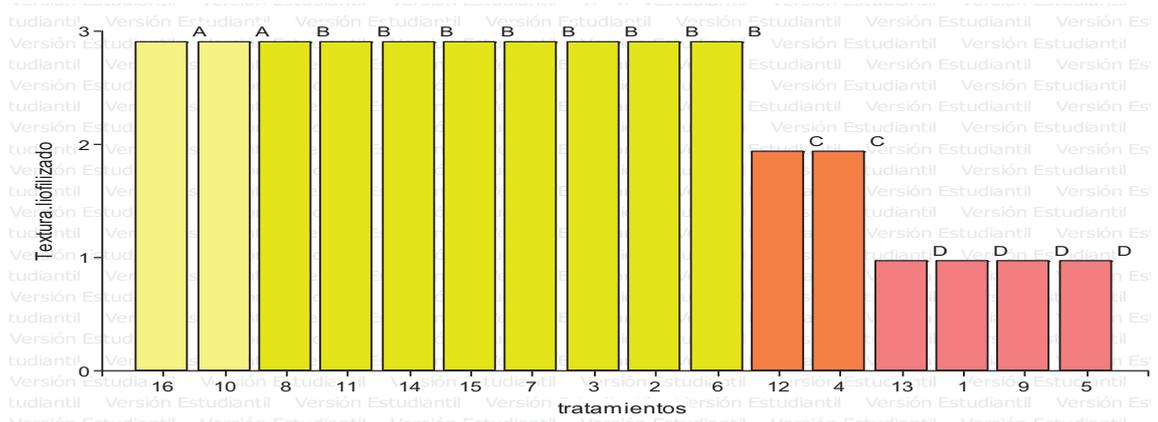


Fig.3. 4. Textura de las muestras liofilizadas en relación a los diferentes tratamientos evaluados. En la escala, 1 representa quebradizo, 2 representa compacto, 3 representa pegajoso.

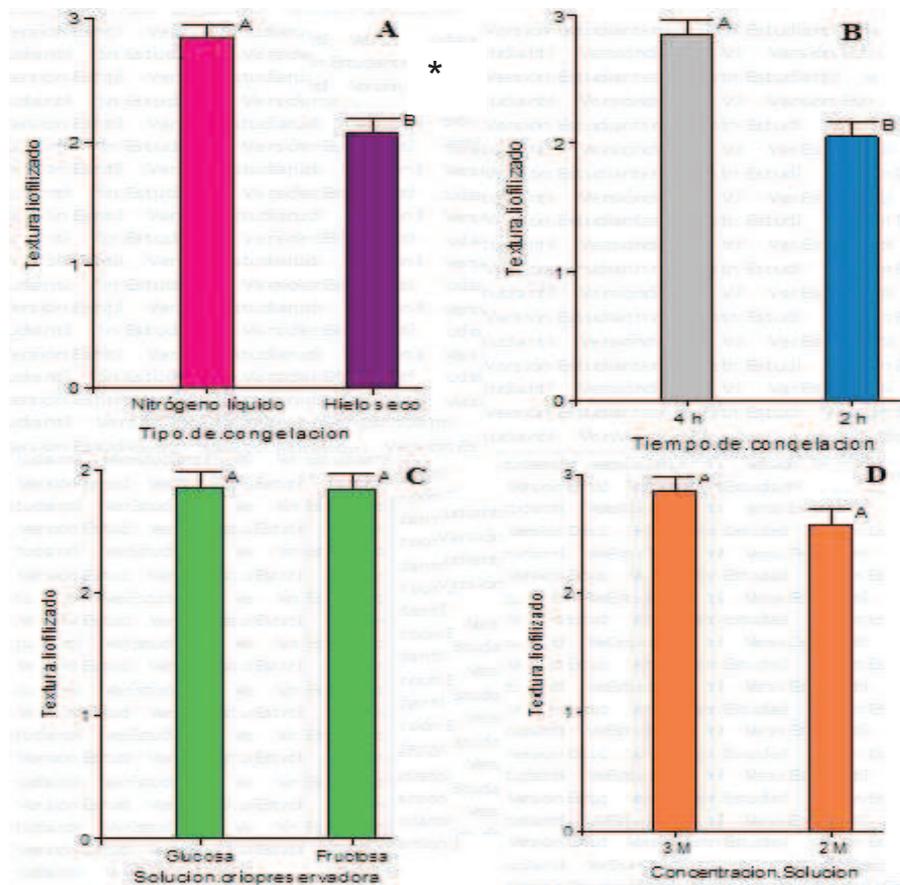
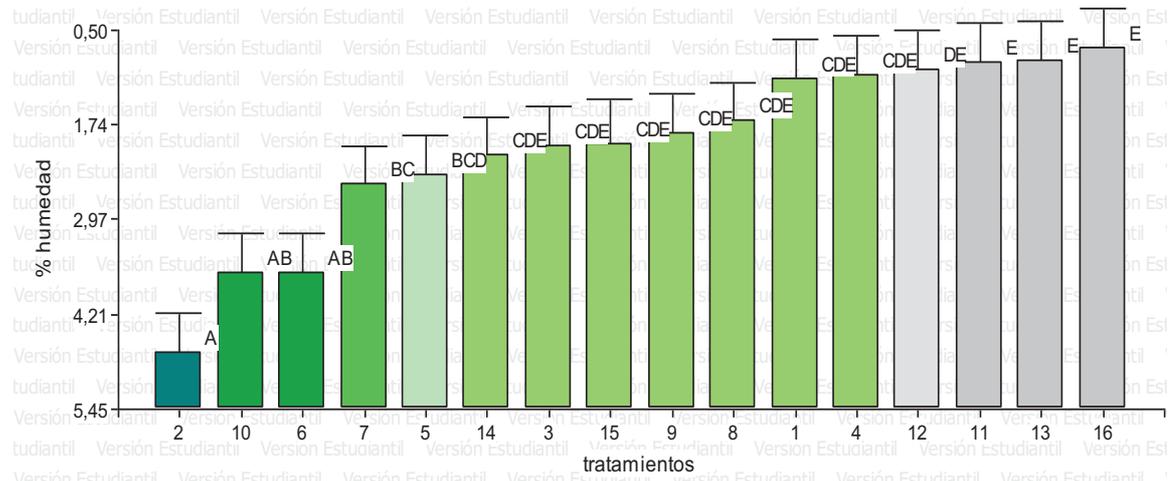


Fig.3. 5. Evaluación de la textura de las muestras liofilizadas según (A) Tipo de congelación, (B) Tiempo de congelación, (C) Tipo de solución crio-preservadora y (D) Concentración de solución crio-preservadora. \* Presentan variación estadística significativa.

### 3.1.1 Porcentaje de humedad

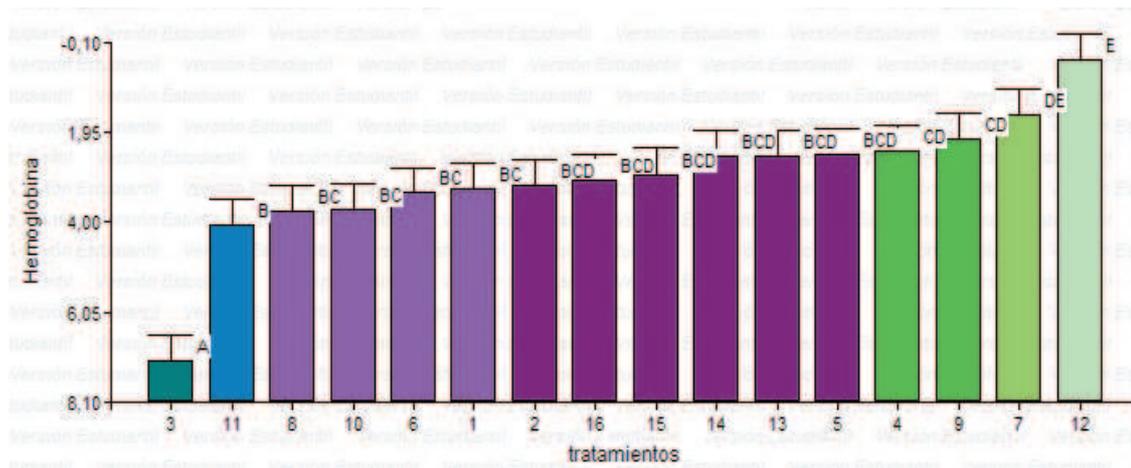
La humedad promedio presente en las muestras después de ser sometidas a un proceso de liofilización fue de 2%. Siendo los tratamientos 16, 13, 12 los que presentaron menor humedad (véase fig.3.6)



**Fig.3. 6. Porcentaje de humedad presente en las muestras liofilizadas con relación a los diferentes tratamientos.**

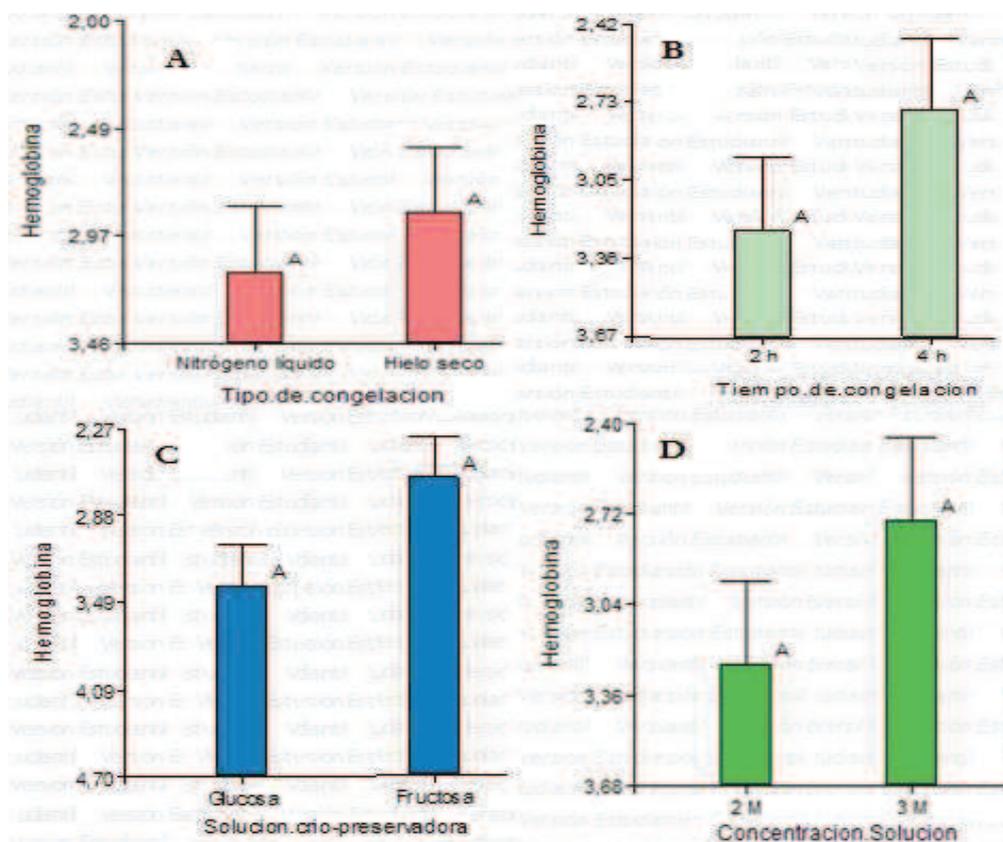
### 3.1.2 Hemoglobina

Con base a los 16 tratamientos previamente establecidos y a las 5 rehidrataciones realizadas al azar de cada tratamiento en un período de 12 días con intervalos de 3 días, se observó una disminución de los valores de hemoglobina con respecto al tiempo de conservación. Este parámetro se evaluó considerando los valores iniciales de hemoglobina. Sin embargo se pudo determinar que los mejores tratamientos fueron: 12, 7, 9, 4 (véase fig.3.7. y anexo 11)



**Fig.3. 7. Variación de hemoglobina con relación a los diferentes tratamientos.**

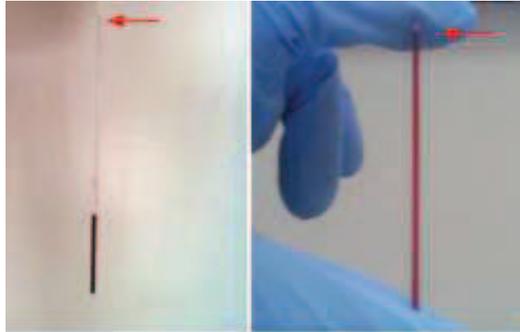
En relación a la hemoglobina presente en las muestras rehidratadas después de un proceso de liofilización, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en cuanto al tipo de solución crio-preservadora, su concentración, tipo de congelación, ni tiempo de aplicación de este proceso (véase fig.3.8. y Anexos 12,13,14,15).



**Fig.3. 8. Evaluación de hemoglobina según (A) Tipo de congelación, (B) Tiempo de congelación, (C) Tipo de solución crio-preservadora y (D) Concentración de solución crio-preservadora. En los que no se encontraron diferencias estadísticas significativas.**

### 3.1.3 Hematocrito

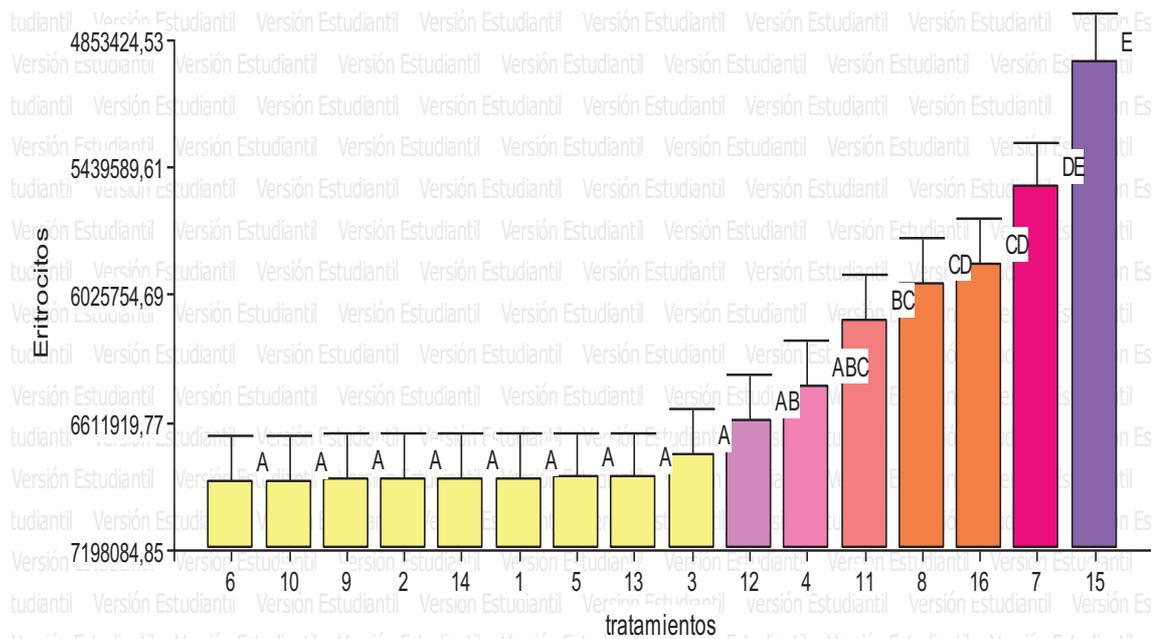
En base a los 16 tratamientos previamente establecidos, se observó la ausencia de valores de hematocrito en cada una de las 5 rehidrataciones realizadas al azar (véase fig.3.9).



**Fig.3. 9. Comparación de valores de hematocrito en sangre fresca de carnero (izquierda) y sangre liofilizada de carnero (derecha). Las flechas señalan los respectivos meniscos.**

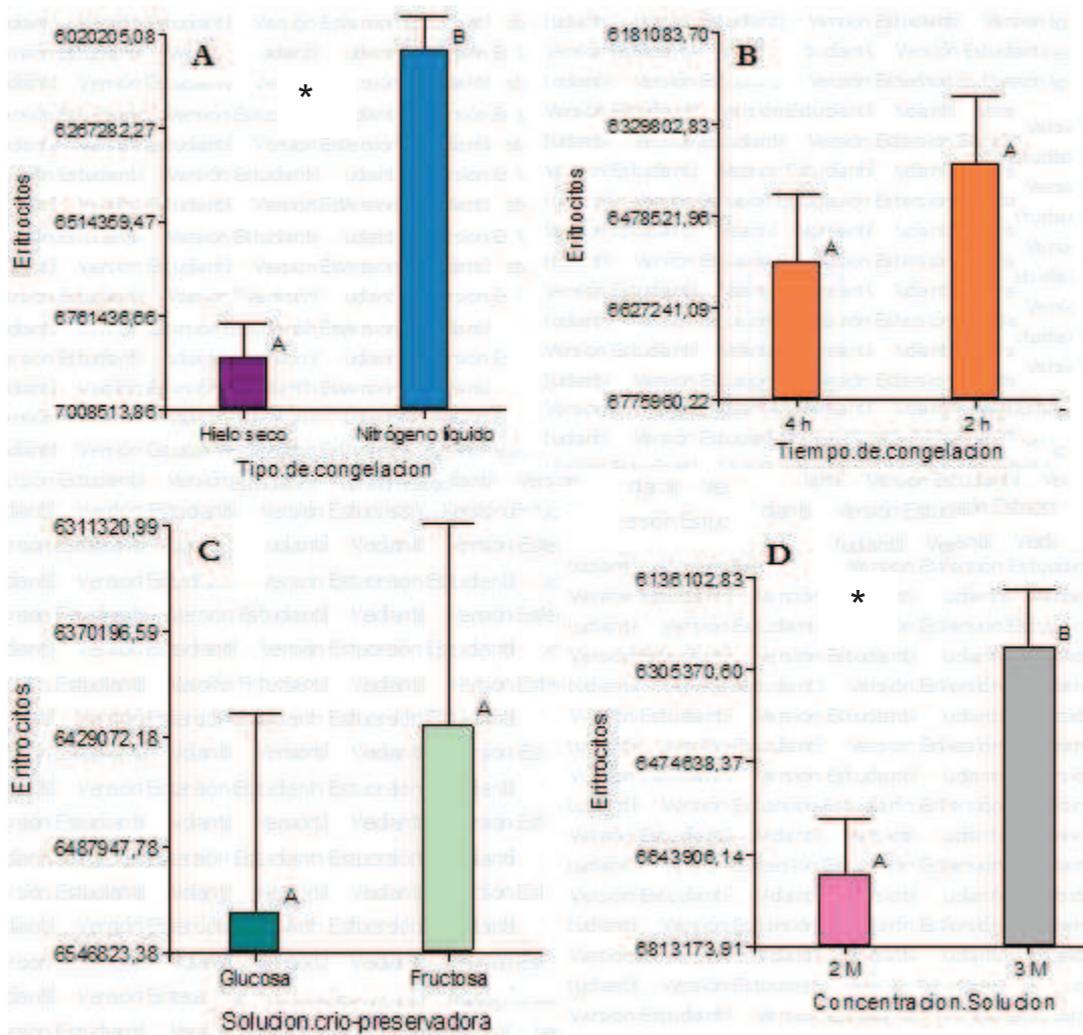
### 3.1.4 Conteo de eritrocitos

Según los datos obtenidos de los 16 tratamientos y una vez realizadas las respectivas rehidrataciones, se determinó que el conteo de eritrocitos liofilizados disminuía en relación al conteo inicial de los mismos. Considerando la menor variación del número de eritrocitos, se determinó que los tratamientos 15, 7, 16 y 8 presentaron los mejores resultados (véase fig.3.10 y anexo 16).



