

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**ESTABLECIMIENTO DEL MEJOR METODO DE PRESERVACION PARA
ALGUNAS CEPAS DE *Streptococcus* spp,
Neisseria gonorrhoeae y *Haemophilus influenzae*.**



Para optar al título de:

QUIMICO BIOLOGO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Guatemala, julio de 1996

R
06
+696947
C.3

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

| | |
|-------------------|---|
| DECANO | Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar |
| SECRETARIA | Licda. Ana Fortuny de Armas |
| VOCAL I | Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez |
| VOCAL II | Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán |
| VOCAL III | Lic. Rodrigo Herrera San José. |
| VOCAL IV | Br. Ana María Rodas Cardona |
| VOCAL V | Br. Hayro Oswaldo García García |

DEDICATORIA

A DIOS

Fuente infinita de luz, amor, sabiduría y fortaleza, que ha guiado cada paso en mi vida.

A MIS PADRES

Oralia Herrera de Martínez y Héctor Edmundo Martínez por su apoyo, constancia y comprensión

A mi abuela Betzabé Paiz Vda. de Herrera

Por su amor y apoyo en mi camino

A mis hermanos

Melvin, Mirle y Kelim con cariño

A mis tíos especialmente a

Arseli, Hernán y Ramiro Herrera, Carlota Paiz, Irma Oliva y Enma España.

A mis primos en general y en especial a

Lorena, Isa, Karen, Wanda, Karla, Suly, Tatiana, Amilcar y Eugenia.

A mis sobrinos

Gabriel Andrés y Cristhopher

A la Señoras Romelia Espina Vda. de Hernández y Angélica Paz de Barrientos

por su cariño y amistad.

A mis padrinos Miriam Velarde, Mynor Hernández y Guillermo Orantes por su amistad, consejos y apoyo

A mis amigos y compañeros en general y en particular a Kerim Orellana, Olga de Orellana, Ingrid Tabarini, Cecilia Barrientos, German Fuentes, Rosita Mutzus, Jorge Luis Galindo, Sandra de León, Thelma Yapan, Luis Hugo Santa Cruz, Mauricio Chajón Brenda Díaz, Arturo Ojeda, Rubia de Ojeda, Teresa Velarde y Yolanda Bernad

AGRADECIMIENTOS

A la Licda. Ingrid Tabarini por su magnífica y desinteresada asesoría y colaboración en esta investigación.

Al Lic. Mynor Hernández por su asesoría en la parte estadística de la investigación.

A la Escuela de Química Biológica, al laboratorio Clínico Tabarini y al Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá por el uso de las instalaciones..

Al señor Julio Cesar Mass por su colaboración.

INDICE

| | pag. |
|-----------------------------------|------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCION | 3 |
| 3. ANTECEDENTES | 4 |
| 3.1 Cultivos Puros | 4 |
| 3.2 <i>Streptococcus</i> spp | 4 |
| 3.3 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 7 |
| 3.4 <i>Haemophilus influenzae</i> | 9 |
| 3.5 Métodos de Preservación | 10 |
| 4. JUSTIFICACIONES | 15 |
| 5. OBJETIVOS | 16 |
| 6. HIPOTESIS | 17 |
| 7. MATERIALES Y METODOS | 18 |
| 7.1 Universo de Trabajo | 18 |
| 7.2 Recursos | 18 |
| 7.3 Metodología | 19 |
| 7.4 Diseño Experimental | 22 |
| 8. RESULTADOS | 26 |
| 9. DISCUSION | 59 |
| 10. CONCLUSIONES | 62 |
| 11. RECOMENDACIONES | 63 |
| 12. REFERENCIAS | 64 |
| 13. ANEXOS | 67 |

1. RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue realizado con el propósito de evaluar los métodos de preservación: nitrógeno líquido, sangre de carnero, aceite mineral, leche descremada y resiembra periódica en medios frescos, mediante comparación de los mismos con el método de preservación por liofilización como control de referencia. Los sujetos de estudio sometidos a los métodos de preservación antes citados fueron tres cepas de *Streptococcus* spp, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*.

Para el presente trabajo se plantearon los objetivos siguientes: evaluar la calidad de todos los métodos de preservación estudiados, establecer el método que en aspectos de calidad, costo y tiempo mostrase la mayor similitud con el control de referencia (liofilización), y, determinar la factibilidad de implementación a nivel de laboratorios clínicos convencionales del método de preservación, alternativo a la liofilización, que mostrase mejores características de calidad, costo y tiempo.

El estudio fue realizado en dos etapas, evaluándose en la primera la calidad de los métodos de preservación; en la segunda etapa se establecieron costos y tiempo de los métodos que tuvieron mejores características de calidad. En lo referente a la calidad, los aspectos evaluados fueron: crecimiento en el medio, tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular; los tiempos de lectura fueron 1.5, 3, 4.5 y 6 meses. El diseño experimental utilizado fue de bloques al azar, los resultados fueron medidos en una escala ordinal y analizados mediante métodos estadísticos no paramétricos, utilizándose la prueba de Friedman para la evaluación del crecimiento en el medio y la prueba de Cochran para los otros tres aspectos estudiados; al haber evidencia significativa entre los métodos, se procedió con la realización de comparaciones pareadas de los métodos con respecto al control de referencia (liofilización). La evaluación de costos y tiempos se realizó mediante la utilización de tablas y diagramas PERT (Program Evaluation and Review Technique) para aquellos métodos de preservación que mejores características de calidad mostrasen.

Hasta un período de 6 meses, los resultados observados demostraron que únicamente el método de preservación en nitrógeno

líquido tiene atributos de calidad (crecimiento en el medio, tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular) similares, a los del control de referencia (liofilización). Los métodos de preservación en sangre de carnero, aceite mineral, leche descremada y resiembra periódica en medios frescos son, en función de los aspectos de calidad evaluados estadísticamente diferentes con el control de referencia ($p < \alpha$). En lo referente a costos y tiempos el método de preservación en nitrógeno líquido, comparado con el método de liofilización resulta ser menos costoso en lo que a implementación y funcionamiento se refiere, y con respecto al tiempo y laboriosidad son casi equivalentes, por lo que se considera factible su implementación a nivel de laboratorios clínicos convencionales.

2. INTRODUCCION

En la actualidad en Guatemala se cuenta con varios métodos para preservar microorganismos tales como: *Streptococcus* spp, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* los cuales son necesarios para ser utilizados como cepas control en los laboratorios clínicos. Estos juegan un papel importante en las enfermedades infecciosas del país, se encuentran con mucha frecuencia causando trastornos de salud. Por lo anterior, la preservación ayuda a tener cepas control y de esta manera dar un diagnóstico fidedigno. Sin embargo, existen dificultades debido a que estos métodos de preservación no son factibles de implementar a nivel de laboratorios clínicos convencionales, por lo que se hace indispensable establecer el método de mayor funcionalidad a este nivel, tomando en cuenta costos que puedan ser cubiertos por dichos laboratorios.

Para el efecto, en el presente trabajo de tesis se evaluaron diferentes métodos de preservación de microorganismos, tales como: nitrógeno líquido, sangre de carnero, leche descremada, aceite mineral y resiembra periódica en medios frescos, utilizando además la liofilización como método de referencia, lo que permitió determinar cuál es el más indicado para preservar la morfología, viabilidad y características específicas de las cepas mencionadas a nivel de laboratorios clínicos convencionales.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

3. ANTECEDENES

3.1. CULTIVOS PUROS:

Puro significa libre de elementos extraños o de otros microorganismos vivos. Para poder identificar exitosamente un microorganismo como responsable de una enfermedad, se debe estar seguro que está presente como componente exclusivo del medio en el cuál se aísla, a lo que se le denomina cultivo puro. Con muy pocas excepciones, las propiedades morfológicas de los procariontes son tan limitadas que no puede hacerse una identificación absoluta y a veces ni siquiera aproximada de un microorganismo sin aislarlo en cultivo puro. De la misma manera, sin dichos cultivos no se pueden determinar las características de un microorganismo que son de mayor interés general, como las necesidades nutricionales, las respuestas al medio ambiente, los productos metabólicos o la patogenicidad (1,2).

3.2. *Streptococcus* spp

3.2.1. Generalidades:

El género *Streptococcus* pertenece a la familia *Streptococcaceae*, son cocos Gram-positivo, citocromo y catalasa negativo que miden de 0.5 a 1.9 μ m de diámetro, agrupados preferentemente en cadenas, en pares y a veces en tétradas, móviles, no esporulados y anaerobios facultativos. Las especies con más importancia clínica son *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. pneumoniae* o neumococo, de los cuales los dos primeros producen una hemólisis completa o β -hemólisis y el tercero una hemólisis parcial o α -hemólisis (2-4).

3.2.2. Características metabólicas:

Los microorganismos del género *Streptococcus* poseen un metabolismo fermentativo y el principal producto de éste es el ácido láctico puesto que su energía proviene principalmente de la fermentación de los azúcares. Tanto *S. pneumoniae* como *S. pyogenes* y *S. agalactiae* crecen en un medio de infusión de carne que contiene sangre o suero (4,5).

3.2.3. Habitat y toma de muestra:

El ser humano es el reservorio por excelencia de *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. pneumoniae*, por lo regular se encuentran en órganos, sistemas y tejidos provocando grandes infecciones (4).

S. pyogenes se localiza principalmente en la garganta en la porción de las amígdalas causando serios problemas como faringitis y más esporádicamente en la piel, vagina y recto; *S. agalactiae* también está presente en la microbiota anteriormente mencionada pero también puede causar infecciones en heridas, endocarditis, infecciones puerperales, septicemia neonatal y meningitis. Las infecciones de heridas son más comunes en pacientes con Diabetes Mellitus y enfermedad vascular periférica; en lo que respecta a *S. pneumoniae* se ubica como la principal causa de neumonía bacteriana adquirida en la comunidad; además, puede causar meningitis, otitis media y bacteremia en lactantes y niños (4).

La toma de muestra para obtener cultivos puros de estas especies se hace principalmente en garganta con hisopo estéril. De la nariz se toma con un alambre flexible estéril con punta de algodón (humedecido con agua o solución salina estéril); de la piel se obtiene mejor de lesiones cutáneas quitando las costras de la cubierta de las pústulas o vesículas; el hisopo esterilizado debe frotarse firmemente en la lesión (4).

Existen otros lugares de los cuales pueden recolectarse las muestras, como por ejemplo: sangre, líquido cefalorraquídeo, esputo, orina, y otros líquidos del organismo (3,4).

3.2.4. Métodos de transporte:

Para el transporte de muestras en hisopos al laboratorio de bacteriología es necesario tomar en cuenta tres aspectos importantes: 1) la fuente de la muestra, 2) el tiempo que se tarda el tránsito de la muestra y 3) las ideas del médico y director de laboratorio con respecto a las bacterias que se consideran patógenas del tracto respiratorio superior. Antes de comenzar los procedimientos de laboratorio, el médico y el director deben decidir la clase de examen bacteriológico necesario para cada muestra dependiendo de la fuente (4).

Los *Streptococcus* spp sobreviven en un ambiente seco, si el tiempo para su descarga en el medio de cultivo no pasa de dos horas. El hisopo se guarda en su envoltura de papel o en un tubo de ensayo esterilizado para su transporte. Si la muestra va a ser procesada hasta el día siguiente

o si deben considerarse otros patógenos, se debe usar medios de transporte como Stuart o Amies. Si el tránsito va a durar más de un día, debe usarse el sistema de transporte gel de sílica o papel de filtro seco. Estos sistemas se utilizan más para muestras de garganta y piel (4).

3.2.5. Medio de cultivo con enriquecimiento:

El medio de cultivo recomendado es el agar sangre de carnero al 5% debido a que los eritrocitos de la especie *Ovis aries*, son sumamente susceptibles a la acción de las hemolisinas bacterianas, y de esta manera se evitan las reacciones hemolíticas dudosas que dificultan la interpretación de los cultivos (5).

Es importante el uso de sangre de carnero porque posee bajo contenido de nucleótidos de piridina inhibiendo el crecimiento de *Haemophilus haemolyticus* que produce colonias idénticas a *S. pyogenes*. La sangre de carnero no contiene anticoagulantes, ni anticuerpos, ni antibióticos contra las bacterias patógenas del hombre, por lo que en general permite mejores crecimientos (5).

3.2.6. Aislamiento e identificación de laboratorio:

El aislamiento de los estreptococos es muy selectivo ya que tienen necesidades nutritivas específicas. Los medios que más se utilizan en este caso son infusión enriquecida en agar y caldo, como tripticasa soya, la infusión cardíaca, el medio Todd-Hewitt o la peptona proteasa y se prefiere el agar sangre de carnero para el aislamiento primario; estos medios son libres de azúcares reductores y sustancias que influyen en la expresión de la β -hemólisis. El aislamiento en placas de agar sangre puede incubarse en cualquier atmósfera, pero muchas cepas crecen mejor anaeróbica que aeróbicamente por lo que a veces se les llama microaerófilas o anaerobias aerotolerantes (3,4).

La identificación de los estreptococos en estudio en agar sangre de carnero se lleva a cabo de la siguiente manera: *Streptococcus* β -hemolíticos pertenecientes al grupo A de Lancefield son susceptibles a la Bacitracina 0.04 unidades y producen una reacción positiva a la hidrólisis de la PYR (Pirrolidina), los que pertenecen al grupo B de Lancefield son CAMP (Cristy Adkins Monch Peterson) e hidrólisis del hipurato positivo y raramente crecen en NaCl al 6.5%; con respecto a la identificación de *Streptococcus* α -hemolíticos pertenecientes al grupo D, específicamente

Streptococcus pneumoniae, se ha establecido que el mismo es susceptible a la Optoquina y soluble en bilis (3,4,6).

