

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA PRODUCIR
LEUCOTOXINA A PARTIR DE *Mannheimia haemolytica*.**

AUTOR:

GUILLERMO DANIEL GUAYASAMÍN PÉREZ

DIRECTORA:

GERMANIA MARGARITA KAROLYS GUTIERREZ

Quito, julio del 2015

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaro que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Quito, julio de 2015

Guillermo Daniel Guayasamín Pérez

1717481434

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi Dios y a mi virgencita del Quinche que supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban; enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia, pues por ellos soy lo que soy.

Para mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor y ayuda en los momentos difíciles con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos, por estar siempre presentes acompañándome para poder realizar mis proyectos.

A mi esposa, por ser mi fuente de inspiración y fortaleza.

A mi hijo, quien ha sido y es mi motivación y felicidad.

A la empresa James Brown Pharma que confiaron en mí para sacar adelante la investigación planteada y al Área de Biológicos por ser el equipo de trabajo que me ayudo y aportó para que mi tesis salga adelante desde el principio.

AGRADECIMIENTO

Con un profundo y sentido gesto de agradecimiento a mi tutora por ser una profesional al poder subsanar todos los retos que esta investigación conllevó.

Muy agradecido con el resto de profesionales de mi universidad que fueron mis lectores y los cuales me ayudaron a mejorar cada vez mi tesis.

Reitero mi sentimiento de gratitud a la empresa farmacéutica James Brown Pharma del Ecuador por ser los benefactores para que esta tesis tenga el suficiente sustento práctico.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	2
1.2. Objetivos:	3
1.2.1. General	3
1.2.2. Específicos	3
CAPÍTULO 2	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1. Desarrollo de medios de cultivo	4
2.1.1. Clasificación de los medios de cultivo	4
2.1.1.1. <i>Según su origen</i>	4
2.1.1.2. <i>Según su composición</i>	5
2.1.2. Propiedades de los medios de cultivo	6
2.1.2.1. <i>Fertilidad</i>	6
2.1.2.2. <i>pH</i>	6
2.1.2.3. <i>Transparencia</i>	6
2.1.3. Constituyentes habituales de los medios de cultivo	7
2.1.3.1. <i>Agua</i>	7
2.1.3.2. <i>Extractos</i>	7
2.1.3.3. <i>Sistemas amortiguadores</i>	7
2.3. Curva de crecimiento	9

2.3.1. Fase latencia	10
2.3.2. Fase exponencial	10
2.3.3. Fase estacionaria:	11
2.3.4. Fase de muerte	11
2.4. Matemática del crecimiento exponencial	11
2.4.1. Área bajo la curva	12
2.5. <i>Mannheimia haemolytica</i>	13
2.5.1. Bioquímica de la <i>M. haemolytica</i> y requerimientos nutricionales.....	14
2.5.2. Leucotoxinas de <i>Mannheimia haemolytica</i>	15
2.5.2.1. <i>Importancia de la leucotoxina en la generación de las vacunas</i>	16
2.6. Enfermedades respiratorias en el ganado	16
2.7. Industrialización de fermentaciones	17
2.7.1. Escalamiento de la fermentación	17
2.7.1.1. <i>Proceso de escalado</i>	18
2.7.2. Fermentaciones industrializadas.....	18
2.7.2.1 <i>Fermentadores industriales</i>	18
2.7.2.2. <i>Birreactor aerobio</i>	19
2.8. Pruebas <i>in vivo</i> de la presencia de la leucotoxina	20
2.9. Ética de la experimentación animal	20
2.10. Técnica de eutanasia.....	21
CAPÍTULO 3	22

MARCO METODOLÓGICO	22
3.1. Formulación de los medios de cultivo	22
3.1.1. Medio de cultivo 1	23
3.1.2. Medio de cultivo 2	24
3.1.3. Medio de cultivo 3	24
3.1.4. Medio de cultivo 4	24
3.1.5. Medio de cultivo 5	24
3.1.6. Medio de cultivo 6	24
3.1.7. Medio de cultivo 7	24
3.1.8. Medio de cultivo 8	25
3.2. Selección de los medios de cultivo	26
3.3. Detección <i>in-vivo</i> de la presencia de leucotoxina	28
3.4. Comparación de estructura interna e identificación de órganos diana de <i>M. haemolytica</i>	30
CAPÍTULO 4	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 Control inicial de los medios de cultivo:	31
4.2 Reconstitución de <i>M. haemolytica</i>.	33
4.3 Producción a nivel de laboratorio, primera experimentación	33
4.4 Segunda experimentación a nivel de laboratorio	36
4.5 Tercera experimentación a nivel industrial	38

4.6 Supervivencia de ratones	41
4.7 Reconocimiento del daño en órganos internos de los ratones	41
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES	44
LISTA DE REFERENCIAS	45
ANEXOS	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características bioquímicas de la <i>M. haemolytica</i>	14
Tabla 2. Formulaciones de cada medio de cultivo empleado, MEM: Medio estándar mínimo, TPB: Triptosa fosfato Broth, BHI: Infusión cerebro-corazón.	25
Tabla 3. Variables físico-químicas	32
Tabla 4. Resultados obtenidos en la primera experimentación a nivel de laboratorio... 37	
Tabla 5. Resultados obtenidos en la primera experimentación a nivel de laboratorio... 40	
Tabla 6. Desviación estándar de los 2 medios de cultivo en escala industrial	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento identificando todas las fases de desarrollo de los microorganismos sembrados en un medio de cultivo.....	10
Figura 2. Cálculo del área bajo la curva por el método de los trapecios	13
Figura 3. Esquema general del proceso de fermentación	17
Figura 4. Esquema de un birreactor aerobio, donde se puede observar su estructura, composición y control del proceso	19
Figura 5. Desarrollo esquemático de la escalada del desarrollo de los medios de cultivo para <i>M. haemolytica</i>	28
Figura 6. Curva de crecimiento de <i>M. haemolytica</i> en los 8 medios de cultivo.....	34
Figura 7. Curva de crecimiento de <i>M. haemolytica</i> en los 5 medios de cultivo.....	37
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>M. haemolytica</i> de los 2 medios de cultivo.....	39
Figura 9. Supervivencia de ratones durante la cinética de crecimiento de <i>M. haemolytica</i>	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Control de pureza de <i>Mannheimia haemolytica</i> semillas de trabajo.....	52
Anexo 2. Reconstitución de viales de trabajo y prueba en medios de cultivo experimentales	54
Anexo 3. Actividades previas a la inyección intraperitoneal.....	56
Anexo 4. Resultados de la selección del medio de cultivo eficiente precursor de la generación de leucotoxina.	57
Anexo 5. Preparación de Frotis Fijos para Tinciones:.....	58
Anexo 6. Cartas de la empresa James Brown Pharma	59

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. $N_g = 1,44(\ln(V) + \ln(N) - \ln(N_o))$	11
Ecuación 2. $T_g = \Delta t \ln N - \ln(N_o) \ln(2)$, $T_g = \Delta t N_g$	12
Ecuación 3. $\ln N = \ln N_o + ut$	12

RESUMEN

El presente estudio comparó diferentes medios de cultivo para la producción de leucotoxina a partir de *M. haemolytica*, encontrándose que aquellos medios de cultivo enriquecidos con un complejo de vitamina B y Hierro tienen la mayor producción de leucotoxina, ya que sus áreas bajo la curva para el medio de cultivo 5 es de 6 billones de unidades de área, su tiempo de generación es de 0.35 horas para poder generar 28.40 generaciones en las 10 horas de la cinética bacteriana y para el caso del medio de cultivo 2 tiene en su formulación TPB, Hierro y Tiamina es por ello que el área bajo la curva es de 8 billones de unidades de área expresando un tiempo de generación de 0.37 horas para generar 27.19 generaciones en todo el transcurso de la cinética bacteriana.

Los inmunógenos a base de bacterias vivas de cultivos de 10 horas son los que han dado resultados más eficientes. Se argumenta que este tipo de agentes biológicos son eficaces, porque los cultivos jóvenes producen más material inmunogénico (material capsular, leucotoxina y otros antígenos no muy bien definidos) (Moore, 2005). Es por ello que los medios de cultivo 2 y 5 en el Ecuador son eficientes a escala industrial para generar la leucotoxina.

La presencia de leucotoxina fue evidenciada en los ratones de laboratorio *Mus musculus*, machos de un peso promedio de 28 g, a los cuales se les administró por vía intraperitoneal 1 ml del sobrenadante filtrado del medio de cultivo (1mL/28g) que les produjo la muerte a los ratones, además, se les practicó la necropsia para poder reconocer el daño a nivel de los órganos internos. Los órganos diana de la leucotoxina de *M. haemolytica* son los pulmones, generándoles un hinchamiento y cambio la coloración normal de cada órgano.

El presente estudio se realizó con el auspicio de la empresa JAMES BROWN PHARMA del Ecuador donde se probó un medio de cultivo de buen rendimiento y mejorando la eficacia para producir a nivel industrial leucotoxina a partir de *M. haemolytica*.

Palabras claves: *Mannheimia haemolytica*, *Mus musculus*, leucotoxina.

ABSTRACT

This study compared different culture media for production of leukotoxin from *M. haemolytica*, finding that those culture media enriched with vitamin B complex and iron have the greatest leukotoxin production, as their areas under the curve for the culture medium 5 is 6 trillion area units, generation time is 0.35 hours to produce 28.40 generations in 10 hours of bacterial kinetics and for the case of culture medium 2 has in its formulation TPB, Iron and Thiamine is why the area under the curve is 8 billion of area units expressing a generation time of 0.37 hours to generate 27.19 generations throughout the course of bacterial kinetics.

The immunogens based on live bacteria cultures 10 hours are those who have given more efficient results. It is argued that this type of biological agents are effective because young crops produce more material immunogenic (capsular material, leukotoxin and other poorly defined antigens) (Moore, 2005). That is why the culture media 2 and 5 in Ecuador are efficient industrial scale to produce leukotoxin.

The presence of leukotoxin was evidenced in laboratory rodents *Mus musculus* males with a mean weight of 28 g, to which they were administered via intraperitoneal 1 ml of filtered supernatant from the culture medium (1 mL / 28g) that produced the Death mice also were necropsied to recognize the damage level of internal organs. The target organs of *M. haemolytica* leukotoxin are the lungs, generating swelling and change the normal color of each organ.

This study was conducted under the auspices of the company PHARMA JAMES BROWN of Ecuador where a culture medium were proved good performance and improving efficiency to produce leukotoxin industrially from *M. haemolytica*.

Keywords: *Mannheimia haemolytica*, *Mus musculus*, leukotoxin.

INTRODUCCIÓN

En la neumonía bovina de origen multifactorial, los agentes infecciosos productores de la neumonía, el bovino y el entorno en que este se encuentra se hallan íntimamente relacionados. Es una enfermedad infecciosa y contagiosa, de estado agudo a crónico, que evoluciona por la invasión bacteriana secundaria. Las características anatómicas de los bovinos: pulmones chicos para su tamaño corporal, y las lesiones irreversibles del corazón, hacen que la neumonía comprometa el futuro productivo de los animales y de su vida.

La tecnología de la vacunación no ha cambiado desde hace varios años. Sin embargo, con la llegada de la biotecnología y la comprensión de factores de virulencia de agentes infecciosos, combinado con el conocimiento de la respuesta inmune, se ha creado una revolución en el número de nuevos agentes que pueden ser controlados potencialmente por inmunización. Los avances en biología molecular, bioquímica, inmunología y áreas afines han producido el desarrollo de muchas nuevas vacunas, así como la mejora de las que ya existen. La disponibilidad creciente de estos inmunógenos, está proporcionando la oportunidad para prevenir enfermedades infecciosas serias en grupos de edad diferentes y de reducir la mortandad.

El desarrollo de los métodos contra la neumonía bovina trae importantes beneficios no solo para los agricultores, al extender la población viva de ganado y, por ende, sus ingresos económicos sino, sobre todo, atiende a la necesidad de garantizar la soberanía alimentaria, elemento de gran interés en la política ecuatoriana actual.

Las vacunas contra la enfermedad se desarrollan de la generación de leucotoxina a través de *Mannheimia haemolytica*. Por lo que es un aporte importante el desarrollo de técnicas que mejoren la productividad tanto de la bacteria como de la leucotoxina.

La presente investigación desarrolla medios de cultivo eficaces para la producción de *M. haemolytica* con las condiciones nutricionales adecuadas para la generación de leucotoxina, bajo la supervisión del Área de Biológicos de JAMES BROWN PHARMA del Ecuador, empresa farmacéutica dedicada a la elaboración de productos veterinarios y humanos de alta calidad.

CAPITULO 1

1.1. Justificación

Con el presente trabajo, se busca generar un importante aporte en el ámbito teórico y práctico lo que justifica su realización, es por ello que la neumonía bovina tiene una importancia económica muy alta por varias razones: pérdidas por mortalidad alta en animales menores aun año de vida, el alto costo de los tratamientos de medicamentos, aumento en la mano de obra de las personas que manejan al ganado delicado y sano. Los animales enfermos que logran sanar queda disminuida su capacidad productora por lo que hay que prevenir la enfermedad (Casella., 2005).

