

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

Alicia Paulina Chicaiza Martínez
Julio-2013.

RESUMEN

La sangre de carnero constituye un suplemento de medios de cultivo de uso clínico que garantiza el desarrollo de *Streptococcus spp.* como: *S.* -hemolítico del grupo A y del grupo B; *S. viridans* y *S. 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), así como también el tipo y concentración de solución criopreservadora (Glucosa o Fructosa; 2M o 3M). El producto fue mantenido a temperatura ambiente (18-25°C) y evaluado después de un proceso de rehidratación cada 72h en un período de 12 días. Los resultados demostraron que los parámetros hematológicos se recuperaron con mayor eficiencia en el liofilizado obtenido con la aplicación de Fructosa 2M y congelación con nitrógeno líquido por 4 horas. La viabilidad del crecimiento y capacidad hemolítica de los microorganismos sembrados se estableció observando el tamaño, forma y halos de hemólisis de las colonias. Todas estas características se vieron disminuidas respecto al control de crecimiento establecido en medios de cultivo suplementados con sangre fresca. Se demostró un mejor crecimiento microbiano en los cultivos suplementados con el liofilizado obtenido con Fructosa 3M y congelación en nitrógeno líquido por 4h. En base a los resultados descritos, es posible afirmar que un suplemento nutritivo para medios de cultivo en base a sangre liofilizada de carnero para uso clínico es factible, sin embargo es importante establecer un diseño de optimización de dicha producción en base a nuevos parámetros y condiciones fisicoquímicas bajo las cuales se de la liofilización del producto.

Palabras clave: Sangre de carnero, liofilización, *Streptococcus spp.*, medios de cultivo.

ABSTRACT

Sheep blood is an important supplement of culture media in medical use. It guarantees the normal development of *Streptococcus spp.* such as *S.* -hemolytic of A and B group; *S. viridans* and *S. 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 cryopreservation solution (glucose or fructose with 2M or 3M). The product was stored to environmental temperature (18-25 °C). After that, the product was evaluated by a rehydration process 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 viability of growing and hemolysis of microorganisms were established by observation of the size and shape of hemolytic halos. All of these characteristics were lower than those were observed in fresh samples. It was demonstrated the best bacteria growing was obtained with Fructose 3M 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 establish a optimization design of that product and test new physicochemical parameters and lyophilization conditions in order to optimize the process.

Key words: Sheep blood, freeze-dry, *Streptococcus spp.*, culture media.

INTRODUCCIÓN

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, como suplemento nutritivo, en la elaboración de medios de cultivo¹. Esta práctica se fundamentó en la observación rigurosa del crecimiento de microorganismos exigentes como los pertenecientes al género *Streptococcus*³. Actualmente, la norma ISO 14001:2004 prohíbe este tipo de prácticas, haciendo indispensable la búsqueda de alternativas de adquisición de dicho suplemento¹⁹. En el Ecuador, muchas instituciones dedicadas al diagnóstico clínico, han decidido importar sangre desfibrinada de carnero, lo que implica un incremento en los costos asociados a la preparación de medios de cultivo, la posibilidad de contaminación y la generación de desperdicios con riesgo biológico⁸. El almacenamiento prolongado 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), y defectos de funcionamiento de la Na⁺- K⁺-ATPasa¹⁵.

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; y expone innecesariamente a un incremento de la incidencia de patologías asociadas al desempeño laboral, riesgos que incluyen la probable infección con HBV, VIH u otros agentes infecciosos de transmisión hemática².

La liofilización de los eritrocitos de carnero ha sido uno de los procedimientos que se ha propuesto como una alternativa factible, que facilitaría la disponibilidad del suplemento por períodos prolongados evitando los inconvenientes antes mencionados.

La liofilización es un proceso que busca conservar la estructura y viabilidad celular por medio de la deshidratación de un producto

termo lábil bajando la temperatura e incrementando la presión. Existen investigaciones que aseguran que los eritrocitos son células que pueden ser sometidas a este proceso, conservando sus propiedades y la función de la hemoglobina que es la proteína más importante en este tipo de estructura celular⁴.

El objetivo principal de este estudio fue establecer un protocolo inicial de liofilización de eritrocitos de carnero como estrategia alternativa de preservación de este suplemento.