3.3 *Neisseria gonorrhoeae*

3.3.1. Generalidades:

El género *Neisseria* pertenece a la familia *Neisseriaceae*, y comprende varias especies con o sin importancia clínica. Una de las que tiene significado patógeno es la *N. gonorrhoeae* que se presenta como cocos Gram-negativo en parejas con formas arriñonadas o granos de café, que no forman esporas, aerobios o anaerobios facultativos, inmóviles, catalasa y oxidasa positivo. Su tamaño varía de 0.6-1.5 mm de diámetro (1-3).

3.3.2. Características metabólicas:

El metabolismo o variación nutricional de *N. gonorrhoeae* se denota en la utilización o síntesis de polisacáridos en agar tripticasa soya al 5 %. Luego de esto se incuba por 3 días a 36°C, al crecimiento se le agrega lugol de Gram y el apareamiento de una coloración azul es indicativo de síntesis de polisacáridos. Además hay otras formas de identificar una *N. gonorrhoeae* como el crecimiento en agar Thayer Martin modificado con CO₂ extra, el cual es muy importante para su crecimiento (1,2).

3.3.3. Habitat y toma de muestra:

Para poder diagnosticar la gonorrea, los lugares indicados para la toma de muestra dependen en cierta forma de la edad, el sexo, las preferencias sexuales del individuo y la presentación de la infección. Habitualmente se le encuentra causando infección en endocervix, uretra y/o recto (3,7-9).

Para la toma de muestra en los lugares ya indicados deben lubricarse con agua tibia todos los instrumentos a utilizar (espéculos vaginales, anoscopios, etc.), ya que otros lubricantes pueden ser tóxicos para los gonococos. Las muestras pueden recogerse en hisopos o, en algunos casos, con asas bacteriológicas de platinoiridio libre de impurezas. Es mejor usar hisopos compuestos de material sintético como alginato de calcio o dacrón. El material debe recogerse en hisopos separados, para realizarle tinción de Gram y cultivo (7,8).

3.3.4. Métodos de transporte:

Los gonococos son sumamente susceptibles a las condiciones adversas, y puede que se encuentren pocos microorganismos en el material clínico, por lo que las muestras deben transportarse al laboratorio en una forma que puedan preservar su viabilidad. Las formas más comunes de transporte son 1) paso directo a placa utilizando medios de cultivo como New York City (NYC), el medio modificado de Thayer Martin o el medio Martin Lewis, 2) medios de transporte nutritivo como Stuart y el Amies y 3) sistemas de transporte nutritivos como medios de New York City, Martin Lewis o Thayer Martin Modificado en placas JEMBEC (Cámara biológica Ambiental) (6-8).

3.3.5. Medios de cultivo con enriquecimiento:

El medio que permite un crecimiento excelente de casi todas las cepas patógenas de *Neisseria*, e inhibe el crecimiento de *Neisseria* saprófitos y otros comensales que pueden contaminar muestras bucofaringeas y anogenitales, es el medio Thayer Martin con antibióticos agregados (7,8).

El medio New York City es claro y favorece el crecimiento superabundante de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (6,7).

También se puede utilizar agar chocolate para su cultivo, pero se debe tomar en cuenta que este medio no es selectivo, ya que no posee agentes antimicrobianos que inhiban el crecimiento de cualquier otro microorganismo (6,7,10,11).

3.3.6. Aislamiento e identificación de laboratorio:

El aislamiento de *N. gonorrhoeae* se lleva a cabo en un ambiente microaerofílico, a una temperatura de 35-37°C, luego las placas se examinan en el transcurso de 18 a 72 horas, para poder asegurar que el cultivo es negativo (6-9).

La identificación de *N. gonorrhoeae* se lleva a cabo efectuando a las colonias presuntivas la prueba de la oxidasa, la cual da positiva; coloración de Gram, la cual presenta cocos Gram-negativo en pares o diplococos con forma de frijol o arrifionados, pero además de esto se pueden hacer pruebas confirmatorias como tinción con FA (Anticuerpo Fluorescente), coagulación y fermentación de azúcares como la glucosa, maltosa y sacarosa, produciendo ácido únicamente con la glucosa (6,7,10).

3.4 *Haemophilus influenzae*

3.4.1. Generalidades:

El género *Haemophilus*, en su morfología, varía de los cocobacilos a los bacilos filamentosos; en la coloración de Gram se presentan como Gram-negativo y además poseen las características de ser alcohol ácidosresistentes, no móviles, esporulados y anaerobios facultativos. Su diámetro varía de 1 a 1.5 por 0.3 mm. La especie de mayor importancia clínica es *H. influenzae*, por ser una de las tres principales causantes de meningitis bacteriana (12,13).

3.4.2. Características metabólicas:

El *H. influenzae* posee un metabolismo fermentativo de los hidratos de carbono, como la glucosa, que al ser fermentada produce ácido succínico, ácido láctico y ácido acético, y algunas veces gas. Crece mejor en agar chocolate que en cualquier otro medio, ya que éste contiene el factor termoestable X y el factor termolábil V; debe colocársele atmósfera húmeda con 5 a 10% de CO₂ a una temperatura que va de 33-37°C (3,12).

3.4.3. Habitat y toma de muestra:

Las fuentes más importantes de *H. influenzae* son las muestras sanguíneas, en caso de endocarditis bacteriana, líquido cefalorraquídeo (LCR) cuando se sospecha de meningitis, y otros como líquido aspirado de articulaciones infectadas, pus, hisopados nasofaríngeos o de garganta y ocasionalmente hisopados vaginales (12,13).

Para la toma de muestra hay que tener en cuenta que las especies de *Haemophilus* son habitantes normales de las vías respiratorias superiores, por lo que éstas muestras deben ser representativas de la microbiota infecciosa, evitando la contaminación con la microbiota comensal. Por lo tanto, en el muestreo se debe utilizar hisopos humedecidos en caldo si son úlceras, si son aspiraciones con jeringas estériles (12,14).

3.4.4. Métodos de transporte:

Para el transporte de hisopos conteniendo muestra de úlceras se utilizan medios como Amies o Stuart. Si la misma proviene de aspirados, el material se debe inocular directamente en el medio (12).

3.4.5. Medios de cultivo con enriquecimiento:

Los medios de cultivo recomendados en este caso son agar chocolate y Levinthal, ya que en éstos están contenidos el factores X que se encuentra directamente en la sangre común y el V, el cual para obtenerlo es necesario liberarlo, destruyendo los glóbulos rojos por calentamiento (6,12,13).

3.4.6. Aislamiento e identificación de laboratorio:

El aislamiento de *H. influenzae* se obtiene al incubar el cultivo a una temperatura que va de 35-37°C, suplementándole una atmósfera húmeda con 5 a 10% de CO₂ y en condiciones óptimas casi todas las colonias crecen después de 18 a 24 horas de incubación (12,14).

La identificación de *H. influenzae* se lleva a cabo con el fenómeno satélite que puede detectarse en cultivos primarios de placas de agar, y para confirmar es mejor utilizar agar Muller-Hinton y colocar los discos o tiras conteniendo los factores X y V sobre la superficie en el área de inoculación a una distancia aproximada de 1 cm. entre cada una (6,12).

3.5 METODOS DE PRESERVACION:

La mayoría de veces es necesario preservar cultivos de bacterias como material de estudio para fines docentes, o bien para utilizarse como controles o cepas reutilizables en los laboratorios clínicos o de referencia. No obstante, no todas las bacterias responden de manera similar a los procesos y condiciones específicas, lo que significa que lo que se utiliza para la preservación de un cultivo puede que no sea aplicable para otro (1,2,15).

Antes de poner en práctica un programa de almacenamiento deben considerarse ciertos factores importantes que pueden ejercer efectos adversos en la colección de cultivos: 1) no deben usarse los medios que contienen hidratos de carbono fermentables, 2) nunca deben usarse medios selectivos, 3) los cultivos no deben secarse (usar tubos de rosca herméticas o sellos de parafina), 4) los microorganismos termosensibles como *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* no deben refrigerarse, pero pueden someterse a congelación rápida para un mantenimiento a largo plazo y 5) los cultivos de referencia recomendados como controles, no deben usarse diariamente durante más de una semana, pero deben tomarse a intervalos no mayores de una semana de stocks congelados o

liofilizados, o de una provisión de cajas o placas de control de cultivos comerciales guardados tal como lo recomienda el fabricante (2,16).

Por lo tanto, las bacterias requieren de un cuidado y un método especial, para que conserven su morfología y características típicas durante el mayor tiempo posible, como fueron en el momento de la preservación. Para todo esto se necesitan medios especiales, resiembras a intervalos fijos y almacenamiento en condiciones establecidas. Si alguna de estas condiciones no se observan, o por alguna razón los microorganismos se contaminan, pueden perderse. Algunos de los métodos más utilizados se presentan a continuación (1).

3.5.1. LIOFILIZACION:

El proceso de liofilización fue estandarizado en 1,935 por Flosdorf y Mudd, es el procedimiento más eficaz para la preservación de una gran variedad de cultivos. Muchas especies de bacterias han permanecido viables por más de 20 años. Consiste en tres fases distintas las cuales se mencionan a continuación: 1. Congelamiento, 2. Sublimación y 3. Secado secundario (1,16).

Primero las células contenidas en un frasco se secan rápidamente mientras son congeladas por inmersión en una solución (usualmente Etilen-glicol) conteniendo hielo seco. El material alcanza aproximadamente -75°C . En vacío interior, la sublimación toma lugar transformando el solvente congelado (agua) en vapor sin pasar por la fase líquida primero. La sublimación ocurre cuando la presión de vapor de un sólido llega a ser más que la presión atmosférica y el sólido se vaporiza. Así, el agua es removida del material liofilizado existente y el producto permanece seco y poroso. El calor perdido causado por la sublimación, simultáneamente conserva el material congelado hasta ser secado. El secamiento secundario se refiere al tratamiento prolongado bajo vacío dejándolo completamente deshidratado (1,16-21).

Luego de ocurridas las tres fases importantes de la liofilización, los frascos se sellan bajo condiciones al vacío. Las ventajas más significativas de este procedimiento son la gran longevidad, las menores oportunidades de cambio en las características del cultivo y lo pequeño de los recipientes donde se almacenan. Cientos de cultivos se pueden almacenar en un espacio pequeño (16-23).

3.5.2. NITROGENO LIQUIDO:

Sí se dispone de nitrógeno líquido, este constituye un método útil y fidedigno para la preservación de cultivos (24).

Todos los cultivos líquidos que contienen microorganismos vivos se centrifugan y una gota de suspensión concentrada de estos, se colocan con suma precaución en una ampolla estéril de vidrio, ésta se une a una bomba de vacío por medio de un tubo adecuado. Toda la técnica se lleva a cabo bajo vacío. La ampolla se sumerge en nitrógeno líquido, cuando la suspensión se ha congelado, la ampolla se sella con un pequeño mechero Bunsen, se pone de inmediato en el congelador y se conserva a -20°C . Para el uso, la ampolla se calienta rápidamente y el microorganismo se siembra en el medio fresco, el que posteriormente se incuba (24,25).

Muchas cepas no patógenas son selladas en vidrio y pueden ser almacenadas en la fase líquida de un congelador de nitrógeno líquido. Las ampollas almacenadas en esta forma, deben ser selladas apropiadamente para que no hayan problemas de explosión (24-28).

El nivel de nitrógeno líquido empleado en el congelador es mantenido por un controlador de llenado automático, que regula la entrada de éste por un apresurador propio (17,26).

Se ha comprobado que el procedimiento de congelación por nitrógeno líquido mantiene muchos especímenes, que no se preservan por liofilización (16).

3.5.3. SANGRE DE CARNERO:

La sangre de carnero utilizada en agar ha demostrado gran valor en el aislamiento de varias bacterias fastidiosas (5).

Existen dos formas de hacer la preservación. En una se inocula el agar sangre con el microorganismo en estudio, se incuba y luego de su crecimiento se sella el frasco y refrigera bien a 4°C . Así es como sobreviven varios meses, preservando sus características morfológicas y bioquímicas. Son excepciones a la regla las cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* del grupo Viridans que no sobreviven más de una semana (5).

La otra manera de preservar bacterias fastidiosas es sembrarlas en agar sangre de carnero e incubarlas a la temperatura establecida, al haber crecimiento de la bacteria se le traslada masivamente con un hisopo estéril a la sangre de carnero y posteriormente se congela a -70°C . De esta

manera se han preservado en especial los *Streptococcus* durante uno a dos años (4,5).

3.5.4. LECHE DESCREMADA:

Es preparada a partir de una leche descremada al 20% (v/v o p/v), agua destilada dispensada en cantidades de 6 ml, autoclaveada y esterilizada. Usualmente no es utilizada para cepas en las cuales su crecimiento es inhibido por la leche o en cepas que son cultivadas en un medio definido químicamente (26,27).

La leche descremada también es utilizada como un crioprotector cuando se lleva a cabo el congelamiento por secado o liofilización (27,28).

La suspensión de bacterias puede hacerse directamente en la leche descremada estéril, la cual es utilizada frecuentemente para preservar bacterias fastidiosas como *Neisseria* spp, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus* spp, etc. (22,27).

3.5.5. ACEITE MINERAL:

Muchas bacterias se preservan bien, cubriendo el agar en que están creciendo con aceite mineral estéril. Se preparan tubos con superficie inclinada del agar correspondiente a cada bacteria de estudio, estriando en dicha superficie, y cuando ya se ha obtenido el crecimiento del cultivo, se le agrega el aceite mineral estéril, cubriendo más o menos de 1 a 2.5 cm de la superficie inclinada del agar (1,16).

El mantenimiento de la viabilidad bajo este tratamiento varía según la especie de bacterias en estudio y consiste en que se puede tomar algo del desarrollo bacteriano que está abajo del aceite, por medio de un asa bacteriológica, incubar medios frescos y continuar preservando el cultivo inicial (1,16).