**Fig.3. 10. Variación del número de eritrocitos después de someterse a un proceso de liofilización con relación a los diferentes tratamientos.**

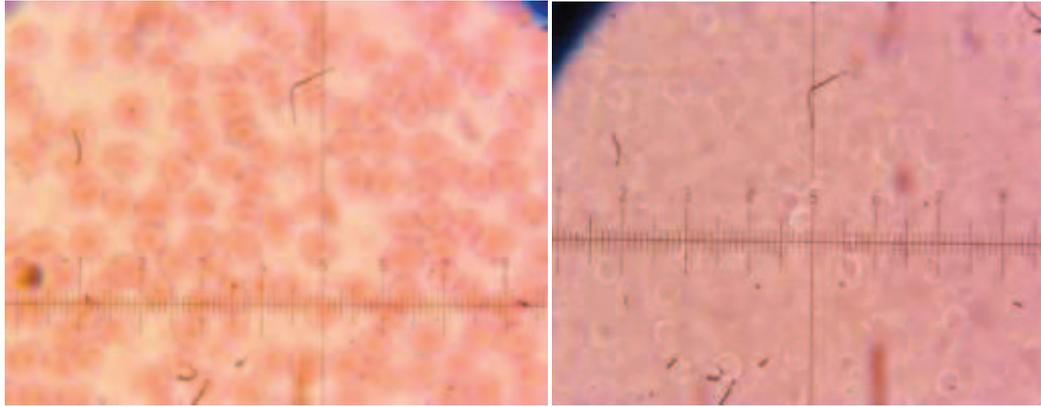
Los datos demuestran que ni el tipo de solución crio-preservadora ni el tiempo de congelación son factores que afectan el número de eritrocitos obtenidos una vez que las muestras se rehidrataron. Por el contrario, se observó que la concentración más alta de solución crio-preservadora (3M), así como el proceso de congelación utilizando nitrógeno líquido, son factores que ayudan a mantener un recuento de eritrocitos más alto respecto al resto de tratamientos (véase fig.3.11 y anexos 17,18,19,20).



**Fig.3. 11.** Evaluación del número de eritrocitos según (A) Tipo de congelación, (B) Tiempo de congelación, (C) Tipo de solución criopreservadora y (D) Concentración de solución criopreservadora. \* Presentan variación estadística significativa.

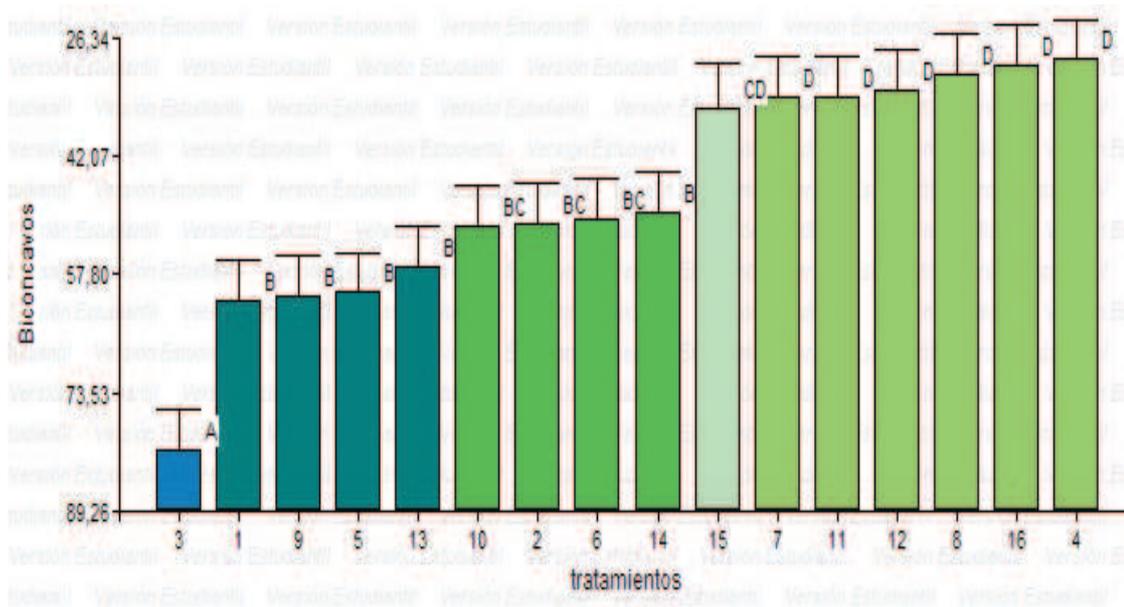
### 3.1.5 Forma de eritrocitos

Se analizaron un total de 100 eritrocitos en cada muestra de sangre liofilizada (16 tratamientos). Se observó células bicóncavas, crenadas (forma de estrella), y sombras (fig.3.12); siendo las células bicóncavas las de mayor predominancia en las rehidrataciones de los días 0, 3 y 6, y las células crenadas en las rehidrataciones de los días 9 y 12. Además se pudo determinar una disminución de células bicóncavas y un aumento de células crenadas y sombras en las muestras de sangre liofilizada con relación a la sangre fresca.

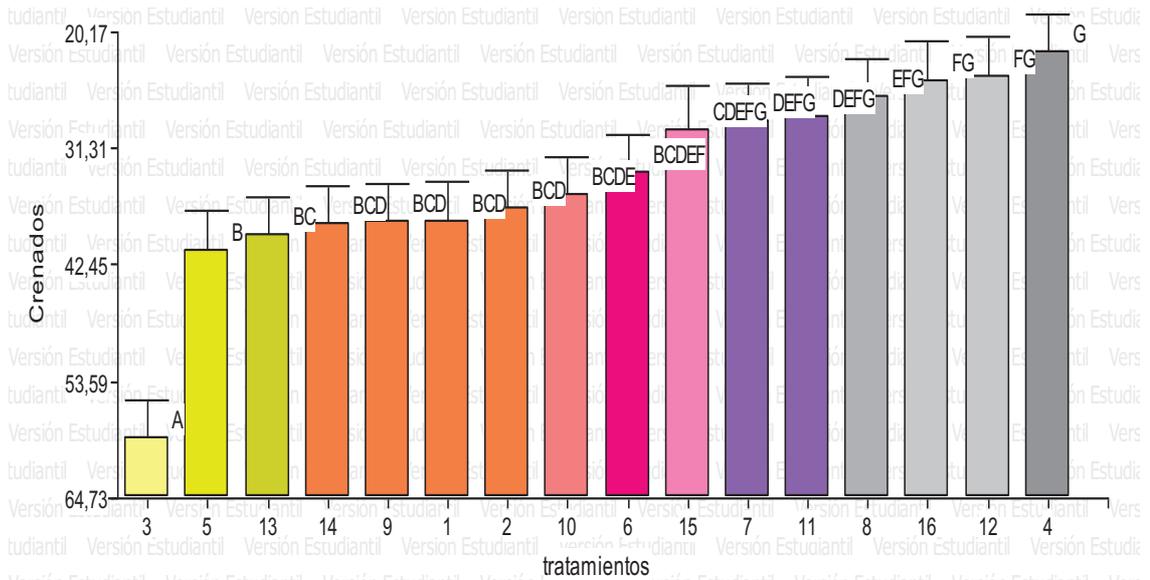


**Fig.3. 12. Comparación de eritrocitos presentes en sangre fresca de carnero (izquierda) y sangre liofilizada de carnero (derecha).**

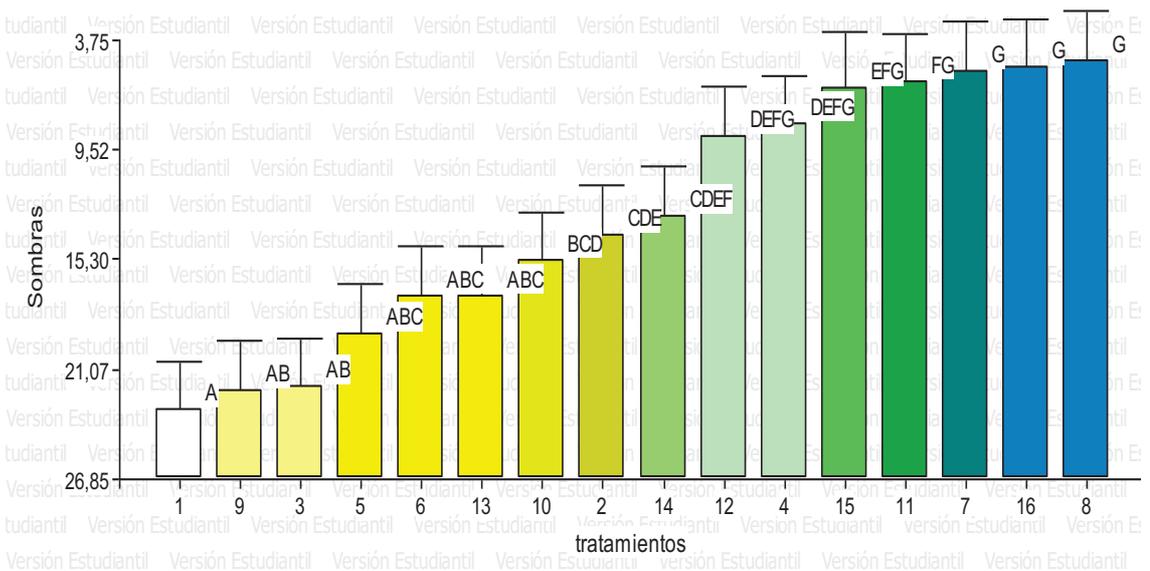
Conforme a la forma de eritrocitos los tratamientos que presentaron la menor variación de eritrocitos bicóncavos fueron: 4, 16, 8, 12 (véase fig.3.13 y anexo 21). La menor variación de eritrocitos crenados correspondió a los tratamientos: 4, 12, 16, 8 (véase fig.3.14 y anexo 22). La menor variación de sombras presentes en las muestras, correspondió a los tratamientos: 8, 16, 7, 11 (véase fig.3.15 y anexo 23).



**Fig.3. 13. Variación del número de eritrocitos bicóncavos con relación a los diferentes tratamientos.**



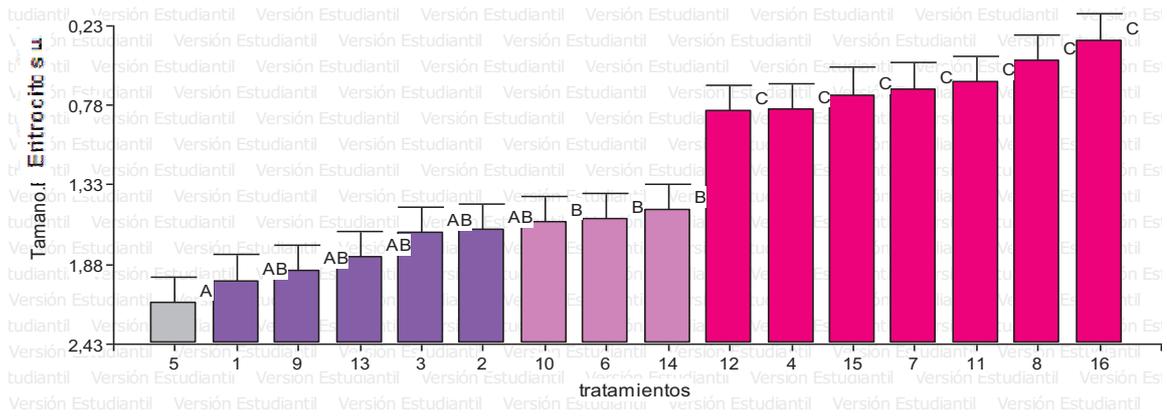
**Fig.3. 14. Variación del número de eritrocitos crenados con relación a los diferentes tratamientos.**



**Fig.3. 15. Variación del número de sombras con relación a los diferentes tratamientos.**

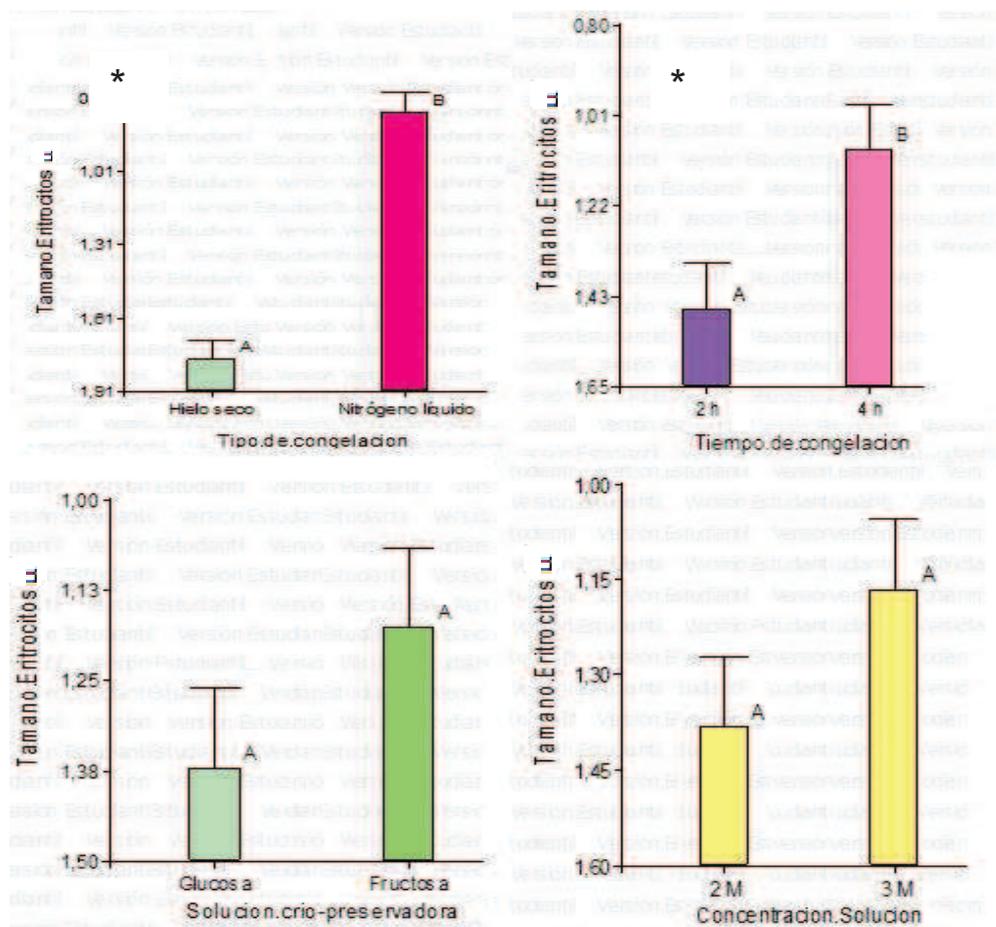
### 3.1.6 Tamaño eritrocitos

Los eritrocitos observados en las muestras rehidratadas presentaron menor tamaño que las muestras de sangre fresca, además se determinó que conforme transcurría el tiempo el tamaño de los eritrocitos disminuía. La menor variación de tamaño de eritrocitos fue encontrada en los tratamientos 16, 8, 11, 7 (véase fig.3.16 y anexo 24).



**Fig.3. 16. Variación del tamaño de eritrocitos con relación a los diferentes tratamientos.**

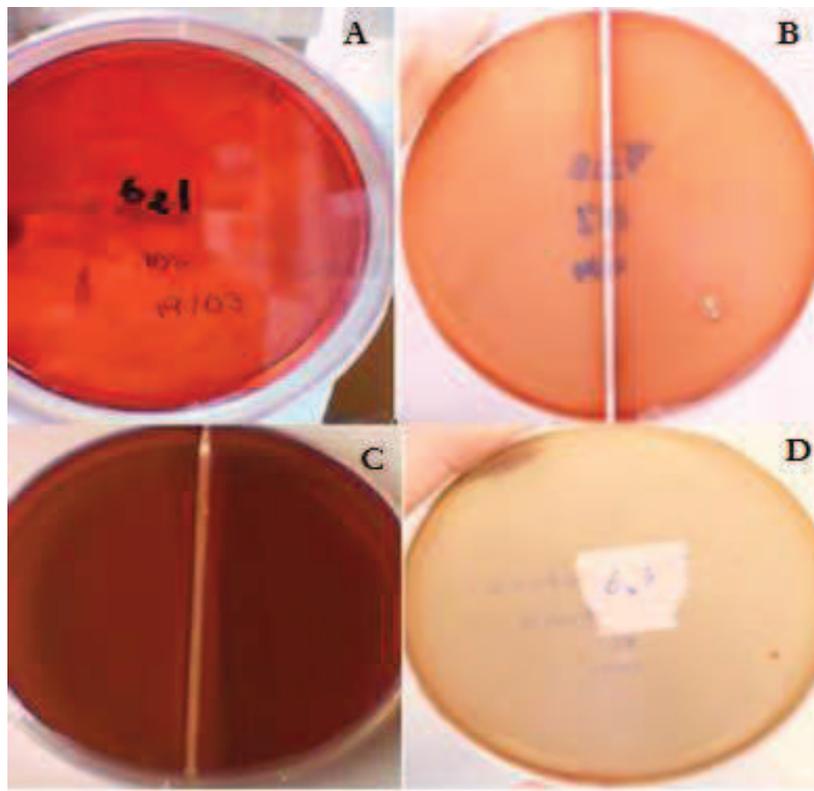
Se observó que la variación del tamaño de los eritrocitos fue menor en tratamientos sometidos a congelación por nitrógeno líquido, así como también aquellos que se sometieron a congelación durante 4 h. Los datos obtenidos demostraron que ni el tipo de solución crio-preservadora ni el tiempo de congelación son factores que afectan al tamaño de eritrocitos (véase fig.3.17 y anexos 25, 26, 27,28).



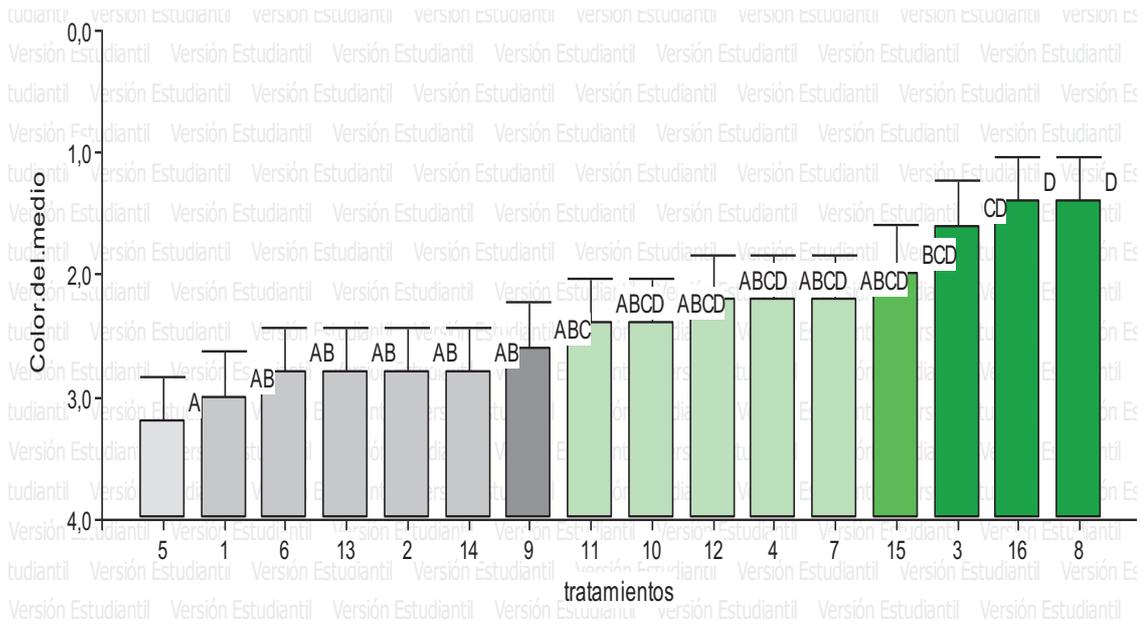
**Fig.3. 17. Evaluación del tamaño de eritrocitos según (A) Tipo de congelación, (B) Tiempo de congelación, (C) Tipo de solución crio-preservadora y (D) Concentración de solución crio-preservadora. \* Presentan variación estadística significativa.**

### 3.2 Elaboración medios de cultivo

Para la elaboración de medios de cultivo se aplicaron dos concentraciones 5% y 10% de sangre liofilizada rehidratada. Dando como resultados medios con apariencia transparente y una gama de cuatro posibles colores: rojo brillante, rojo opaco, rojo tinto y café (véase fig.3.18). Siendo los tratamientos 8 y 16 los que presentaron mayor incidencia en medios de color rojo brillante, los tratamientos 3 y 15 presentaron mayor incidencia en medios rojo opaco, los tratamientos 14, 2, 13, 6 presentaron medios rojo tinto en su mayoría y el tratamiento 5 presentó en su mayoría medios café (véase fig.3.19 y anexo 29).