METODOLOGÍA

1. Fase Inicial

Se aplicó una encuesta a un grupo de posibles beneficiarios del producto final de esta investigación para establecer la percepción de los microbiólogos respecto a las técnicas actuales de aislamiento e identificación y a la alternativa planteada. La encuesta fue validada con la prueba de Alfa de Cronbach.

2. Fase Experimental

2.1.1. Animales

Los carneros fueron provistos por la granja integral de la Hacienda el Prado del Instituto Agropecuario Superior Andino (IASA I). El estado de salud cada animal y el análisis hematológico inicial en base a la cuantificación de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina fueron registrados. La flebotomía se realizó siguiendo procedimientos estándar en condiciones asépticas, obteniendo un volumen aproximado de 200mL de sangre. Durante la extracción el matraz de recepción fue agitado con movimientos rotatorios.

2.1.2. Liofilización

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; con un total de 16 tratamientos evaluados (Tabla 1).

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

# T.	Tipo de solución	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

El proceso de liofilización consistió en colocar 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 h⁵. 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.

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.

2.1.3. Medios de Cultivo

Posteriormente se procedió a la elaboración de medios de cultivo suplementados con sangre liofilizada de carnero utilizando agar base de sangre. 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. Se aplicaron métodos comparativos para determinar la eficiencia del medio de cultivo suplementado con sangre liofilizada de carnero, sembrando cepas de *Streptococcus* - 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.

2.1.4. Evaluación costo beneficio

La determinación del costo requerido para la producción del suplemento liofilizado de sangre de carnero, se obtuvo de un registro de

datos provenientes de las proformas de los materiales y reactivos a utilizados durante la ejecución del proyecto, así como también de la 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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras liofilizadas presentaban un color rojo claro, rojo brillante o rojo tinto y textura compacta, esponjosa o pegajosa. En cuanto al color de las muestras liofilizadas, la mayoría de tratamientos presentaron color rojo tinto, 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. 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, las muestras sometidas a hielo seco y congelación de 2h presentaron textura compacta.

Las diferencias observadas en el color y textura de las muestras liofilizadas pudieron 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 vacío¹⁷.

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.

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 muestra⁹. Así como también variaciones en la

presión y temperatura durante las fases de desecación primaria o secundaria¹⁶.

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 seca⁷.

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.

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 crio-protectores 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 hemolítica⁵.

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.

El estrés ocasionado por la liofilización da lugar a alteraciones en la estructura y actividad de ciertas moléculas⁵; 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 osmolaridad¹⁶.

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. La concentración más alta de solución criopreservadora (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 (Fig.1).

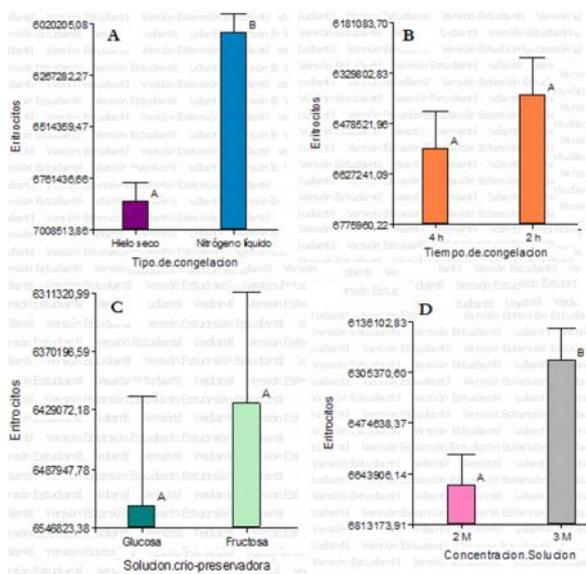


Fig.1. Evaluación del número de eritrocitos según (A) Tipo de congelación, (B) Tiempo de congelación, (C) Tipo de solución criopreservadora y (D) Concentración de solución criopreservadora. * Presentan variación estadística significativa.

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. 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 extracelular¹⁰. 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 células⁴.

En un total de 100 eritrocitos analizados en cada muestra de sangre liofilizada (16 tratamientos). Se observó células bicóncavas, crenadas (forma de estrella), y sombras (Fig.2); 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.

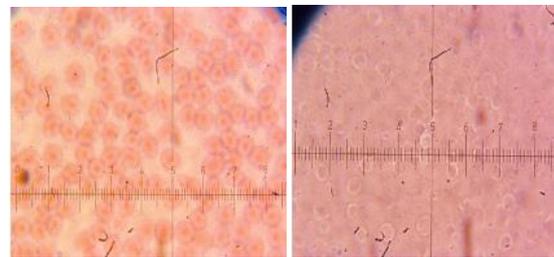


Fig.2. Comparación de eritrocitos presentes en sangre fresca de carnero (izquierda) y sangre liofilizada de carnero (derecha).