3.5.6. RESIEMBRA PERIODICA EN MEDIOS FRESCOS:

Una diversidad de bacterias se puede mantener en tubos con medios, en los cuales han sido cultivadas de forma periódica y constantemente por el proceso de resiembra. Muchas de las bacterias heterotróficas permanecen viables durante varias semanas o meses, en medios como el agar nutritivo. Cuando se va a emplear este procedimiento para el mantenimiento de una colección de cultivos, se deben tomar en cuenta tres cosas antes de manejarlo: Determinar cuál es el medio de cultivo

apropiado para el microorganismo que se estudia, la temperatura apropiada para mantener los cultivos y el tiempo que se necesita para hacer las resiembras (1).

4. JUSTIFICACIONES

El diagnóstico mediante microbiología clínica de patologías infecciosas requiere muchas veces de la utilización de cepas control de los agentes etiológicos de las mismas. Como consecuencia de lo anterior, la preservación de cepas de microorganismos de interés clínico constituye una actividad importante y necesaria para la identificación y caracterización de los agentes infecciosos presentes en muestras de laboratorio.

Actualmente en Guatemala, no se cuenta con métodos factibles a nivel de laboratorios clínicos convencionales para la preservación de algunos microorganismos de interés clínico, por lo cual se hace necesario establecer el método de preservación con mayor funcionalidad y factibilidad a dicho nivel, evaluando su efectividad en cuanto a viabilidad y mantenimiento de las características propias de cada cepa. Dicho método debe tomar en cuenta para su implementación y funcionamiento los costos y el tiempo a invertirse, debido a que la mayoría de los disponibles hasta la fecha a nivel internacional no se encuentran al alcance de cualquier laboratorio. La introducción de un método de preservación, sencillo, de bajo costo y efectivo permitirá que estas cepas sean utilizadas en control de calidad, en docencia, en investigación y de referencia en estudios posteriores.

5. OBJETIVOS

5.1. Evaluar los métodos de preservación para *Streptococcus* spp, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* tomando en cuenta el tiempo, calidad y costos del material a utilizar.

5.2. Establecer el mejor método de preservación de las cepas de *Streptococcus* spp, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* tomando en cuenta el tiempo, calidad y costos del material a utilizar.

5.3. Determinar la factibilidad de implementación a nivel de laboratorios clínicos convencionales del método que se establezca como el más viable a dicho nivel para cada una de las cepas ha estudiar.

6. HIPOTESIS

Los mejores métodos de preservación de las cepas de *Streptococcus* spp, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*, en nuestro medio son liofilización, nitrógeno líquido y sangre de carnero.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de Trabajo

7.1.1 Universo de estudio: Cepas de *Streptococcus* spp, *N. gonorrhoeae* y *H. influenzae*.

7.1.2. Muestra: Una cepa de *S. pyogenes* (IN-871188).
Una cepa de *S. agalactiae* (IN-871377).
Una cepa de *S. pneumoniae* (IN-90583).
Una cepa de *N. gonorrhoeae* (aislada en Guatemala).
Una cepa de *H. influenzae* (IN-90103).

7.2 Recursos

7.2.1 Humanos

7.2.1.1 Investigador:

Br. Erick Obed Martínez Herrera.

7.2.1.2 Asesor:

Lic. Ingrid Tabarini Barrios

7.2.2 Físicos

7.2.2.1 Equipo

Microscopio compuesto

Centrifuga

Mechero de Bunsen

Campanas de flujo laminar

Congelador a 4°C y -20°C

Incubadora a 37°C

Estufa

Liofilizador

Autoclave

Termo para conservar nitrógeno líquido.

7.2.2.2 Materiales

Gradillas para tubos de ensayo

Tubos de ensayo de 25 por 200 mm

Viales de vidrio

Cajas de Petri

Erlenmeyer

Porta y cubre objetos

Asas bacteriológicas

Pipetas serológicas de 1.5 y 10 ml.

7.2.2.3 Reactivos

Sangre de carnero

Aceite mineral

Leche descremada

Glicerol

7.2.2.4 Medios

Agar sangre de carnero

Agar chocolate

Agar Thayer Martin

Sangre de carnero

Glicerol 1%

7.2.2.5 Cepas

S. pyogenes (IN-871188)

S. agalactiae (IN-871377)

S. pneumoniae (IN-90583)

N. gonorrhoeae (aislada en Guatemala)

H. influenzae (IN-90103)

7.3 Metodología:

7.3.1. Sujeto de estudio:

El estudio se realizó a partir de un cultivo de cada una de las siguientes cepas *S. pyogenes* (IN-871188), *S. agalactiae* (871377), *S. pneumoniae* (IN-90583), *N. gonorrhoeae* (aislada en Guatemala) y *H. influenzae* (IN-90103).

7.3.2. Procedimiento general de trabajo:

Dichas cepas fueron resembradas en medios de sangre de carnero, agar chocolate, agar sangre de carnero 5%, glicerol al 1% y sangre achocolatada.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Seguidamente los medios resembrados o inoculados fueron sometidos a los siguientes métodos de preservación: liofilización, nitrógeno líquido, sangre de carnero, aceite mineral leche descremada, y resiembra periódica en medios frescos.

Posteriormente se evaluaron los siguientes aspectos:

Crecimiento en el medio

Reacción a la coloración de Gram

Morfología celular

Tipo de hemólisis

7.3.3. Procedimientos específicos:

7.3.3.1 Liofilización

A partir de cultivos puros, inocular la bacteria en viales conteniendo sangre de carnero y sangre achocolatada para que seguidamente sean sumergidos en una mezcla de hielo seco y alcohol por 24 horas, alcanzando así una temperatura aproximadamente de -75°C . Conectar los frascos a una línea de alto vacío por 24 horas. Al terminar el secado sellar los frascos al vacío (1,16-23).

7.3.3.2 Nitrógeno líquido

Cultivar las bacterias en sus respectivos medios más un crioprotector como glicerol al 10% o leche descremada.

Tomar una gota de la suspensión del microorganismo y colocarla en un vial de vidrio.

Sumergir el vial en nitrógeno líquido.

Cuando la suspensión se haya congelado, sellar el vial con mechero Bunsen.

Congelar de -18 a -15°C (el método está estandarizado para congelar a -20°C ; para los propósitos de la presente tesis, se realizó el cambio de temperatura como una modificación del método para adecuarlo a condiciones de un laboratorio clínico convencional) (24,25).

7.3.3.3 Sangre de carnero

Inocular las cepas en estudio en agar sangre de carnero.

Incubar durante 18-24 horas, a una temperatura de 37°C , en ambiente microaerofílico.

Observar crecimiento y pureza en las cajas incubadas.

Sellar las cajas con parafilm.

Refrigerar las cajas a una temperatura de 4-8 °C (el método está estandarizado para refrigerar a 4 °C; para los propósitos de la presente tesis, se realizó el cambio de temperatura como una modificación del método para adecuarlo a condiciones de un laboratorio clínico convencional) (4,5).

Inocular las cepas en el agar y temperatura correspondientes a cada microorganismo.

Tomar masivamente con un hisopo colonias del microorganismo.

Inocular las colonias aisladas en 2 ml. de sangre de carnero (4,5).

Refrigerar la sangre inoculada a una temperatura de 4-8 °C (el método está estandarizado para congelar a -70 °C; para los propósitos de la presente tesis, se realizó el cambio de temperatura como una modificación del método para adecuarlo a condiciones de un laboratorio clínico convencional) (4,5).

7.3.3.4 Leche descremada

Preparar una suspensión de leche descremada al 20%.

Agregar leche en tubos de ensayo de 2 ml.

Esterilizar la leche en tubos a 121°C por 15 minutos.

Hacer una suspensión de la bacteria previamente aislada.

Incubar durante 18-24 horas, a una temperatura de 37°C.

Congelar la suspensión de la bacteria a una temperatura de -18 a -15 °C (el método está estandarizado para congelar a -70 °C; para los propósitos de la presente tesis, se realizó el cambio de temperatura como una modificación del método para adecuarlo a condiciones de un laboratorio clínico convencional) (26,27).

7.3.3.5 Aceite mineral a temperatura ambiente

Preparar tubos con agar sangre de carnero para *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pneumoniae*; agar chocolate para *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* todos con superficie inclinada.

Esterilizar el aceite mineral a una temperatura de 170°C por una hora.

Obtener un cultivo puro del microorganismo en la superficie inclinada del agar respectivo.

Cuando se vea un buen crecimiento, agregar el aceite mineral estéril cerca de 1 cm. sobre la superficie inclinada.

Almacenar los cultivos con aceite mineral a temperatura ambiente.

Transferir a medios de cultivo nuevos cada 1.5 meses (1,16)

7.3.3.6 Resiembra periódica en medios frescos

Inocular las cepas de *Streptococcus spp*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* en agar sangre de carnero y chocolate.

Incubar las cepas de 24-48 horas, a una temperatura de 37°C en microaerofilia.

Sellar las cajas con parafilm.

Refrigerar a 4-8°C.

Resembrar en medios nuevos (1).

7.4. Diseño Experimental:

Se usó un diseño de bloques al azar para cada uno de los aspectos a evaluar; para ésto se les atribuyó un valor arbitrario de 0-4 al crecimiento en el medio, de 0-1 al tipo de hemólisis, a la reacción de coloración de Gram y a la morfología celular. Los tratamientos comparados fueron los 6 métodos de preservación de las cepas y los bloques estuvieron constituidos por cada repetición de cada una de las tres cepas de *Streptococcus spp*, una de *N. gonorrhoeae* y una de *H. influenzae* siendo 15 el total de bloques formados (5 cepas bacterianas x 3 repeticiones cada una = 15, las cuales fueron establecidas por conveniencia).

Se realizaron lecturas de los aspectos mencionados a los 1.5, 3, 4.5 y 6 meses.

7.4.1. Evaluación de la calidad de los métodos de preservación:

Para cada tiempo de lectura se plantearon las hipótesis estadísticas de prueba:

H₀: Todos los tratamientos para la preservación de *Streptococcus spp*, *N. gonorrhoeae* y *H. influenzae* presentan los mismos resultados a los X meses de sembrados.

Ha: Al menos un tratamiento es diferente a los demás a los X meses de sembrados.

Donde X= 1.5, 3, 4.5 y 6 meses.

7.4.1.1. Prueba de Friedman:

El análisis estadístico para la evaluación del crecimiento en el medio se realizó por medio de la prueba de Friedman. Para dicha prueba se definió:

χ^2_r = Estadística de prueba de Friedman

$$\chi^2_r = \left[\frac{12 \sum_{j=1}^k (R_j)^2}{N(k)(k+1)} \right] - 3(N)(k+1)$$

N= número de bloques = 15

k= número de tratamientos= 6

R_j= suma de rangos para el tratamiento j.

α = 0.05

p= probabilidad de observar un valor tan grande como la estadística de prueba como consecuencia únicamente del azar.

Decisión: La hipótesis nula se rechazó cuando $p < \alpha$

Cuando la H₀ fue rechazada, se realizaron comparaciones pareadas entre el grupo control (liofilización=R_L) y cada uno de los tratamientos (R_j), conforme al modelo propuesto por Siegel (29-31), definiéndose:

$$\text{Diferencia crítica} = q_{(\alpha, k-1)} \sqrt{\frac{N(k)(k+1)}{6}}$$

comparándose la misma con la diferencia $|R_L - R_i|$. Cuando $|R_L - R_i|$ resultó ser mayor que la diferencia crítica, se consideró que los tratamientos eran estadísticamente diferentes.

7.4.1.2. Prueba de Cochran:

El análisis estadístico para el tipo de hemólisis, la reacción a la coloración de Gram y morfología celular que tienen una respuesta de tipo binomial, fue la prueba de Cochran, definiéndose:

Q = Estadística de prueba de Cochran

$$Q = \frac{k(k-1) \sum_{j=1}^k (G_j - \bar{G})^2}{k \sum_{i=1}^N L_i - \sum_{i=1}^N L_i^2}$$

N = número de bloques = 15

k = número de tratamientos = 6

G_j = número total de "éxitos" por tratamiento.

\bar{G} = media de G_j

L_i = número total de "éxitos" por bloque.

$\alpha = 0.05$

p = probabilidad de observar un valor tan grande como la estadística de prueba como consecuencia únicamente del azar.

Decisión: La hipótesis nula se rechazó cuando $p < \alpha$

Cuando la H_0 fue rechazada, se realizaron comparaciones pareadas entre el grupo control (liofilización) y cada uno de los tratamientos. Para el caso de respuestas de tipo binomial, la comparación entre el control y cada tratamiento se realizó conforme a la prueba de signos (32), definiéndose, para un $\alpha = 0.05$:

$\Delta = X_i$ (liofilización) - X_i (tratamiento a probar)

u = frecuencia de valores de $\Delta = 0$.

k = número de signos asociados con la región de rechazo, en este caso el No. de signos (+) observados experimentalmente (valores $\Delta > 0$ observados realmente)

y = frecuencia de valores de $\Delta < 0$ (frecuencia de signos -)

n = tamaño efectivo de la muestra, es decir los valores de Δ diferentes de 0 ($k+y$)

$P(k \leq x | n, p)$ = probabilidad de observar "x" o un menor número de signos (-) cuando se da una muestra de tamaño n y un valor de "p" acorde a una H_0 verdadera.

$p = 0.5$ cuando la H_0 es verdadera.

$q = (1-p)$

Se evalúa:

$$P(k \leq x | n, p) = \sum_{k=0}^x \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

Decisión: La H_0 se rechaza cuando $P(k \leq x | n, p) < \alpha$

7.4.2. Evaluación de costos y tiempo a invertir en la implementación y funcionamiento de los métodos de preservación:

Se estimaron costos y tiempos para los métodos que mostraron respuestas adecuadas en lo concerniente a los parámetros de calidad evaluados.