Por lo antes señalado, es importante generar mejores vías para la producción de leucotoxina, con el fin de reducir usos de recursos para su producción. En este sentido el presente trabajo se justifica por el beneficio que presenta a las compañías que desarrollan estas leucotoxinas ya que se constituirá en un ahorro que se replicará posteriormente en los posibles clientes y beneficiarios de estos elementos.

La concentración óptima de los nutrientes de un medio de cultivo depende de la composición celular de los microorganismos, es decir de la demanda de cada uno de los elementos necesarios para sintetizar sus estructuras; así, para encontrar un balance adecuado entre lo requerido para formar biomasa, teniendo en cuenta factores enzimáticos y fuentes de energía, es necesario contar con fuentes nutricionales adecuadas y así estimar la formulación que genere una mayor producción de biomasa (Ambagala, Ambagala, Deshpande, Kehrl, & Srikumaran., 2002, págs. 5058-5064) Así mismo, las condiciones de cultivo tales como el pH, concentración de oxígeno, temperatura y conductividad eléctrica, influyen fuertemente en la productividad de biomasa; sin embargo, unos de los parámetros más influyentes son la disponibilidad y concentración de nutrientes, ya que determinan la máxima cantidad de biomasa que puede ser producida (Kumar, Trivedi, & Pandey., 2003, págs. 1-9, 93-116).

El presente estudio se fundamenta en el beneficio social que conlleva el mejoramiento de las condiciones de producción pecuaria, lo que se relaciona con el mandato constitucional y el Plan Nacional para el Buen Vivir 2013 – 2017, que establecen la soberanía alimentaria como obligación principal del Estado(Constitución de la República, 2008).

Finalmente, la realización de este estudio cumple lo señalado por la legislación de educación superior vigente y los estatutos de la Universidad Politécnica Salesiana

1.2.Objetivos:

A continuación se presentan las metas que se plantearon al inicio de este estudio que orientaron el proceso.

1.2.1. General

Desarrollar un medio de cultivo para optimizar la producción de leucotoxina a partir de *Mannheimia haemolytica*.

1.2.2. Específicos

- Formular y aplicar diferentes medios de cultivo para la producción de leucotoxina a partir de *Mannheimia haemolytica*.
- Seleccionar los medios de cultivo eficientes, en la generación de leucotoxina.
- Relacionar la cinética de crecimiento bacteriana con la producción de la leucotoxina.
- Reconocer el daño a nivel de los órganos en los ratones de laboratorio inoculados con la toxina.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. Desarrollo de medios de cultivo

Un medio de cultivo es una solución acuosa de diferentes compuestos, que contiene todos los elementos indispensables que requieren los microorganismos para crecer, generalmente las bacterias son sembradas en medios líquidos o solidificados con agar para su propagación o conservación, así como para estudiar sus características de crecimiento es importante recordar que la siembra de los microorganismos en los medios de cultivo, se debe realizar en un área aséptica, en una cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones (Ospina, Castaño, & Zapata., 2011, págs. 15-21).

Al estudiar a los microorganismos previamente se les debe dar las condiciones de desarrollo en un laboratorio, porque así se puede evidenciar la presencia de los mismos ya que al ser sembrados en los medios de cultivo estos permiten caracterizar su crecimiento, encontrando sus actividades metabólicas. Dentro de los microorganismos existen las bacterias, estas son cultivables en medios de cultivo artificiales de laboratorio de tal forma que el medio de cultivo le proporciona los elementos necesarios para su crecimiento y multiplicación. (Pérez & Peris, 2002, págs. 3-4).

2.1.1. Clasificación de los medios de cultivo

2.1.1.1. Según su origen

Naturales: son medios en los cuales sus componentes tanto orgánicos como inorgánicos se encuentran de forma natural y su preparación es artesanal, es por ello que son muy poco utilizados en la bacteriología especialmente. Como ejemplo de estos medios se tiene: leche en todas sus presentaciones, huevo entero, papas y el suero sanguíneo disuelto en una relación de 1:4 de agua destilada estéril (Pérez & Peris, 2002, págs. 10-11).

Semisintéticos: Son medios generalmente conformados por dos partes: una parte de estos medios está constituida por componentes naturales como los extractos de: levadura, malta, patata, sangre, leche y otros y la otra parte contiene componentes sintéticos o químicamente definidos para dicho crecimiento bacteriano (Pérez & Peris, 2002, pág. 11).

Sintéticos: Son los medios de cultivo preparados comercialmente, todos y cada uno de sus componentes son conocidos de acuerdo con la utilidad de cada medio y el desarrollo microbiano deseado, se adicionaran sustancias especiales, se obtiene en el comercio en forma de polvo o granular. Son los más utilizados en bacteriología porque sirven para: aislamiento, identificación, crecimiento, determinación, ensayo y mantenimiento. En general estos medios presentan una complejidad muy variable de elementos según el microorganismo que se desea cultivar o estudiar (Ospina, Castaño, & Zapata., 2011, págs. 11-13).

Medios complejos: Estos medios son muy complejos en su elaboración ya que se parte de tejidos animales y raramente de vegetales, es por ello que estos medios se encuentran casi discontinuado su uso. La composición de un medio complejo no es rigurosamente constante ni claramente definida ya que las materias primas de estos medios suelen ser la carne de algún musculo y el tejido de: hígado o corazón (Pérez & Peris, 2002, pág. 12).

2.1.1.2. Según su composición

Enriquecidos: Ciertos microorganismos requieren para su crecimiento y desarrollo nutrientes especiales e indispensables para su metabolismo. Estos medios se enriquecen mediante la adición de sustancias tales como suero, sangre, vitaminas, leche, huevos y elementos químicos en general. Que facilitan el crecimiento del microorganismo nutricionalmente exigente lo que permite aislar el microorganismo o el producto del mismo que se está buscando (Pérez & Peris, 2002, pág. 10).

Medios selectivos: Estos medios poseen en su formulación algún tipo de compuesto que solo permitirá el desarrollo de ciertos microorganismos de interés e impedirá el desarrollo de otros, permitiendo así la selección en el tipo de microorganismo que si puede crecer (Ospina, Castaño, & Zapata., 2011, págs. 23-25).

Medios diferenciales: son aquellos que en su formulación poseen un componente que impide el desarrollo de ciertos microorganismos, sin embargo posee sustancias que pueden o no ser utilizadas por los microorganismos generando así una información suplementaria y específica de cada microorganismo y es por ello que se los denomina medios de cultivo diferenciales (Pérez & Peris, 2002, pág. 10). Es decir buscan seleccionar el crecimiento de un microorganismo sobre determinado medio, de esta

manera se puede conocer el microbio que se desarrolló. Son medios de cultivo que en su composición presentan un componente o componentes que: primero impedirá el crecimiento de algún tipo de microorganismo y segundo: la selección del tipo de microorganismo que si se desea obtener (Ospina, Castaño, & Zapata., 2011, págs. 24-25).

2.1.2. Propiedades de los medios de cultivo

2.1.2.1. Fertilidad

La fertilidad de un determinado medio de cultivo se basa en tener biodisponibles todos los nutrientes necesarios para que el microorganismo de interés logre desarrollarse después de ser sembrado. No todos los microorganismos exigen los mismos nutrientes en su desarrollo por lo tanto cada medio de cultivo debe llevar incorporados los elementos esenciales que garanticen el desarrollo del microorganismo que se busca. No todas las bacterias son capaces de desarrollarse sobre medios de cultivo donde se encuentran cubiertas las necesidades elementales, existen bacterias que aun así no crecen en tales medios o si lo hacen es muy lentamente. Dichas bacterias necesitan un factor o nutrientes específicos para su metabolismo muy exigente ya que como ellas solas no las pueden producir deben estar presentes en el medio de cultivo estos elementos para que la bacteria se desarrolle y genere el producto que se desea (Pérez & Peris, 2002).

2.1.2.2. pH

Los microorganismos en especial los llamados fastidiosos exigen en su crecimiento óptimo rangos estrechos de pH, la mayor parte de los patógenos requiere un pH cercano a la neutralidad 6.8 a 7.2. Existen sustancias que van a estabilizar el pH del medio conocidas como buffers o tampones proporcionando al medio un pH estable y adecuado que facilite el crecimiento microbiano (Ospina, Castaño, & Zapata., 2011, pág. 11).

2.1.2.3. Transparencia

La transparencia del medio de cultivo indica la calidad excelente que debe presentar el medio que se va a utilizar y es sinónimo de esterilidad, la turbidez de un medio de cultivo nos indica crecimiento bacteriano, ya sea de contaminación antes de iniciar la siembra o de crecimiento bacteriano después de sembrada la bacteria (Ospina, Castaño, & Zapata., 2011, pág. 12).

La esterilidad de un medio de cultivo se determina mediante la no aparición de contaminantes sean estos microorganismos o algún agente diferente como sólidos no disueltos o impurezas al momento de preparar el medio. Los medios de cultivo antes de utilizarse deben haber sido sometidos a controles de esterilidad de 1 a 2 días antes se los debe incubar a 37 °C. La presencia de algún microorganismo no deseado en un medio determinado es causa de eliminación inmediata (Pérez & Peris, 2002).

2.1.3. Constituyentes habituales de los medios de cultivo

2.1.3.1. Agua

El agua que se va a usar debe ser destilada o desionizada, estéril y libre de inhibidores del crecimiento. Se debe considerar un grado de humedad del medio ya que corresponde a la cantidad de agua que va a necesitar la bacteria para su crecimiento, en general, cualquier medio de cultivo sea sólido o líquido requiere una cierta porción de agua (Pérez & Peris, 2002) para disolver los nutrientes que estos contienen y estén disponibles para la bacteria en su desarrollo.

2.1.3.2. Extractos

Los extractos son preparados deshidratados son frecuentemente empleados en la confección de medios de cultivo, en el caso del extracto de levadura provee de vitamina K, nitrógeno y carbono. Estos extractos son una fuente energética necesaria para el metabolismo microbiano ya que aportan nitrógeno necesario para formar proteínas péptidos o aminoácidos (Pérez & Peris, 2002).

2.1.3.3. Sistemas amortiguadores

Las sustancias amortiguadoras o sistemas amortiguadores son incorporados al medio de cultivo para mantener el pH dentro del rango óptimo del crecimiento bacteriano. Los microorganismos más comunes son neutrófilos es decir el pH óptimo para su crecimiento está próximo a la neutralidad y sales como fosfatos bisódicos o bipotásicos o sustancias como las peptonas previenen un cambio del pH (Ospina, Castaño, & Zapata., 2011).

2.2. Contaje en cámara de Neubauer

En Biología Celular es común el encontrarse con la necesidad de conocer el número de células presentes en un volumen dado; por ejemplo, cuando se realizan cultivos celulares se precisa saber cuántas células se encuentran en un momento con respecto al número de células que inicialmente se sembraron. En tales casos se requiere de un instrumento que permita contar directamente o bien, calcular la concentración celular en un medio. Para resolver el problema de conteo celular, se ha optado, en algunos casos, por calibrar sistemas espectrofotométricos, cuyo fundamento se basa en las propiedades de absorción de la luz por parte de las células; sin embargo tales sistemas son poco exactos y los resultados que se obtienen son difíciles de repetir. Una alternativa a este problema es el contar directamente el número de células presentes en un volumen conocido. Esto puede resultar un gran trabajo considerando el tamaño de algunas células, sin embargo, la cámara de Neubauer permite contar células de distintos tamaños de manera muy práctica (figura 4). Cámara de Neubauer (izquierda) y esquema de la cuadrícula utilizada para el recuento de células (derecha) (Pietrasanta & Bilderling., 2015).

La cámara de Neubauer tiene la apariencia de un portaobjetos grueso; en una cara tiene una placa muy delgada de metal grabada con dos cuadrículas muy finas de medidas definidas (figura 4) y separadas una de otra por una ranura. El fondo de la cámara del campo central es usualmente 0,1 mm más bajo (= profundidad cámara) que ambos campos adyacentes. Entre campo central el cubreobjetos que se coloca sobre la misma existe por tanto una ranura de 0,1 mm. La limitación lateral del volumen a contar se establece mediante la cuadrícula de recuento. De esta manera, es posible conocer el volumen de muestra celular que se coloca en la cámara, y sólo es necesario contar el número de células presentes en ese volumen. La concentración de la suspensión de células estará dada entonces por la cantidad de células contadas sobre el volumen de la cuadrícula (superficie contada * profundidad de la cámara). (Pietrasanta & Bilderling., 2015).

Celeromics

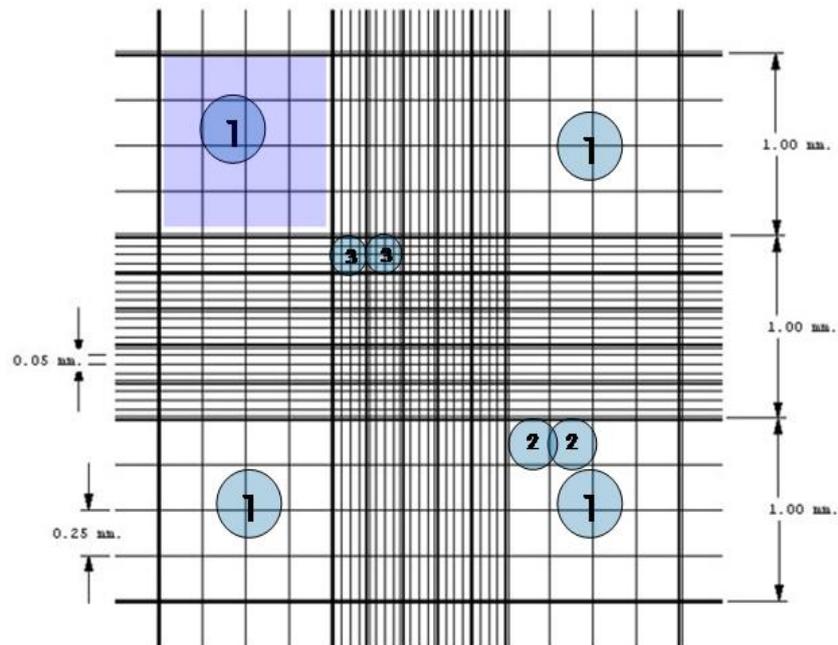


Figura. 1

Elaborado por Celeromic, 2010.