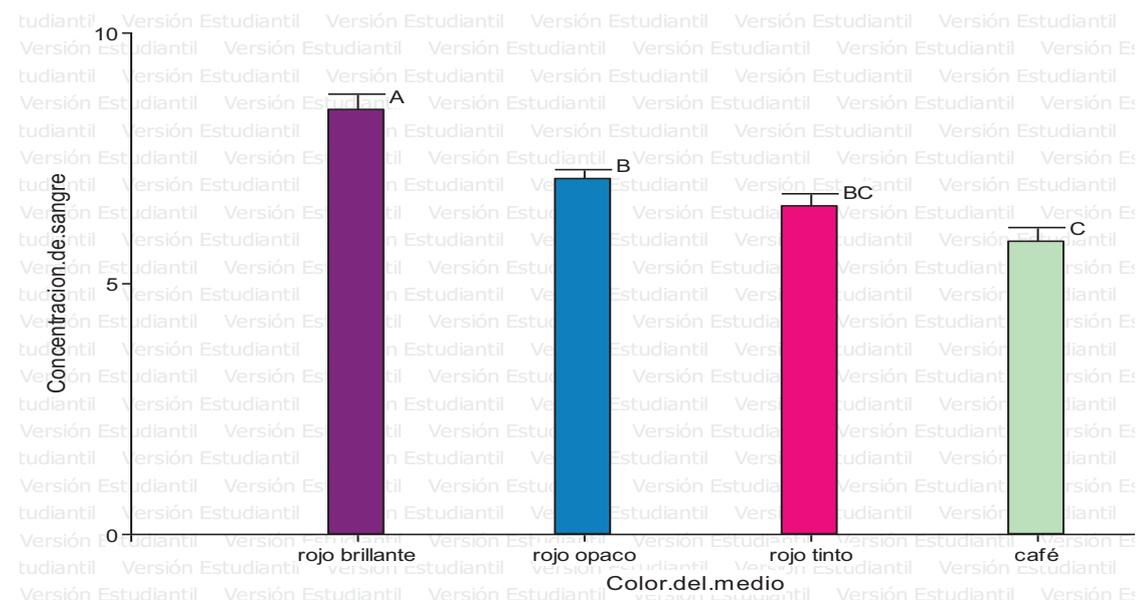
**Fig.3. 18. Medios elaborados a base de sangre liofilizada: rojo brillante (A), rojo opaco (B), rojo tinto (C), café (D).**



**Fig.3. 19. Color del medio con respecto a los diferentes tratamientos. En la escala, 1 representa medios de color rojo brillante, 2 representa medios de color rojo opaco, 3 representa medios rojo tinto y 4 representa medios de color café.**

### 3.2.1 Concentración de sangre

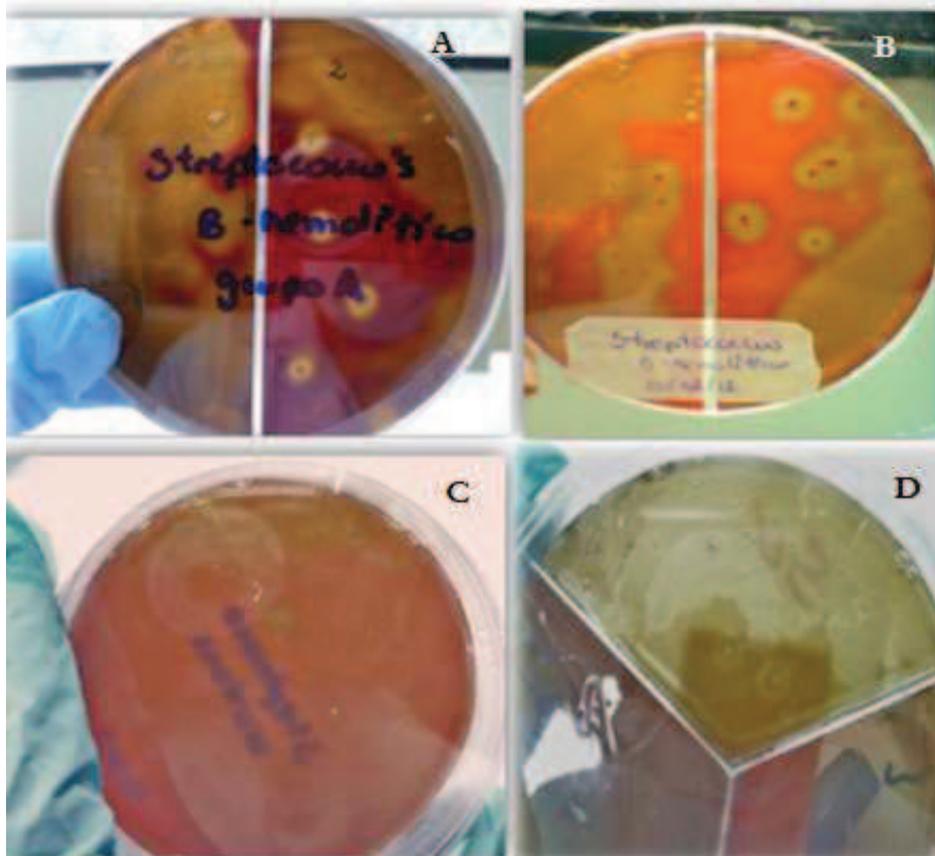
Previa a la elaboración de medios agar sangre liofilizada de carnero se establecieron dos concentraciones de sangre: 5 y 10%. De los resultados obtenidos se pudo mayor cantidad de medios rojo brillante con concentraciones de 10% (véase fig. 3.20 y anexo 30).



**Fig.3. 20. Concentración de sangre liofilizada de carnero en relación al color de los medios.**

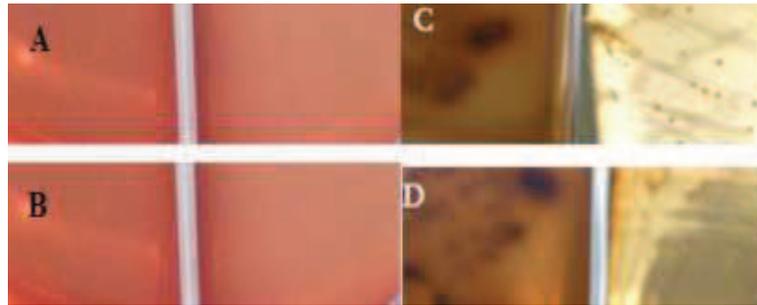
### 3.3 Crecimiento de *Streptococcus*

En cada uno de los tratamientos se analizó el crecimiento de 4 tipos de cepas: *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos del grupo A, *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos del grupo B, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus viridans*, previamente aisladas en agar sangre fresca de carnero (véase fig.3.21).



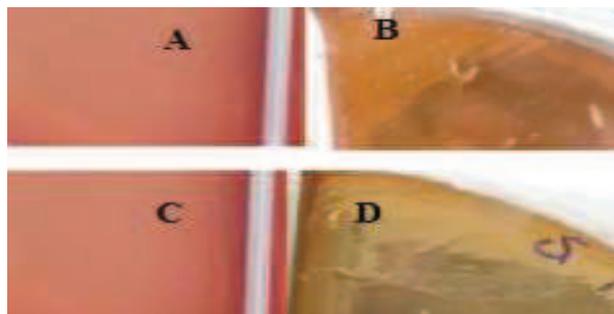
**Fig.3. 21.** *Streptococcus*  $\beta$ - hemolíticos (A) S. grupo A, (B) S. grupo B, (C) *Streptococcus viridans* y (D) *Streptococcus milleri* en agar sangre fresca de carnero.

Después de realizada la siembra e incubación por 48h de las cepas antes mencionadas se obtuvieron los siguientes resultados: las cepas del grupo A presentaban colonias pequeñas (fig.3.29), ligeramente definidas (fig.3.30) y cierta actividad hemolítica (fig.3.25). Mientras que las cepas del grupo B presentaban colonias medianas (fig.3.29), ligeramente definidas (fig.3.30) y cierta actividad hemolítica (fig.3.25) (véase fig. 3,22, anexos 31,32).



**Fig.3. 22.** Evaluación del crecimiento de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos en agar sangre liofilizada de carnero. A. color inicial del medio (rojo opaco) previo a la siembra, vista anterior. B. color inicial del medio (rojo opaco) previo a la siembra, vista posterior. C. D. (No visible in the provided image)

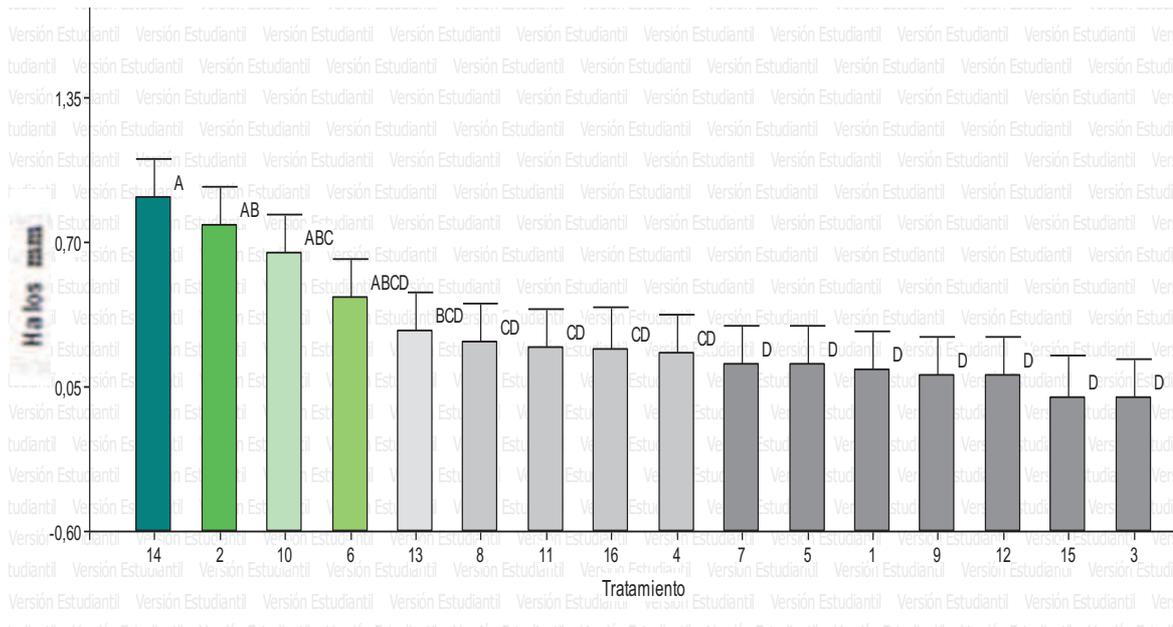
Después de realizada la siembra e incubación por 48h de las cepas antes mencionadas se obtuvieron los siguientes resultados: las cepas del grupo *viridans* presentaban colonias muy pequeñas (fig.3.29), no definidas (fig.3.30) y poca actividad hemolítica (fig.3.25). Mientras que las cepas del grupo *milleri* presentaban colonias muy pequeñas (fig.3,29), no definidas (fig.3.30) y sin actividad hemolítica en su mayoría (fig.3.25) (véase fig. 3,22, anexos 31,32).



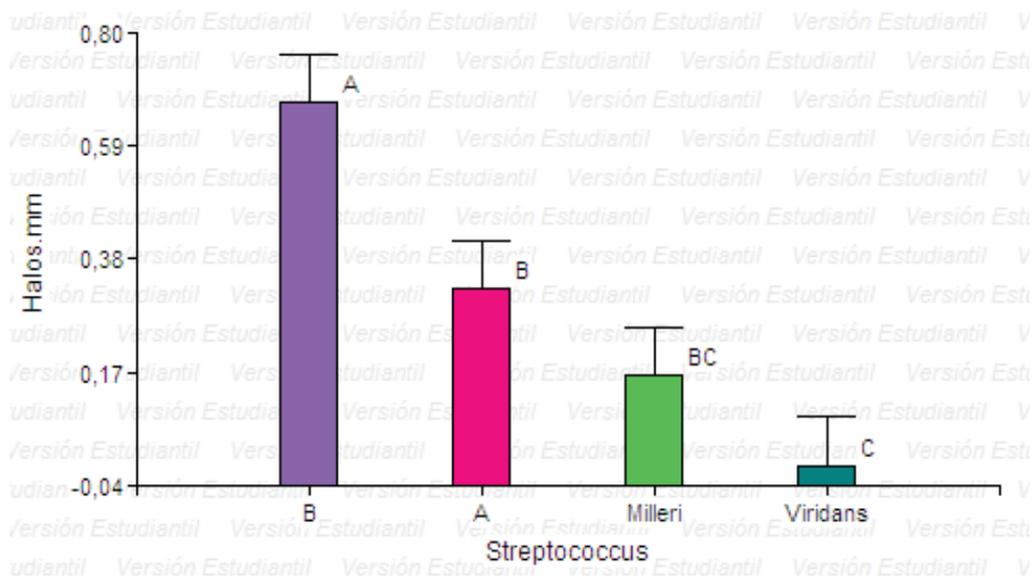
**Fig.3. 23.** Evaluación del crecimiento de *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos en agar sangre liofilizada de carnero. A. color inicial del medio rojo opaco previo a la siembra, B. crecimiento de colonias *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos *viridans* a las 48 h de incubación. C. color inicial del medio rojo opaco previo a la siembra. D. *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos *milleri* a las 48 h de incubación.

### 3.3.1 Hemólisis

La actividad hemolítica fue descrita por el tamaño del diámetro de hemólisis alrededor de las colonias, medidos en milímetros. La mayor actividad hemolítica observada en los diferentes tratamientos, se registró en los tratamientos 14, 2, 10 y 6 (véase fig.3.24. y anexo 35). En relación a la actividad hemolítica de las cepas analizadas, se observó que las cepas del grupo B presentaban mayor actividad hemolítica o halos hemolíticos de mayor diámetro (Véase fig.3.25 y anexo 36).



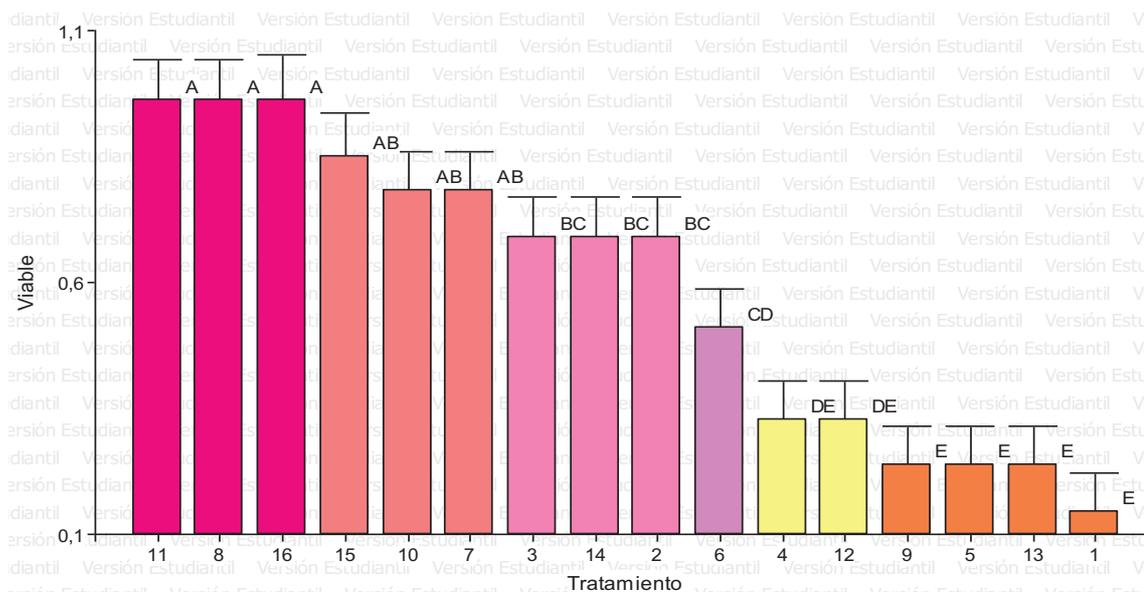
**Fig.3. 24. Halos hemolíticos presentes en las diferentes cepas de *Streptococcus* sembradas en medios de cultivo enriquecidos con sangre liofilizada con relación a los tratamientos.**



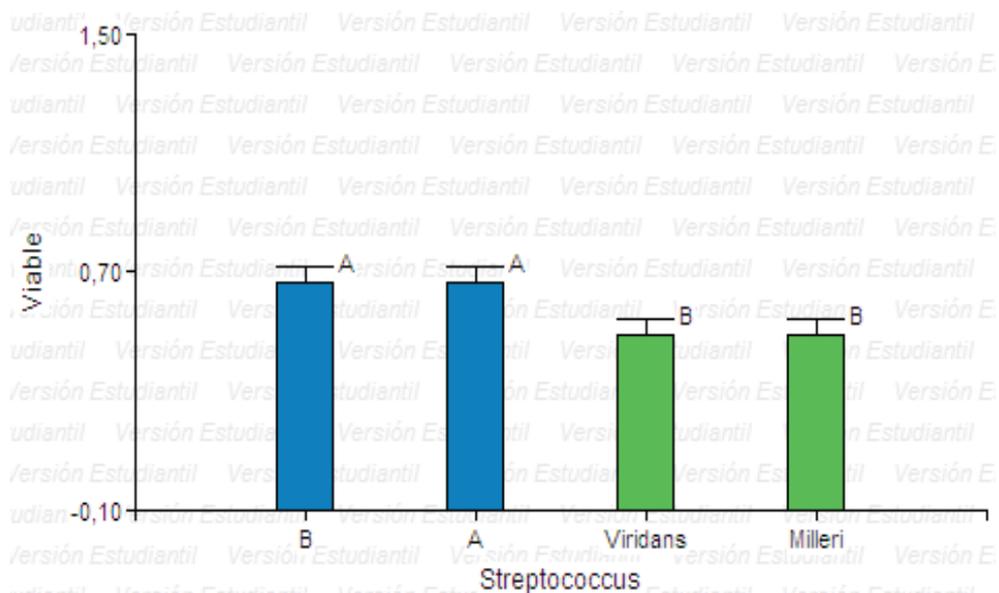
**Fig.3. 25. Halos hemolíticos presentes en las diferentes cepas de *Streptococcus* sembradas en medios de cultivo enriquecidos con sangre liofilizada de carnero.**

### 3.3.2 Viabilidad

De cada una de las rehidrataciones realizadas, se evaluó la viabilidad de las cuatro cepas de *Streptococcus*, de las cuales se determinó que los tratamientos 11, 8, 16,15 fueron los que presentaron mayor viabilidad (véase fig.3.26 y anexo 37). Según la cepa de *Streptococcus*, se determinó que la mayor viabilidad correspondía a las cepas del grupo A y grupo B (véase fig.3.27 y anexo 38).