Estos aspectos fueron evaluados mediante diagramas PERT simplificados y estadística descriptiva, tomando en cuenta los resultados obtenidos en las evaluaciones de la calidad en función del tiempo (ver inciso anterior). Se estimaron costos y tiempos de realización de tareas para alcanzar puntos finales equivalentes para cada tratamiento y de esta forma compararlos mediante gráficos de costo-tiempo (33).

8. RESULTADOS

8.1 Evaluación de la calidad de los métodos de preservación.

8.1.1 Crecimiento en el medio

Tabla No. 1
Crecimiento en el medio (valores experimentales) 1.5 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Leche descremada | Resiembra periódica en medios frescos |
|---|----------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|--|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 4 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 4 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 4 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 4 | 4 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 4 | 4 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 4 | 4 | 3 | 0 | 0 | 2 |

Ponderación:

- 0 = ningún crecimiento
- 1 = poco crecimiento
- 2 = regular crecimiento
- 3 = mucho crecimiento
- 4 = abundante crecimiento.

Tabla No. 2
Crecimiento en el medio (valores experimentales) 3 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Acete mineral | Leche descremada | Resiembra periódica en medios frascos |
|---|----------------------------|----------------------|-------------------------|------------------|---------------------|--|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 4 | 3 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 4 | 3 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 4 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Ponderación:

- 0 = ningún crecimiento
- 1 = poco crecimiento
- 2 = regular crecimiento
- 3 = mucho crecimiento
- 4 = abundante crecimiento.

Tabla No. 3
Crecimiento en el medio (valores experimentales) 4.5 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Leche descremada | Resiembra periódica en medios frescos |
|---|----------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|--|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 4 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 4 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 4 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 4 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 4 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Ponderación:

- 0 = ningún crecimiento
- 1 = poco crecimiento
- 2 = regular crecimiento
- 3 = mucho crecimiento
- 4 = abundante crecimiento.

Tabla No. 4
Crecimiento en el medio (valores experimentales) 6 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Acete mineral | Leche descremada | Re siembra periódica en medios frascos |
|---|----------------------------|----------------------|-------------------------|------------------|---------------------|---|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 4 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 4 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 4 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Ponderación:

- 0 = ningún crecimiento
- 1 = poco crecimiento
- 2 = regular crecimiento
- 3 = mucho crecimiento
- 4 = abundante crecimiento.

8.1.2. Tipo de hemólisis

Tabla No. 5
 Tipo de hemólisis (valores experimentales) 1.5 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Leche descremada | Resembra periódica en medios frescos |
|---|----------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|--|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Total | 0 | 0 | 3 | 9 | 9 | 6 |

Ponderación:

0 = hemólisis representativa

1 = hemólisis no representativa

Tabla No. 6
 Tipo de hemólisis (valores experimentales) 3 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Liclitización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Acetate mineral | Leche deleciemada | Relembra peidón en medios frescos |
|---|----------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|---|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Total | 0 | 0 | 9 | 9 | 12 | 12 |

Ponderación:

0 = hemólisis representativa

1 = hemólisis no representativa

Tabla No. 7
Tipo de hemólisis (valores experimentales) 4.5 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Lecio descremada | Replanteo pefídico en medios frescos |
|---|----------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|--|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Total | 0 | 0 | 9 | 15 | 12 | 15 |

Ponderación:

0 = hemólisis representativa

1 = hemólisis no representativa

Tabla No. 8
 Tipo de hemólisis (valores experimentales) 6 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Licfilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Camero | Acete mineral | Leche descremada | Relembra periódica en medios frescos |
|---|----------------------------|----------------------|---------------------|------------------|---------------------|--|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Total | 0 | 0 | 9 | 15 | 12 | 15 |

Ponderación:

0 = hemólisis representativa

1 = hemólisis no representativa

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
 Biblioteca Central

8.1.3. Reacción a la coloración de Gram

Tabla No. 9
Reacción a la coloración de Gram (valores experimentales) 1.5 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Acéite mineral | Leche descremada | Resiembr patófica en medios frescos |
|---|----------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|---|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Total | 0 | 0 | 3 | 9 | 9 | 6 |

Ponderación:

0 = reacción representativa

1 = reacción no representativa

Tabla No. 10
Reacción a la coloración de Gram (valores experimentales) 3 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Licofización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Lecle descremada | Reemplazo peñón en medios frescos |
|---|---------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|---|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Total | 0 | 0 | 9 | 9 | 12 | 12 |

Ponderación:

0 = reacción representativa

1 = reacción no representativa

Tabla No. 12
Reacción a la coloración de Gram (valores experimentales) 6 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Licfilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Leche descremada | Resembra periódica en medio fresco |
|---|----------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|--|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Total | 0 | 0 | 9 | 15 | 12 | 15 |

Ponderación:

0 = reacción representativa

1 = reacción no representativa

8.1.4. Morfología celular:

Tabla No. 13
Morfología celular (valores experimentales) 1.5 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Acetate mineral | Lече desecrada | Reestima peódica en medios frescos |
|---|----------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|-------------------|--|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Total | 0 | 0 | 3 | 9 | 9 | 6 |

Ponderación:

0 = morfología representativa
1 = morfología no representativa

Tabla No. 14
Morfología celular (valores experimentales) 3 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Fertilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Leche descremada | Reemplazo periódico en medios frescos |
|---|----------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|---|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Total | 0 | 0 | 9 | 9 | 12 | 12 |

Ponderación:

0 = morfología representativa

1 = morfología no representativa

Tabla No. 15
Morfología celular (valores experimentales) 4.5 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Acseite mineral | Leche descremada | Reviembre periódica en medios frescos |
|---|----------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|---------------------|---|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Total | 0 | 0 | 9 | 15 | 12 | 15 |

Ponderación:

0 = morfología representativa

1 = morfología no representativa

Tabla No. 16
Morfología celular (valores experimentales) 6 meses

| BLOQUE (Bacteria-No. repetición) | Licfilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Leche descremada | Resembra peridica en medios frescos |
|---|----------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|---|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> -repetición 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Total | 0 | 0 | 9 | 15 | 12 | 15 |

Ponderación:

0 = morfología representativa

1 = morfología no representativa

Tabla No. 17
Resumen de estadística de prueba para crecimiento en el medio¹

Ho: Todos los tratamientos son iguales

H1: Al menos uno de los métodos de preservación difiere significativamente de los demás

| |
|--|
| Tiempo de lectura: 1.5 meses |
| Para la estadística de prueba de Friedman, $p < \alpha$, por lo que Ho se rechaza |

| Comparaciones de cada tratamiento contra el control | | | | |
|--|---------------|---|--------------------|------------------|
| Diferencias de rangos comparadas con la diferencia crítica | | | | |
| Comparación | $ R_L - R_j $ | | Diferencia crítica | Decisión |
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 0.00 | < | 25.72 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 36.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Aceite mineral | 48.50 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 50.50 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resiembra periódica en medios frescos | 45.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |

| |
|--|
| Tiempo de lectura: 3 meses |
| Para la estadística de prueba de Friedman, $p < \alpha$, por lo que Ho se rechaza |

| Comparaciones de cada tratamiento contra el control | | | | |
|--|---------------|---|--------------------|------------------|
| Diferencias de rangos comparadas con la diferencia crítica | | | | |
| Comparación | $ R_L - R_j $ | | Diferencia crítica | Decisión |
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 20.00 | < | 25.72 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 43.50 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Aceite mineral | 50.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 52.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resiembra periódica en medios frescos | 59.50 | > | 25.72 | Ho se rechaza |

¹ Para mayor rigor estadístico ver Anexo No. 1, pág. 69

Tabla No. 18
Resumen de estadística de prueba para crecimiento en el medio

Ho: Todos los tratamientos son iguales

H1: Al menos uno de los métodos de preservación difiere significativamente de los demás

| |
|--|
| Tiempo de lectura: 4.5 meses |
| Para la estadística de prueba de Friedman, $p < \alpha$, por lo que Ho se rechaza |

| Comparaciones de cada tratamiento contra el control | | | | |
|--|---------------|---|--------------------|------------------|
| Diferencias de rangos comparadas con la diferencia crítica | | | | |
| Comparación | $ R_L - R_j $ | | Diferencia crítica | Decisión |
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 16.50 | < | 25.72 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 44.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Aceite mineral | 57.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 50.50 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resiembra periódica en medios frescos | 57.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |

| |
|--|
| Tiempo de lectura: 6 meses |
| Para la estadística de prueba de Friedman, $p < \alpha$, por lo que Ho se rechaza |

| Comparaciones de cada tratamiento contra el control | | | | |
|--|---------------|---|--------------------|------------------|
| Diferencias de rangos comparadas con la diferencia crítica | | | | |
| Comparación | $ R_L - R_j $ | | Diferencia crítica | Decisión |
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 16.50 | < | 25.72 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 44.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Aceite mineral | 57.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 50.50 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resiembra periódica en medios frescos | 57.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |

Tabla No. 19
Resumen de estadística de prueba para Tipo de hemólisis,
reacción a la coloración de Gram y morfología celular

Ho: Todos los tratamientos son iguales

H1: Al menos uno de los métodos de preservación difiere significativamente de los demás

Tiempo de lectura: 1.5 meses

Para la estadística de prueba de Cochran, $p < \alpha$, por lo que Ho se rechaza

Comparaciones de cada tratamiento contra el control

Prueba del signo, estimación de $P(k \leq x | n, p)$

| COMPARACION | u | n | k | p | q | $P(k \leq x n, p)$ | | α | DECISION |
|--|----|---|---|-----|-----|----------------------|---|----------|------------------|
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 15 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 1.000 | > | 0.05 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 12 | 3 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.125 | > | 0.05 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Acete Mineral | 6 | 9 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.002 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 6 | 9 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.002 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resembra periódica en medios frescos | 9 | 6 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.015 | < | 0.05 | Ho se rechaza |

Tiempo de lectura: 3.0 meses

Para la estadística de prueba de Cochran, $p < \alpha$, por lo que Ho se rechaza

Comparaciones de cada tratamiento contra el control

Prueba del signo, estimación de $P(k \leq x | n, p)$

| COMPARACION | u | n | k | p | q | $P(k \leq x n, p)$ | | α | DECISION |
|--|----|----|---|-----|-----|----------------------|---|----------|------------------|
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 15 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 1.0000 | > | 0.05 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 6 | 9 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.0020 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Acete Mineral | 6 | 9 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.0020 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 3 | 12 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.0002 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resembra periódica en medios frescos | 3 | 12 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.0002 | < | 0.05 | Ho se rechaza |

Tabla No. 20
Resumen de estadística de prueba para Tipo de hemólisis,
reacción a la coloración de Gram y morfología celular

Ho: Todos los tratamientos son iguales

H1: Al menos uno de los métodos de preservación difiere significativamente de los demás

| |
|---|
| Tiempo de lectura: 4.5 meses |
| Para la estadística de prueba de Cochran, $p < \alpha$, por lo que Ho se rechaza |

| Comparaciones de cada tratamiento contra el control | | | | | | | | | |
|--|----|----|---|-----|-----|----------------------|---|----------|------------------|
| Prueba del signo, estimación de $P(k \leq x n, p)$ | | | | | | | | | |
| COMPARACION | u | n | k | p | q | $P(k \leq x n, p)$ | | α | DECISION |
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 15 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 1.00000 | > | 0.05 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 6 | 9 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00200 | > | 0.05 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Acete Mineral | 0 | 15 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00003 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 3 | 12 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00020 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Reslembra periódica en medios frescos | 0 | 15 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00003 | < | 0.05 | Ho se rechaza |

| |
|---|
| Tiempo de lectura: 6.0 meses |
| Para la estadística de prueba de Cochran, $p < \alpha$, por lo que Ho se rechaza |

| Comparaciones de cada tratamiento contra el control | | | | | | | | | |
|--|----|----|---|-----|-----|----------------------|---|----------|------------------|
| Prueba del signo, estimación de $P(k \leq x n, p)$ | | | | | | | | | |
| COMPARACION | u | n | k | p | q | $P(k \leq x n, p)$ | | α | DECISION |
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 15 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 1.00000 | > | 0.05 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 6 | 9 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00200 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Acete Mineral | 0 | 15 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00003 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 3 | 12 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00020 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Reslembra periódica en medios frescos | 0 | 15 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00003 | < | 0.05 | Ho se rechaza |

8.2. Diagramas PERT para la estimación de costos y tiempo para cada método de preservación:

8.2.1. Nitrógeno líquido:

8.2.1.1. Meta: producción de 12 viales inoculados con una cepa bacteriana X.

8.2.1.2. Inventario de Operaciones:

Tabla No. 21

| OPERACION | Etapa inicial | Etapa final |
|--|---|---|
| A. Consecución de cepas | Definición de cepas de interés (etapa No. 1) | Obtención de las cepas de interés (etapa No. 2) |
| B. Preparación de medios | Obtención de medios (etapa No. 3). | Inoculación de las cepas en los medios de cultivo para confirmación de identidad (etapa No. 4) |
| C. Resiembra y confirmación de la identidad de las bacterias. | Inoculación de las cepas en los medios de cultivo para confirmación de identidad (etapas Nos. 2 y 4) | Inoculación de las cepas bacterianas en glicerol-sangre de carnero para preservación (etapa No. 5). |
| D. Congelamiento en N ₂ -líquido. | Inoculación de las cepas bacterianas en glicerol-sangre de carnero para preservación (etapa No. 5). | Congelamiento por inmersión en N ₂ -líquido (etapa No. 6). |
| E. Almacenamiento | Congelamiento por inmersión en N ₂ -líquido (etapa No. 6). | Almacenamiento de las cepas bacterianas en congelador a -15 °C (etapa No. 7). |
| F. Muestreo para el monitoreo de la calidad del proceso. | Congelamiento por inmersión en N ₂ -líquido (etapa No. 6). | Descongelamiento de uno de los viales (etapa No. 8) |
| G. Comprobación de viabilidad de las bacterias en los viales congelados. | Descongelamiento de uno de los viales (etapa No. 8) | Verificación de la viabilidad de las cepas congeladas (etapa No. 9). |
| H. Preservación. | Almacenamiento de las cepas bacterianas en congelador a -15 °C (etapa No. 7). | Descongelamiento de cada vial con la cepa bacteriana en el momento en que se necesiten (etapa No. 10). |
| I. Descongelamiento y verificación de identidad. | Descongelamiento de cada vial con la cepa bacteriana en el momento en que se necesiten (etapa No. 10). | Crecimiento en el medio y confirmación de características propias de la cepa bacteriana (etapa No. 11). |
| J. Control de Calidad | Crecimiento en el medio y confirmación de características propias de la cepa bacteriana (etapa No. 11). | Comparación con muestras desconocidas de procedencia externa al laboratorio. Preparación de material infectocontagioso para su descarte (etapa No. 12). |
| K. Destrucción de material infectocontagioso. | Preparación de material infectocontagioso para su descarte (etapa No. 12). | Esterilización y descarte del material no reutilizable (etapa No. 13). |
| L. Reinicio del proceso de preservación. | Crecimiento en el medio y confirmación de características propias de la cepa bacteriana (etapa No. 11). | Inoculación de las cepas bacterianas en glicerol-sangre de carnero para preservación (etapa No. 5). |