Total Células Contadas x 10.000

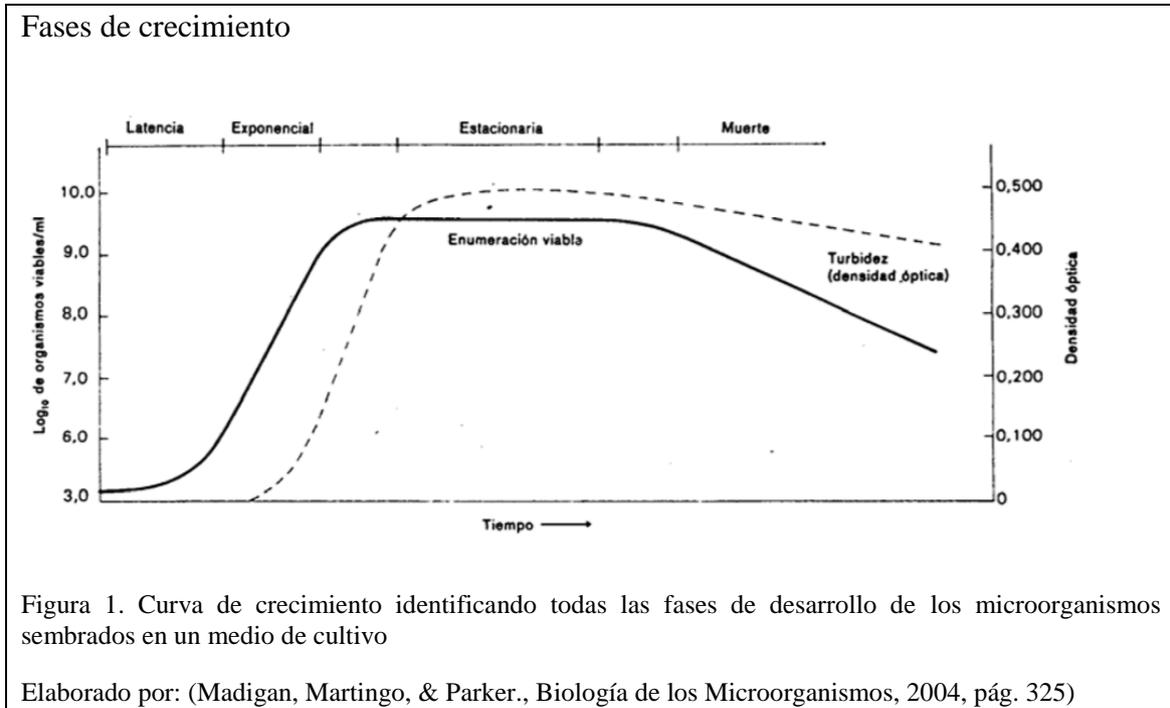
Concentración =

Número de Cuadrados

2.3. Curva de crecimiento

El desarrollo de un microorganismo específico se lo representa gráficamente a través de una curva de crecimiento. Si se introduce un microorganismo en un medio nutritivo que

haga posible su desarrollo, el cultivo sembrado pasara a través de una serie de estadios. La curva de crecimiento puede dividirse en las siguientes fases: latencia exponencial estacionaria y muerte (figura 1)(Walker & Gingold., 2009, págs. 1-2). El estudio de la cinética de un cultivo continuo revela si el cultivo favorece la propagación del microorganismo (Walker & Gingold., 2009, pág. 13).



2.3.1. Fase latencia

Se define a esta fase en el momento en que una población microbiana se inocula en un medio fresco, aquí no ocurre crecimiento inmediatamente, sino después de cierto tiempo. En el período, donde no se produce crecimiento, se designa como fase de latencia que puede ser considerada también como una etapa de adaptación (Ospina, Castaño, & Zapata., 2011, págs. 25-27).

2.3.2. Fase exponencial

Esta fase ocurre cuando una célula se divide en 2 y estas en otras 2 y así sucesivamente, tras un intervalo de tiempo durante el cual la tasa de crecimiento celular se incrementa gradualmente, las células crecen con una velocidad constante, periodo denominado fase logarítmica o exponencial, las velocidades de crecimiento exponencial pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales: temperatura, pH, dextrosa (7g/L),

composición del medio de cultivo y características genéticas del microorganismo (Walker & Gingold., 2009, págs. 2-3).

2.3.3. Fase estacionaria:

La fase estacionaria es un periodo de la curva de crecimiento en la cual se ha consumido los nutrientes del medio de cultivo, se acumulan los productos tóxicos y la tasa de crecimiento celular eventualmente cesa. En un cultivo donde no se renueva el medio, el crecimiento exponencial no puede ocurrir indefinidamente ya que un nutriente esencial del medio se acaba o algún producto de desecho se acumula en el medio (Ospina, Castaño, & Zapata., 2011, pág. 24).

2.3.4. Fase de muerte

Después de que la población alcance la fase estacionaria, las células deben permanecer vivas y metabólicamente activas pero también deben morir en algunos casos, la muerte va acompañada de lisis celular (Ospina, Castaño, & Zapata., 2011, pág. 26).

2.4. Matemática del crecimiento exponencial

Cuando se inocula una bacteria en un medio y ha transcurrido el tiempo de generación de este microorganismo, se forman dos células; después de otra generación se forman cuatro células; posterior de la tercera generación ocho células. Es decir en cada generación sucesiva se duplica la población. La relación que existe entre el número de células y las generaciones de un cultivo crece en forma exponencial (Tortora, Funke, & Case, 2007, págs. 33-35).

Para tener una correcta interpretación de la matemática del crecimiento bacteriano se deben emplear métodos de conteo celular por medio de la cámara de Neubauer esto nos permitirá vincular los datos crudos obtenidos en una investigación con la ciencia que la determina. (Prescott, 2008, págs. 320-410)

Dicha matemática está fundamentada con la variación del número de células y el volumen del cultivo. (Godia & Lopez., 2000) Desarrolla la siguiente fórmula:

Ecuación 1. $N_g = 1,44(\ln(V) + \ln(N) - \ln(N_0))$

Donde Ng es el número de generaciones, V el volumen del cultivo, N número final de UFC y No número inicial de UFC. Además el tiempo que requiere la bacteria para duplicar su número es conocido como el tiempo de generación y se describe de la siguiente forma:

Ecuación 2. $Tg = \frac{\Delta t}{\ln(N) - \ln(No)} \ln(2)$, lo cual puede escribirse como, $Tg = \frac{\Delta t}{Ng}$

Donde Tg es el tiempo de generación, t representa el tiempo del ensayo o del cultivo.

Ecuación 3. $\ln(N) = \ln(No) + ut$

Donde u es la tasa específica de crecimiento.

Al desarrollar esta matemática se podrá manejar correctamente los datos recabados de cada una de las cinéticas de crecimiento.

2.4.1. Área bajo la curva

La ecuación de Wagner y Nelson está basada en el cálculo de las áreas bajo la curva de absorción, es decir, aquella área delimitada por el gráfico obtenida al representar la concentración plasmática en función del tiempo. En los estudios de biodisponibilidad es importante determinar exactamente estas áreas ya que, en virtud de la ley de Dost, que dice: "la relación del área bajo la curva de concentración sanguínea en función del tiempo, luego de una administración oral, y la que se obtiene después de una inyección intravenosa de la misma dosis del fármaco es una medida de la absorción del fármaco administrado".

Para la determinación del área bajo la curva pueden utilizarse varios métodos:

- i)** Los niveles sanguíneos o plasmáticos se representan en función del tiempo en papel milimétrico. Las curvas se cortan y se pesan en balanza analítica.
- ii)** Se determina mediante un planímetro, el área de las curvas dibujadas en papel milimétrico.
- iii)** El método de la "regla trapezoidal": la curva se divide en secciones que se aproximan a trapecios en su forma (Fig. 2) y se calcula el área de cada una de ellas mediante la fórmula siguiente:

Área bajo la curva

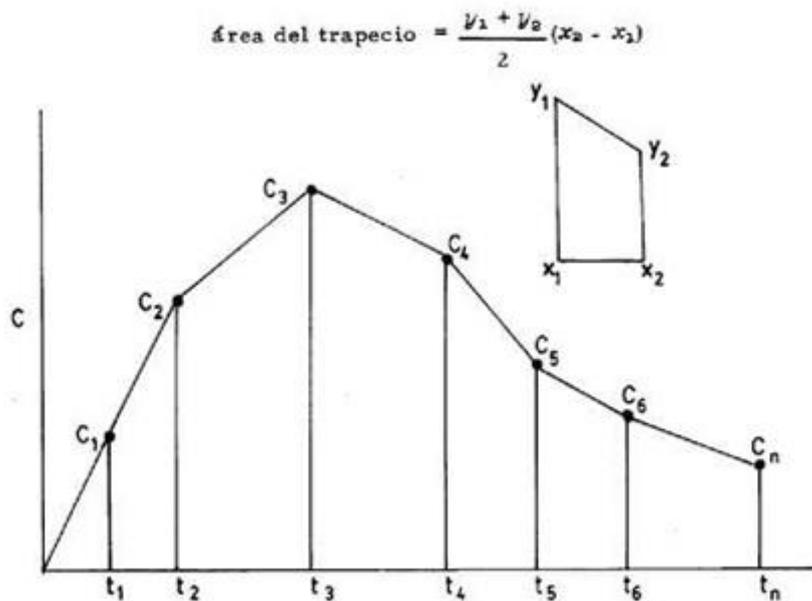


Figura 2. Cálculo del área bajo la curva por el método de los trapecios

Fuente: (Universidad de Chile, 2015).

2.5. *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia (Pasteurella) haemolytica es una bacteria relacionada a enfermedades respiratorias; el cómo se desarrolle la enfermedad dependerá de la capacidad de las cepas y del huésped. La bacteria se encuentra naturalmente en el tracto respiratorio del ganado bovino sano, cuando se propaga en la parte superior de este tracto se convierte en un agente patógeno, si el huésped está inmunosuprimido, este afecta a los mecanismos de defensa permitiendo que la bacteria se propague muy rápido y logre penetrar a los pulmones en el transcurso de la inhalación iniciando la infección del epitelio alveolar (Gentry, Confer, Weinberg, & Homer, 2003).

M. haemolytica se encuentra dentro del género *Pasteurella* que está conformado por microorganismos gram-negativos, aerobios-anaerobios facultativos, no esporulados e inmóviles. La especie típica es *M. haemolytica*, caracterizada por presentar catalasa, citocromo oxidasa e indol positivas, reduce nitrato, utiliza glucosa, manosa y sacarosa, como fuente de carbono y no produce hemólisis ni ureasa. Se divide en tres subespecies según su capacidad de utilizar trehalosa, dulcitol y sorbitol: *P. subsp. multocida*, *P. subsp. septica* y *P. subsp. gallicida*. Los esquemas de tipificación utilizados con mayor

frecuencia para *P. haemolytica* incluyen 5 tipos capsulares (A, B, D, E, F) y 16 serotipos somáticos (Malbran, 2006).

2.5.1. Bioquímica de la *M. haemolytica* y requerimientos nutricionales

Las cepas de *M. haemolytica*, aislada del ganado vacuno con pasteurelisis neumónica producen leucotoxina que es determinada de especie y tiene una actividad citolítica contra las células linfoides de los rumiantes. La leucotoxina es una proteína de 105 a 108 kDa que corresponde a la familia de las toxinas RTX, que también incluye la hemolisina de *E. coli*, la adenilatociclasa/hemolisina de *B. pertussis* y la toxina ApX de *A. pleuropneumoniae*. RTX (repeticiones de la toxina se refiere a la presencia de unidades repetidas ricas en glicina características en el término C de la molécula peptídica. En baja concentración, la leucotoxina de *M. haemolytica* activa los neutrófilos, provoca la formación de citosinas inflamatorias e induce cambios en el citoesqueleto que transportan a la apoptosis. En una concentración más alta, la toxina produce la formación de poros en las membranas celulares que conducen a tumefacción celular y lisis. In vitro, la leucotoxina induce cambios citopáticos alveólos bovinos, donde se relaciona con las membranas de los macrófagos y los neutrófilos en degeneración. Los mutantes de la *M. haemolytica* leucotoxina negativos muestran una disminución importante de la virulencia en los modelos animales en comparación con las cepas productoras de leucotoxina.