**Fig.3. 26. Viabilidad de crecimiento de *Streptococcus* con relación a los diferentes tratamientos. En la escala 0 representa ausencia de bacterias, 1 representa crecimiento bacteriano.**

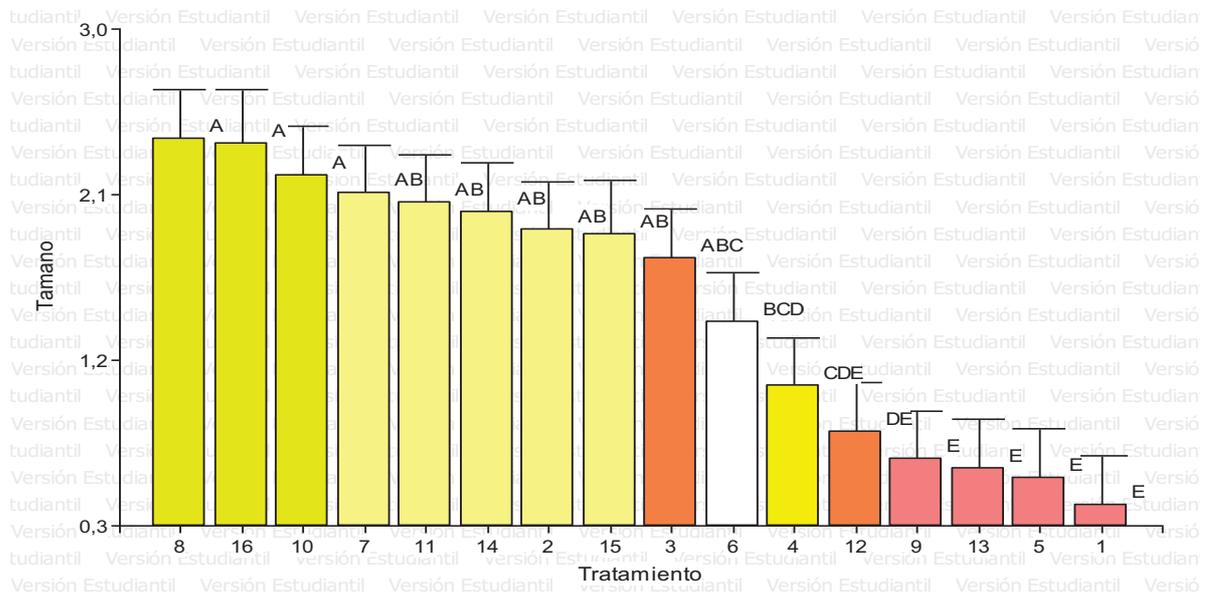


**Fig.3. 27. Viabilidad de crecimiento de *Streptococcus* con relación a las diferentes cepas. En la escala 0 representa ausencia de bacterias, 1 representa crecimiento bacteriano.**

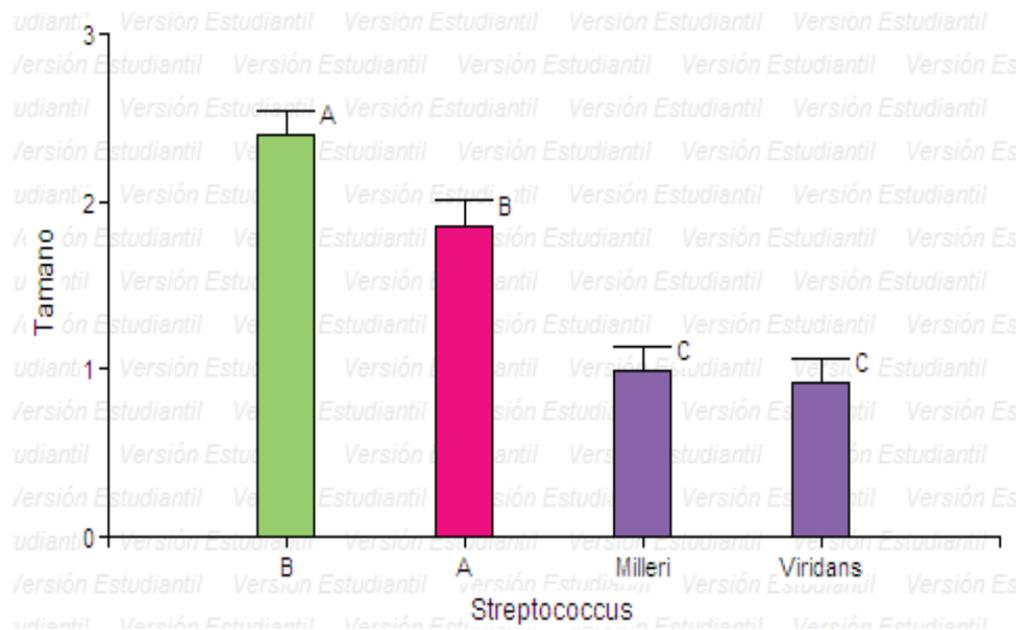
### 3.3.3 Tamaño colonias

De acuerdo al tamaño de las cepas se establecieron cuatro criterios de clasificación: muy pequeñas, pequeñas, medianas y grandes. Evaluando el tamaño de colonias presentes en cada uno de los tratamientos se pudo determinar que los tratamientos 8, 16, 10, 7 presentaron colonias de mayor tamaño (véase fig.3.28 y anexo 39). De igual manera se obtuvo como resultado que las cepas pertenecientes a

*Streptococcus* β-hemolíticos del grupo B presentaban las colonias de mayor tamaño (véase fig.3.29 y anexo 40).



**Fig.3. 28. Tamaño de colonias en relación a los diferentes tratamientos evaluados. En la escala 1 representa la ausencia de bacterias, 2 representa colonias muy pequeñas, 3 colonias pequeñas.**

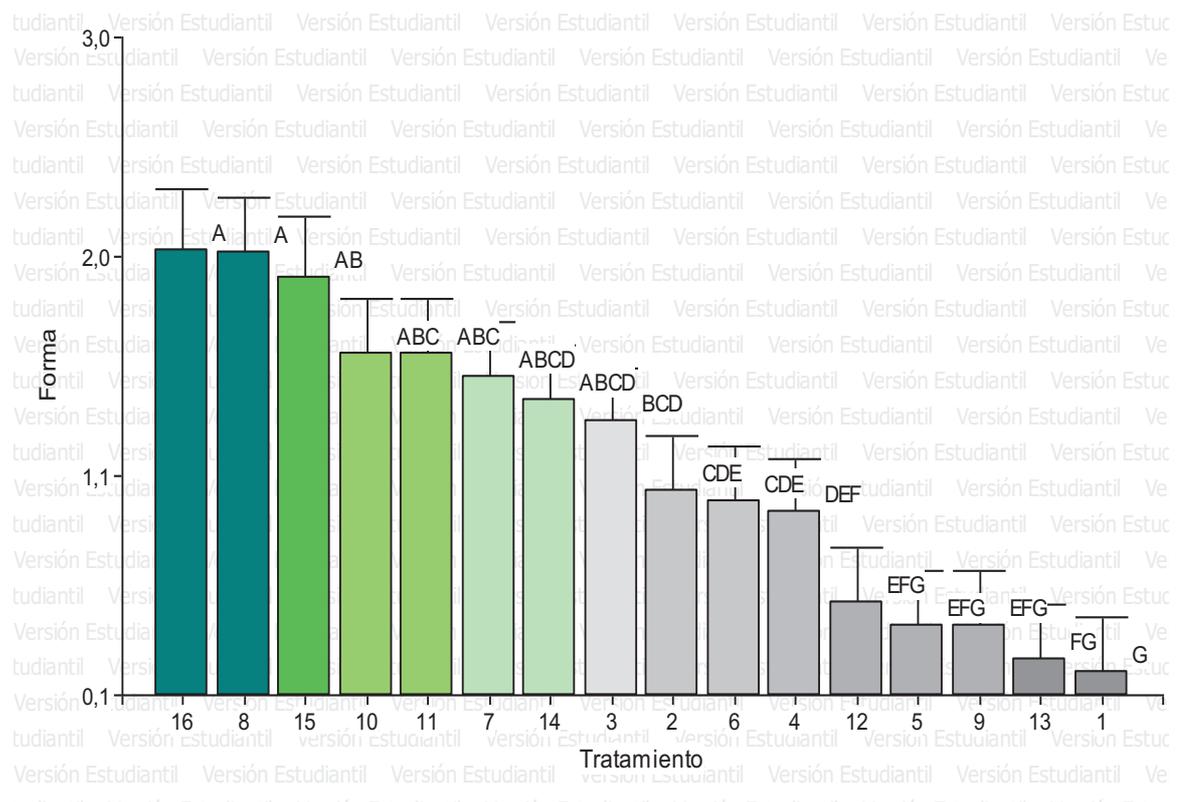


**Fig.3. 29. Tamaño de colonias en relación al tipo de cepa evaluado. En la escala 1 representa la ausencia de bacterias, 2 representa colonias muy pequeñas, 3 colonias pequeñas.**

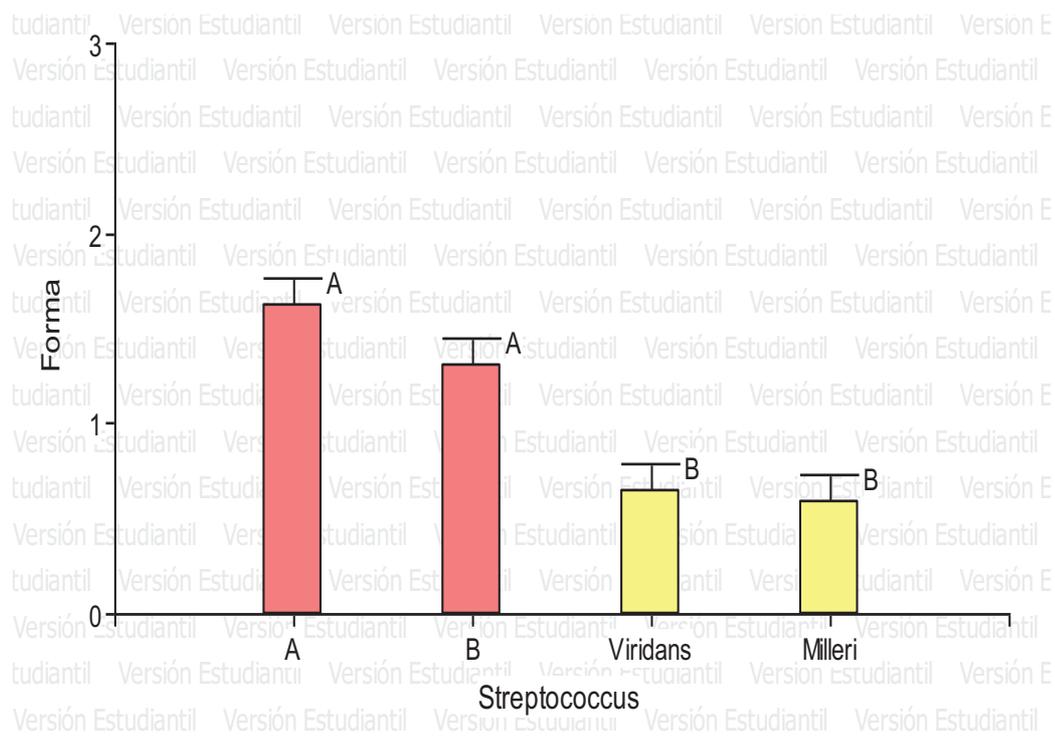
### 3.3.4 Forma colonias

Otra de las características del crecimiento bacteriano que se tomaron en cuenta para su posterior análisis fue la forma de las colonias. Por lo que se establecieron tres

critérios de classificação: no definidas, levemente definidas, definidas. Las cepas de *Streptococcus* evaluadas presentaron forma levemente definida en los tratamientos 16, 8, 15, 10 (véase fig.3.30 y anexo 41). En relación al tipo de cepa se observó que en promedio las cepas de *Streptococcus* del grupo A y B presentaban forma levemente definida y en promedio la cepas de *S. viridans* *S. milleri* presentaban forma no definida (véase fig.3.31 y anexo 42).



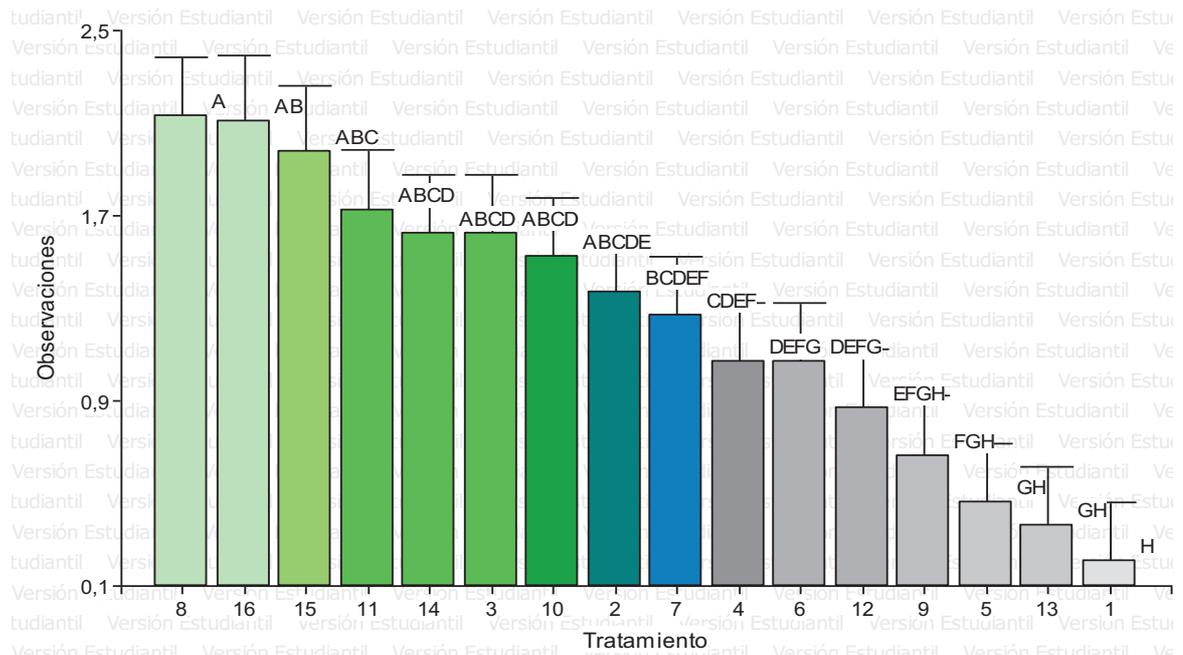
**Fig.3. 30. Forma de colonias presentes en los diferentes tratamientos evaluados. En la escala, 1 representa colonias no definidas, 2 representa colonias levemente definidas; 3 representa colonias definidas.**



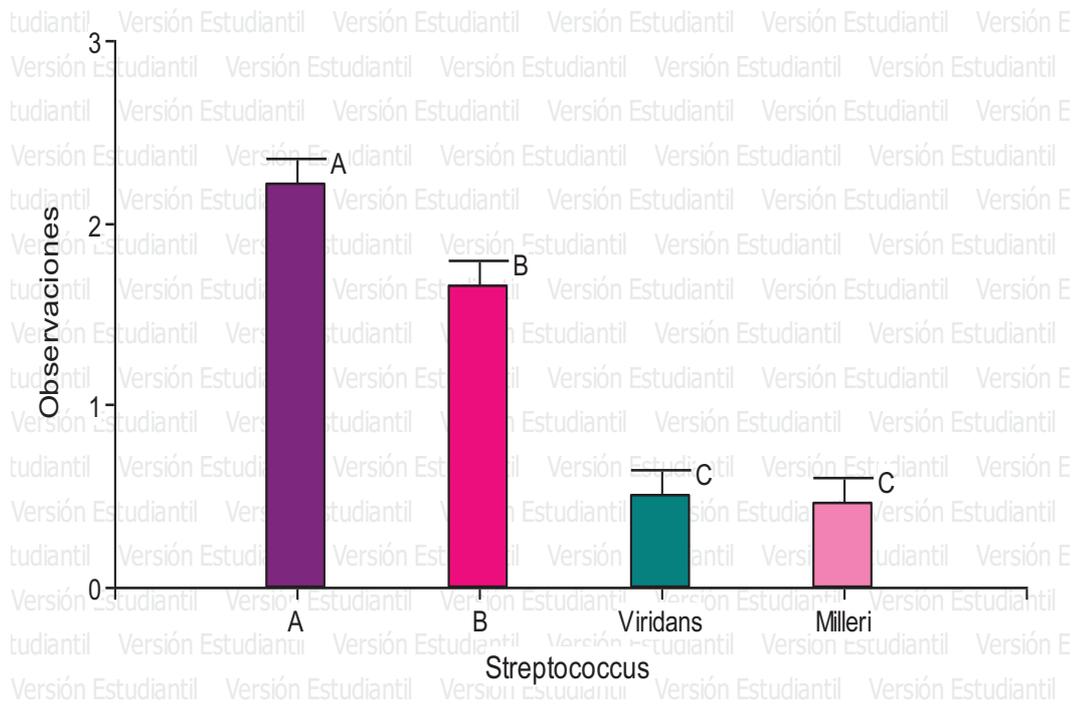
**Fig.3. 31. Forma de colonias de acuerdo al tipo de cepa de *Streptococcus*. En la escala, 1 representa colonias no definidas, 2 representa colonias ligeramente definidas; 3 representa colonias definidas.**

### 3.3.5 Observaciones

Al suplementar los medios con el producto liofilizado se obtuvo un medio de cultivo en el que se evaluó el color, la zona de punción oscurecida, la zona de punción aclarada, y una opción en la que se aprecia una combinación de la zona de punción oscurecida y la zona de crecimiento aclarada. Los tratamientos 8, 16, 15 presentaron en su mayoría oscurecimiento en las zonas de punción (véase fig. 3.32 y anexo 43). En cuanto al tipo de cepa evaluado, los *Streptococcus* del grupo A y B presentaron en su mayoría oscurecimiento en la zona de punción, mientras que los *Streptococcus viridans* y *milleri* presentaron en su mayoría medio sin alteración en su color (véase fig. 3.33 y anexo 44).