8.2.1.3 Tiempo estimado de duración de cada operación (Te)

Tabla No. 22

| OPERACION | Tiempo de duración ¹ | Tiempo efectivo de trabajo hora-hombre |
|--|---|--|
| A. Consecución de cepas | a = 4 horas m = 8 horas b = 24 horas Te = 10 horas | 2 horas |
| B. Preparación de medios | a = 4 horas m = 8 horas b = 8 horas Te = 8 horas | 4 horas |
| C. Resiembra y confirmación de la identidad de las bacterias. | a = 28 horas m = 28 horas b = 36 horas Te = 29 horas | 1.5 horas |
| D. Congelamiento en N ₂ -líquido. | a = 1 hora m = 1.25 horas b = 1.5 horas Te = 1.25 horas | 1.25 horas |
| E. Almacenamiento | Conjuntamente con la operación D | |
| F. Muestreo para el monitoreo de la calidad del proceso. | a = 0.25 horas m = 0.50 horas b = 1 hora Te = 0.50 horas | 0.08 horas (5 minutos) |
| G. Comprobación de viabilidad de las bacterias en los viales congelados. | a = 28 horas m = 28 horas b = 36 horas Te = 29 horas | 1.5 horas |
| H. Preservación. | a = 168 horas (1 semana) m = 2160 horas (3 meses) b = 4320 horas (6 meses) Te = 2160 horas (3 meses) | 0 horas |
| I. Descongelamiento y verificación de identidad. | a = 28 horas m = 28 horas b = 36 horas Te = 28 horas | 1.5 horas |
| J. Control de Calidad | a = 0.25 horas m = 0.50 horas b = 1 hora Te = 0.50 horas | 0.50 horas |
| K. Destrucción de material infectocontagioso. | a = 3 horas m = 4 horas b = 8 horas Te = 4.50 horas | 0.25 horas |
| L. Reinicio del proceso de preservación. | a = 1 hora m = 1.25 horas b = 1.5 horas Te = 1.25 horas | 1.25 horas |

¹ a = tiempo mínimo; m= tiempo más factible; b= tiempo máximo; Te= tiempo estimado

8.2.1.4. Recursos materiales y energéticos consumidos en cada etapa:

Tabla No. 23

| OPERACION | Recursos materiales | Recursos energéticos |
|--|--|--|
| A. Consecución de cepas | - medios de transporte | - Refrigeración (8 horas). |
| B. Preparación de medios | - 1 caja de petri. - 50 ml de sagre de carnero. - 1 g de agar base. | - gas propano (0.5 horas). - Esterilización en autoclave (0.5 horas). |
| C. Resiembra y confirmación de la identidad de las bacterias. | - medios de cultivo - colorante de Gram - 13 viales con tapa de rosca. | - gas propano (0.5 horas) - incubación (24 horas) |
| D. Congelamiento en N ₂ -líquido. | - nitrógeno líquido | |
| E. Almacenamiento | | |
| F. Muestreo para el monitoreo de la calidad del proceso. | | |
| G. Comprobación de viabilidad de las bacterias en los viales congelados. | - medios de cultivo - colorante de Gram | - gas propano (0.5 horas) - incubación (24 horas) |
| H. Preservación. | | - congelación en Freezer de refrigeradora (4320 horas = 6 meses). |
| I. Descongelamiento y verificación de identidad. | - medios de cultivo - colorante de Gram | - gas propano (0.5 horas) - incubación (24 horas) |
| J. Control de Calidad | - medios de cultivo - colorante de Gram - pruebas especiales (taxo A, taxo P, taxo SXT y otras). | - incubación (24 horas). |
| K. Destrucción de material infectocontagioso. | - Hipocloritos de Ca y Na. | - esterilización (0.5 horas). |
| L. Reinicio del proceso de preservación. | - medios de cultivo - colorante de Gram | - gas propano (0.5 horas) - incubación (24 horas) |

8.2.1.5. Costos estimados para cada operación:

Tabla No. 24

| OPERACION | Recursos materiales (Q) | Insumos energéticos (Q) | Costo hora/hombre (Q) | TOTAL (Q) |
|--|-------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------|
| A. Consecución de cepas | 20.00 | 0.16 | 12.00 | 32.16 |
| B. Preparación de medios | 43.85 | 0.26 | 24.00 | 68.11 |
| C. Resiembra y confirmación de la identidad de las bacterias. | 9.85 | 0.74 | 9.00 | 19.59 |
| D. Congelamiento en N ₂ -líquido. | 9.79 | | 7.50 | 17.29 |
| E. Almacenamiento | | | | 0.00 |
| F. Muestreo para el monitoreo de la calidad del proceso. | | | 0.48 | 0.48 |
| G. Comprobación de viabilidad de las bacterias en los viales congelados. | 4.25 | 0.74 | 9.00 | 13.99 |
| H. Preservación. | | 86.00 | | 86.00 |
| I. Descongelamiento y verificación de identidad. | 63.75 | 8.88 | 108.00 | 180.63 |
| J. Control de Calidad | 98.00 | 5.76 | 36.00 | 137.76 |
| K. Destrucción de material infectocontagioso. | 40.00 | 1.32 | 18.00 | 59.32 |
| L. Reinicio del proceso de preservación. | 4.25 | 0.74 | 7.50 | 12.49 |
| | | | Total: | 627.82 |

FIGURA No. 1

Diagrama PERT del método de preservación en Nitrógeno líquido

Te= Tiempo estimado para la ejecución de cada operación

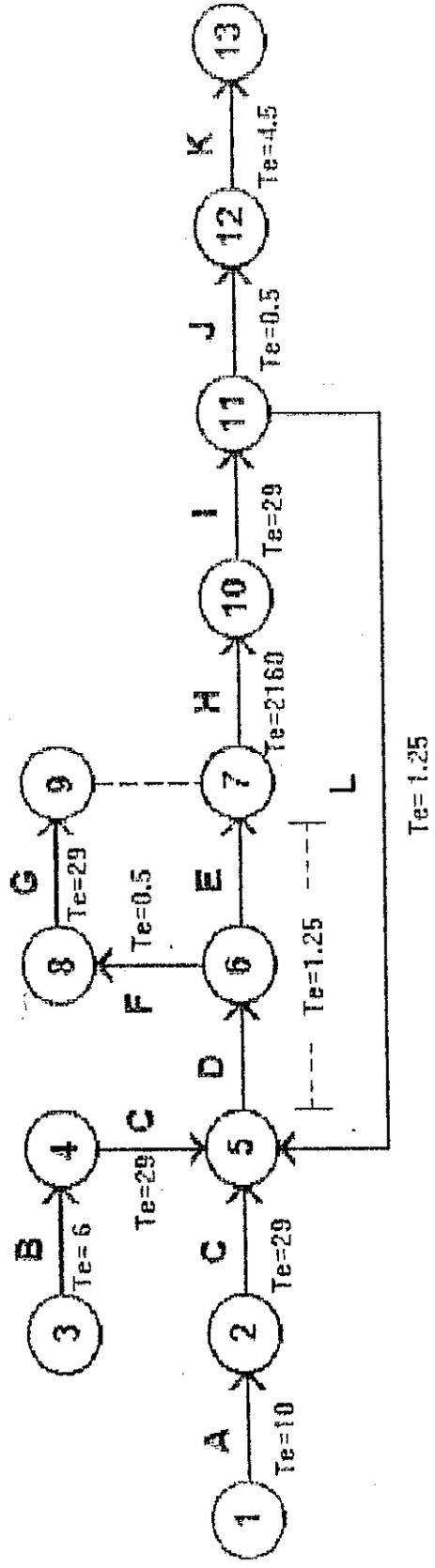
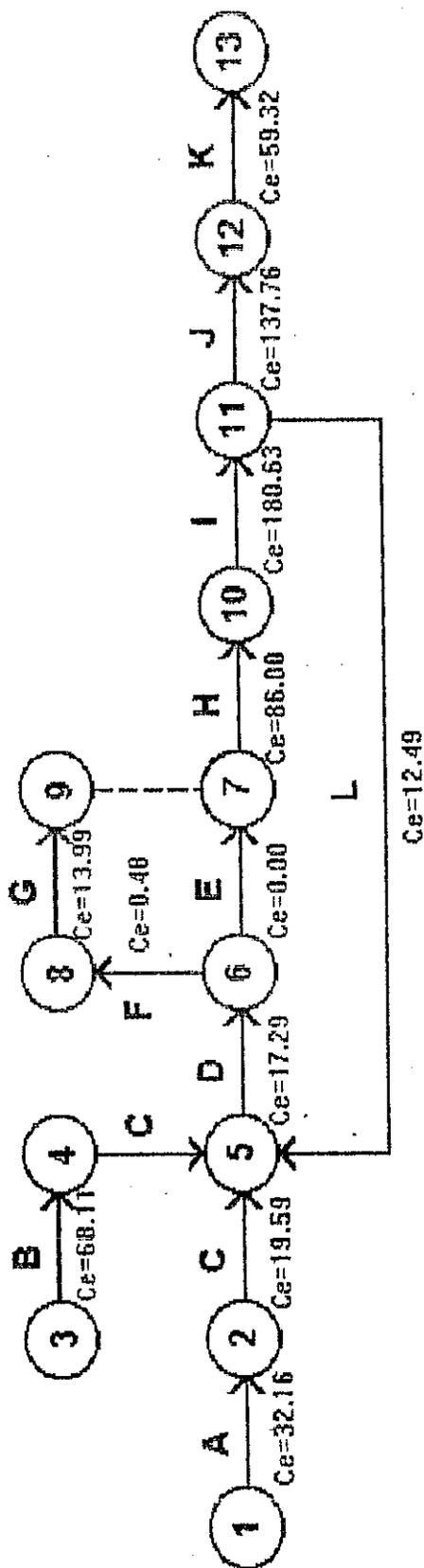


FIGURA No. 2

Diagrama PERT del método de preservación en Nitrógeno líquido

Ce= Costo estimado para la ejecución de cada operación



8.2.2. Liofilización:

8.2.2.1. Meta: producción de 12 viales inoculados con una cepa bacteriana X.

8.2.2.2. Inventario de Operaciones:

Tabla No. 25

| OPERACION | Etapa inicial | Etapa final |
|---|--|---|
| A. Consecución de cepas | Definición de cepas de interés (etapa No. 1) | Obtención de las cepas de interés (etapa No. 2) |
| B. Preparación de medios | Obtención de medios (etapa No. 3). | Inoculación de las cepas en los medios de cultivo para confirmación de identidad (etapa No. 4) |
| C. Resiembra y confirmación de la identidad de las bacterias. | Inoculación de las cepas en los medios de cultivo para confirmación de identidad (etapas Nos. 2 y 4) | Inoculación de las cepas bacterianas en sangre de carnero para preservación (etapa No. 5). |
| D. Congelamiento en etilenglicol-hielo seco | Inoculación de las cepas bacterianas en sangre de carnero para preservación (etapa No. 5). | Congelamiento por inmersión en etilenglicol-hielo seco y colocación de los viales en las boquillas del liofilizador (etapa No. 6). |
| E. Sublimación en alto vacío | Congelamiento por inmersión en etilenglicol-hielo seco y colocación de los viales en las boquillas del liofilizador (etapa No. 6). | Sellado de los viales con el material liofilizado (etapa 7). |
| F. Almacenamiento | Sellado de los viales con el material liofilizado (etapa 7). | Almacenamiento en lugar adecuado a temperatura ambiente (etapa 8). |
| G. Preservación | Almacenamiento en lugar adecuado a temperatura ambiente (etapa 8). | Rehidratación del material liofilizado (etapa 9) |
| H. Reconstitución y verificación de identidad. | Rehidratación del material liofilizado (etapa 9) | Crecimiento en el medio y confirmación de características propias de la cepa bacteriana (etapa No. 10). |
| I. Control de Calidad | Crecimiento en el medio y confirmación de características propias de la cepa bacteriana (etapa No. 10). | Comparación con muestras desconocidas de procedencia externa al laboratorio. Preparación de material infectocontagioso para su descarte (etapa No. 11). |
| J. Destrucción de material infectocontagioso. | Preparación de material infectocontagioso para su descarte (etapa No. 11). | Esterilización y descarte del material no reutilizable (etapa No. 12). |
| K. Reinicio del proceso de preservación. | Crecimiento en el medio y confirmación de características propias de la cepa bacteriana (etapa No. 10). | Inoculación de las cepas bacterianas en sangre de carnero para preservación (etapa No. 5). |