Tabla 1. Características bioquímicas de la *M. haemolytica*

Hemólisis, sangre bovina	β
Oxidasa	+
Reducción de nitrato	+
Fosfatasa alcalina	+
Citrato	-
Motilidad	-
Ureasa	-
Indol	-
Arginina Dihidrolasa	-
OrnitinaDescarboxilasa	-
Gas a partir de Glucosa	V
Ácido a partir de:	
Adonitol	-
Amidalina	-
Arabinosa	-
Arbutina	-
Celobiosa	-

Dextrina	+
Esculina	-
Gentabiosa	-
Mesoinositol	V
Maltosa	+
Manitol	+
Manosa	-
Melibiosa	-
Salicina	-
Sorbitol	+
Trehalosa	-
Xilosa	+
β -glucosidasa	-
β -galactosidasa	V
β -xilosidasa	V
β -fucosidasa	+

Nota: Fuente: (Koneman, 2008)

2.5.2. Leucotoxinas de *Mannheimia haemolytica*

La leucotoxina es un miembro de la familia RTX (*Repeats in toxin*), el operón de esta leucotoxina está constituida por 4 genes ltx C, A, B, D, en orden de transcripción siendo el ltx A, la porción activa de la toxina. Tiene actividad citoletal en polimorfonucleares, leucocitos, macrófagos, penetrando y formando poros transmembranosos, que producen pérdida de potasio intracelular, con un resultado fatal para la célula. Su nula acción, sobre determinadas células como epitelio, fibroblastos, plaquetas, eritrocitos, está comprobado de estudios *in vitro*.(Ramos, Moroni, Martínez, & Mendoza, 2010, págs. 42-45).

Las exotoxinas son proteínas solubles, a menudo enzimas termolábiles que la bacteria libera al ambiente durante su crecimiento, son expresadas por numerosas bacterias gram positivas o negativas (Gamazo, Sánchez, & Camacho., 2013, págs. 15-20).

Las características de la leucotoxina son: proteína termolábil, calcio-dependiente, estable al oxígeno y al pH, y soluble en agua, y las más altas concentraciones en su producción se dan en la fase logarítmica del crecimiento y el hierro es un factor requerido en el crecimiento de la bacteria y la producción de la leucotoxina (Jaramillo–Arango, Tavera, & Suárez–Güemes, 2009, págs. 293-314).

La leucotoxina para desarrollar el daño tisular en el pulmón, inicia con la activación y deterioro de los neutrófilos polimorfonucleares; inmediatamente después ocurre una activación en cadena: primero de las enzimas fosfolipasas de los macrófagos y segundo la liberación del factor activador de las plaquetas y tercero gracias al ácido araquidónico ocurren los efectos vasoactivos y también quimiotácticos. Posteriormente los lisosomas se degranulan enzimáticamente generando radicales libres de oxígeno que son tóxicos (Highlander & Fedorova, 2000, págs. 1128-1150).

2.5.2.1. Importancia de la leucotoxina en la generación de las vacunas

La leucotoxina se ha asociado con la inmunidad protectora de los animales; con anticuerpos anti-toxina relacionados con la resistencia a la enfermedad; vacunas comerciales del sobrenadante que contiene leucotoxina y que se muestra eficaz para reducir la incidencia y gravedad de la neumonía después de una estimulación experimental y en la alimentación han sido desarrolladas y aceptadas en el mercado veterinario con éxito (Curell Suñol, 2004).

En el hecho de que las enfermedades infecciosas siempre han estado presentes, la inmunización tiene un gran impacto para disminuir las pérdidas económicas debido a estas enfermedades. La búsqueda de nuevas vacunas, para enfermedades importantes en animales permitirá mejorar la producción.

2.6. Enfermedades respiratorias en el ganado

Dentro del síndrome respiratorio bovino (SRB) se encuentran infecciones y enfermedades respiratorias del ganado vacuno generadas por distintos agentes infecciosos como virus y bacterias, que se pueden manifestar de forma aislada o conjunta. Los virus denominados agentes primarios arrancan el proceso de infección, las bacterias llamadas agentes secundarios actuarán después, complicando la enfermedad. Por esta razón el SRB se considera un proceso plurietiológico (Javier Diéguez Casalta; M. Luisa Sanjuán Hernández; Eduardo Yus Respaldiza, 2003).

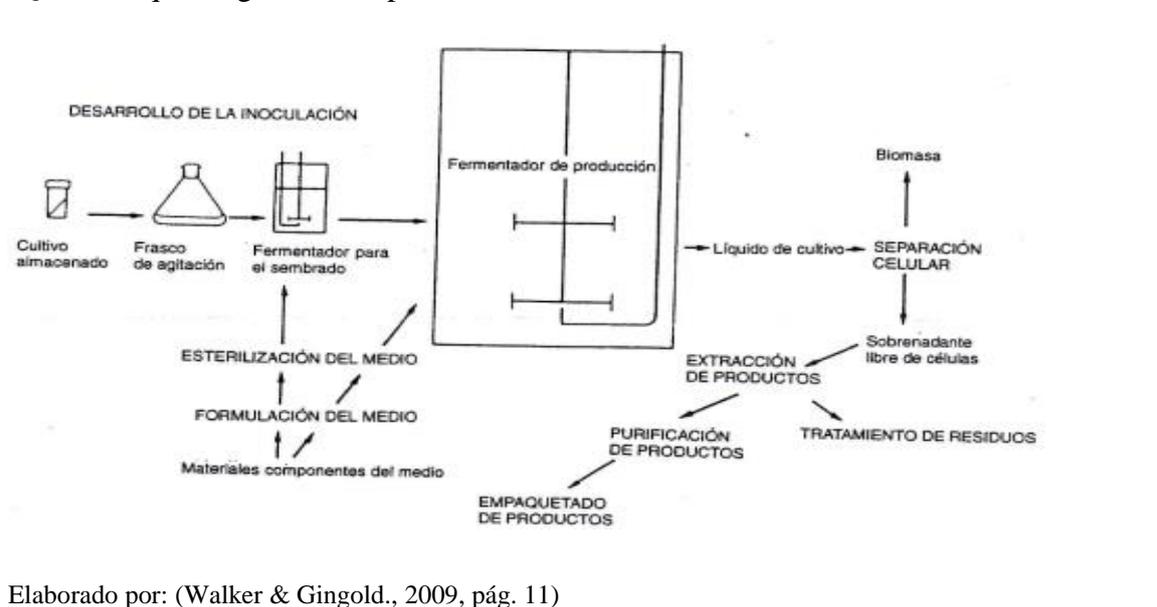
La pasteurelosis neumónica, es considerada la principal causa de neumonía en terneros, afectando principalmente a los animales jóvenes y también a animales de todas las edades. Tanto virus, micoplasmas y *Pasteurella* actúan sinérgicamente y son la causa final de la

neumonía. *Pasteurella* genera una leucotoxina, citotoxina tóxica que afecta a neutrófilos y macrófagos. Una vez que se ha dado la inhalación de las bacterias y virus estos se depositan en los neutrófilos y son destruidos por la leucotoxina liberando enzimas proteolíticas que degradan las membranas celulares, logrando el aumento en la permeabilidad vascular por lo tanto hay acumulación de líquidos en el intersticio de la pared alveolar, necrosis y edema pulmonar (Scicchitano, 2002, págs. 20-22).

2.7. Industrialización de fermentaciones

Los procesos de fermentación poseen como parte central un fermentador o birreactor, en el cual los microorganismos se desarrollan en condiciones apropiadas para la formación de productos, se debe considerar todas las operaciones que se efectúan antes, durante y después de la fermentación. Las primeras operaciones a realizarse son: preparación del medio de cultivo estéril, esterilizar el fermentador y obtener un primer cultivo en un correcto estado fisiológico para poder inocular al fermentador. Luego de transcurrido el tiempo de la fermentación, el producto generado debe ser purificado, procesado y los desechos generados deben ser tratados (Walker & Gingold., 2009, pág. 11).

Figura 3. Esquema general del proceso de fermentación



Elaborado por: (Walker & Gingold., 2009, pág. 11)

2.7.1. Escalamiento de la fermentación

El escalamiento de la fermentación microbiológica es un proceso que se transfiere desde un laboratorio es decir una pequeña escala hasta un equipo comercial a gran escala. Para

realizar un escalado eficiente se debe tener conocimientos de la biología del microorganismo productor, física del diseño y del funcionamiento del birreactor (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark., 2009, pág. 817).

2.7.1.1. Proceso de escalado

Este proceso se inicia en un matraz del laboratorio a pequeña escala que permite conocer si las condiciones son factibles para llevarlas al proceso industrial. Luego se transfiere al birreactor que generalmente es de vidrio con una capacidad de diez litros, se puede ensayar posibles variaciones: en el medio, la temperatura, la agitación, pH, cantidad de dextrosa y otros (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark., 2009, pág. 818).

Durante todas las etapas del escalado, la aireación es una variable fundamental que está sometida a un control estricto. A medida que el proceso de escalado avanza desde el matraz hasta el fermentador comercial, además de mantener la temperatura, el pH y los nutrientes a niveles adecuados, la dinámica del oxígeno se mide cuidadosamente para determinar cómo afectan los diferentes incrementos de volumen a la demanda de oxígeno de la fermentación (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark., 2009, pág. 819).

2.7.2. Fermentaciones industrializadas

Conjunto de procesos controlados que permiten mayor productividad en la obtención de productos de los microorganismos (Walker & Gingold., 2009, pág. 11).

2.7.2.1 Fermentadores industriales

Los fermentadores o birreactores son recipientes en los cuales se lleva a cabo un proceso de microbiología industrial que se denomina fermentación. Dicha fermentación hace referencia al proceso microbiano a gran escala sea esta o no una fermentación en el sentido bioquímico. Dichos birreactores se dividen en 2 tipos: los que se usan en procesos aerobios y los que se usan en procesos anaerobios (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark., 2009, págs. 814-816).

Los birreactores anaerobios no exigen mucho equipamiento, ya que solo se necesita un mecanismo que elimine el calor generado durante la fermentación. Los birreactores aerobios requieren un equipamiento mucho más complejo porque se debe garantizar el

mezclado y aireación adecuados (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark., 2009, págs. 814-820).

2.7.2.2. Birreactor aerobio

Los fermentadores a escala industrial son de acero inoxidable, consiste de un cilindro cerrado por la parte superior, en la base como en la tapa contiene diversas tuberías y válvulas que permiten controlar de forma adecuada el desarrollo del medio de cultivo.

Esquema de un birreactor aerobio.

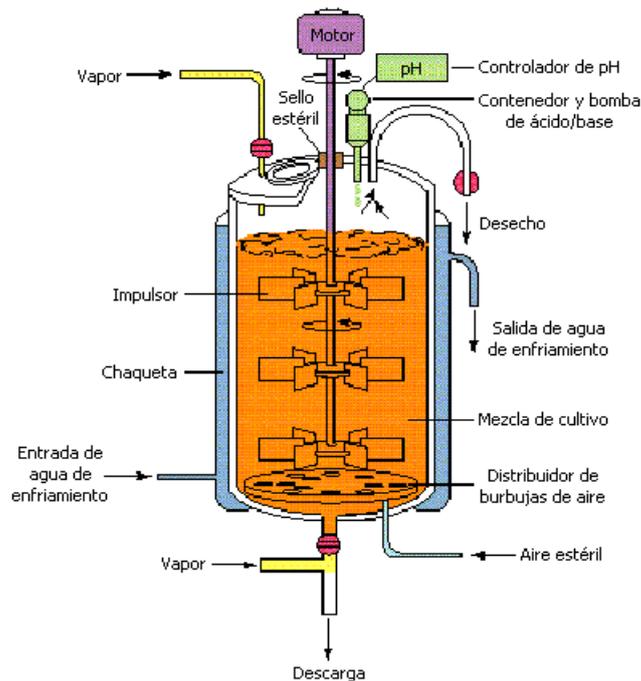


Figura 4. Esquema de un birreactor aerobio, donde se puede observar su estructura, composición y control del proceso

Elaborado por: (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark., 2009, pág. 815).

El calor generado en la fermentación debe ser controlado, ya que la temperatura debe ser la adecuada para que el microorganismo genere sus productos, es por ello que los reactores están recubiertos por una chaqueta refrigerante en la cual circula tanto vapor para la esterilización o agua para el enfriamiento y control de la temperatura (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark., 2009, pág. 816).

Los instrumentos para el control de un birreactor requieren de sensores que midan los procesos fermentativos y sistemas que ajusten al equipo. Los sensores deben estar en

línea, para medir las propiedades físicas del cultivo, estos deben ser autoclavables para asegurar la asepsia del proceso fermentativo. Sin embargo, no todas las mediciones pueden hacerse en línea, algunas medidas requieren de tomar muestras y analizarlas (concentración bacteriana, pH, metabolitos generados, fuente de carbono, etc.). Las propiedades físicas que monitorean los sensores son: temperatura, presión, agitación, viscosidad del medio, flujo, concentración de gases, fluidos, espuma, volumen y masa. Para la medición de las propiedades químicas se utilizan electrodos autoclavables al vapor, y estos son: pH, redox, oxígeno disuelto y CO₂. El más utilizado es el de pH, aunque no tiene utilidad para todas las fermentaciones, sólo en las que se necesita mantener un valor (Arévalo, Llanos, & Flores., 2003, págs. 57-58).

2.8. Pruebas *in vivo* de la presencia de la leucotoxina

Las pruebas de validación *in vivo* miden directamente la actividad biológica de la toxina en animales de laboratorio. Las pruebas tienden a ser costosas por el gran número de animales que se usan, y también porque el personal del bioterio debe ser entrenado constantemente para el manejo de ratones (Galazka, 2000).