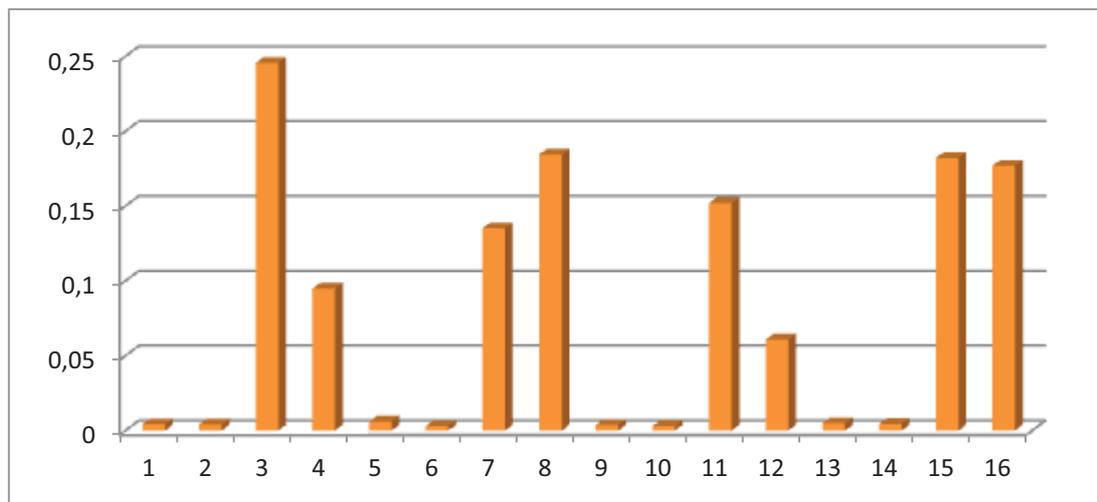
**Fig.3. 32. Observaciones de crecimiento bacteriano presente en los diferentes tratamientos. En la escala, 1 representa medio sin alteración de color, 2 representa zona de punción oscurecida, 3 representa zona de punción aclarada, 4 representa zona de punción oscurecida y zona de crecimiento aclarada.**



**Fig.3. 33. Observaciones de crecimiento bacteriano de acuerdo a las diferentes cepas de *Streptococcus*. En la escala, 1 representa medio sin alteración de color, 2 representa zona de punción oscurecida, 3 representa zona de punción aclarada, 4 representa zona de punción oscurecida y zona de crecimiento aclarada.**

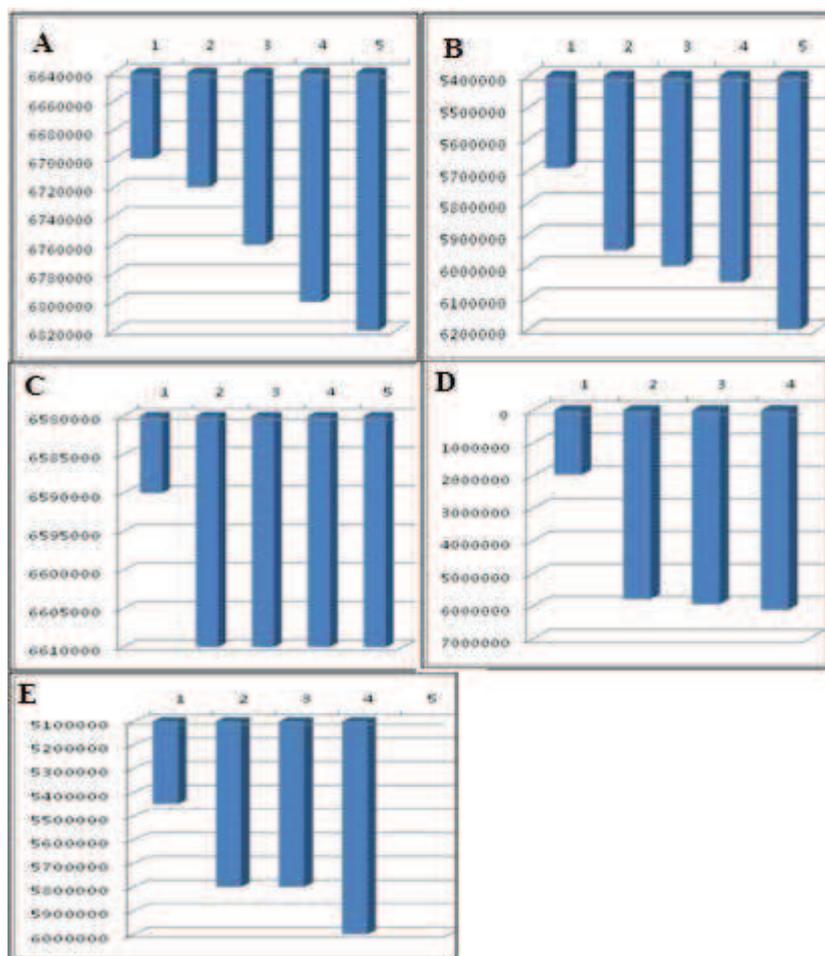
### 3.4 Viabilidad de eritrocitos en el período de rehidratación

La variación de número de eritrocitos recuperados después de la liofilización en período de rehidratación (12 días con intervalos de 72h), se observa en la fig. 3.34 En general el tratamiento 3 muestra en promedio el mejor índice de recuperación del recuento de eritrocitos. Existen además 8 tratamientos en los cuales el número de eritrocitos recuperados es menor 5% del recuento inicial de hematíes.



**Fig.3. 34. Recuperación del recuento de los eritrocitos del liofilizado recuperado respecto al recuento inicial de la muestra de sangre fresca de carnero (Delta: Número de eritrocitos final/Número de eritrocitos inicial). Los resultados muestran el promedio de la variación para cada tratamiento.**

Es importante mencionar que la rehidratación se dio cada 72 horas en un período de 12 días, la fig.3.35 muestra los tratamientos que para esta investigación constituyeron los mejores tanto en los parámetros hematológicos como microbiológicos recuperados del liofilizado respecto a la sangre fresca utilizada inicialmente.



**Fig.3. 35.** Variación del recuento de eritrocitos (número de eritrocitos inicial – número de eritrocitos final) contados cada 72h en un frasco rehidratado nuevo para cada determinación en un período de 12 días. Liofilizado obtenido en A. tratamiento 3. B. tratamiento 8. C. tratamiento 12. D. tratamiento 15 y E. tratamiento 16.

### 3.5 Percepción de los usuarios frente al uso de sangre liofilizada de carnero

De acuerdo a las 25 encuestas aplicadas al personal de laboratorio clínico el 44% mencionó utilizar sangre de carnero para diagnóstico clínico, el 52% mencionó que la ventaja del uso de agar sangre de carnero es el aspecto del crecimiento y la nitidez de los halos de hemólisis, el 40% mencionó el tiempo de crecimiento microbiológico y el 8% restante se inclinó por las otras alternativas. El 44% mencionó que el mayor inconveniente del uso de sangre de carnero es su disposición, el 40% señaló como desventaja el tiempo de vida útil de los medios. En cuanto a la elaboración de medios de cultivo el 48% señaló como desventaja del uso de sangre humana por la probable presencia de sustancias interferentes. Con respecto al uso de la sangre liofilizada de carnero como una alternativa al uso de sangre fresca de carnero, el 80% mencionó estar de acuerdo. El 36% de los encuestados se inclinaría por usar una alternativa de

suplemento si esta fuera de fácil acceso y disponibilidad inmediata, el 28% lo utilizaría por la durabilidad del producto, el 16% lo utilizaría si éste presentara menor riesgo de contaminación. En cuanto a las razones por las cuales los posibles beneficiarios no se inclinarían por su uso, el 40% de los encuestados mencionó la falta de confiabilidad en los resultados, el 32% indicó que no se ha demostrado que ningún suplemento iguale o mejore la calidad de diagnóstico, el 16% por la dificultad de acceso y el 12% por el costo.

### 3.6 Estimación de producción de sangre desfibrinada liofilizada de carnero.

En base a las proformas obtenidas, y depreciación de materiales y reactivos se obtuvieron los resultados representados en la Tabla 3.2:

Misma que menciona un costo de un dólar con veintiún centavos (1,21) para la producción y comercialización de sangre desfibrinada liofilizada estéril.

**Tabla 3. 2. Descripción del costo de producción de sangre liofilizada de carnero.**

Gasto por actividad	Materiales	Responsable	Gasto anual
<b>Gastos por insumos por extracción de sangre</b>	Agujas # 16	Dpto. Financiero-IASA, Encargado proyecto ovino, Tesista, Jornalero	6
	Equipo de extracción sanguínea		30
	Guantes		5
	Algodón		3
	Alcohol yodado		10
	Tijera para esquilar		29
	Perlas de vidrio		10
	Papel aluminio		6
<b>Gastos por insumos de envasado</b>	Guantes	Dpto. Financiero-IASA, Director de proyecto, Tesista	8
	Mascarilla		6,8
	Parafilm		3
	Alcohol potable		7
	Alcohol antiséptico		7
	Otros (fósforos, gas, etc.)		2
<b>Gastos por liofilización</b>	Viales de liofilización	Dpto. Financiero-IASA, Director de proyecto, Tesista	300
	Pistola de liofilización		600
	Hielo seco		144
	Nitrógeno líquido		200
	Grasa de silicona		80

<b>Gasto por actividad</b>	<b>Materiales</b>	<b>Responsable</b>	<b>Gasto anual</b>
<b>Gasto logísticos transporte</b>	Hielo seco/geles fríos	Comercialización IASA, Tesista	20
	Vehículo		80
<b>Gastos servicios básicos</b>	Infraestructura (pintura, etc.)	Dpto. Financiero IASA	15
	Luz		25
	Agua		5
	Internet y teléfono		25
<b>Gasto por permisos</b>	Registro Sanitario	Dpto. Financiero -IASA, Director del Proyecto, Tesista	40
	Patente		50
<b>Gastos por insumos de oficina y papelería</b>	Etiquetas	Dpto. Financiero-IASA, Tesista	20
	Facturas		8
	Registros varios		10
	Recarga de tóner		20
	Otros (grapapas, clips, etiquetas adhesivas, etc.)		10
<b>Gastos por insumos de limpieza</b>	Detergente	Dpto. Financiero-IASA, Personal de limpieza, Tesista	4
	Jabón Líquido		12
	Gel desinfectante		18
	Fundas rojas		8
<b>Gastos por mantención de animales</b>	Alimento, Vacunas, Desparasitantes	Dpto. Financiero-IASA, Encargado proyecto ovino, Tesista, Jornalero	100
<b>Gastos por salarios</b>	Jornalero	Dpto. Financiero-IASA	1095
	Auxiliar de campo		30
	Personal de limpieza		36
	Analistas de laboratorio		120
	Supervisión técnica		120
<b>Depresión de materiales y equipos</b>	Cámara de flujo laminar	Dpto. Financiero -IASA, Director del Proyecto, Tesista	24,33
	Liofilizador		60
	Autoclave		20
	Estufa esterilizador		15
	Tijeras		0,15
	Erlenmeyers		0,24
	Mechero		0,3
	Probeta		0,23

<b>Gasto por actividad</b>	<b>Materiales</b>	<b>Responsable</b>	<b>Gasto anual</b>
	Embudo		0,18
	Frascos doble tapa		4
	Computadora		10
	Impresora		2,5
	Cooler		0,3
<b>GASTO OPERACIONAL ANUAL</b>			<b>3465,03</b>
<b>GASTO OPERACIONAL POR 150 ML</b>			<b>144,376</b>
<b>GASTO REAL POR 1 ML</b>			<b>0,9625</b>
<b>SUSTENTABILIDAD DEL PROYECTO AL 25%</b>			<b>0,25</b>
<b>TOTAL POR 1ML</b>			<b>1,21</b>

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

La sangre desfibrinada de carnero, constituye uno de los suplementos nutricionales para la preparación de medios de cultivo más importantes para garantizar el aislamiento e identificación de microorganismos fastidiosos del género *Streptococcus*. Sin embargo, el acceso a este producto es limitado por el requerimiento constante de animales sanos que provean el producto. Una alternativa que los laboratorios de análisis clínico consideran es la importación del suplemento. Con ello se incrementa el costo del análisis y los riesgos de contaminación y exposición asociados.

Este proyecto se ejecutó en base a un diseño experimental completamente al azar con el fin de establecer un proceso de liofilización de eritrocitos de carnero y evaluar el crecimiento de cepas conocidas de *Streptococcus spp* en un medio de cultivo suplementado con este producto.

Las diferencias observadas en el color y textura de las muestras liofilizadas pueden deberse a una demora en el traslado de la muestra del congelador hasta el liofilizador, porque los viales adquirieron temperatura en su superficie o porque hubo demora en el accionamiento del vacío (TERRONI EQUIPAMENTOS LTDA).

Al final del proceso de liofilización se esperaba una apariencia compacta y seca del producto una vez congelado, dada su estructura sólida sin intersticios en los que se encuentre concentrado el líquido favoreciendo la sublimación. La textura pegajosa de algunos de los liofilizados obtenidos en esta investigación responde a una aparente desecación incompleta en las muestras liofilizadas y se explica por las altas concentraciones de las soluciones crio-conservadoras. Los intersticios son propiciados por la presencia de azúcares, alcoholes, cetonas, aldehídos y ácidos y por las altas concentraciones de sólidos en el producto inicial (Orrego Alzate, 2003). Una posible desecación incompleta puede deberse a fluctuaciones en la presión. Es importante que durante el proceso de desecación se mantenga una diferencia de presión entre el frente de sublimación del producto y la pared fría del condensador; dado que esta diferencia actúa como fuerza motriz de sublimación. De igual manera la desecación puede limitarse por el espesor de la muestra, ya que esta avanza en profundidad, a razón de 1mm por hora, una muestra con un espesor de 10 o 12 mm puede demorar en liofilizar aproximadamente 18 y 24 horas (TELSTAR).

Las muestras liofilizadas bajo condiciones de congelación en hielo seco presentaron color rojo brillante, es decir su color final fue más claro que el color de congelación (aparente liofilización completa). Esto responde a que probablemente las muestras alcanzaron estabilidad en el proceso de congelación; es decir que a pesar de que las temperaturas más bajas evitan la destrucción de células y pérdida de sus funciones, la congelación en nitrógeno líquido no alcanzó una completa estabilidad del conjunto de células en la muestra. Otra explicación de esta diferencia es que la temperatura del nitrógeno líquido (-196°) se encontraba por debajo del punto eutéctico de las muestras y una prolongada exposición a la misma comprometió una concentración hipertónica de las soluciones crio-conservantes y en su defecto un daño a las células por plasmólisis o precipitación de las partículas no-cristalinas (Pegg, 2007).

La alta concentración de humedad presente en muestras como las del tratamiento 2 (Glucosa 2M en hielo seco por 4h) pueden deberse a que la congelación no se realizó de manera uniforme o completa, ocasionando que la superficie de la muestra se congele y parte del agua permanezca atrapada en el interior de la muestra. Así como también variaciones en la presión y temperatura durante las fases de desecación primaria o secundaria (TELSTAR; LC, 2010). Se deduce que las soluciones crio-conservadoras en este experimento pudieron tener un efecto sobre el equilibrio de los solutos y células en la solución, incrementando la capacidad de las células para adquirir agua y almacenarla aún después de la liofilización (Pegg, 2007). Según Méndez Lagunas, Rodríguez, y García Cortes, (2008), conforme la materia pierde humedad, se comporta como material seco y se produce sublimación regresiva en aproximadamente 200 minutos; la pérdida de humedad se alterna con la sublimación, razón por la cual se puede depositar la humedad del aire en forma de escarcha en la muestra seca.

El análisis de la interacción de las variables permitió describir 4 tratamientos favorables en base a la concentración más alta de hemoglobina y fue el caso de los tratamientos 12 (Fructosa 2M en nitrógeno líquido por 4h), 7 (Glucosa 3M en nitrógeno líquido por 2h), 9 (Fructosa 2M en hielo seco por 2h) y 4 (Glucosa 2M en nitrógeno líquido por 4h). En estos casos, no se observaron diferencias significativas de esta variable al analizarse respecto al tiempo y tipo de congelación, o el tipo de solución crio-conservadora. Sin embargo, se observó un incremento en la presencia de hemoglobina y su función en muestras tratadas con una solución 3M de Glucosa o

Fructosa. Esto puede deberse a que la hemoglobina es una molécula termolábil, que puede ser fácilmente alterada por cambios bruscos de temperatura, pero puede presentar resultados más favorables en presencia de soluciones con mayor concentración de crioprotectores como es el caso de monosacáridos que resultan permeables a la membrana de los eritrocitos y la combinación de estos con un polímero (PVP) permiten la recuperación de eritrocitos con actividad hemolítica (Goodrich y Williams, 1989; Rudolph, Md, y P., 1993).

Doyong y Cristser, (2001) mencionan, que el estrés ocasionado por la liofilización da lugar a alteraciones en la estructura y actividad de ciertas moléculas; lo que se vio reflejado en la ausencia de valores de hematocrito en las muestras liofilizadas, lo que denota una hemólisis de las muestras. Este hecho pudo corresponder a ciertos aspectos como: el tiempo y tipo de congelación; la sublimación, ya que en esta pudieron fluctuar los valores de presión ejercidos sobre las muestras por condiciones ambientales o eléctricas en la rehidratación; ya que pudo generarse condiciones de estrés por ligeras variaciones en la temperatura de la solución de rehidratación y por su osmolaridad (Sputtek, 2007).

La menor variación del número de eritrocitos en el proceso de liofilización se observó en tratamientos con combinaciones de solución crio-preservadora Fructosa 3M y congelación por 2 horas en nitrógeno líquido (tratamiento 15), combinaciones de solución crio-preservadora Glucosa 3M y congelación por 2 horas en nitrógeno líquido (tratamiento 7), combinaciones de solución crio-preservadora Fructosa 3M y congelación por 4 horas en nitrógeno líquido (tratamiento 16) y combinaciones de solución crio-preservadora Glucosa 3M y congelación por 4 horas en nitrógeno líquido (tratamiento 8). Dicha evaluación se confirmó con el estudio individual de las variables, lo que demostró que las muestras con concentración de solución 3M y sometidas a congelación en nitrógeno líquido presentaron una menor variación del número de eritrocitos en las muestras rehidratadas.

Esto pudo deberse a una menor tasa de enfriamiento de las muestras en hielo seco con respecto a la tasa de enfriamiento de las muestras en nitrógeno líquido. Según (Nijs y Ombelet, 2001) cada célula posee una velocidad de enfriamiento específica, en la cual los daños son reducidos al mínimo; a velocidades de enfriamiento lentas se produce daño celular por deshidratación debida a la elevada concentración de solutos en

el medio extracelular. Otro factor a tomar en cuenta en la presencia/ausencia de eritrocitos es la rehidratación, ya que la supervivencia de las células en un proceso de calentamiento depende de: la congelación, tipo de célula y el tiempo de almacenamiento. Ciertos estudios mencionan que un calentamiento lento es adecuado para la óptima crio supervivencia de células (Doyong y Cristser, 2001).

La disminución del tamaño de los eritrocitos se relacionó con la pérdida de agua, la osmolaridad de las soluciones crio-preservadoras adicionadas previamente al proceso de liofilización lo que pudo ocasionar un estrés osmótico (Fernández, Gonzalvo, Clavero, Ruiz de Assín, y Zamora, 2009). De igual manera se debe considerar que la osmolaridad de la solución rehidratante al ser hipotónica permitió la absorción de agua y por tanto un ligero agrandamiento de las células. Los tratamientos 16 (Fructosa 3M en nitrógeno líquido por 4h), 8 (Glucosa 3M en nitrógeno líquido por 4h), 11 (Fructosa 2M en nitrógeno líquido por 2h), 7 (Fructosa 2M en nitrógeno líquido por 2h) presentaron menor variación en el tamaño de sus eritrocitos que se puede explicar en una relación directa entre el tiempo de congelación y la concentración de solución crio-conservadora. De igual manera al analizar el tamaño de las células rojas de la sangre liofilizada y rehidratada en un período de 72 h por un total de 12 días, se observó una disminución de las mismas con el transcurso del tiempo, esto pudo deberse a los procesos propios de oxidación y degradación de eritrocitos ya que las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente (Rudolph, Md, y P., 1993).

Las muestras rehidratadas presentaron una mayor incidencia de eritrocitos bicóncavos en los primeros días, se observó además un incremento paulatino de la presencia de eritrocitos crenados y sombras. Esto puede explicarse en la fragilidad de la membrana plasmática de los eritrocitos, que después del proceso de liofilización sufre alteraciones múltiples que son difíciles de recuperar. Además hay que considerar que el tiempo de vida útil de una RBC es de máximo 120 días (Lang, y otros, 2007). Sin embargo si no se considera la estirpe celular, el proceso al cual fueron sometidas, las altas condiciones de estrés, la osmolaridad de las soluciones crio-protectoras, el proceso previo de congelación o las condiciones de rehidratación, pueden afectar seriamente su morfología (Wilhelm Oetjen, 2008).