1.2.3. Tiempo estimado de duración de cada operación (Te)

Tabla No. 26

| OPERACION | Tiempo de duración ¹ | Tiempo efectivo de trabajo hora-hombre |
|---|---|--|
| A. Consecución de cepas | a = 4 horas m = 8 horas b = 24 horas Te = 10 horas | 2 horas |
| B. Preparación de medios | a = 4 horas m = 8 horas b = 8 horas Te = 8 horas | 4 horas |
| C. Resiembra y confirmación de la identidad de las bacterias. | a = 28 horas m = 28 horas b = 36 horas Te = 28 horas | 1.5 horas |
| D. Congelamiento en etilenglicol-hielo seco | a = 24 horas m = 24 horas b = 36 horas Te = 28 horas | 0.25 horas |
| E. Sublimación en alto vacío | a = 24 horas m = 26 horas b = 36 horas Te = 27 horas | 0.25 horas |
| F. Almacenamiento | a = 0.125 horas m = 0.250 horas b = 0.400 horas Te = 0.250 horas | 0.08 horas |
| G. Preservación | a = 168 horas (1 semana) m = 2160 horas (3 meses) b = 4320 horas (6 meses) Te = 2160 horas (3 meses) | 0 horas |
| H. Reconstitución y verificación de identidad. | a = 28 horas m = 28 horas b = 36 horas Te = 28 horas | 1.5 horas |
| I. Control de Calidad | a = 0.25 horas m = 0.50 horas b = 1 hora Te = 0.50 horas | 0.50 horas |
| J. Destrucción de material infectocontagioso. | a = 3 horas m = 4 horas b = 8 horas Te = 4.50 horas | 0.25 horas |
| K. Reinicio del proceso de preservación. | a = 1 hora m = 1.25 horas b = 1.5 horas Te = 1.25 horas | 1.25 horas |

¹ a = tiempo mínimo; m= tiempo más factible; b= tiempo máximo; Te= tiempo estimado

8.2.2.4. Recursos materiales y energéticos consumidos en cada etapa:

Tabla No. 27

| OPERACION | Recursos materiales | Recursos energéticos |
|---|--|--|
| A. Consecución de cepas | - medios de transporte | - Refrigeración (8 horas). |
| B. Preparación de medios | - 1 caja de petri. - 50 ml de sagre de carnero. - 1 g de agar base. | - gas propano (0.5 horas). - Esterilización en autoclave (0.5 horas). |
| C. Resiembra y confirmación de la Identidad de las bacterias. | - medios de cultivo - colorante de Gram - viales con tapón de hule. | - gas propano (0.5 horas) - incubación (24 horas) |
| D. Congelamiento en etilenglicol-hielo seco | - etilenglicol - hielo seco | - congelación (24 horas) |
| E. Sublimación en alto vacío | | - vacío (24 horas) - congelación (24 horas) |
| F. Almacenamiento | - casquetes de aluminio | |
| G. Preservación. | | |
| H. Reconstitución y verificación de Identidad. | - medios de cultivo - colorante de Gram - agua tridestilada | - gas propano (0.5 horas) - incubación (24 horas) |
| I. Control de Calidad | - medios de cultivo - colorante de Gram - pruebas especiales (taxo A, taxo P, taxo SXT y otras). | - incubación (24 horas). |
| J. Destrucción de material infectocontagioso. | - Hipocloritos de Ca y Na. | - esterilización (0.5 horas). |
| K. Reinicio del proceso de preservación. | - medios de cultivo - colorante de Gram | - gas propano (0.5 horas) - incubación (24 horas) |

8.2.2.5. Costos estimados para cada operación:

Tabla No. 28

| OPERACION | Recursos materiales (Q) | Insumos energéticos (Q) | Costo hora/hombre (Q) | TOTAL (Q) |
|---|-------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------|
| A. Consecución de cepas | 20.00 | 0.16 | 12.00 | 32.16 |
| B. Preparación de medios | 43.85 | 0.26 | 24.00 | 68.11 |
| C. Resiembra y confirmación de la identidad de las bacterias. | 9.85 | 0.74 | 9.00 | 19.59 |
| D. Congelamiento en etilenglicol-hielo seco | 500 | 1.00 | 1.50 | 502.50 |
| E. Sublimación en alto vacío | | 4.03 | 1.50 | 5.53 |
| F. Almacenamiento | 15.00 | | 0.48 | 15.58 |
| G. Preservación. | | | | 0.00 |
| H. Reconstitución y verificación de identidad. | 99.99 | 8.88 | 108.00 | 216.87 |
| I. Control de Calidad | 96.00 | 5.76 | 36.00 | 137.76 |
| J. Destrucción de material infectocontagioso. | 40.00 | 1.32 | 18.00 | 59.32 |
| K. Reinicio del proceso de preservación. | 4.25 | 0.74 | 7.50 | 12.49 |
| | | | Total: | 1069.91 |

FIGURA No. 3

Diagrama PERT del método de preservación mediante Liofilización

Te= Tiempo estimado para la ejecución de cada operación

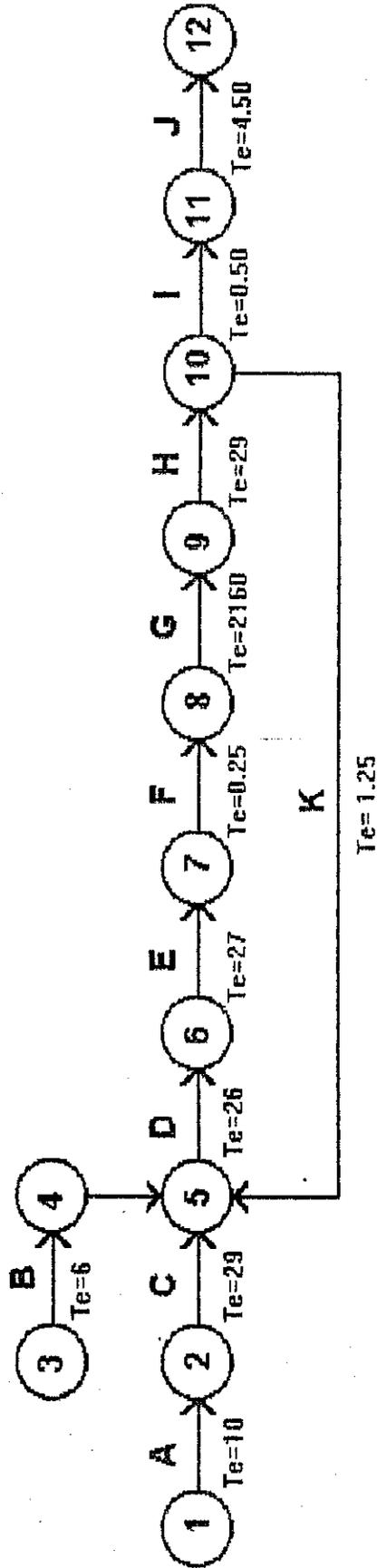
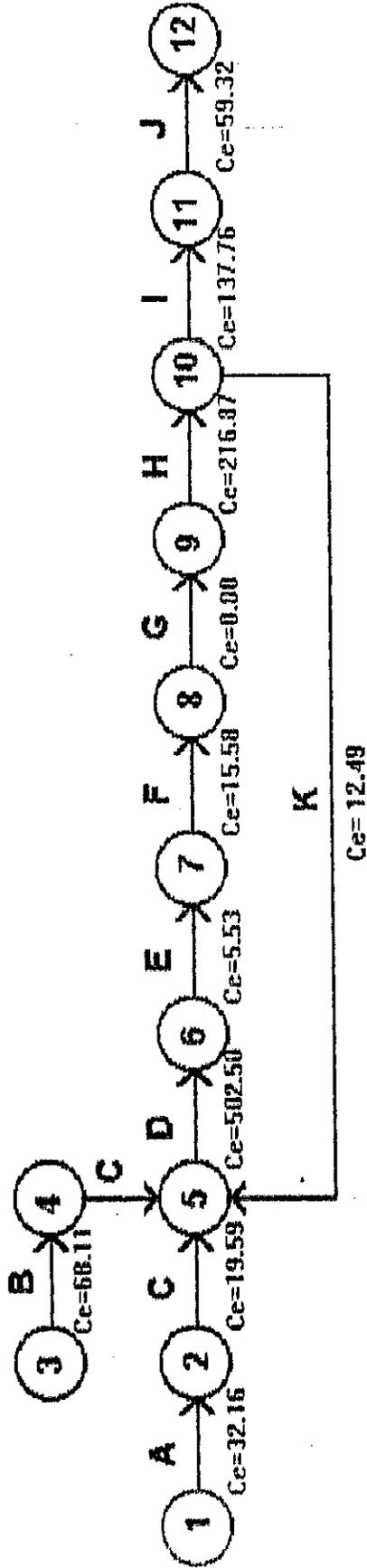


FIGURA No. 4

Diagrama PERT del método de preservación mediante Liofilización

Ce= Costo estimado para la ejecución de cada operación



8.2.3. Comparación de los métodos de preservación de Liofilización versus Nitrógeno líquido:

Tabla No. 29

Comparación de tiempos estimados (Te)
Liofilización versus Nitrógeno líquido

| Descripción | N ₂ -líquido | Liofilización |
|--|-------------------------|---------------|
| Sumatoria de tiempos estimados (Te) en horas | 2271.00 | 2293.50 |

Tabla No. 30

Comparación de costos
Liofilización versus Nitrógeno líquido

| Descripción | N ₂ -líquido | Liofilización |
|--|-------------------------|-----------------|
| 1. Inversión Inicial | | |
| 1.1. Liofilizadora (LABCONCO, Modelo 77510) | | 60000.00 |
| 1.2. Termo de 1 litro | 60.00 | |
| 1.3. Congelador (-18 a -15 °C) | 6000.00 | |
| 1.4. Pinzas | 35.00 | |
| 2. Costos de funcionamiento de los métodos implementados | 627.82 | 1069.91 |
| TOTAL | 6722.82 | 61069.91 |

9 DISCUSION

9.1 Evaluación de la calidad de los métodos de preservación:

9.1.1 Crecimiento en el medio:

Conforme a los resultados observados en las tablas Nos. 1-4 y 17-18 se infiere que no hay diferencia significativa entre el tratamiento control, es decir la liofilización, y el grupo sometido al método de preservación con nitrógeno líquido, a los 4 momentos de lectura (1.5, 3, 4.5 y 6 meses, siendo $p > \alpha$). En lo concerniente a los demás métodos, es decir, sangre de carnero, aceite mineral, leche descremada y resiembra periódica en medios frescos, se observa diferencia significativa entre dichos métodos y el control de referencia, a los 4 momentos de lectura ($p < \alpha$), por lo que se infiere que ninguno de éstos cumple con los atributos de calidad dados por el método de liofilización.

9.1.2 Tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular:

Conforme a los resultados observados en las tablas Nos. 5 y 19, se infiere que no hay diferencia significativa entre el tratamiento control (liofilización) y los métodos de preservación en nitrógeno líquido y sangre de carnero a 1.5 meses de sometidos a dichos tratamientos ($p > \alpha$). En lo referente a los restantes métodos, se observa que hay diferencia estadísticamente significativa ($p < \alpha$) entre los mismos y el tratamiento control, por lo que se infiere que los mismos no cumplen con los atributos de calidad dados por el método de liofilización. En lo concerniente a los momentos de lectura a los 3, 4.5 y 6 meses y conforme a las tablas Nos. 6-8, 19 y 20, se infiere que no hay diferencia significativa entre el control de referencia, es decir la liofilización, y el grupo sometido al método de preservación con nitrógeno líquido ($p > \alpha$). Y por último se observa que los demás métodos, es decir, sangre de carnero, aceite mineral, leche descremada y resiembra periódica en medios frescos, presentan diferencia estadísticamente significativa ($p > \alpha$) entre dichos métodos y el control de referencia, a los 3 momentos de lectura citados, por lo que se infiere que ninguno de éstos cumple con los atributos de calidad dados por el método de liofilización.

9.1.3 Integración de resultados de calidad:

Comparando los resultados observados para los cuatro atributos de calidad evaluados, es decir, crecimiento en el medio, tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular, se infiere que únicamente cumplen las expectativas de calidad los métodos de liofilización y nitrógeno líquido. Podrían considerarse como puntos críticos de la efectividad de la preservación, el congelamiento rápido de la suspensión de bacterias en glicerol-sangre de carnero, para el caso del nitrógeno líquido, y el congelamiento rápido y la eliminación de la humedad del medio para el caso de la liofilización.

Los fenómenos moleculares durante la congelación se conocen bastante bien en la actualidad. Cuando las bacterias se someten a las temperaturas de congelación, el citoplasma no se congela tan rápidamente como el medio que le rodea y el contenido celular queda superenfriado. En determinado momento, las células alcanzan un equilibrio con su entorno congelado; la manera en que esto se lleva a cabo depende, en parte, de si las células han sido enfriadas lenta o rápidamente, y en parte, de cuán permeables son al agua. Puesto que la presión agua-vapor en una célula superenfriada es mayor que en el hielo, si las células son enfriadas lentamente o son muy permeables al agua, empiezan a equilibrarse perdiendo agua y se deshidratan. Si el enfriamiento es rápido o la permeabilidad al agua es baja, el equilibrio tiene lugar por congelación intracelular y se forman cristales de hielo en el citoplasma. La transformación del agua celular en cristales de hielo produce un aumento en la concentración de los solutos en el agua remanente dentro de la célula produciendo una deshidratación efectiva. Muchas células son muy sensibles a la deshidratación y no sobreviven a la congelación por esta causa; sin embargo, el principal daño producido por la congelación intracelular posiblemente es la consecuencia del efecto físico de los cristales de hielo sobre las estructuras celulares, especialmente sobre la membrana plasmática. Si el tamaño de los cristales se mantiene pequeño por una congelación muy rápida, el daño puede minimizarse, aunque los cristales pueden crecer también durante el calentamiento, de manera que este proceso también debe efectuarse rápidamente. A temperaturas suficientemente bajas el citoplasma complejo se congela. El medio en el

que las células están suspendidas modifica considerablemente la sensibilidad a la congelación (34).