Conforme a la forma de eritrocitos los tratamientos que presentaron la menor variación de eritrocitos bicóncavos fueron: 4, 16, 8, 12. La menor variación de eritrocitos crenados correspondió a los tratamientos: 4, 12, 16, 8. La menor variación de sombras presentes en las muestras, correspondió a los tratamientos: 8, 16, 7, 11.

Esta variación 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^{6,12}. 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 crioprotectoras, el proceso previo de congelación o las condiciones de rehidratación, pueden afectar seriamente su morfología¹⁷.

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 (Fig.3). 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.

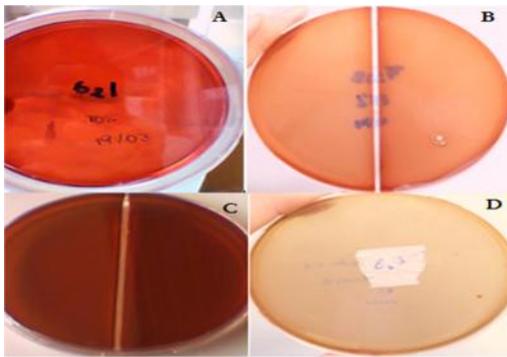


Fig.3. Medios elaborados a base de sangre liofilizada: rojo brillante (A), rojo opaco (B), rojo tinto (C), café (D).

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 temperaturas¹¹. Con el transcurso de los días el tratamiento 5, 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^{5, 13}.

Previo a la elaboración de medios agar sangre liofilizada de carnero se establecieron dos concentraciones de sangre: 5 y 10%. De los resultados obtenidos se determinó que la mayor cantidad de medios rojo brillante se obtuvo concentraciones 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 sangre¹³.

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

Todos los aislados de *Streptococcus spp* recultivados 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 (-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)^{3, 14}.

Lo que permitió la visualización de -hemólisis en los medios de cultivo suplementados con los liofilizados de los tratamientos 14, 2, 10, 6.

Se evaluó también 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. Según la cepa de *Streptococcus*, se determinó que la mayor viabilidad correspondía a las cepas del grupo A y grupo B, esto pudo

deberse a que presentan una mayor virulencia y adaptabilidad al medio de cultivo².

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. De igual manera se obtuvo como resultado que las cepas pertenecientes a *Streptococcus* - hemolíticos del grupo B presentaban las colonias de mayor tamaño, lo que determina que las muestras tratadas con fructosa probablemente influyen sobre el tamaño de las colonias³.

Otra de las características de evaluación del crecimiento bacteriano fue la forma de las colonias. Por lo que se establecieron tres criterios de clasificación: no definidas, ligeramente definidas, definidas. Las cepas de *Streptococcus* evaluadas presentaron forma ligeramente definida en los tratamientos 16, 8, 15, 10. En relación al tipo de cepa se observó que en promedio las cepas de *Streptococcus* del grupo A y B (Fig.4), presentaban forma ligeramente definida y en promedio la cepas de *S. viridans* *S. milleri* presentaban forma no definida.

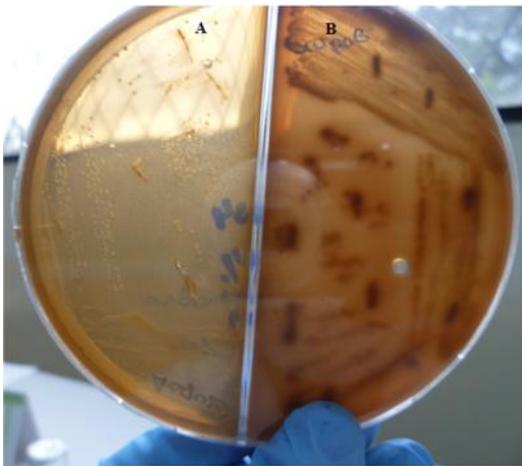


Fig.4. Evaluación del crecimiento de *Streptococcus* - hemolíticos en agar sangre liofilizada de carnero, posterior a incubación por 48 h. A. *Streptococcus* - hemolíticos del grupo B. B. *Streptococcus* - hemolíticos del grupo A. Vista posterior.