El uso de ratones debe tener varias consideraciones, entre las ventajas se encuentran : pequeño tamaño, que facilita el mantenimiento y uso; tiene también bajo costo de reproducción y crianza; al trabajar con una cepa definida se mejora el control de enfermedades; tienen una vida corta, óptima para ensayos de microbiología, farmacología, etc. y rápido tiempo de generación de nuevos individuos. La utilización de guantes a la medida del operario evitara dificultades en la manipulación de los animales. Esto es fundamental ya que los animales al sentirse capturados al momento de la sujeción tienden a morder. Entre las desventajas se encuentran: poco aporte de material biológico, hay problemática en la administración de drogas por su pequeña anatomía y existe en la actualidad un conflicto en la práctica de técnicas quirúrgicas específicas en estos animales. (Centro Nacional de Productos Biológicos Instituto Nacional de Salud, 2008).

2.9. Ética de la experimentación animal

En la investigación se deberá minimizar cualquier dolor o angustia a los animales, ya que son el objeto esencial para la obtención de los resultados experimentales. Los

investigadores están moralmente obligados a tener respeto, por tratarse de seres vivos sensibles, que están sintiendo sufrimiento.

Éticamente, si se sigue el principio de las tres R de la experimentación humanizada para con los animales la investigación biomédica es aceptable, esta propuesta es realizada por William Russell (zoólogo y psicólogo) y Rex Burch (microbiólogo) en 1959 y consiste en: reducir, reemplazar y refinar. Reducir al máximo el número de ratones que se deban sacrificar durante toda la investigación, reemplazar siempre que sea posible el animal de experimentación por otro modelo experimental, cuando no resulte indispensable el uso de estos; y por último refinar los métodos y técnicas utilizadas de modo que se evite el menor sufrimiento posible.

La responsabilidad con frecuencia cae en el investigador principal que esté realizando el procedimiento científico (Centro Nacional de Productos Biológicos Instituto Nacional de Salud, 2008).

2.10. Técnica de eutanasia

Deberá elegirse un método que no cause sufrimiento al ratón.

- a) Agentes inhalatorios: gases anestésicos, gases no anestésicos.
- b) Agentes no inhalatorios: tranquilizantes (curare y estricnina).

Cuando se somete a los ratones a agentes inhalatorios, se los debe dirigir a cámaras apropiadas, donde se aplicará el agente de manera uniforme. Al tratarse de ratones recién nacidos se utilizará otro método puesto que estos son resistentes a la hipoxia. Se deberá elegir agentes no degradables a la hora de ser inhalados para evitar la irritación y el estrés en el operario, el mismo que deberá tomar en cuenta las precauciones de seguridad y utilización del equipo adecuado. El gas más utilizado para este fin es el CO₂ en concentraciones superiores a 60%, actuando como elemento anestésico y para la pérdida de conciencia, en concentraciones superiores al 70% es efectivo para la eutanasia (Centro Nacional de Productos Biológicos Instituto Nacional de Salud, 2008).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Formulación de los medios de cultivo

Se debe seguir exactamente las recomendaciones que exige la casa comercial respectiva, en este caso el medio de cultivo utilizado en la presente investigación indican usar para la hidratación del mismo solamente agua destilada estéril. Se adicionarán únicamente los componentes indicados por el proveedor o las que en la formulación se indiquen. En la hidratación del medio, usar solamente material de vidrio totalmente limpio para evitar la contaminación del medio de cultivo, se debe pesar exactamente las cantidades indicadas para evitar que nuestro microorganismo no se desarrolle por que las cantidades de los excipientes no se encuentran en la cantidad necesaria.

Vaciar la cantidad del medio pesada previamente en un matraz, agregar la cantidad de agua necesaria, se debe agitar manualmente y procurar que no queden restos del medio en las paredes del matraz sin disolverse. Esta mezcla homogénea se la debe calentar hasta ebullición y cerciorarse que el medio quede totalmente transparente libre de materias extrañas. Los medios se deben esterilizar en autoclave en las siguientes condiciones: 15 libras de presión, 121 °C por 15 minutos. (Ospina, Castaño, & Zapata., 2011).

Los medios de cultivo que son formulados y reconstituidos se les efectúa un control de calidad al tomar una alícuota de 5 mL. y se los siembre en medios de cultivos tales como TIO (Tioglicolato), SAB (Sabouraud) y TSB (Trypticase Soya Broth) medios específicos para el crecimiento de microorganismo aerobios, anaerobios y ambientales, son usados para controlar la inocuidad de los medios de cultivo que se usaron para la producción a nivel de laboratorio o industrial (BD Diagnostic Systems, 2015). Luego el medio de cultivo inocuo se transfiere al birreactor que generalmente es de vidrio con una capacidad de diez litros, se puede ensayar posibles variaciones: en el medio, la temperatura, la agitación, pH, cantidad de dextrosa, y otros (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark., 2009, pág. 818).

3.1.1. Medio de cultivo 1

Esta formulación se obtuvo de la empresa JAMES BROWN PHARMA Colombia. Este medio de cultivo está conformado por: L-Glutamina aminoácido esencial para la demanda fisiológica, Sulfato de Magnesio que funciona como fuente de electrolitos, MEM: Medio Esencial Mínimo (MEM), desarrollado por Harry Eagle, es uno de los más utilizados de todos los medios de cultivo de células sintético, ayuda al crecimiento de una variedad más amplia de células fastidiosos. MEM, que incorpora estas modificaciones, incluye concentraciones más altas de aminoácidos de modo que el medio se aproxima más a la composición de proteínas de células de mamíferos. MEM se ha utilizado para el cultivo de una amplia variedad de células cultivadas en mono-capas. Suplementación opcional de no esenciales aminoácidos a las formulaciones que incorporan ya sea de Hanks o Eagles sales ha ampliado la utilidad de este medio. La formulación se ha modificado adicionalmente por eliminación opcional de calcio para permitir el crecimiento de células en suspensión (ALDRICH-SIGMA., 2015), TPB: Triptosa fosfato Broth (TPB) se compone de cuatro componentes: Triptosa (20 g / L); Dextrosa (2 g / L); NaCl (5 g / L) y fosfato disódico (2,5 g / L) típicamente ajustaron a pH 7,3. El componente de Triptosa es una peptona (mezcla de aminoácidos y péptidos cortos) derivado por la hidrólisis enzimática mixta (enzimas pancreáticas) de la caseína proteína de la leche. Este hidrolizado proporciona una fuente de nutrientes a base de aminoácidos y factores de supervivencia que apoyan el crecimiento de microorganismos como *Brucella*, *Streptococcus*, y *Neisseria*; así como las células eucariotas y células de insectos y animales. Dextrosa proporciona un hidrato de carbono fermentable que puede ser utilizado por microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico e iónico y fosfato disódico proporciona la capacidad tampón básico (SIGMA-ALDRICH, 2015). Sulfato ferroso su función es ser fuente de hierro, sulfato de manganeso, es la fuente de electrolitos para proporcionar radicales libres necesarios para microorganismos en su desarrollo, Tiamina es la fuente de vitamina indispensable para el desarrollo microbiano, Cloruro de sodio se lo usa por su poder osmótico es decir como un compuesto de crecimiento bacteriano selectivo y específico y también se lo administro como una fuente de electrolitos disponibles para el desarrollo microbiano, Extracto de levadura este componente se lo usa como una fuente de nutrientes en general de proteínas para el medio de cultivo, Dextrosa como un factor de desarrollo del microorganismo y Bicarbonato de

sodio como estabilizador de la fórmula. Esta fórmula se obtuvo de JAMES BROWN PHARMA sede en Colombia.

3.1.2. Medio de cultivo 2

La formulación del medio es la siguiente: TPB y tiamina. El TPB es el medio de cultivo comercial al cual se le adiciona la tiamina ya que las propiedades de estos componentes están descritos en la ATCC por sus siglas en inglés: American Type Culture Collection, como el medio adecuado para *M. haemolytica* es ATCC medium: 1206 Tryptose broth with thiamine (ATCC, 2015).

3.1.3. Medio de cultivo 3

Este medio de cultivo se formula de una combinación entre: TPB y Sulfato ferroso. Ya que las propiedades del TPB son las adecuadas para el desarrollo microbiano y se le adiciona una fuente de hierro ya que la *M. Haemolytica* es nutricionalmente exigente para este mineral.

3.1.4. Medio de cultivo 4

Sus componentes son los siguientes: TPB, Sulfato Ferroso e Hidróxido de calcio. Esta fórmula se desarrolló por las características y necesidades que la *M. haemolytica* requiere para desarrollarse y logre producir la leucotoxina de interés.

3.1.5. Medio de cultivo 5

La formulación de este medio de cultivo contiene: TPB, Sulfato Ferroso y Tiamina, estos son los componentes vitales para que la *M. haemolytica* obtenga todos los nutrientes necesarios para poder generar la leucotoxina.

3.1.6. Medio de cultivo 6

Este medio de cultivo es una variación del medio número 5, sus componentes son los siguientes: TPB, Tiamina e Hidróxido de Calcio, en esta formulación contiene una fuente de calcio ya que por investigación bibliográfica se conoce que la bacteria de interés es calcio dependiente, es por ello que se formuló este medio.

3.1.7. Medio de cultivo 7

Este medio de cultivo contiene: TPB, Sulfato ferroso, Tiamina e Hidróxido de Calcio. Se considera a este medio de cultivo como uno de los más completos ya que en su formulación contiene todos los nutrientes esenciales que indica la bibliografía.

3.1.8. Medio de cultivo 8

Este medio de cultivo contiene: BHI: Infusión cerebro-corazón, fórmula: Infusión cerebro: 200g/l, Infusión corazón: 250g/l, Peptona (polipeptona-BBL):10g/l, Cloruro de sodio: 5g/l, Fosfato disodio: 2.5 g/l, Dextrosa: 2.0g/l, Agar: 15g/l. Suspender 52 g en 1 L de agua destilada y esterilizar a 15 psi a 121 °C por 15min, pH: 7.4 ± 0.1. Este caldo es un medio de cultivo nutritivo que contiene infusión de cerebro, tejido de corazón y peptonas que proporciona proteínas y otros nutrientes necesarios para permitir el crecimiento de microorganismos patógenos y no patógenos. Cuando al medio se le adiciona 6.5% de cloruro de sodio, las sales activas actúan como agentes diferenciales y selectivos, los cuales interfieren en la permeabilidad y el equilibrio eléctrico y osmótico en microorganismos intolerables a dichas sales (Ospina, Castaño, & Zapata., 2011).

Se realizó la formulación de 8 medios de cultivo que fueron modificados con la administración de hierro, una fuente de vitamina B y nutrientes necesarios en el desarrollo de *M. haemolytica* y la producción de la leucotoxina.

La formulación de los 8 medios de cultivo fue:

Tabla 2. Formulaciones de cada medio de cultivo empleado, MEM: Medio estándar mínimo, TPB: Triptosa fosfato Broth, BHI: Infusión cerebro-corazón.

Componente (g/100mL)	MEDIOS DE CULTIVO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
L-Glutamina	0,03715							
Sulfato de Magnesio	0,0299							
MEM	0,0002							
TPB	3	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	
Sulfato ferroso	0,002		0.2	0.2	0.2		0.2	
Sulfato de manganeso	0,0005							
Tiamina	0,0015	1.5			1.5	1.5	1.5	
Cloruro de sodio	0,55							

Extracto de levadura	0,5							
Dextrosa	0,1							
Bicarbonato de sodio	1,1							
Hidróxido de Calcio				0.1		0.1	0.1	
BHI								3.7

Nota: Elaborado por Guayasamín, 2015

Se pesaron todas las materias primas de cada uno de los medio y se prepararon en frascos de vidrio transparente de aproximadamente 500 ml de capacidad, una vez disuelto el medio de cultivo y todos sus componentes se los llevó a autoclavar por 15 minutos, a 121 °C y a 15 PSI; excepto la vitamina B-tiamina que por sus características químicas se desnaturalizaría en el proceso del autoclavado. El rango del pH para los medios elaborados está entre 6.70 a 7.2, siempre tendiendo a la neutralidad.

Mientras el medio de cultivo se enfría a temperatura ambiente, se disolvió la tiamina la cantidad adecuada para formulación en 10 mL de agua purificada estéril, para posteriormente adicionarla a través de un filtro millex 0,22um.

Posteriormente, los viales de *Mannheimia haemolytica* conservados a -80° se descongelaron sumergiéndolos en alcohol al 70%, todo el material desinfectado y estéril se dejó dentro de la cabina de bioseguridad para continuar con la siembra.

Una vez ya descongelado el vial se realizaron pruebas de calidad mediante tinción Gram y observación al microscopio óptico para verificar la pureza de la cepa y adicionalmente se realizó un conteo inicial de la bacteria mediante la cámara de Neubauer, determinándose una concentración de 1×10^5 UFC/mL esto es resultado. Se tomó 1 ml y se sembró a cada uno de los medios de cultivo preparados.

3.2. Selección de los medios de cultivo

Una vez formulados los 8 medios de cultivo se sembró *M. haemolytica*, para seleccionar el medio de cultivo con mayor crecimiento, se evaluó la concentración del microorganismo a través del tiempo.