Los medios elaborados con la sangre liofilizada rehidratada presentaron colores rojo brillante, rojo opaco, rojo tinto y café. Los colores rojo tinto y café en los medios

probablemente se debieron a que, después de un proceso de liofilización los eritrocitos sufrieron lisis y la molécula de hemoglobina (responsable del color rojo de la sangre) se vio afectada por el estrés provocado por la presión al vacío y las bajas temperaturas (Rudolph, Md, y P., 1993). Así mismo se determinó que aún con el transcurso de los días los tratamientos 8 (Glucosa 3M en nitrógeno líquido por 4h), y 16 (Fructosa 3M en nitrógeno líquido por 4h) presentaron con mayor frecuencia medios de color rojo brillante, en el transcurso de los días. Los tratamientos 3 (Glucosa 2M en nitrógeno líquido por 2h) y 15 (Fructosa 3M en nitrógeno líquido por 2h) presentaron mayor incidencia en medios rojo opaco en el transcurso de los días. Los tratamientos 14 (Fructosa 3M en hielo seco por 4h), 2 (Glucosa 2M en hielo seco por 4h), 13 (Fructosa 3M en hielo seco por 2h) y 6 (Glucosa 3M en hielo seco por 4h) presentaron medios rojo tinto en su mayoría. Con el transcurso de los días el tratamiento 5 (Glucosa 3M hielo seco 2h) presentó en su mayoría medios café. De igual manera se pudo determinar que los medios elaborados son sangre liofilizada de carnero presentaban un aspecto transparente, esto debido a la ausencia de hematocrito en las muestras rehidratadas. De todo lo antes mencionado se pudo establecer que existe una relación entre un buen proceso de congelación-liofilización y la obtención de un significativo número de eritrocitos viables (Rudolph, Md, y P., 1993).

La elaboración de medios de cultivo en base a concentraciones de 5 y 10% de sangre liofilizada rehidratada determinó que con el transcurso del tiempo la concentración que presentó mejores resultados especialmente en medios de color rojo brillante fue la de 10%. Esto debido a que la cantidad de hemoglobina presente en las muestras liofilizadas fue menor que en las muestras frescas; además por la ausencia de hematocrito en las mismas dado a hemólisis ocasionada en el proceso de liofilización, por lo que para obtener una coloración adecuada en los medios fue necesaria la adición de más sangre (Singleton, 2004).

Una desventaja de la ejecución de esta investigación radica en la facilidad de contaminación ambiental que se puede observar en los medios de cultivo preparados y almacenados. Aunque, por otro lado, muestra la factibilidad de crecimiento microbiológico en los medios suplementados con este producto.

Todos los aislados de *Streptococcus spp* re-cultivados en medios de agar sangre y suplementados con sangre desfibrinada y liofilizada de carnero presentaron

actividad hemolítica distinguible, aunque los halos descritos fueron de menor diámetro que los halos observados en el crecimiento de las mismas cepas en agar sangre fresca de carnero. De las cuatro cepas de *Streptococcus* analizadas, las que mayor actividad hemolítica presentaron fueron los *Streptococcus* del grupo B, debido a que los halos de hemólisis ( $\beta$ -hemolíticos) presentaban mayor tamaño. Aunque muchas de las zonas de punción se observaron con una tonalidad oscuras, producto de hemólisis de eritrocitos con valores inferiores a los reportados en sangre fresca. Las colonias de *Streptococcus* del grupo A exhibieron una significativa actividad hemolítica que responde a la acción de sus dos hemolisinas: la estreptolisina O (exhibe su efecto en la profundidad del agar debajo del desarrollo bacteriano) y la estreptolisina S (exhibe su efecto en la superficie del agar) (Buxton, 2013).

Lo que permitió la visualización de  $\beta$ -hemólisis en los medios de cultivo suplementados con los liofilizados de los tratamientos 14 (Fructosa 3M en Hielo seco por 4h), 2 (Glucosa 2M en Hielo seco por 4h), 10 (Fructosa 2M en hielo seco por 4h), 6 (Glucosa 3M en Hielo seco por 4h).

La factibilidad del uso del suplemento liofilizado en los medios de cultivo en base al crecimiento microbiano se definió con la presencia/ausencia de colonias aisladas. Los tratamientos: 11 (Fructosa 2M en nitrógeno líquido por 2h), 8 (Glucosa 3M en nitrógeno líquido por 4h), 16 (Fructosa 3M en nitrógeno líquido por 4h), 15 (Fructosa 3M en nitrógeno líquido por 2h) fueron reportados por los mejores resultados, siendo que el suplemento del medio de cultivo consistió en sangre liofilizada tratada con fructosa y congelada en nitrógeno líquido. La mayor viabilidad de acuerdo a las cepas se presentó en *Streptococcus* del grupo B, esto pudo deberse a que presentan una mayor virulencia y adaptabilidad al medio de cultivo (Chávez Castillo, y otros, 2007).

A pesar de que el tratamiento 12 (Fructosa 2M en nitrógeno líquido por 4h) presentó óptimas condiciones hematológicas después de su rehidratación, no se observaron resultados favorables en el aspecto microbiológico lo que pudo deberse a fallas eléctricas que descontinuaron el normal funcionamiento de los equipos entre ellos refrigeradoras en donde estuvieron almacenados los medios y por tanto estos se vieron afectados en su calidad (Negróni, 2009).

La variación en el tamaño y la forma en colonias en medios de cultivos suplementados con sangre liofilizada rehidratada en períodos de tiempo sucesivos tiene una explicación en la resiembra de la cepa del microorganismo, por su hábil adaptabilidad al cultivo in vitro (Peñas Parrilla, 2008).

Los tratamientos evaluados que presentaron mayor tamaño de las colonias aisladas fueron el 8 (Glucosa 3M en nitrógeno líquido por 4 h), 16 (Fructosa 3M en nitrógeno líquido por 4 h), 10 (Fructosa 2 M en hielo seco por 4 h), 7 (Glucosa 3M en nitrógeno líquido por 2 h), lo que determina que las muestras tratadas con fructosa probablemente influyen sobre el tamaño de las colonias (Goodrich y Williams, 1989).

Las muestras tratadas con fructosa presentaron mejores resultados en el crecimiento microbiano cuando el tiempo de congelación ha sido de 4h. Con respecto a la forma de las colonias los tratamientos: 16 (Fructosa 3M en nitrógeno líquido por 4 h), 8 (Glucosa 3M en nitrógeno líquido por 4 h), 15 (Fructosa 3M en nitrógeno líquido por 2 h), 10 (Fructosa 2M en hielo seco por 4h) presentaron mejores resultados; señalando que los medios elaborados con la mayoría de las combinaciones de fructuosa en sus tratamientos, permiten un crecimiento de colonias ligeramente definidas y que los únicos medios que permiten el crecimiento de colonias ligeramente definidos tratados previamente con glucosa requieren de altas concentraciones solución y mayor tiempo de congelación en nitrógeno líquido (Goodrich y Williams, 1989).

Dentro de las observaciones que se pudieron apreciar al crecimiento y desarrollo bacteriano cabe resaltar que los tratamientos 8 (Glucosa 3M en nitrógeno líquido por 4 h), 16 (Fructosa 3M en nitrógeno líquido por 4 h), 15 (Fructosa 3M en nitrógeno líquido por 2 h) presentaron obscurecimiento en la zona de punción. Mientras que las cepas que presentaron similar característica fueron *Streptococcus* del grupo A y B; lo que pudo deberse a una actividad hemolítica (Brizuela, 2007).

Se observa que el número de eritrocitos recuperados con el tratamiento 3 (Glucosa 2M en nitrógeno líquido por 2h) disminuye notablemente a lo largo del tiempo, aunque su promedio general demuestre que es el tratamiento donde mayor recuperación de eritrocitos existió, se observa que las células o su membrana son frágiles y por eso su inestabilidad a lo largo del tiempo.

Los resultados demostraron que el porcentaje del número de eritrocitos que se puede recuperar íntegros después de la rehidratación del liofilizado corresponden a menos del 25%. Esto puede deberse a que la membrana citoplasmática de esta célula sufre alteraciones importantes que la hacen frágil y su fragilidad aumenta de forma directa al período de tiempo en el que se ha mantenido el liofilizado. Los estudios de las células de la sangre, han demostrado que el eritrocito tiene un tiempo de vida útil de 120 días, luego de lo cual su membrana plasmática se vuelve frágil y se rompe al pasar por los capilares del bazo (Quintanar Escorza y Calderón Salinas, 2006). Es posible que el proceso de deshidratación en todas sus fases sean causas de una mayor fragilidad de la membrana en la célula que se demuestra únicamente cuando el producto de la liofilización se rehidrata. Esto también explicaría la ausencia de hematocrito y la apariencia transparente de los medios de cultivo suplementados con liofilizados (Rudolph, Md, y P., 1993).

Cabe recalcar que el tratamiento 3 (Glucosa 2M en nitrógeno líquido por 2h) es el que demuestra en promedio una mejor recuperación del número de eritrocitos, sin embargo se observa que los eritrocitos tienen a destruirse en una proporción mayor a lo largo del tiempo es decir que la estabilidad que el tratamiento les otorga a temperatura ambiente es baja y por tanto la célula se vuelve frágil.

Por otro lado el tratamiento 12 (Fructosa 2M en nitrógeno líquido por 4h) tiene un porcentaje de recuperación del número de eritrocitos que rodea el 5%, pero permanece constante a lo largo del tiempo, lo cual demuestra que este tratamiento garantiza la vida útil de las células que resisten el proceso de liofilización aunque no necesariamente estas correspondan a un número alto. Probablemente existe una condición fisicoquímica de liofilización, que no se ha tomado en consideración en este tratamiento, que puede ser responsable de la no recuperación eritrocítica. Las células jóvenes por el contrario resistieron el tratamiento a pesar de que fueron mantenidas a temperatura ambiente (Yigit & Aktas, 2009).

En la gráfica 3.35 se muestra también el comportamiento en cuanto a la recuperación de los eritrocitos de los tratamientos 8 (Glucosa 3M en nitrógeno líquido por 4 h), 15 (Fructosa 3M en nitrógeno líquido por 2 h), 16 (Fructosa 3M en nitrógeno líquido por 4 h), para los cuales se reportó los promedios de variación del número de eritrocitos más favorables. Sin embargo, para estos tratamientos se muestra también la

pérdida de células proporcional al tiempo de almacenamiento del liofilizado antes de su rehidratación.

La encuesta aplicada fue validada con un índice de correlación Alfa de Cronbach de 0,71, dado que el instrumento piloto con un alfa de 0,4 fue corregido y aplicado a un nuevo grupo de posibles beneficiarios del producto desarrollado en consecuencia de esta investigación (Céspedes Quirós, Cortés Ángel, y Madrigal Meneses, 2011).

El costo de producción de la sangre liofilizada de carnero representa un valor de 1,21 dólares por mililitro, comparando los resultados de crecimiento y desarrollo de *Streptococcus spp.* a las condiciones previamente establecidas, es aún elevado el costo de producción en relación a la sangre fresca (aproximadamente 0,80 dólares por mililitro). Sin embargo, cabe mencionar que el proceso de liofilización es más lento que los procesos convencionales de secado por lo que requiere mayor consumo energético, lo que lo convierte en un proceso costoso (Aulton, 2004).

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. La preparación del liofilizado con el tratamiento en el que se aplicó una solución crio-conservadora de Fructosa 2M y congelación en nitrógeno líquido por 4h presentó los mejores resultados hematológicos (hemoglobina, tamaño, forma de eritrocitos).
2. El liofilizado preparado con el tratamiento en el que se aplicó una solución crio-conservadora Fructosa 3M y congelación en nitrógeno líquido por 4h, presentó resultados aceptables tanto en los aspectos hematológicos, así como microbiológicos (viabilidad, forma, tamaño y hemólisis de las colonias).
3. El color de las muestras liofilizadas se vio influenciado por la concentración de solución crio-conservadora. El color rojo brillante se evidenció en muestras tratadas con concentraciones de 3M.
4. La textura de las muestras liofilizadas dependió del tiempo y tipo de congelación. Las muestras compactas y secas que hacen referencia a una liofilización completa se obtuvieron de tratamientos a los que se aplicó congelación con nitrógeno líquido y un tiempo de congelación de 4h.
5. Los valores hematológicos de: hemoglobina, número, tamaño y forma de eritrocitos en las muestras liofilizadas bajo las condiciones establecidas en el proyecto fueron inferiores a los valores hematológicos en las muestras frescas.
6. Los medios de cultivo suplementados con sangre liofilizada de carnero, presentaron aspecto transparente debido a la ausencia de valores de hematocrito.
7. Los *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos del grupo A, *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos grupo del B, los *Streptococcus viridans*, y los *Streptococcus milleri* crecieron y se desarrollaron de acuerdo a lo esperado. Se observó la actividad hemolítica correspondiente a cada grupo microbiano aunque el tamaño del halo de hemólisis fue de menor diámetro.

8. El almacenamiento de las muestras liofilizadas a temperatura ambiente presenta variación en los valores hematológicos y de crecimiento bacteriano en el transcurso del tiempo.
9. El tiempo de almacenamiento en el cual se observa la menor variación de los valores hematológicos y mejores resultados en el crecimiento de *Streptococcus* es de 6 días en promedio.
10. Los medios de cultivo suplementados con agar sangre liofilizada de carnero con las condiciones establecidas en el presente estudio; poseen menor rendimiento y efectividad que los medios de cultivo suplementados con agar sangre fresca de carnero. Sin embargo son una buena alternativa para el aislamiento de cepas de *Streptococcus spp.*
11. El costo de producción sangre liofilizada de carnero como suplemento para medios de cultivo para diagnóstico clínico según las condiciones establecidas en este estudio es de 1,21 dólares por cada mililitro del producto.
12. El personal de laboratorio clínico encuestado que no utiliza sangre de carnero, menciona que esto se debe a la dificultad de acceso a la misma.
13. La gran mayoría de posibles beneficiarios de la sangre liofilizada de carnero, estarían de acuerdo en utilizar un suplemento alternativo siempre y cuando éste sea de disponibilidad inmediata, presente menor riesgo de contaminación y mayor tiempo de vida útil.

## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Realizar lavado de eritrocitos previo el proceso de liofilización, para aumentar la concentración de eritrocitos en la sangre.
- Variar la concentración de las soluciones crio-conservadoras aplicadas en las muestras previo el proceso de liofilización.
- Variar el tiempo de congelación de las muestras previo el proceso de liofilización.
- Cambiar el tipo de congelación aplicado previo al proceso de congelación.
- Evaluar las condiciones de crio-conservación (Glucosa, Fructosa) y congelación (Hielo seco y nitrógeno líquido) en un proceso de liofilización con almacenamiento a temperatura de refrigeración.
- Evaluar los valores hematológicos y microbiológicos de la sangre liofilizada de carnero aplicando una solución de rehidratación con sacarosa.
- Realizar estudios similares en otras cepas de *Streptococcus*, así como cepas de *Staphylococcus*.
- Es importante considerar el estado de salud, la alimentación, la edad y el género de los animales de los cuales se obtiene la sangre para el análisis experimental, puesto que las variables biológicas sujetas a estos parámetros pueden influir en el rendimiento del proceso de liofilización en cada experimento.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, J. (1979). *Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos*. Quito: Radio Quito.
- Anand, C., Gordon, R., Shaw, H., Fonseca, K., y Olsen, M. (29 de Julio de 1999). *Pig and Goat Blood as Substitutes for Sheep Blood in Blood-Supplemented Agar Media*. Recuperado el 14 de Noviembre de 2011, de Journal of Clinical Microbiology: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86154/>
- Antón Fos, G. M., García Doménech, R., y Moreno Frigols, J. L. (2011). *Introducción a la Físico-química* (Segunda edición ed.). Valencia: Universitat de València.
- Aulton, M. (2004). *Farmacología: Ciencia y Diseño de Formas Farmacéuticas* (Segunda edición ed.). Madrid: Elsevier.
- Bencomo Fonte, L., Álvarez Ampudia, Y., Medina Fonte, N., León Apaulaza, L., Alcalde Pérez, J., y Gonzales Frontela, I. (2008). *Obtención de Sangre Total ovina con fines diagnósticos*. Recuperado el 11 de Noviembre de 2011, de Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Ernesto Che Guevara de la Serna": <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=63612840012>
- Bourne, R., Himmelreich, U., Sharma, A., Mountford, C., y Sorrell, T. (Agosto de 2001). *Identification of Enterococcus, Streptococcus and Staphylococcus by Multivariate Analysis of Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Data from Plate Culture*. Recuperado el 14 de Noviembre de 2011, de Journal of Clinical Microbiology: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88260/>
- Brizuela, M. (Febrero de 2007). *Estreptococo Agalactiae Grupo B (EGB). Patógeno emergente de infección grave en neonatos y niños*. Recuperado el 11 de Noviembre de 2011, de Bionáalisis: [www.revistabioanalisis.com/arxiu/notas/Nota2\\_13.pdf](http://www.revistabioanalisis.com/arxiu/notas/Nota2_13.pdf)
- Buxton, R. (1 de Abril de 2013). *Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols*. Recuperado el 28 de Mayo de 2013, de Microlibrary:

<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2885-blood-agar-plates-and-hemolysis-protocols>

Céspedes Quirós, Y., Cortés Ángel, R., y Madrigal Meneses, M. (Julio de 2011). *Validación de un instrumento para medir la percepción de la calidad de los servicios farmacéuticos del Sistema Público de Salud de Costa Rica*, vol.20 no.2. (Revista Costarricense de Salud Pública) Recuperado el 26 de Junio de 2012, de Revista Costarricense de Salud Pública: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-14292011000200002](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292011000200002)

Chávez Castillo, M., Córdova G, L., Muñoz Ganoza, E., Otiniano García, M., Luján Velásquez, M., y Castro Sarabia, J. (2007). *Evaluación comparativa de agar sangre de carnero y agar sangre humana en el aislamiento de Streptococcus beta hemolíticos de pacientes con faringitis del Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo de Chiclayo*. Recuperado el 8 de Noviembre de 2011, de <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/rmv/v04n2/pdf/a07v4n2.pdf>

Coronel Castillo, O. J. (Octubre de 2007). *Manual para el manejo de ganado ovino*. Recuperado el 20 de Julio de 2012, de <http://www.infolactea.com/descargas/biblioteca/423.pdf>

Day, J. G., & McLellan, M. R. (2007). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Totowa,NJ: Humana Press.