9.1.3.1. Congelación rápida en presencia de glicerol (método de preservación en nitrógeno líquido):

Los líquidos miscibles en agua, como el glicerol y el dimetilsulfóxido, cuando se agregan en cantidades adecuadas al medio en donde se suspenden las células son capaces de penetrar dentro de ellas y protegerlas reduciendo la gravedad de los efectos por deshidratación. El significado práctico de esto es que las bacterias sensibles pueden preservarse congeladas, seleccionando el medio adecuado para su suspensión (34). Como consecuencia de lo anterior, se deduce entonces el por qué de la efectividad del método de preservación en nitrógeno líquido (congelamiento rápido y presencia de glicerol en el medio) y la ineficacia de los métodos de preservación en sangre de carnero, aceite mineral, leche descremada y resiembra periódica en medios frescos (sin congelación, enfriamiento lento y ausencia de glicerol en el medio).

9.1.3.2. Congelación rápida y eliminación de humedad (Liofilización):

La efectividad de este método, se podría considerar análoga al anterior, con sólo que en vez de agregar un crioprotector que minimice el daño físico causado por los cristales de hielo intracelulares, mediante la sublimación de dichos cristales, se elimina el daño físico causado por los mismos.

9.2. Evaluación de costos y tiempos para los métodos de preservación que mostraron atributos de calidad adecuados.

Conforme a las tablas Nos. 21-30 y figuras Nos. 1-4, se observa que el método de preservación en nitrógeno líquido resulta ser menos costoso en lo que a implementación y funcionamiento se refiere, y con respecto a tiempo y laboriosidad son casi equivalentes por lo que se considera factible su implementación a nivel de laboratorios clínicos convencionales.

10. CONCLUSIONES:

10.1. En función de los atributos de calidad evaluados (crecimiento en el medio, tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular) el método de preservación en nitrógeno líquido es el único que no tiene diferencia significativa con el control de referencia (liofilización).

10.2. Los métodos de preservación en sangre de carnero, aceite mineral, leche descremada y resiembra periódica en medios frescos tienen, en función de los aspectos de calidad evaluados, diferencia estadísticamente significativa con el control de referencia (liofilización)

10.3 El método de preservación en nitrógeno líquido, es el mejor método de preservación alternativo a la liofilización en función de la calidad.

10.4. En función de la calidad, tiempo y costos el método de preservación en nitrógeno líquido es el de mayor factibilidad de implementación a nivel de laboratorios clínicos convencionales.

11. RECOMENDACIONES:

11.1. Realizar un estudio complementario al presente para determinar el tiempo de viabilidad máximo para la preservación de las bacterias estudiadas con los métodos de liofilización y nitrógeno líquido.

11.2 En base al presente estudio continuar determinando el comportamiento de las bacterias con pruebas específicas, para comprobar que no han perdido sus características bioquímicas.

12. REFERENCIAS

- 12.1 Pelczar MJ, Roger DR, Chan E. Microbiología. 4a. ed. México: McGraw-Hill, 1991. (p.118-123).
- 12.2 Sonmenwirth AC, Jarett L. Métodos y Diagnóstico del Laboratorio Clínico. 8a. ed. Landes D, trad. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1983. VIII+2240p. (p. 1344-1357).
- 12.3 Joklik WK, Willett HP, Amos DB. Zinsser Microbiología. 18a. ed. Meeroff NG, trad. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1986. X+1454p.
- 12.4 Facklan RR, Carey RB. *Streptococcus* and *Aerococcus*. p. 202-228.(In Balows A, *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 5th. ed. Washington: Am. Soc. Microbiol., 1991. XIX+1364p.).
- 12.5 Torres M, ed. ¿Por qué Sangre de Carnero en el Laboratorio Clínico? Guatemala: BIO-BACTE Sangre de Carnero, Doc. Tec. 1992.
- 12.6 Gini GA. Manual de Procedimientos para la Identificación de las Bacterias con Importancia Clínica. Guatemala: MERCK, 1993.VII+124P.
- 12.7 Morello JA, Janda WM, Doern GV. *Neisseria gonorrhoeae* and *Branhamella*. p. 258-276. (In balows A. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 5th. ed. Washington: Am. Soc. Microbiol. 1991. XIX+1364p.).
- 12.8 Baron EJ, Finegold SM. Diagnostic Microbiology. 8th. ed. E.E.U.U. of America: The C.V. Mosby Company. 1990. XV+861p.
- 12.9 Noble RC. Sexually Transmitted Diseases. 2nd. ed. Garden City, NewYork: Medical Examination Publishing CO., ONC., 1982. IX + 228 p.(p. 17-41).
- 12.10 Yeung KH, NG LA, Dillon JA. Evaluation of Etest for Testing Antimicrobial Suceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates With Different Growth Media. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:3053-3055.
- 12.11 Handsfield HH, *et al.* A Comparison of Single-Dose Cefixime With Ceftriaxone as Treatment for Uncomplicated Gonorrhoea. N. Engl. J.Med. 1991; 325:1337-1341.
- 12.12 Kilian M. *Haemophilus*. p. 487-494.(In Balows A. *et al* Manual of Clinical Microbiology. 5th. ed. Washington: Am. Soc.Microbiol., 1991. XIX+1364p).

- 12.13 Davis BD, *et al* Tratado de Microbiología; con Inclusión de Inmunología y Génética Molecular. 2a. ed. Barcelona: Salvat Editores S.A., 1978. XVI+1559p. (p. 818-823).
- 12.14 Barbé G, *et al* Evaluation of API NH, a New 2 Hour System for Identification of *Neisseria* and *Hemophilus* Species and *Moraxella catarrhalis* in a Routine Clinical Laboratory. Am. Soc. Microbiol. 1994; 32:187-189.
- 12.15 Difco. Manual de Bacteriología. Recopilación de Técnicas. 9a. ed. México: McGraw-Hill, 1911. (p.160-161).
- 12.16 Mortón HE, Pulaski EJ. The Preservation of Bacterial Cultures. J. Bacteriol. 1938; 38:163-183.
- 12.17 Chang LT, Elander RP. Long-Term Preservation of Industrially Important Microorganisms. p. 49-55. (In Demain AL, Salomon NA. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Washington: Am. Soc. Microbiol., 1986. XI+466p.).
- 12.18 Kim TH, Kubica GP. Long-Term Preservation and Storage of Mycobacteria. Am. Soc. Microbiol. 1972; 24:311-317.
- 12.19 Kim TH, Kubica GP. Preservation of Mycobacteria: 100% Viability of Suspensions Stored at -70°C. Am. Soc. Microbiol. 1973; 25:956-960.
- 12.20 Bartlett RC. Medical Microbiology; Quality Coast and Clinical Relevance. New York: John Wiley & Sons Inc., 1974. XVII+252p.
- 12.21 Utzinger D, Rivera P, Hernández F. Un Método Sencillo para Preservar Cepas de *Helicobacter* y *Campylobacter* Rev. Costarric. Cienc. Med. 1989; 10(3):77-79.
- 12.22 Bergey's. Manual of Determinative Bacteriology. 8th. ed. USA: Copyright/The Wilkins Company/Baltimore, 1974. XXVI+1268p.
- 12.23 Simatos D, Rey L. Freeze-drying of Biologic Materials. Am. Soc. Exp. Biology; 24:(2)III.
- 12.24 Society of American Bacteriologists. Manual of Microbiological Methods. New York: McGraw-Hill, 1957. (p.125-132)
- 12.25 Norman MC, Franck EB, Choate RV. Preservation of *Mycoplasma* Strains by Freezing in Liquid Nitrogen and by Lyophilization with Sucrose. Am. Soc. Microbiol. 1970; 20:69-71.

12.26 Lynch MJ. Métodos de Laboratorio. 2a. ed. México: Interamericana, 1992. (p.1010-1011).

12.27 Alexander M, *et al* American Type Culture Collection Methods, Fase I. Laboratory Manual on Preservation Freezing and Freeze-Drying; As Applied to Algae, Bacteria, Fungi and Protozoa. Rockville, Maryland, USA.: H. Hatt, 1980. 50p.

12.28 Clark WA, Horneland W, Klein AG. Attempts to Freeze Some Bacteriophages to Ultralow Temperatures. Rec. Publ. 1962; 463-465.

12.29 Daniel WW. Bioestadística, Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3a. ed. México: Limusa, 1987. 667p. (p. 539-545).

12.30 Montgomery DC. Diseño y Análisis de Experimentos. Delgado J. trad. México: Iberoamérica, 1991. XII+589p.

12.31 Siegel S. Estadística no Paramétrica; Aplicada a las Ciencias de la Conducta. 3a. ed. Javier Aguilar Villalobos, trad. Veracruz, México: Trillas, 1990. VI+344p.

12.32 Siegel S. Castellan NJ. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. 2nd. ed. Pennsylvania:McGraw-Hill, 1988. XIX+399p.

12.33 Jeannin C, Mangeot A, Verain A. Ingeniería Farmacéutica. México: El Manual Moderno, 1986. 662p.

12.34. Brock T, Smith D, Madigan M. Microbiología. 4a. ed. Pecina J. trad México: Prentice-Hall, 1984. 906p.

ANEXOS

Indice de Anexos

| | Pág. |
|--|------|
| Anexo No. 1: Tablas y análisis estadístico | 69 |
| Anexo No. 2. Tablas recolectoras de datos. | 78 |

A.1.1. Crecimiento en el medio

Estadística de prueba (Friedman) para la comparación de todos los tratamientos simultáneamente se define como:

$$\chi_r^2 = \left[\frac{12 \sum_{j=1}^k (R_j)^2}{N(k)(k+1)} \right] - 3(N)(k+1)$$

Estadística de prueba para comparaciones pareadas (cada tratamiento contra el control) se define como:

$$\text{Diferencia crítica} = q_{(\alpha, k-1)} \sqrt{\frac{N(k)(k+1)}{6}}$$

A.1.1.1. Evaluación a los 1.5 meses:

Tabla No. A1- 1

Crecimiento en el medio (sumatoria de rangos = R_j)

H₀: todos los métodos de preservación son iguales.

H₁: al menos uno de los métodos de preservación difiere significativamente de los demás.

| Sumatoria de rangos | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Llecha descremada | Resiembra periódica en medios frescos |
|---------------------|----------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|----------------------|--|
| R _j = | 82.5 | 82.5 | 46.5 | 33.0 | 32.0 | 37.5 |

$$\chi_r^2 = 53.78$$

Para un nivel $\alpha=0.05$ se tiene que "p" para 53.78 es menor que 0.001 (es decir $p<0.001$) por lo que la H₀ se rechaza ($p<\alpha$).

Tabla No. A1- 2

Comparación de los diferentes métodos contra el control (Liofilización)
Diferencias de rangos comparadas con la diferencia crítica

$$H_0: R_{(\text{Liofilización})} = R_{(\text{tratamiento i})}$$

$$H_1: R_{(\text{Liofilización})} \text{ no es igual a } R_{(\text{tratamiento i})}$$

$$\text{Diferencia crítica} = 25.72$$

| Comparación | $ R_L - R_i $ | | Diferencia crítica | Decisión |
|---|---------------|---|--------------------|------------------|
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 0.00 | < | 25.72 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 36.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Aceite mineral | 48.50 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 50.50 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resiembra periódica en medios frescos | 45.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |

A.1.1.2. Evaluación a los 3 meses:

Tabla No. A1- 3

Crecimiento en el medio (sumatoria de rangos = Rj)

H₀: todos los métodos de preservación son iguales.

H₁: al menos uno de los métodos de preservación difiere significativamente de los demás.

| Sumatoria de rangos | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Leche descremada | Resiembra periódica en medios frescos |
|---------------------|----------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|--|
| Rj= | 90.0 | 70.0 | 46.5 | 40.0 | 38.0 | 30.5 |

$$\chi_r^2 = 49.50$$

Para un nivel $\alpha=0.05$ se tiene que "p" para 49.50 es menor que 0.001 (es decir $p < 0.001$) por lo que la Ho se rechaza ($p < \alpha$).

Tabla No. A1- 4

Comparación de los diferentes métodos contra el control (Liofilización)
Diferencias de rangos comparadas con la diferencia crítica

$$H_0: R_{(\text{Liofilización})} = R_{(\text{tratamiento i})}$$

$$H_1: R_{(\text{Liofilización})} \text{ no es igual a } R_{(\text{tratamiento i})}$$

$$\text{Diferencia crítica} = 25.72$$

| Comparación | $ R_L - R_j $ | | Diferencia crítica | Decisión |
|---|---------------|---|--------------------|------------------|
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 20.00 | < | 25.72 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 43.50 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Aceite mineral | 50.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 52.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resiembra periódica en medios frescos | 59.50 | > | 25.72 | Ho se rechaza |

A.1.1.3. Evaluación a los 4.5 meses:

Tabla No. A1- 5

Crecimiento en el medio (sumatoria de rangos = Rj)

H₀: todos los métodos de preservación son iguales.