La cinética de crecimiento se llevó hasta llegar a su fase de muerte, a 37 °C, con un rango de pH de 6.00 a 7.50. Se tomó 10ml de medio cada hora para medir: la concentración

bacteriana, pH y cantidad de glucosa, estas condiciones se establecieron bajo los procedimientos operativos de la empresa.

La concentración de bacterias se determinó mediante la cámara de Neubauer, que fue llevada al microscopio óptico para la realización del contaje, esto se realizó una vez cada hora por el lapso de 10 horas que dura la cinética de crecimiento. Este parámetro es el de mayor importancia, pues indica la cantidad de bacterias.

En cada experimentación se logró controlar parámetros determinantes en una cinética de crecimiento pues la cantidad de dextrosa debe ser óptima para el proceso de multiplicación de bacterias. Este parámetro se midió con un glucómetro y los niveles deben ser de 700-800 mg/dl, puesto que si la cantidad de glucosa disminuye se considerará adicionar al birreactor dextrosa para que la multiplicación bacteriana sea la adecuada.

La agitación constante de 60 rpm, permite la homogenización de todo el reactor y por consecuencia la biodisponibilidad y dispersión de los nutrientes y bacterias en el medio de cultivo y de esta forma lograr parámetros adecuados para la cinética de crecimiento de esta bacteria.

En base a la cinética de crecimiento de los 8 medios de cultivo, se seleccionaron los 5 medios con mejor curva de crecimiento. Con estos se les realizó un nuevo montaje y se evaluó la curva de crecimiento, aquellos que mostraron tener una mayor concentración bacteriana entre 8 y 10 horas de cultivo, fueron seleccionados para demostrar la eficacia en la producción de la leucotoxina. Luego de esta experimentación solo se seleccionaron los 2 medios de cultivo que presentaron mayor concentración bacteriana entre 8 y 10 horas de la cinética de crecimiento.

En los dos medios de cultivo seleccionados se efectuó la escalada del proceso, desde una producción a baja escala de 100 mL en botellas de vidrio a escala de producción industrial de 10 L del medio de cultivo en birreactores.

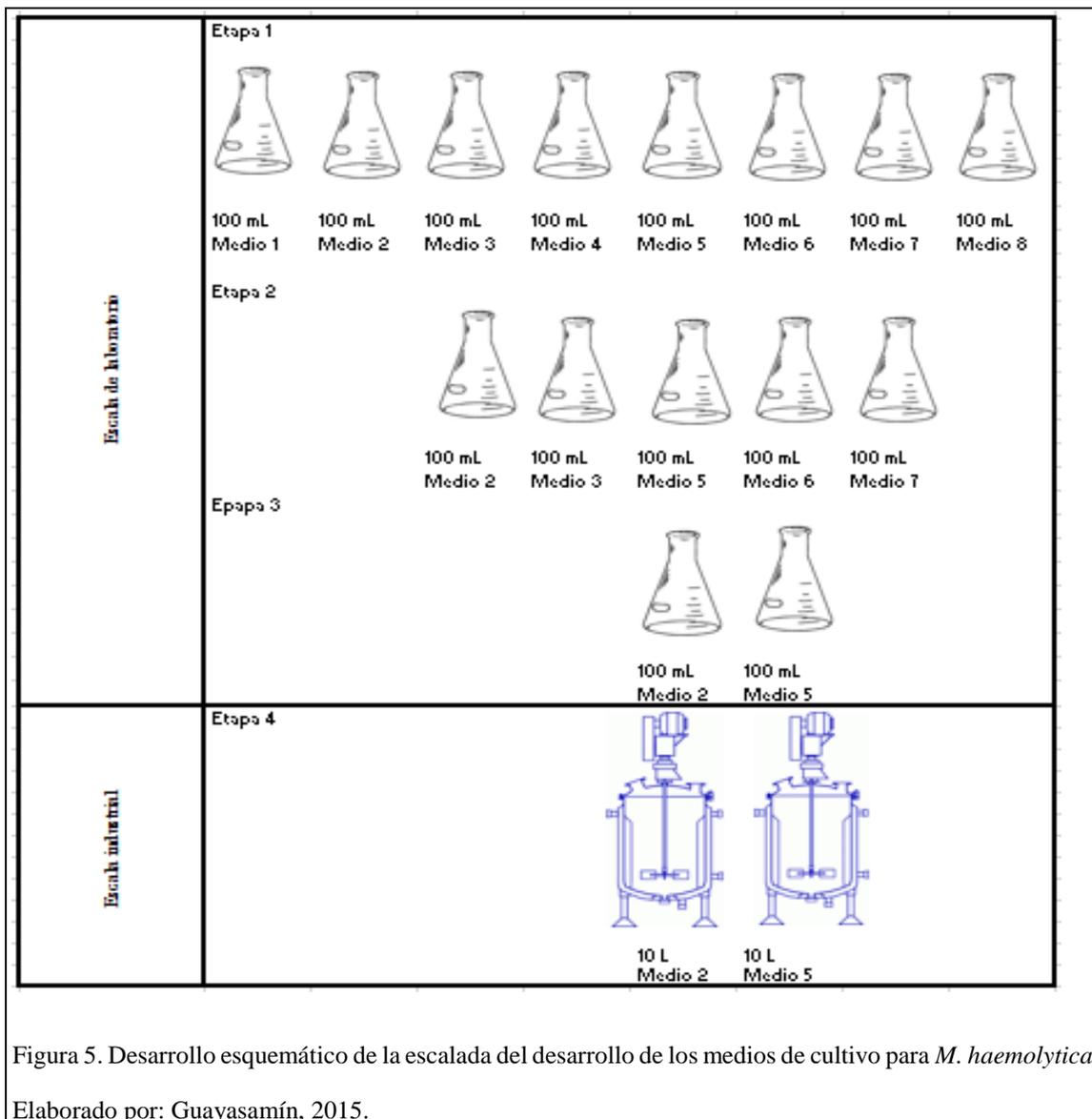


Figura 5. Desarrollo esquemático de la escalada del desarrollo de los medios de cultivo para *M. haemolytica*.

Elaborado por: Guayasamín, 2015.

Se evaluó la producción de leucotoxina en los 2 medios de cultivo, mediante inyección del filtrado del sobrenadante producido en el birreactor, a ratones de laboratorio, controlando su sintomatología por 72 horas.

3.3. Detección *in-vivo* de la presencia de leucotoxina

Para la detección *in vivo* se tomó ratones *Mus musculus*, los que fueron mantenidos en 24 jaulas de 4 individuos cada una.

A lo largo de toda la cinética de crecimiento microbiano de los 2 medios de cultivo seleccionados anteriormente, cada hora se extrajo 10 ml de medio de cultivo que contenga

las bacterias, se filtró a través de filtros milipore 0,22 μ m, para la obtención de leucotoxina libre de bacterias.

El filtrado tomado cada hora fue inyectado a los 4 ratones por vía intraperitoneal, se inoculó 1ml por ratón y se procede a su observación. El experimento se lo desarrolló con 10 jaulas en todo el tratamiento de inoculación y 2 jaulas sirvieron de testigos, una que mantiene ratones inoculados con medio de cultivo estéril y otra con ratones sin tratamiento. Esto se realizó por cada medio de cultivo.

A todos estos ratones una vez iniciado la experimentación se los mantiene bajo observación por el lapso de 72 horas, para así poder recabar datos y ver si el medio cultivo generó la leucotoxina. La identificación de la presencia de la leucotoxina en los medio de cultivo seleccionados se realizó mediante la inyección en ratones de laboratorio, para esto se trabajó con 12 jaulas cada una con 4 ratones, 10 jaulas con los tratamientos, designando una jaula por cada hora de cultivo, además se contó con 2 controles, uno con ratones inyectados con medio de cultivo estéril y otra con ratones que no fueron inyectados. Los ratones testigos tuvieron las mismas condiciones de temperatura, alimentación, hidratación e iluminación que los ratones experimentados

Se espera que la leucotoxina produzca la muerte de los ratones ya que ataca a los pulmones.

Las cajas fueron observadas por 72 horas, si el ratón murió durante este tiempo se realizó la necropsia para la visualización de los órganos, si los ratones sobrevivieron se los sacrificó después de las 72 horas; se realizó la necropsia y se compararon los órganos con los ratones control que también fueron sacrificados.

Para la muerte de los animales vivos del experimento, primero se toma de la cola con la mano derecha y con la mano izquierda se toma el cuello, con un fuerte jalón desde la cola se produce la dislocación de la cabeza produciendo la muerte del ratón. La necropsia se realiza mediante la inserción del bisturí #2 desde el cuello hasta la entrepierna, teniendo cuidado de no dañar el peritoneo.

Sujetando con una pinzase analiza el peritoneo y con el bisturí se inicia a romper desde el cuello hacia abajo; con una tijera se corta las costillas que se unen al esternón permitiendo abrir la cavidad torácica y poder extraer el corazón y los pulmones.

3.4. Comparación de estructura interna e identificación de órganos diana de *M. haemolytica*

La estructura interna de un ratón se la compara visualmente tanto tamaño, color y forma, los órganos diana son los pulmones y el corazón. Estos órganos de los todos ratones experimentados se los compara anatómicamente con los órganos de un ratón sano, es decir un ratón testigo que no haya tenido interacción con el medio ni con la bacteria.

Se sacrifica a todos los ratones testigo y se los compara con los ratones que mueren durante la cinética de crecimiento bacteriano y a los que sobreviven a las 72 horas de observación. Los órganos internos de los ratones infectados por la leucotoxina tienden a cambiar de color y aumentan de tamaño, es decir que el color rojo del corazón de un ratón sano cambia a un tono morado en los ratones infectados y en el caso de los pulmones son pequeños en un ratón sano y los pulmones de un ratón infectado son más grandes, produciendo así la muerte del ratón.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se abordarán los resultados obtenidos durante la investigación para ser analizados y confrontados con otras investigaciones, lo que permitirá conocer la situación en la cual *M. haemolytica* se ha desarrollado en medios de cultivo en el Ecuador.

4.1 Control inicial de los medios de cultivo:

De acuerdo a los estudios realizados por Ospina, Castaño y otros autores (2011) , un medio de cultivo para microorganismos considerados fastidiosos se debe cumplir con las siguientes condiciones: una temperatura de 37°C, el pH óptimo muy cercano a la neutralidad de 6.8 a 7.2. Walker y Gingold (2009) establecen la cantidad de dextrosa a utilizar que es de 7g/L. Es así que para el presente estudio se mantuvo constante la temperatura durante toda la cinética de crecimiento de 37°C, en cuanto al pH vario de 6.00 a 7.50 considerándose también un valor de pH cercano a la neutralidad.

Las variables físico-químicas iniciales evaluadas en los medios de cultivo para el desarrollo de *Mannheimia haemolytica* fueron: pH, dextrosa, temperatura y agitación que se observan en la tabla 3. Se mantuvo constante la temperatura a 37°C y la velocidad de agitación a 60 rpm.

El rango de pH inicial de los medios de cultivo se encuentra entre 6.00 - 7.50. La concentración inicial de dextrosa que se la midió con un glucómetro comercial se ubica dentro del intervalo 700-800 mg/dL.

Además hay que considerar que la siembra del microorganismo se hizo en un medio líquido cumpliendo con las condiciones de asepsia bajo una cámara de flujo laminar que evita la contaminación. Al ser la *Mannheimia haemolytica* un microorganismo nutricionalmente exigente (Pérez & Peris, 2002); puesto que requirió que se adicione tiamina y sulfato ferroso para su desarrollo y crecimiento, obteniendo resultados cuantitativamente representativos.

Los medios de cultivo formulados deben ser controlados mediante la siembra de una alícuota de los mismos en los medios TIO, TSB y SAB para controlar contaminación por

microorganismos aerobios, anaerobios o ambientales. (Madigan M.T, 2008) Como se muestra en la tabla 3 no hubo crecimiento en ninguno de los medios empleados desde su esterilización hasta que se completó la cinética de crecimiento.

Tabla 3. Variables físico-químicas

Condiciones	pH	Concentración de dextrosa (mg/dL)	Crecimiento de microorganismos		
			TIO	TSB	SAB
1	6.50	750	Nulo	Nulo	Nulo
2	7.00	780	Nulo	Nulo	Nulo
3	6.00	750	Nulo	Nulo	Nulo
4	6.50	750	Nulo	Nulo	Nulo
5	7.00	780	Nulo	Nulo	Nulo
6	6.50	770	Nulo	Nulo	Nulo
7	6.50	770	Nulo	Nulo	Nulo
8	6.50	790	Nulo	Nulo	Nulo

Nota: Elaborado por Guayasamín, 2015.

4.2 Reconstitución de *M. haemolytica*.

En el desarrollo del experimento se formularon 8 medios de cultivo, el medio de cultivo 1 es una formulación tipo comercial de la empresa auspiciante, el medio de cultivo 8 es solo un medio de cultivo comercial y los medios de cultivo desde el 2 hasta el 7 tienen como base en su composición al medio de cultivo comercial TPB al cual se le adiciona tiamina, sulfato ferroso e hidróxido de calcio, es por estas variaciones que solo se formularon estos 8 medios de cultivo.

La ATCC (2015), recomienda que para la reconstitución de cepas de *M. haemolytica* se debe efectuar en un medio de cultivo TPB enriquecido en tiamina y en esta parte del proceso se escogió al medio de cultivo 2 como uno de los medios eficientes para el desarrollo de *M. haemolytica* y producción de la leucotoxina.