Dickson U., L. C., y Muñoz Milano, G. (2005). *Manual de producción ovino y caprino*. Recuperado el 20 de Julio de 2012, de Ministerio de Ciencia y Tecnología Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Centro de Investigaciones Agrícolas del Estado de Lara: [http://bioteccaprina.inia.gob.ve/dmdocuments/manual\\_de\\_produccion\\_ovino\\_y\\_caprino.pdf](http://bioteccaprina.inia.gob.ve/dmdocuments/manual_de_produccion_ovino_y_caprino.pdf)

*Diccionario Ilustrado de términos médicos*. (s.f.). Obtenido de Hemólisis: <http://www.iqb.es/diccio/h/he2.htm>

- Doyong, G., & Cristser, J. K. (2001). *Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells*. (O. University, Ed.) Recuperado el 14 de December de 2011, de ILAR Journal: <http://ilarjournal.oxfordjournals.org/content/41/4/187.full>
- Fernández, A.; Gonzalvo, M. C.; Clavero, A.; Ruiz de Assín, R., y Zamora, S. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *ASEBIR*. 14:17-25
- Fitzpatrick, T. (30 de Junio de 2009). *Dermatología en Medicina General*. (M. Panamericana, Ed.) Recuperado el Noviembre 15 de 2011, de [http://books.google.com.ec/books?id=83V0I\\_tJbggC&dq=Estreptococos&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com.ec/books?id=83V0I_tJbggC&dq=Estreptococos&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Goodrich, R. P., y Williams, C. M. (1989). *Patente n° ES 2055 048*. España.
- Hemólisis* (s.f.). Obtenido de Diccionario Ilustrado de términos médicos. <http://www.iqb.es/diccio/h/he2.htm>
- ITESCAM. (2007). *Deshidratación: secado y liofilización*. Obtenido de <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r46891.PDF>
- Jácome, M. B. (Noviembre de 2003). *Adecuación y Funcionamiento un Deshidratador de Gabinete con Flujo de Aire Horizontal, para Prácticas de Laboratorio en la Universidad Tecnológica Equinoccial. Estudio de Caso: ajo (allium sativum l), hojas de apio (apium graveolens var), manzana (pyrus malus)*. Obtenido de UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL: [http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/5331/1/22908\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/5331/1/22908_1.pdf)
- Kachhwaha, S. J. (2005). *Prospects in Lyophilization*. Recuperado el 16 de Agosto de 2012, de Pharmainfo.net: <http://www.pharmainfo.net/reviews/prospects-lyophilization>
- Krishna Prasad, N. (2010). *Downstream Process Technology: A New Horizon in Biotechnology*. New Delhi: PHI Learning Private Limited.

- L. Microbiología Pasteur. (2006). *Sangre de Carnero*. Recuperado el 7 de Noviembre de 2011, de Laboratorio de Microbiología Pasteur: [www.microbiologiapasteur.com](http://www.microbiologiapasteur.com)
- Labconco Corporation. (2010). *A Guide to Freeze-Drying for the Laboratory*. Recuperado el 5 de Marzo de 2012, de [http://chiron.no/pdf/Labconco\\_guide\\_to\\_freeze\\_drying.pdf](http://chiron.no/pdf/Labconco_guide_to_freeze_drying.pdf)
- Lang, S., Xue, J., Guo, Z., y Palmer, M. (2007). *Streptococcus agalactiae CAMP factor binds to GPI-anchored proteins*. Recuperado el 15 de Noviembre de 2011, de Medical Microbiology and Immunology: <http://www.springerlink.com/content/17174q01xv662023/>
- Mendenhall, W., y Sincich. (1997). *Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias* (6 ta ed.). México: Thomson.
- Méndez Lagunas, J. L., Rodríguez, R. J., & García Cortes, M. Y. (7 de Agosto de 2008). *Variaciones del contenido de humedad por efecto de congelado a temperatura de criogenia*. Recuperado el 19 de Febrero de 2013, de Revista Mexicana de Ingeniería Química.
- Mitchell Lewis, S., Bain, B. J., & Bates, I. (2008). *Hematología Práctica*. Recuperado el 23 de Octubre de 2012, de Google Books: <http://books.google.com.ec/books?ei=5D7QTPqvEcrvggekx6XRDg&ct=result&hl=es&id=6ka6vwRbogEC&dq=desfibrinaci%C3%B3n+sangre+con+citrato&q=hematocrito#v=snippet&q=hematocrito&f=false>.
- Negróni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía práctica* (Segunda edición ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Nijs, M.; Ombelet, W. (2001). Cryopreservation of human sperm. *Human Fertility*. 158-63
- Oliva y Herrera, M. (2010). *Liofilización*. Recuperado el 27 de Septiembre de 2011, de <http://ocw.ub.edu/farmacia/tecnologia-farmaceutica-i/fitxers/temes/T.11-Liofilb7litzacio.pdf>.

- OMS. (2003). *Prácticas de Seguridad Estándar en el Laboratorio de Microbiología*. Recuperado el 17 de Noviembre de 2011, de [http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO\\_CDS\\_CSR\\_RMD\\_2003.6\\_apendices\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_RMD_2003.6_apendices_spa.pdf)
- Orrego Alzate, C. E. (2003). *Procesamiento de Alimentos*. Manizales: Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales.
- Peñas Parrilla, M. (2008). *Microbiología Clínica (Guión de Prácticas)*. Recuperado el 14 de Enero de 2013, de <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/practicas.pdf>
- Pharmaceutical Technology. (2004). *The Saga of Freeze-Drying*. Recuperado el 18 de Agosto de 2012, de Pharmaceutical Technology: <http://www.pharmtech.com/pharmtech/data/articlestandard/pharmtech/072004/84716/article.pdf>
- Porras Pino, D. (1981). *Recomendaciones para la Cría de Ovinos*. República de Venezuela. (Tercera edición ed.). Ministerio de Agricultura y Cría.
- Quintanar Escorza, M. A., y Calderón Salinas, J. V. (21 de Agosto de 2006). *Eriptosis, La Apoptosis del Eritrocito*. Recuperado el 25 de Febrero de 2012, de [http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2006/03/g\\_Eriptosis.pdf](http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2006/03/g_Eriptosis.pdf)
- Ramírez Navas, J. S. (2006). *Liofilización de alimentos*. Recuperado el 10 de Noviembre de 2011, de Revista Recitela: [http://books.google.com.ec/books?id=hNckTLfmPI4C&pg=PA2&dq=liofilizaci%C3%B3n+de+alimentos&hl=es&sa=X&ei=ZbteT\\_epHsWysAKLh5GUCA&ved=0CDYQ6AEwAA#v=onepage&q=liofilizaci%C3%B3n%20de%20alimentos&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=hNckTLfmPI4C&pg=PA2&dq=liofilizaci%C3%B3n+de+alimentos&hl=es&sa=X&ei=ZbteT_epHsWysAKLh5GUCA&ved=0CDYQ6AEwAA#v=onepage&q=liofilizaci%C3%B3n%20de%20alimentos&f=false).
- Rodríguez, G. (2002). *Géneros Streptococcus y Enterococcus*. Recuperado el 30 de Octubre de 2011, de Temas de Bacteriología y Virología Médica: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/StreptococcusyEnterococcus.pdf>
- Rudolph, A. S., Md, B., y P., J. (1993). *Patente n° 5,242,792*. Estados Unidos.

- San Miguel, J. F., y Sánchez Guijo, F. M. (2009). *Hematología Manual Básico Razonado*. Recuperado el 23 de Octubre de 2012, de Google Books: [http://books.google.com.ec/books?id=bWXhtbgVL3wC&printsec=frontcover&q=desfibrinaci%C3%B3n+sangre+con+citrato&hl=es&source=gbs\\_book\\_similarbooks#v=onepage&q=hemoglobina&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=bWXhtbgVL3wC&printsec=frontcover&q=desfibrinaci%C3%B3n+sangre+con+citrato&hl=es&source=gbs_book_similarbooks#v=onepage&q=hemoglobina&f=false)
- Singleton, P. (2004). *Bacterias, en Biología, Biotecnología y Medicina*. Zaragoza: Acribia.
- Sputtek, A. (2007). Cryopreservation of Blood Red Cells ad Platelets. En J. G. Day, & M. R. McLellan (Edits.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (Segunda edición ed., págs. 283-302). Totowa, New Jersey, Estados Unidos: Humana Press.
- Sterzik, B., y Fehernbach, F. (1985). *Reaction components influencing CAMP factor induces lysis*. Recuperado el 12 de Noviembre de 2011, de <http://mic.sgmjournals.org/content/131/4/817.full.pdf>
- Tecnovax S.A. (2006). *Liofilización*. (Tecnovax S.A.) Recuperado el 27 de Junio de 2012, de Providean Viratec: <http://www.tecnovax.com.ar/2007/images/06-OrigLiofilizacion.pdf>
- Telstar. (s.f.). Guía de liofilización: Equipos de laboratorio Cryodos-Lyoalfa. IMA.
- TERRONI EQUIPAMENTOS LTDA. (s.f.). *Manual básico de liofilización*.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología* (Novena ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Universidad de Granada. (2008). *Guiones de prácticas de laboratorio Experimentación en Ingeniería Química III*. Recuperado el 25 de Junio de 2012, de Departamento de Ingeniería Química: <http://es.scribd.com/doc/70276694/12/Secado-por-lio-filizacion-Determinacion-del-punto-de-fusion-incipiente>
- Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. (s.f.). *CAPITULO 11. CRIOCONCENTRACION Y LIOFILIZACION*. (D. N. Virtuales, Editor) Recuperado el 30 de Julio de 2012, de Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales:

<http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/sedes/manizales/4070035/lecciones/cap11/cap11.htm>

Valencia, I. K., Calderón, R., Callisaya, J. E., y Choque, M. (Junio de 2010). Recuperado el 10 de 11 de 2011, de Evaluación de medios de cultivo para el aislamiento de Streptococcus: <http://www.scielo.org.bo/pdf/rbfb/v18n1/a06v18n1.pdf>

Wilhelm Oetjen, G. (2008). *Freeze-Drying*. Lubeck: John Wiley and Sons.

Wilhelm Oetjen, G. (2008). Freeze-Drying. En G. Wilhelm Oetjen, *Freeze-Drying* (pág. 1). Lubeck: John Wiley and Sons.

Yeh, E., Pinsky, B., Banaei, N., y Baron, E. (3 de Julio de 2009). *Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests*. Recuperado el 10 de Noviembre de 2011, de PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578541>

Yigit, N., y Aktas, E. (June de 2009). *Comparison of the efficacy of different blood medium in determining the hemolytic activity of Candida species*. Recuperado el 14 de Noviembre de 2011, de Journal of Medical Mycology: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1156523309000432>

## ANEXOS

**Anexo 1. Descripción estadística del color de las muestras liofilizadas de acuerdo a los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para tratamientos**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamientos	Medias	E.E.		
11	3,00	0,00	A	
10	3,00	0,00	A	
8	3,00	0,00	A	
16	3,00	0,00	A	
15	3,00	0,00	A	
14	3,00	0,00	A	
7	3,00	0,00	A	
2	3,00	0,00	A	
3	3,00	0,00	A	
6	3,00	0,00	A	
1	2,00	0,00	B	
13	2,00	0,00	B	C
5	2,00	0,00	B	C
9	2,00	0,00		C
12	1,00	0,00		D
4	1,00	0,00		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 2. Descripción estadística del color de las muestras liofilizadas de acuerdo al tipo de congelación según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Tipo.de.congelacion**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

**Tipo.de.congelacion Medias E.E.**

Hielo seco 2,50 0,11 A

Nitrógeno líquido 2,49 0,11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 3. Descripción estadística del color de las muestras liofilizadas de acuerdo al tiempo de congelación según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo.de.congelacion**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

**Tiempo.de.congelacion Medias E.E.**

4 h 2,50 0,11 A

2 h 2,49 0,11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 4. Descripción estadística del color de las muestras liofilizadas de acuerdo al tipo de solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Solucion.criopreservadora**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Solucion.criopreservadora Medias E.E.

Glucosa 2,50 0,11 A

Fructosa 2,49 0,11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 5. Descripción estadística del color de las muestras liofilizadas de acuerdo a la concentración de solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Concentracion.Solucion**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Concentracion.Solucion Medias E.E.

3 M 2,74 0,11 A

2 M 2,25 0,11 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 6. Descripción estadística de la textura de las muestras liofilizadas de acuerdo a los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para tratamientos**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamientos Medias E.E.

16 3,00 0,00 A

10 3,00 0,00 A

8 3,00 0,00 B

11 3,00 0,00 B

14 3,00 0,00 B

15 3,00 0,00 B

7 3,00 0,00 B

3 3,00 0,00 B

2 3,00 0,00 B

6 3,00 0,00 B

12 2,00 0,00 C

4 2,00 0,00 C

13 1,00 0,00 D

1 1,00 0,00 D

9 1,00 0,00 D

5 1,00 0,00 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Anexo 7. Descripción estadística de la textura de las muestras liofilizadas de acuerdo al tipo de congelación según un modelo general lineal y mixto.

Medias ajustadas y errores estándares para Tipo.de.congelacion

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tipo.de.congelacion Medias E.E.

Hielo seco 2,50 0,11 A

Nitrógeno líquido 2,49 0,11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Anexo 8. Descripción estadística de la textura de las muestras liofilizadas de acuerdo al tiempo de congelación según un modelo general lineal y mixto.

Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo.de.congelacion

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tiempo.de.congelacion Medias E.E.

4 h 2,50 0,11 A

2 h 2,49 0,11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Anexo 9. Descripción estadística de la textura de las muestras liofilizadas de acuerdo al tipo de solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto.

Medias ajustadas y errores estándares para Solucion.criopreservadora

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Solucion.criopreservadora Medias E.E.

Glucosa 2,38 0,11 A

Fructosa 2,36 0,11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Anexo 10. Descripción estadística de la textura de las muestras liofilizadas de acuerdo a la concentración de solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto.

Medias ajustadas y errores estándares para Concentracion.Solucion

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Concentracion.Solucion Medias E.E.

3 M 2,49 0,11 A

2 M 2,25 0,11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 11. Descripción estadística de la variación del valor de hemoglobina presente en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para tratamientos**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamientos	Medias	E.E.	
3	7,14	0,58	A
11	4,04	0,58	B
8	3,73	0,58	B C
10	3,71	0,58	B C
6	3,33	0,58	B C
1	3,21	0,58	B C
2	3,14	0,58	B C D
16	3,04	0,58	B C D
15	2,93	0,65	B C D
14	2,49	0,58	B C D
13	2,48	0,58	B C D
5	2,44	0,58	B C D
4	2,35	0,58	C D
9	2,10	0,58	C D
7	1,53	0,58	D E
12	0,27	0,58	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 12. Descripción estadística de la variación del valor de hemoglobina de acuerdo al tipo de congelación según un modelo general lineal y mixto.**

**Tipo.de.congelacion Medias E.E.**

Nitrógeno líquido 3,13 0,30 A

Hielo seco 2,86 0,29 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 13. Descripción estadística de la variación del valor de hemoglobina de acuerdo al tiempo de congelación según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo.de.congelacion**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

**Tiempo.de.congelacion Medias E.E.**

2 h 3,24 0,29 A

4 h 2,76 0,29 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 14. Descripción estadística de la variación del valor de hemoglobina de acuerdo a la sustancia crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Solucion.criopreservadora**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Solucion.criopreservadora Medias E.E.

Glucosa 3,36 0,29 A

Fructosa 2,62 0,29 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

**Anexo 15. Descripción estadística de la variación del valor de hemoglobina de acuerdo a la concentración de sustancia crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Concentracion.Solucion**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Concentracion.Solucion Medias E.E.

2 M 3,25 0,29 A

3 M 2,74 0,29 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

**Anexo 16. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos presentes en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamientos	Medias	E.E.			
6	6881200,00	210309,38	A		
10	6880800,00	210309,38	A		
9	6875000,00	210309,38	A		
2	6874000,00	210309,38	A		
14	6872000,00	210309,38	A		
1	6871000,00	210309,38	A		
5	6867000,00	210309,38	A		
13	6866000,00	210309,38	A		
3	6760000,00	210309,38	A		
12	6606000,00	210309,38	A	B	
4	6442000,00	210309,38	A	B	C
11	6140000,00	210309,38		B	C
8	5978000,00	210309,38		C	D
16	5884000,00	210309,38		C	D
7	5530000,00	210309,38			D E
15	4960000,00	235133,04			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Anexo 17. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos de acuerdo al tipo de congelación según un modelo general lineal y mixto.

Medias ajustadas y errores estándares para Tipo.de.congelacion

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tipo.de.congelacion	Medias	E.E.
Hielo seco	6873375,00	90215,73 A
Nitrógeno líquido	6065128,21	91365,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Anexo 18. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos de acuerdo al tiempo de congelación según un modelo general lineal y mixto.

Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo.de.congelacion

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tiempo.de.congelacion	Medias	E.E.
4 h	6552250,00	110306,74 A
2 h	6394487,18	111711,98 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Anexo 19. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos de acuerdo al tipo de congelación según un modelo general lineal y mixto.

Solucion.criopreservadora Medias E.E.

Glucosa 6525400,00 110718,73 A

Fructosa 6422025,64 112129,21 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Anexo 20. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos de acuerdo a la concentración de solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto.

Medias ajustadas y errores estándares para Concentracion.Solucion

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Concentracion.Solucion	Medias	E.E.
2 M	6681100,00	105843,41 A
3 M	6262333,33	107191,78 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 21. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos bicóncavos presentes en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para tratamientos**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamientos	Medias	E.E.	
3	81,00	5,40	A
1	61,20	5,40	B
9	60,60	5,40	B
5	60,20	5,40	B
13	56,80	5,40	B
10	51,20	5,40	B C
2	51,00	5,40	B C
6	50,40	5,40	B C
14	49,60	5,40	B C
15	35,75	6,04	C D
7	34,20	5,40	D
11	34,20	5,40	D
12	33,20	5,40	D
8	31,20	5,40	D
16	30,00	5,40	D
4	29,20	5,40	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 22. Descripción estadística de la variación del número de eritrocitos crenados presentes en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para tratamientos**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamientos	Medias	E.E.	
3	59,00	3,71	A
5	41,00	3,71	B
13	39,60	3,71	B C
14	38,60	3,71	B C D
9	38,40	3,71	B C D
1	38,20	3,71	B C D
2	37,00	3,71	B C D
10	35,80	3,71	B C D E
6	33,60	3,71	B C D E F
15	29,50	4,14	C D E F G
7	28,80	3,71	D E F G
11	28,20	3,71	D E F G
8	26,40	3,71	E F G
16	24,80	3,71	F G
12	24,40	3,71	F G
4	22,20	3,71	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 23. Descripción estadística de la variación del número de sombras presentes en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para tratamientos**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamientos	Medias	E.E.						
1	23,20	2,60	A					
9	22,20	2,60	A	B				
3	22,00	2,60	A	B				
5	19,20	2,60	A	B	C			
6	17,20	2,60	A	B	C			
13	17,20	2,60	A	B	C			
10	15,40	2,60		B	C	D		
2	14,00	2,60			C	D	E	
14	13,00	2,60			C	D	E	F
12	8,80	2,60				D	E	F
4	8,20	2,60				D	E	F
15	6,25	2,90					E	F
11	6,00	2,60						F
7	5,40	2,60						G
16	5,20	2,60						G
8	4,80	2,60						G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 24. Descripción estadística de la variación del tamaño de eritrocitos presentes en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para tratamientos**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamientos	Medias	E.E.			
5	2,15	0,18	A		
1	1,99	0,18	A	B	
9	1,93	0,18	A	B	
13	1,83	0,18	A	B	
3	1,66	0,18	A	B	
2	1,65	0,18	A	B	
10	1,59	0,18		B	
6	1,57	0,18		B	
14	1,51	0,18		B	
12	0,82	0,18			C
4	0,81	0,18			C
15	0,71	0,20			C
7	0,67	0,18			C
11	0,62	0,18			C
8	0,47	0,18			C
16	0,33	0,18			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 25. Descripción estadística de la variación del tamaño de eritrocitos de acuerdo a los tipos de congelación según un modelo general lineal y mixto.**

<u>Tipo.de.congelacion</u>	<u>Medias</u>	<u>E.E.</u>	
Hielo seco	1,78	0,08	A
Nitrógeno líquido	0,76	0,08	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)*

**Anexo 26. Descripción estadística de la variación del tamaño de eritrocitos de acuerdo al tiempo de congelación según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Tiempo.de.congelacion**  
 LSD Fisher (Alfa=0,05)  
 Procedimiento de corrección de p-valores: No

<u>Tiempo.de.congelacion</u>	<u>Medias</u>	<u>E.E.</u>	
2 h	1,46	0,11	A
4 h	1,09	0,11	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)*