H₁: al menos uno de los métodos de preservación difiere significativamente de los demás.

| Sumatoria de rangos | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite de mineral | Leche descremada | Resiembra periódica en medios frescos |
|---------------------|----------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|--|
| Rj= | 90.0 | 73.5 | 46.0 | 33.0 | 39.5 | 33.0 |

$$\chi^2 = 53.70$$

Para un nivel $\alpha=0.05$ se tiene que "p" para 53.70 es menor que 0.001 (es decir $p<0.001$) por lo que la H₀ se rechaza ($p<\alpha$)

Tabla No. A1- 6

Comparación de los diferentes métodos contra el control (Liofilización)
Diferencias de rangos comparadas con la diferencia crítica

$$H_0: R_{(\text{Liofilización})} = R_{(\text{tratamiento i})}$$

$$H_1: R_{(\text{Liofilización})} \text{ no es igual a } R_{(\text{tratamiento i})}$$

$$\text{Diferencia crítica} = 25.72$$

| Comparación | $ R_L - R_j $ | | Diferencia crítica | Decisión |
|---|---------------|---|--------------------|------------------|
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 16.50 | < | 25.72 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 44.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Aceite mineral | 57.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 50.50 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resiembra periódica en medios frescos | 57.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |

A.1.1.4. Evaluación a los 6 meses:

Tabla No. A1- 7

Crecimiento en el medio (sumatoria de rangos = R_j)

H_0 : todos los métodos de preservación son iguales.

H_1 : al menos uno de los métodos de preservación difiere significativamente de los demás.

| Sumatoria de rangos | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Leche descremada | Resiembra periódica en medios frescos |
|---------------------|----------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|--|
| $R_j =$ | 90.0 | 73.5 | 46.0 | 33.0 | 39.5 | 33.0 |

$$\chi_r^2 = 53.70$$

Para un nivel $\alpha=0.05$ se tiene que "p" para 53.70 es menor que 0.001 (es decir $p < 0.001$) por lo que la H_0 se rechaza ($p < \alpha$)

Tabla No. A1- 8

Comparación de los diferentes métodos contra el control (Liofilización)
Diferencias de rangos comparadas con la diferencia crítica

$$H_0: R_{(\text{Liofilización})} = R_{(\text{tratamiento } i)}$$

$$H_1: R_{(\text{Liofilización})} \text{ no es igual a } R_{(\text{tratamiento } i)}$$

Diferencia crítica = 25.72

| Comparación | $ R_L - R_j $ | | Diferencia crítica | Decisión |
|---|---------------|---|--------------------|------------------|
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 16.50 | < | 25.72 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 44.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Aceite mineral | 57.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 50.50 | > | 25.72 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resiembra periódica en medios frescos | 57.00 | > | 25.72 | Ho se rechaza |

A.1.2. Tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram, morfología celular:

Estadística de prueba (Q de Cochran) para la comparación de todos los tratamientos simultáneamente se define como:

$$Q = \frac{k(k-1) \sum_{j=1}^k (G_j - \bar{G})^2}{k \sum_{i=1}^N L_i - \sum_{i=1}^N L_i^2}$$

Estadística de prueba (prueba del signo) para comparaciones pareadas (cada tratamiento contra el control) se define como:

$$P(k \leq x | n, p) = \sum_{k=0}^x \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

A.1.2.1. Evaluación a los 1.5 meses:

Tabla No. A1- 9

Tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular

Ho: todos los métodos de preservación son iguales.

H1: al menos uno de los métodos de preservación difiere significativamente de los demas.

| Sumatoria de "éxitos" = Gj | Liofilización (Control) | Nitrógen o líquido | Sangre de Carnero | Acéite mineral | Leche descremada | Resiembr periódica en medios frescos | Li | Li2 |
|----------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|---|----|-----|
| Gj | 0 | 0 | 3 | 9 | 9 | 6 | 27 | 87 |

$$Q = 34.20$$

Para un nivel $\alpha=0.05$ y $gl = 5$ se tiene que "p" para 34.20 es menor que 0.001 (es decir $p<0.001$) por lo que la Ho se rechaza ($p<\alpha$)

Tabla No. A1-10

Tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular

(Diferencias entre el tratamiento de referencia y cada uno de los tratamientos evaluados)

| Sumatoria de signos menos (-) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de -Carnero | Acéite mineral | Leche descremada | Resiembr periódica en medios frescos |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|--|
| Total de signos (-) | 0 | 0 | 3 | 9 | 9 | 6 |

PRUEBA DEL SIGNO

Para comparación de los tratamientos contra un control

Ho: la mediana de las diferencias es cero.

H1: la mediana de las diferencias es negativa.

| COMPARACION | u | n | k | p | q | $P(k \leq x n, p)$ | | α | DECISION |
|--|----|---|---|-----|-----|----------------------|---|----------|------------------|
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 15 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 1.000 | > | 0.05 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 12 | 3 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.125 | > | 0.05 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Acéite Mineral | 6 | 9 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.002 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 6 | 9 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.002 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resiembr periódica en medios frescos | 9 | 6 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.015 | < | 0.05 | Ho se rechaza |

A.1.2.2. Evaluación a los 3 meses:

Tabla No. A1- 11

Tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular

Ho: todos los métodos de preservación son iguales.

H1: al menos uno de los métodos de preservación difiere significativamente de los demás.

| Sumatoria de "éxitos" = Gj | Liofilización (Control) | Nitrógeno o líquido | Sangre de Carnero | Aceite de mineral | Leche descremada | Reseembra periódica en medios frescos | Li | Li2 |
|----------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|--|----|-----|
| Gj | 0 | 0 | 9 | 9 | 12 | 12 | 42 | 156 |

$$Q = 48.75$$

Para un nivel $\alpha=0.05$ y $gl = 5$ se tiene que "p" para 48.75 es menor que 0.001 (es decir $p<0.001$) por lo que la Ho se rechaza ($p<\alpha$)

Tabla No. A1-12

Tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular

(Diferencias entre el tratamiento de referencia y cada uno de los tratamientos evaluados)

| Sumatoria de signos menos (-) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite de mineral | Leche descremada | Reseembra periódica en medios frescos |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|---|
| Total de signos (-) | 0 | 0 | 9 | 9 | 12 | 12 |

PRUEBA DEL SIGNO

Para comparación de los tratamientos contra un control

Ho: la mediana de las diferencias es cero.

H1: la mediana de las diferencias es negativa.

| COMPARACION | u | n | k | p | q | $P(k \leq x n, p)$ | | α | DECISION |
|---|----|----|---|-----|-----|----------------------|---|----------|------------------|
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 15 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 1.0000 | > | 0.05 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 6 | 9 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.0020 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Aceite Mineral | 6 | 9 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.0020 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 3 | 12 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.0002 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Reseembra periódica en medios frescos | 3 | 12 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.0002 | < | 0.05 | Ho se rechaza |

A.1.2.3. Evaluación a los 4.5 meses:

Tabla No. A1- 13

Tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular

Ho: todos los métodos de preservación son iguales.

H1: al menos uno de los métodos de preservación difiere significativamente de los demas.

| Sumatoria de "éxitos" = G _j | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Leche descremada | Resiembra periódica en medios frescos | Li | Li2 |
|--|----------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|--|----|-----|
| G _j | 0 | 0 | 9 | 15 | 12 | 15 | 51 | 183 |

$$Q = 58.90$$

Para un nivel $\alpha=0.05$ y $g_l = 5$ se tiene que "p" para 58.90 es menor que 0.001 (es decir $p<0.001$) por lo que la Ho se rechaza ($p<\alpha$)

Tabla No. A1-14

Tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular

(Diferencias entre el tratamiento de referencia y cada uno de los tratamientos evaluados)

| Sumatoria de signos menos (-) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Leche descremada | Resiembra periódica en medios frescos |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|---|
| Total de signos (-) | 0 | 0 | 9 | 15 | 12 | 15 |

PRUEBA DEL SIGNO

Para comparación de los tratamientos contra un control

Ho: la mediana de las diferencias es cero.

H1: la mediana de las diferencias es negativa.

| COMPARACION | u | n | k | p | q | $P(k \leq x n, p)$ | | α | DECISION |
|---|----|----|---|-----|-----|----------------------|---|----------|------------------|
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 15 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 1.00000 | > | 0.05 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 6 | 9 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00200 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Aceite Mineral | 0 | 15 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00003 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 3 | 12 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00020 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resiembra periódica en medios frescos | 0 | 15 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00003 | < | 0.05 | Ho se rechaza |

A.1.2.4. Evaluación a los 6 meses:

Tabla No. A1- 15

Tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular

Ho: todos los métodos de preservación son iguales.

H1: al menos uno de los métodos de preservación difiere significativamente de los demás.

| Sumatoria de "éxitos" = G _j | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Leche descremada | Resembra periódica en medios frescos | Li | Li2 |
|--|----------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|---|----|-----|
| G _j | 0 | 0 | 9 | 15 | 12 | 15 | 61 | 183 |

$$Q = 58.90$$

Para un nivel $\alpha=0.05$ y $gl = 5$ se tiene que "p" para 58.90 es menor que 0.001 (es decir $p<0.001$) por lo que la Ho se rechaza ($p<\alpha$)

Tabla No. A1-16

Tipo de hemólisis, reacción a la coloración de Gram y morfología celular

(Diferencias entre el tratamiento de referencia y cada uno de los tratamientos evaluados)

| Sumatoria de signos menos (-) | Liofilización (Control) | Nitrógeno líquido | Sangre de Carnero | Aceite mineral | Leche descremada | Resembra periódica en medios frescos |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|--|
| Total de signos (-) | 0 | 0 | 9 | 15 | 12 | 15 |

PRUEBA DEL SIGNO

Para comparación de los tratamientos contra un control

Ho: la mediana de las diferencias es cero.

H1: la mediana de las diferencias es negativa.

| COMPARACION | u | n | k | p | q | $P(k \leq x n, p)$ | | α | DECISION |
|--|----|----|---|-----|-----|----------------------|---|----------|------------------|
| Liofilización-Nitrógeno líquido | 15 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 1.00000 | > | 0.05 | Ho no se rechaza |
| Liofilización-Sangre de Carnero | 6 | 9 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00200 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Aceite Mineral | 0 | 15 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00003 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Leche descremada | 3 | 12 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00020 | < | 0.05 | Ho se rechaza |
| Liofilización-Resembra periódica en medios frescos | 0 | 15 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.00003 | < | 0.05 | Ho se rechaza |

TABLA RECOLECTORA DE DATOS
Streptococcus pyogenes

| METODOS | PARAMETROS EVALUADOS | | |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------|
| | Crecimiento en el Medio | Reacción a la coloración Gram | Morfología Celular |
| Liofilización | | | Tipo de Hemólisis |
| Nitrógeno líquido | | | |
| Sangre de carnero | | | |
| Leche descremada | | | |
| Aceite mineral | | | |
| Resembra periódica en medios frescos | | | |

TABLA RECOLECTORA DE DATOS
Streptococcus agalactiae

| METODOS | PARAMETROS EVALUADOS | | | |
|--|-------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------|
| | Crecimiento en el Medio | Reacción a la coloración Gram | Morfología Celular | Tipo de Hemólisis |
| Liofilización | | | | |
| Nitrógeno líquido | | | | |
| Sangre de camero | | | | |
| Leche descremada | | | | |
| Acete mineral | | | | |
| Resiembras periódica en medios frescos | | | | |

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

TABLA RECOLECTORA DE DATOS
Streptococcus pneumoniae

| METODOS | PARAMETROS EVALUADOS | | | |
|---|-------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------|
| | Crecimiento en el Medio | Reacción a la coloración Gram | Morfología Celular | Tipo de Hemólisis |
| Liofilización | | | | |
| Nitrógeno líquido | | | | |
| Sangre de carnero | | | | |
| Leche descremada | | | | |
| Ácido mineral | | | | |
| Resistencia periódica en medios frescos | | | | |

TABLA RECOLECTORA DE DATOS
Neisseria gonorrhoeae

| METODOS | PARAMETROS EVALUADOS | | |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------|
| | Crecimiento en el Medio | Reacción a la coloración Gram | Morfología Celular |
| Liofilización | | | Tipo de Hemólisis |
| Nitrógeno líquido | | | |
| Sangre de carnero | | | |
| Leche descremada | | | |
| Aceite mineral | | | |
| Resembra periódica en medios frescos | | | |

TABLA RECOLECTORA DE DATOS
Haemophilus influenzae

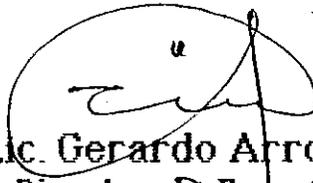
| METODOS | PARAMETROS EVALUADOS | | | Tipo de Hemólisis |
|--|-------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------|
| | Crecimiento en el Medio | Reacción a la coloración Gram | Morfología Celular | |
| Liotización | | | | |
| Nitrógeno líquido | | | | |
| Sangre de carnero | | | | |
| Leche descremada | | | | |
| Acetate mineral | | | | |
| Reservorio periódica en medios frescos | | | | |



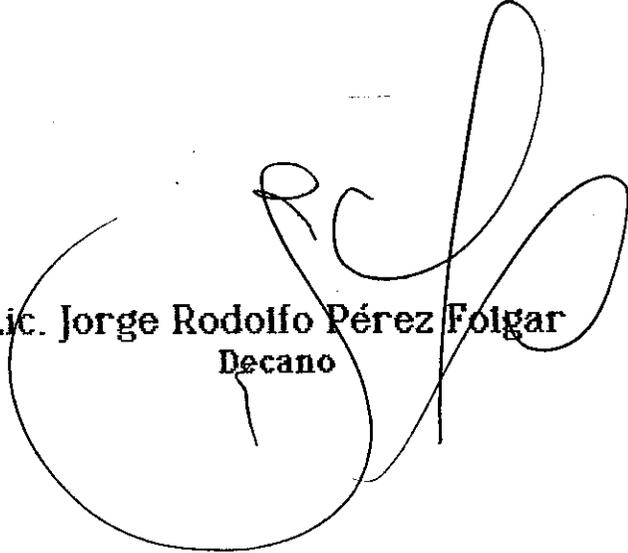
Erick Obed Martínez Herrera
Autor



Lic. Ingrid Verónica Tabarini
Asesora



Lic. Gerardo Arroyo
Director de Escuela



Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Decano