En México varios autores (Jaramillo–Arango, Tavera, & Suárez–Güemes, 2009) mencionan que *M. haemolytica* es una bacteria calcio dependiente y que el hierro es fundamental para el desarrollo de la bacteria y sobre todo para la producción de la leucotoxina de interés. En esta investigación se demuestra que el calcio suministrado al medio de cultivo TPB en el medio de cultivo 6 tiene un desarrollo bacteriano óptimo y en el caso del medio de cultivo 5 el hierro es uno de los componentes esenciales para el desarrollo de la bacteria y la producción de la leucotoxina.

Se tomaron los viales de *M. haemolytica* que se encontraban conservados a -80°C en un tanque de nitrógeno, se los comenzó a descongelar sumergiendo los viales en alcohol al 70% hasta llegar a la temperatura ambiente del laboratorio. Se los reconstituyó exitosamente con cada uno de los medios de cultivo.

Se realizó un control de pureza mediante la tinción gram con la extracción de una muestra de cada medio de cultivo sembrado. Se observó que no hubo contaminación y que las cepas eran puras.

4.3 Producción a nivel de laboratorio, primera experimentación

La cinética de crecimiento de *M. haemolytica* se la desarrolla con un conteo de biomasa bacteriana a cada hora con el uso de la cámara de Neubauer. Se realizaron curvas de crecimiento para cada uno de los medios empleados (Figura 7).

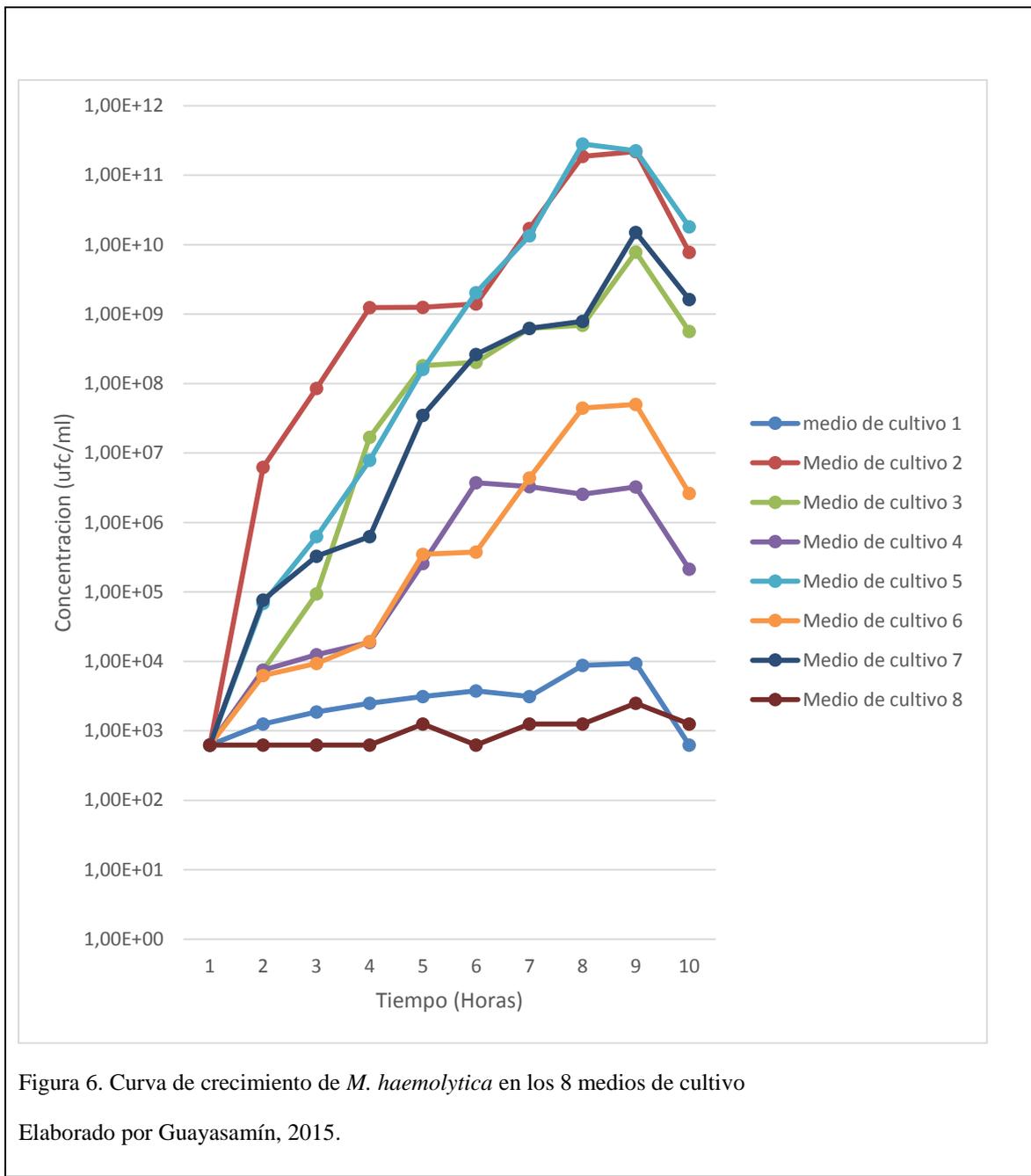


Figura 6. Curva de crecimiento de *M. haemolytica* en los 8 medios de cultivo

Elaborado por Guayasamín, 2015.

Prescott (2015) describe al efecto diaúxico como el crecimiento microbiano bifásico que tiene lugar cuando hay presencia de dos sustratos diferentes que pueden ser utilizados como fuente de carbono. Este tipo de crecimiento microbiano es debido a la utilización secuencial de las distintas fuentes de carbono. El metabolismo del microorganismo es selectivo para uno de los sustratos: primero utiliza el sustrato que permite un crecimiento más rápido y cuando este se agota comienza a metabolizar el otro. En la figura 6 podemos evidenciar este comportamiento de la tendencia de la curva de crecimiento para los

medios desde el 2 al 7 por poseer como fuentes de carbono a la dextrosa y triptosa. Mediante la matemática del crecimiento determinamos: número de generaciones, tasa específica de crecimiento, tiempo de generación y el área bajo la curva, los cuales se presentan en la tabla 4, para cada uno de los ocho medios de cultivo que se evaluaron.

Tabla 4. Resultados obtenidos en la primera experimentación a nivel de laboratorio.

Medio de cultivo	Número de generaciones	Tasa específica de crecimiento	Tiempo de generación	Área bajo la curva
1	3,91	0,27	2,56	61 111
2	28,38	1,97	0,35	766 751`111 667
3	23,58	1,63	0,42	17 445`736 111
4	12,34	0,86	0,81	23`528 333
5	28,42	1,97	0,35	944 729`656 111
6	16,29	1,13	0,61	179`496 111
7	24,52	1,70	0,41	31 148`493 889
8	2,00	0,14	5,00	17 222
Max	28,42	1,97	5,00	944 729`656 111
Min	2,00	0,14	0,35	17 222
Rango	2,00-28,42	0,14-1,97	0,35-5,00	17 222-944 729`656 111

Nota: Elaborado por: Guayasamín, 2015.

En la tabla se detallan rangos máximos y mínimos para el numero de generaciones, tasa específica de crecimiento, tiempo de generación y el valor del área bajo la curva Es por ello que con los resultados obtenidos se pudieron seleccionar las mejores 5 curvas de crecimiento, se pudo observar en base al área bajo la curva presentan mejor resultado

Se asignó en la tabla el color amarillo a los datos máximos y de color azul a los datos mínimos, esto se realizó para poder visualizar mejor las diferencias matemáticas entre cada medio de cultivo evaluado.

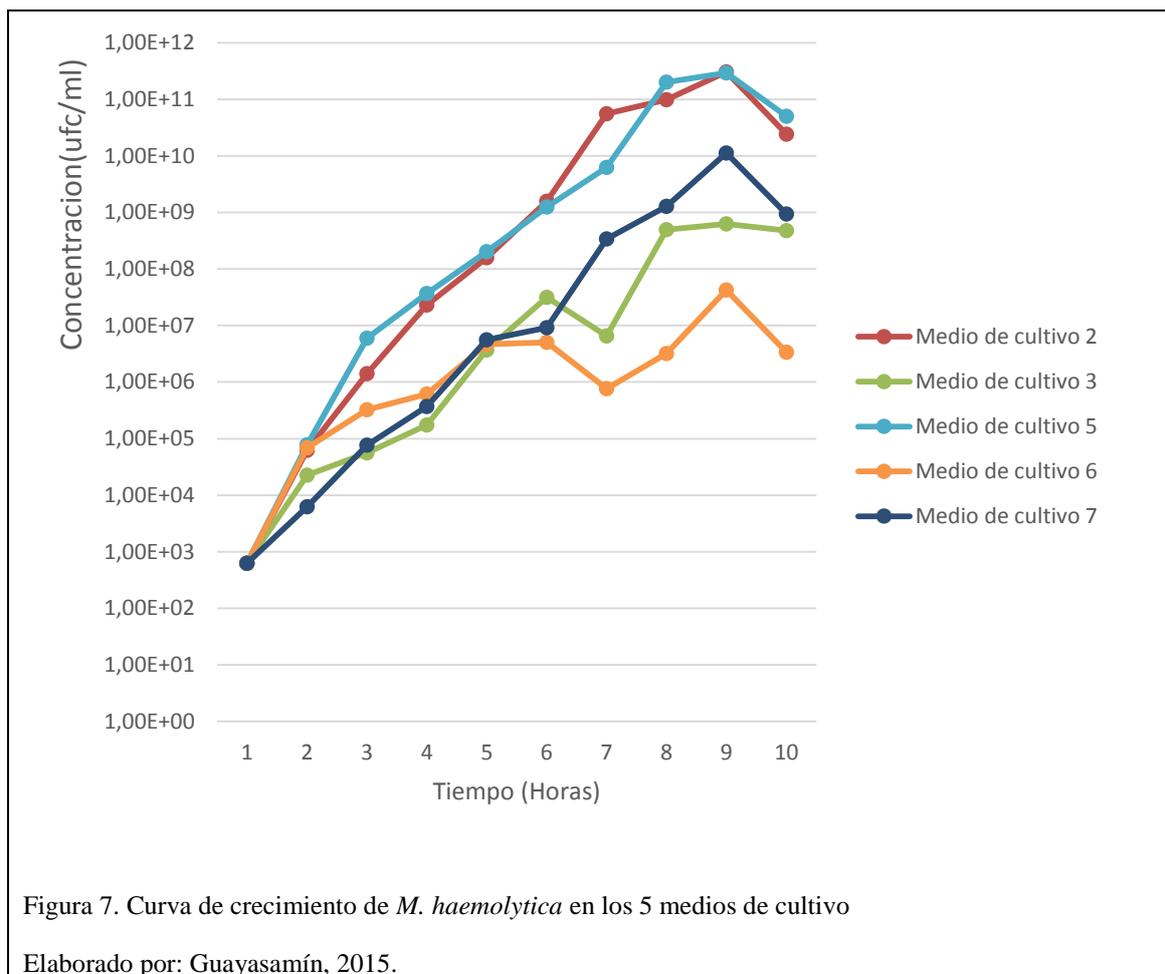
Los medios de cultivo 2, 3, 5, 6 y 7 de la tabla 4 presentan: áreas bajo la curva superiores a 170`000 000 unidades de área, números de generaciones son superiores a 15, tasa específica de crecimiento superiores a 1.0 y tiempo de generación menores a 1.0.

Los medios de cultivo uno, cuatro y ocho presentan: áreas bajo la curva menores a 24`000 000 unidades de área, número de generaciones menores a 13, tasa específica de crecimiento menores a 0.90 y tiempo de generación superiores a 0.80.

De esta primera experimentación a nivel de laboratorio con los ocho medios de cultivo se decide que los mejores medios por sus áreas bajo la curva para continuar con la investigación son los medios: 2, 3, 5, 6 y 7.

4.4 Segunda experimentación a nivel de laboratorio

Los medios de cultivo seleccionados para esta segunda experimentación fueron: 2, 3, 5, 6 y 7 los cuales expresan una curva de crecimiento como se ve en la figura 8



Los medios seleccionados: 2, 3, 5, 6 y 7 se los volvió a evaluar y en la tabla 4 se puede observar los resultados obtenidos.

Tabla 4. Resultados obtenidos en la primera experimentación a nivel de laboratorio.

Medio de cultivo	Numero de generaciones	Tasa específica de crecimiento	Tiempo de generación	Área bajo la curva
2	28,87	2,00	0,35	844 309`933 889
3	19,93	1,38	0,50	2 484`607 222
5	28,81	2,00	0,35	937 383`307 222
6	16,05	1,11	0,62	104`692 778
7	24,10	1,67	0,41	23728`250556

Max	28,87	2,00	0,62	937383`307222
Min	16,05	1,11	0,35	104`692778
Rango	16,05-28,87	1.11-2.00	0,35-0.62	104`692778-937383`307222

Nota: Elaborado por Guayasamín, 2015.

Con estos valores obtenidos demostramos que los medios de cultivo con mayor área bajo la curva son los medios de cultivo 2 y 5.