**Anexo 27. Descripción estadística de la variación del tamaño de eritrocitos presentes de acuerdo a la solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Solucion.criopreservadora**  
 LSD Fisher (Alfa=0,05)  
 Procedimiento de corrección de p-valores: No

<u>Solucion.criopreservadora</u>	<u>Medias</u>	<u>E.E.</u>	
Glucosa	1,37	0,11	A
Fructosa	1,18	0,11	A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)*

**Anexo 28. Descripción estadística de la variación del tamaño de eritrocitos de acuerdo a la concentración de solución crio-preservadora según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Concentracion.Solucion**  
 LSD Fisher (Alfa=0,05)  
 Procedimiento de corrección de p-valores: No

<u>Concentracion.Solucion</u>	<u>Medias</u>	<u>E.E.</u>	
2 M	1,38	0,11	A
3 M	1,17	0,11	A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)*

**Anexo 29. Descripción estadística del color de los medios en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para tratamientos**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

tratamientos	Medias	E.E.				
5	3,20	0,37	A			
1	3,00	0,37	A	B		
6	2,80	0,37	A	B		
13	2,80	0,37	A	B		
2	2,80	0,37	A	B		
14	2,80	0,37	A	B		
9	2,60	0,37	A	B	C	
11	2,40	0,37	A	B	C	D
10	2,40	0,37	A	B	C	D
12	2,20	0,37	A	B	C	D
4	2,20	0,37	A	B	C	D
7	2,20	0,37	A	B	C	D
15	2,00	0,42		B	C	D
3	1,60	0,37			C	D
16	1,40	0,37				D
8	1,40	0,37				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 30. Descripción estadística de la concentración de sangre liofilizada de carnero en relación al color de los medios según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Color.del.medio**

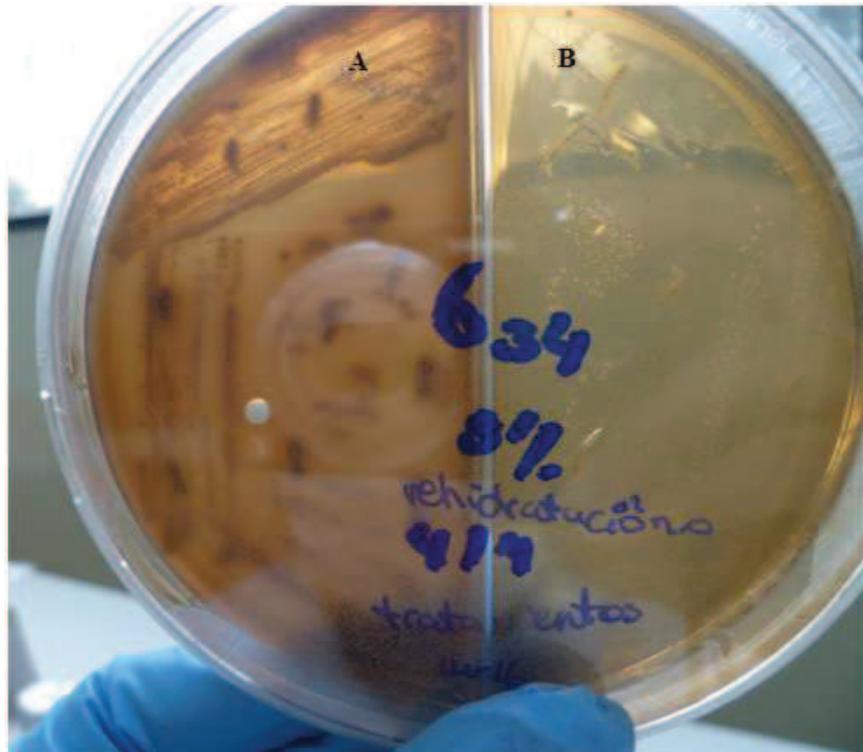
LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

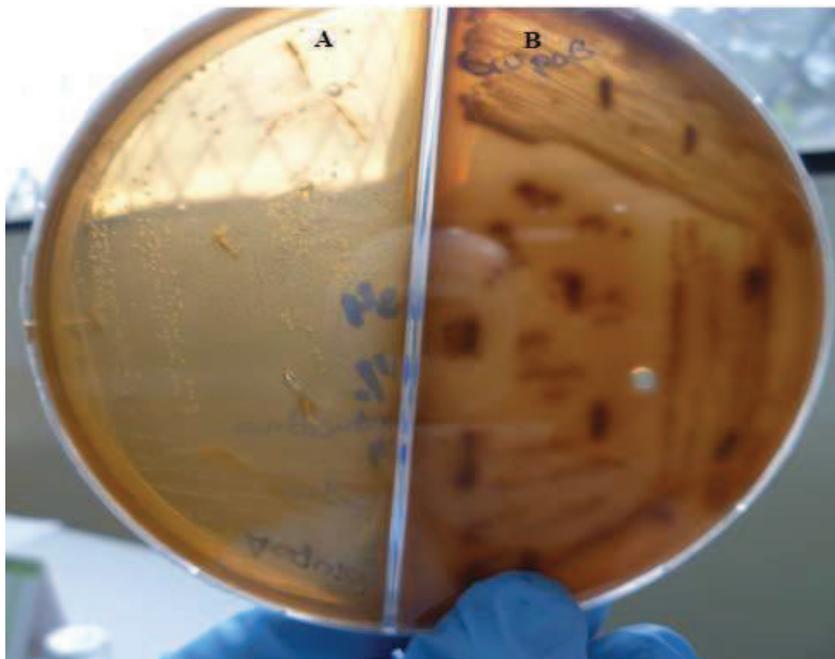
Color.del.medio	Medias	E.E.		
rojo brillante	8,46	0,32	A	
rojo opaco	7,07	0,21		B
rojo tinto	6,55	0,25	B	C
café	5,83	0,30		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Anexo 31. Evaluación del crecimiento de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos en agar sangre liofilizada de carnero, posterior a incubación por 48 h. A. *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos del grupo B. B. *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos del grupo A. Vista anterior.



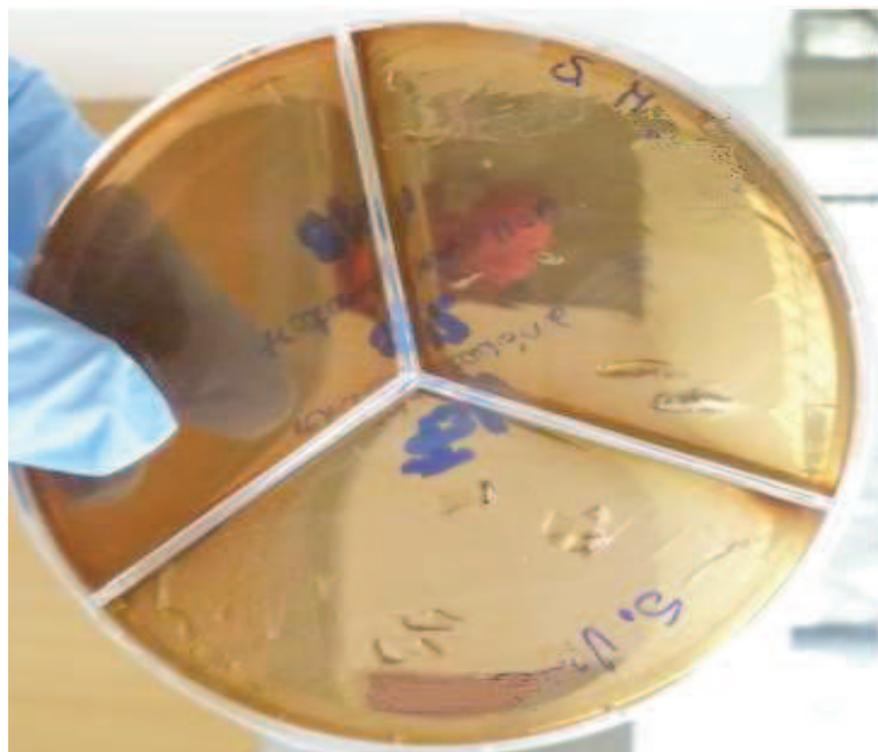
Anexo 32. Evaluación del crecimiento de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos en agar sangre liofilizada de carnero, posterior a incubación por 48 h. A. *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos del grupo B. B. *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos del grupo A. Vista posterior.



Anexo 33. Evaluación del crecimiento de *Streptococcus viridans* en agar sangre liofilizada de carnero, posterior a incubación por 48 h.



Anexo 34. Evaluación del crecimiento de *Streptococcus milleri* en agar sangre liofilizada de carnero, posterior a incubación por 48 h.



**Anexo 35. Descripción estadística de la actividad hemolítica presente en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Tratamiento**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tratamiento	Medias	E.E.	
14	0,90	0,17	A
2	0,78	0,17	A B
10	0,65	0,17	A B C
6	0,45	0,17	A B C D
13	0,30	0,17	B C D
8	0,25	0,17	C D
11	0,23	0,17	C D
16	0,22	0,19	C D
4	0,20	0,17	C D
7	0,15	0,17	D
5	0,15	0,17	D
1	0,13	0,17	D
9	0,10	0,17	D
12	0,10	0,17	D
15	0,00	0,19	D
3	0,00	0,17	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 36. Descripción estadística de la actividad hemolítica presente en las cepas de *Streptococcus* evaluadas según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para *Streptococcus***

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

<i>Streptococcus</i>	Medias	E.E.	
Viridans	6,92	0,28	A
Mirabilis	6,92	0,28	A
B	6,92	0,28	A
A	6,92	0,28	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 37. Descripción estadística de la viabilidad de *Streptococcus* presente en los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Tratamiento**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tratamiento	Medias	E.E.			
11	1,00	0,09	A		
8	1,00	0,09	A		
16	1,00	0,10	A		
15	0,88	0,10	A	B	
10	0,80	0,09	A	B	
7	0,80	0,09	A	B	
3	0,70	0,09		B	C
14	0,70	0,09		B	C
2	0,70	0,09		B	C
6	0,50	0,09		C	D
4	0,30	0,09		D	E
12	0,30	0,09		D	E
9	0,20	0,09			E
5	0,20	0,09			E
13	0,20	0,09			E
1	0,10	0,09			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 38. Descripción estadística de la viabilidad de *Streptococcus* con respecto al tipo de cepa según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Streptococcus**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Streptococcus	Medias	E.E.	
B	0,68	0,04	A
A	0,68	0,04	A
Viridans	0,50	0,04	B
Mirabilis	0,50	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 39. Descripción estadística del tamaño de *Streptococcus* en relación a los diferentes tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

Medias ajustadas y errores estándares para Tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tratamiento	Medias	E.E.			
8	2,40	0,27	A		
16	2,38	0,30	A		
10	2,20	0,27	A		
7	2,10	0,27	A	B	
11	2,05	0,27	A	B	
14	2,00	0,27	A	B	
2	1,90	0,27	A	B	
15	1,88	0,30	A	B	
3	1,75	0,27	A	B	C
6	1,40	0,27		B	C D
4	1,05	0,27			C D E
12	0,80	0,27			D E
9	0,65	0,27			E
13	0,60	0,27			E
5	0,55	0,27			E
1	0,40	0,27			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 40. Descripción estadística del tamaño de *Streptococcus* según el tipo de cepa según un modelo general lineal y mixto.**

Medias ajustadas y errores estándares para *Streptococcus*

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

<i>Streptococcus</i>	Medias	E.E.	
B	2,39	0,13	A
A	1,84	0,13	B
Mirabilis	0,94	0,13	C
Viridans	0,86	0,13	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 41. Descripción estadística de la forma de colonias en relación a los tratamientos según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Tratamiento**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tratamiento	Medias	E.E.										
16	2,06	0,27	A									
8	2,05	0,24	A									
15	1,94	0,27	A	B								
10	1,60	0,24	A	B	C							
11	1,60	0,24	A	B	C							
7	1,50	0,24	A	B	C	D						
14	1,40	0,24	A	B	C	D						
3	1,30	0,24		B	C	D						
2	1,00	0,24			C	D	E					
6	0,95	0,24				C	D	E				
4	0,90	0,24					D	E	F			
12	0,50	0,24						E	F	G		
5	0,40	0,24							E	F	G	
9	0,40	0,24								E	F	G
13	0,25	0,24									F	G
1	0,20	0,24										G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 42. Descripción estadística de la forma de colonias en relación a las cepas de Streptococcus según un modelo general lineal y mixto.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Streptococcus**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Streptococcus	Medias	E.E.	
A	1,69	0,12	A
B	1,38	0,12	A
Viridans	0,75	0,12	B
Mirabilis	0,69	0,12	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 43. Descripción estadística de las observaciones de crecimiento bacteriano según las diferentes cepas de *Streptococcus*.**

**Medias ajustadas y errores estándares para Tratamiento**

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tratamiento	Medias	E.E.							
8	2,15	0,25	A						
16	2,13	0,28	A	B					
15	2,00	0,28	A	B	C				
11	1,75	0,25	A	B	C	D			
14	1,65	0,25	A	B	C	D			
3	1,65	0,25	A	B	C	D			
10	1,55	0,25	A	B	C	D	E		
2	1,40	0,25		B	C	D	E	F	
7	1,30	0,25			C	D	E	F	
4	1,10	0,25				D	E	F	G
6	1,10	0,25				D	E	F	G
12	0,90	0,25					E	F	G H
9	0,70	0,25						F	G H
5	0,50	0,25							G H
13	0,40	0,25							G H
1	0,25	0,25							H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Anexo 44. Descripción estadística de las observaciones de crecimiento bacteriano según las diferentes cepas de *Streptococcus*.**

**Medias ajustadas y errores estándares para *Streptococcus***

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

<i>Streptococcus</i>	Medias	E.E.	
A	2,25	0,13	A
B	1,71	0,13	B
Viridans	0,61	0,13	C
Mirabilis	0,56	0,13	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

## Anexo 45.

El cuestionario descrito a continuación permitirá establecer cuáles son las herramientas de diagnóstico aplicadas en su laboratorio para la identificación de microorganismos del género *Streptococcus spp.* así como también conocer cuáles son sus perspectivas frente a este análisis microbiológico. Muchas gracias por su colaboración.

1. **Seleccione el medio de cultivo que usted utiliza en su laboratorio para el aislamiento de *Streptococcus spp***
  - a. Agar sangre humana
  - b. Agar sangre de carnero
  - c. Agar suplementado con sangre de otro animal distinto del carnero
  - d. Envía las muestras a un laboratorio de referencia y no conoce que utilicen
  - e. Otro medio de cultivo
  
2. **De acuerdo a su experiencia seleccione la característica que representa una ventaja representativa de la utilización de agar sangre de carnero en el aislamiento de microorganismos del género *Streptococcus spp.***
  - a. La conservación de la morfología de las colonias
  - b. Aspecto del crecimiento y la nitidez de los halos de hemólisis
  - c. Costo de la determinación
  - d. Tiempo de crecimiento microbiológico
  - e. Reproducibilidad de los resultados
  
3. **De acuerdo a su experiencia seleccione la característica que representa una desventajas significativa de la utilización de agar sangre de carnero en el aislamiento de microorganismos del género *Streptococcus spp.***
  - a. El costo de la determinación
  - b. El tiempo de vida útil de los medios de cultivo
  - c. Los riesgos asociados al uso de sangre de carnero
  - d. La alta probabilidad de contaminación
  - e. La falta de acceso al suplemento (sangre desfibrinada de carnero)
  
4. **De acuerdo a su experiencia cuales son las ventajas de la utilización de agar sangre humana en el aislamiento de microorganismos del género *Streptococcus spp.***
  - a. La conservación de la morfología de las colonias
  - b. Aspecto del crecimiento y la nitidez de los halos de hemólisis
  - c. Costo de la determinación
  - d. Tiempo de crecimiento microbiológico
  - e. Reproducibilidad de los resultados
  
5. **De acuerdo a su experiencia cuales son las desventajas de la utilización de agar sangre humana en el aislamiento de microorganismos del género *Streptococcus spp.***
  - a. El costo de la determinación
  - b. El tiempo de vida útil de los medios de cultivo
  - c. Los riesgos asociados al uso de sangre humana
  - d. La alta probabilidad de contaminación
  - e. La falta de precisión en los hallazgos microbiológicos
  - f. La probable presencia de sustancias interferentes en el suplemento

6. **Considera usted que el aislamiento y crecimiento de microorganismos del grupo *Streptococcus* en medios de cultivo es indispensable para su posterior identificación**
- a. Siempre
  - b. Algunas veces
  - c. Poco frecuente
  - d. Nunca
7. **Utiliza usted herramientas alternativas de identificación de *Streptococcus* independientes de cultivo.**
- a. Siempre
  - b. Algunas veces
  - c. Poco frecuente
  - d. Nunca
8. **El aislamiento e identificación de microorganismos del género *Streptococcus spp* es:**
- a. Un proceso difícil y tedioso
  - b. Fácil pero muy largo
  - c. Igual a cualquier aislamiento microbiano
  - d. Requiere mucha experticia
  - e. Depende mucho del medio de cultivo utilizado
9. **Considera usted que la utilización de sangre de carnero en este tipo de aislamiento es:**
- a. Indispensable
  - b. Necesaria
  - c. Ocasionalmente necesaria
  - d. Innecesaria
  - e. Solo en caso muy especiales
10. **Si existiera un suplemento alternativo en base a eritrocitos liofilizados de sangre de carnero, usted lo utilizaría**
- a. Definitivamente si
  - b. Tal vez
  - c. Ocasionalmente
  - d. Nunca
11. **Cuáles son las razones por las que usted se inclinaría por una opción alternativa de suplemento del agar sangre de carnero.**
- a. Fácil acceso y disponibilidad inmediata
  - b. Costo
  - c. Tiempo de vida útil o durabilidad del suplemento
  - d. Fácil de almacenar y utilizar
  - e. Menor riesgo de contaminación
12. **Cuáles son las razones por las que usted no utilizaría una opción alternativa de suplemento del agar sangre de carnero.**
- a. No se ha comprobado que ningún suplemento iguale o mejore la calidad del diagnóstico que se obtiene con la sangre fresca desfibrinada de carnero.
  - b. Costo
  - c. Falta de confiabilidad en los resultados obtenidos con un suplemento alternativo
  - d. La posibilidad de que el suplemento contenga sustancias interferentes
  - e. Dificultad de acceso y uso del producto.

#### **Anexo 46.**

El siguiente cuestionario tiene la finalidad de establecer las semejanzas o diferencias en medios de cultivo agar sangre de carnero y medios de cultivo agar sangre desfibrinada liofilizada de carnero determinadas por expertos microbiólogos.

Apariencia del medio de cultivo (Sin crecimiento microbiano)

<b>Característica</b>	<b>Caja 1</b>	<b>Caja 2</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Color:</b>			
rojo brillante			
rojo opaco			
rojo tinto			
<b>Aspecto:</b>			
transparente			
opaco			

## **BIOGRAFÍA**

Alicia Paulina Chicaiza Martínez, nacida en Quito el 25 de Octubre de 1988. Ha cursado sus estudios primarios y secundarios en la Unidad Educativa de La Salle, obteniendo en Julio de 2006, el título de Bachiller en la especialidad Químico-Biológicas con un promedio de sobresaliente y siendo portadora del reconocimiento de segunda escolta de la bandera del colegio. Ha culminado sus estudios de educación superior en la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Superior Politécnica del Ejército ESPE.

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

Alicia Paulina Chicaiza Martínez

**DIRECTORA DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN  
BIOTECNOLOGÍA**

---

Ing. Tatiana Páez

**DELEGADO UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO**

---

Abg. Carlos Orozco Bravo, MSc.

Sangolquí, 1 de julio de 2013