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^{11, 19}.

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 En general el tratamiento 3 muestra en promedio el mejor índice de recuperación del recuento de eritrocitos, sin embargo se observa que las células o su membrana son frágiles y por eso su inestabilidad a lo largo del tiempo.

Existen además 8 tratamientos en los cuales el número de eritrocitos recuperados es menor 5% del recuento inicial de hematíes.

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 días¹², luego de lo cual su membrana plasmática se vuelve frágil y se rompe al pasar por los capilares del bazo. 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^{5, 15}.

Por otro lado el tratamiento 12 (fig. 5 C) 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 ambiente¹⁸.

En la gráfica 5 se muestra también el comportamiento en cuanto a la recuperación de los eritrocitos de los tratamientos 8, 15, 16, 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

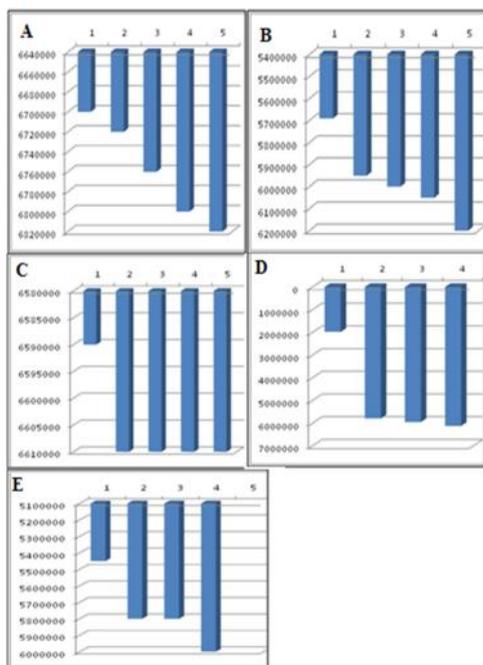


Fig.5. Variación del recuento de eritrocitos (número de eritrocitos inicial – número de eritrocitos final) contados cada 72h en un frasco rehidratado nuevo para cada determinación en un período de 12 días. Liofilizado obtenido en A. tratamiento 3. B. tratamiento 8. C. tratamiento 12. D. tratamiento 15 y E. tratamiento 16.

CONCLUSIONES:

- 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).

- 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).
- 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.
- 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.
- 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.
- Los medios de cultivo suplementados con sangre liofilizada de carnero, presentaron aspecto transparente debido a la ausencia de valores de hematocrito.
- Los *Streptococcus* -hemolíticos del grupo A, *Streptococcus* -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.
- El almacenamiento de las muestras liofilizadas a temperatura ambiente presenta variación en los valores hematológicos y de crecimiento bacteriano en el transcurso del tiempo.
- 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.

- 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.*
- 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.

- 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.
- 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.

REFERENCIAS

1. Bencomo Fonte, L., Álvarez Ampudia, Y., Medina Fonte, N., León Apaulaza, L., Alcalde Pérez, J., & 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>
2. 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>
3. 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>
4. 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>
5. Goodrich, R. P., y Williams, C. M. (1989). *Patente nº ES 2055 048*. España.
6. Krishna Prasad, N. (2010). *Downstream Process Technology: A New Horizon in Biotechnology*. New Delhi: PHI Learning Private Limited.
7. 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
8. 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/>
9. 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.
 10. Nijs, M., & Ombelet, W. (2001). Cryopreservation of human sperm. *Human Fertility*, 4, 158-63.
 11. 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>
 12. Quintanar Escorza, M. A., & 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
 13. Rudolph, A. S., Md, B., & P., J. (7 de Septiembre de 1993). *Patente n° 5,242,792*. Estados Unidos.
 14. Singleton, P. (2004). *Bacterias, en Biología, Biotecnología y Medicina*. Zaragoza: Acribia.
 15. Sputtek, A. (2007). Cryopreservation of Blood Red Cells and 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.
 16. Telstar. (s.f.). Guía de liofilización: Equipos de laboratorio Cryodos-Lyoalfa. IMA.
 17. TERRONI EQUIPAMENTOS LTDA. (s.f.). *Manual básico de liofilización*.
 18. Wilhelm Oetjen, G. (2008). Freeze-Drying. En G. Wilhelm Oetjen, *Freeze-Drying* (pág. 1). Lubeck: John Wiley and Sons.
 19. Yigit, N., & 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>