Los medios de cultivo dos y cinco en la tabla 4 presentan: áreas bajo la curva superiores a 800 000`000 000 unidades de área, números de generaciones superiores a 28, tasa específica de crecimiento 2.0 y tiempo de generación menores a 0.40.

Los medios de cultivo tres, seis y siete presentan: áreas bajo la curva menores a 24 000`000 000 unidades de área, número de generaciones menores a 25, tasa específica de crecimiento menores a 1.70 y tiempo de generación superiores a 0.40.

Es por ello que seleccionamos por tener las áreas bajo la curva más alta solo los medios de cultivo 2 y 5 para escalarlos a nivel industrial.

4.5 Tercera experimentación a nivel industrial

Una vez ya seleccionados los medios de cultivo dos y cinco en esta parte de la investigación ya se lo escala de 100 mL de escala de laboratorio a 8 L de medio de cultivo a escala industrial. En la tabla 7 observamos los resultados finales.

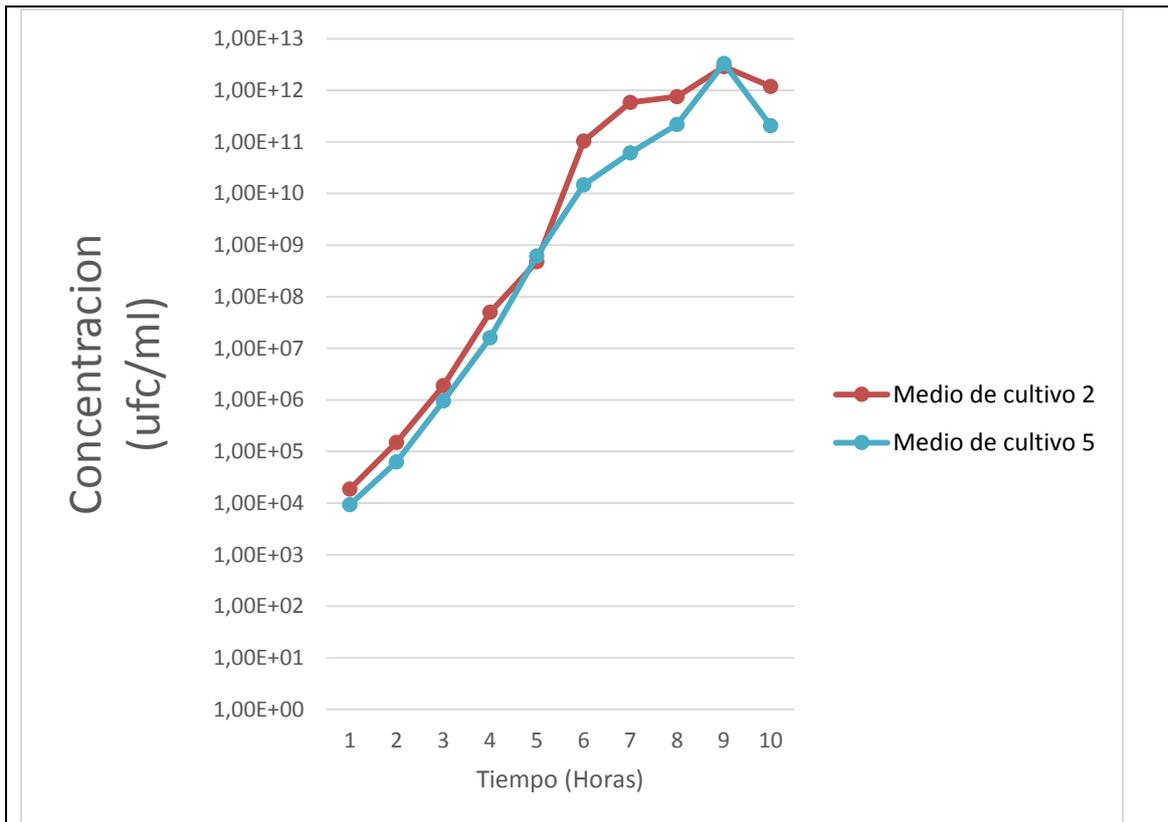


Figura 8. Curva de crecimiento de *M. haemolytica* de los 2 medios de cultivo

Elaborado por Guayasamín, 2015.

Mediante las gráficas de cada medio de cultivo vamos a poder determinar los valores medidos de: el área bajo la curva, la tasa específica de crecimiento, número de generaciones y tiempo de generación.

Estos valores medidos que los obtenemos de cada una de las gráficas de los 2 medios de cultivo se los expresa en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados obtenidos en la primera experimentación a nivel de laboratorio.

Medio de cultivo	Numero de generaciones	Tasa especifica de crecimiento(h-1)	Tiempo de Generación (h)	Área bajo la curva
2	27,19	1,88	0,37	8`721 604`904 444
5	28,40	1,97	0,35	6`597 563`586 111

Nota: Elaborado por Guayasamín, 2015.

Los valores de la desviación estándar y la media para los medios de cultivo dos y cinco se los obtuvo de las tres experimentaciones desde las dos etapas a nivel de laboratorio y de la etapa industrial.

Tabla 6. Desviación estándar de los 2 medios de cultivo en escala industrial

Medio de cultivo 5	Desviación St.	0,23	0,02	0,00
	Media	28,54	1,98	0,35
Medio de cultivo 2	Desviación St.	0,86	0,06	0,01
	Media	28,14	1,95	0,36

Nota: Elaborado por: Guayasamín, 2015.

Los medios de cultivo dos y cinco presentan: áreas bajo la curva superiores a 6`000 000`000 000 unidades de área, números de generaciones superiores a 27, tasa específica de crecimiento 2.0 y tiempo de generación menores a 0.40.

Con los valores de 28.40 de número de generaciones para el medio de cultivo 5 y por tener un tiempo de generación de 0.35 y una tasa específica de crecimiento de 1.97 este medio es el más adecuado para desarrollar *M. haemolytica* y producir leucotoxina en 10 horas de cinética de crecimiento en el Ecuador.

Los valores menores a 1 de la desviación estándar para los medios de cultivo dos y cinco nos demuestran que el modelo matemático es reproducible. La desviación estándar cuantifica el grado de dispersión de los puntos de los datos cerca de la media y es usada para establecer los límites en los que es determinada la aceptabilidad del resultado (Cooper, 1997), es por ello que el modelo matemático aplicado es el adecuado para poder reproducirlo a escala industrial.

4.6 Supervivencia de ratones

Se considera que a partir de la hora 9, inicia la fase de muerte bacteriana para el cultivo dos y cinco, dado que decae la concentración celular. En el medio de cultivo cinco también se aprecian el 100% de muertes en las horas ocho y nueve.

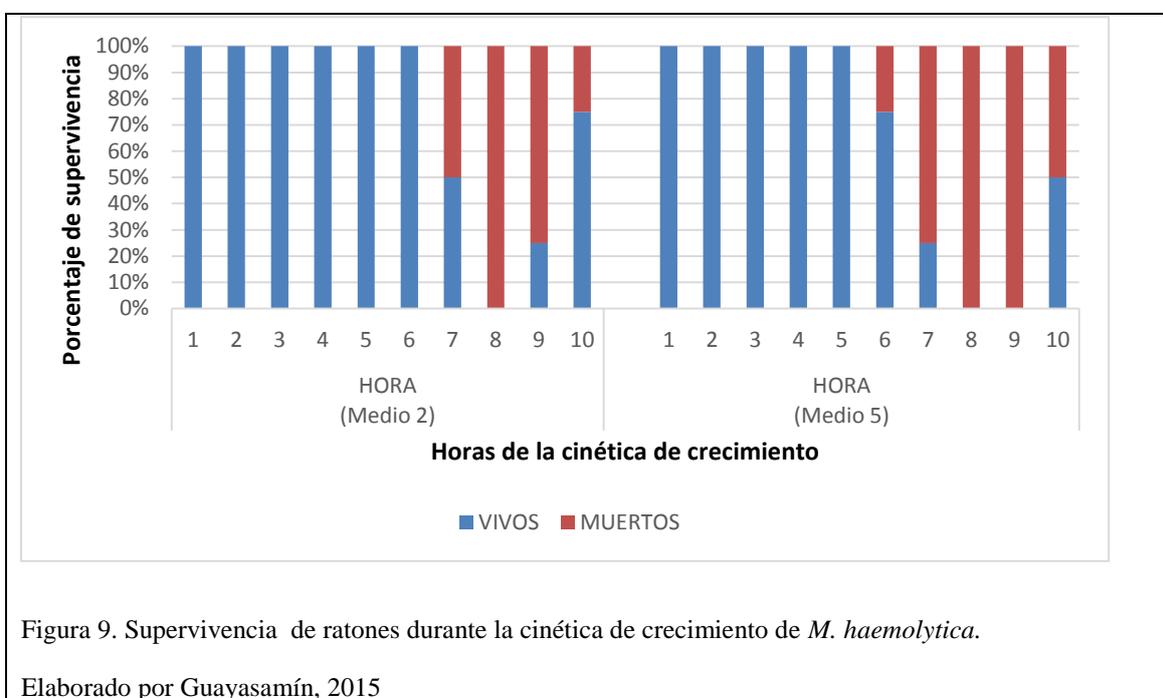


Figura 9. Supervivencia de ratones durante la cinética de crecimiento de *M. haemolytica*.

Elaborado por Guayasamín, 2015

Con esta grafica se logró evidenciar una variabilidad en la mortalidad de cada uno de los ratones utilizados en este experimento.

4.7 Reconocimiento del daño en órganos internos de los ratones

A todos los ratones se realizó necropsia para observar los órganos diana (corazón y pulmones) y su afectación por la presencia de la toxina, comparándola con el ratón testigo.

Los pulmones y corazón de un ratón muerto a partir de la octava hora de la cinética de crecimiento de los medios de cultivo 2 y 5, presentaron un claro ensanchamiento de pulmones y disminución del tamaño del corazón, determinando el daño de órganos diana de la *M. haemolytica* y por ello la presencia de la leucotoxina generada.

Desde la hora 9 y 10 ocurre la fase de muerte de la bacteria disminuyendo así la concentración de *M. haemolytica*. Es por ello que se considera que a partir de la hora 7 en adelante para los 2 medios de cultivo ocurre una posible degradación de la leucotoxina, esto se evidencia con la sobrevivencia de los ratones a partir de la hora 9 para el medio de cultivo 2 y la hora 10 para el medio de cultivo 5.

Se puede evidenciar que la concentración de *M. haemolytica* es directamente proporcional a la presencia de la leucotoxina.

CONCLUSIONES

El medio de cultivo más idóneo es el número 5 que en su formulación posee: TPB, Sulfato Ferroso y Tiamina, componentes idóneos para el desarrollo de *M. haemolytica*, comprobándose así que estos componentes son los que generan un desarrollo bacteriano adecuado y una producción de leucotoxina eficiente.

Los medios de cultivo 2 y 5 lograron cumplir con la etapa de transición desde la fase experimental de laboratorio a la fase de producción industrial evidenciándose así que la empresa auspiciante es eficiente para lograr desarrollar en el Ecuador *M. haemolytica* y producir leucotoxina en menos de 10 horas que dura la cinética de crecimiento, cabe recalcar que para la realización de este procedimiento se contó con la maquinaria adecuada de alta calidad y la correcta aplicación de las prácticas de manufactura y de producción.

La curva de crecimiento del medio de cultivo 5 presenta una fase de latencia muy corta desde el tiempo 0 hasta la hora 2 y desde la hora 2 inicia la fase exponencial y en la hora 5 se logra evidenciar el efecto diaúxico, desde la hora 6 hasta la 9 se desarrolla la fase estacionaria y es aquí que se evidencia la mayor producción de leucotoxina ya que la muerte de los ratones llega al 100% y por último ocurre la fase de muerte desde la hora 9 hasta la 10.

En los ratones usados en esta investigación se inyectó el sobrenadante libre de bacterias encontrados en los medios 2 y 5 evidenciando la presencia de la leucotoxina con su muerte y en la necropsia practicada después con el hinchamiento de los pulmones, a partir de la hora 8 el porcentaje de supervivencia disminuye hasta llegar al 25 % de muerte de los ratones, pudiendo determinar que la muerte puede producirse no solo por la leucotoxina sino por una infección bacteriana.

Con los valores de 28.40 de número de generaciones para el medio de cultivo 5 y por tener un tiempo de generación de 0.35 y una tasa específica de crecimiento de 1.97 este medio es el más adecuado para desarrollar *M. haemolytica* y producir leucotoxina en 10 horas de cinética de crecimiento en el Ecuador.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se recomienda la utilización del medio de cultivo de TPB comercial enriquecido con un suplemento de vitamina B para la producción de leucotoxina en lugar del medio de cultivo utilizado actualmente por la empresa en el Ecuador.

Para futuras investigaciones se debería considerar cuantificar la cantidad de leucotoxina producida con el medio de cultivo cinco en su fase exponencial para poder determinar porque a partir de la hora 8 el porcentaje de muerte decrece.

Se sugiere además, que en próximas investigaciones en las que sea la única opción el uso de animales, se tome en cuenta el número mínimo de individuos y que su tratamiento cause el menor dolor y sufrimiento del animal.

LISTA DE REFERENCIAS

- Ackermann, M., & Brogden, K. (2000). Response of the ruminant respiratory tract to Mannheimia (Pasteurella) haemolytica. *Microbes Infect*, 1079-1088.
- ALDRICH-SIGMA. (27 de 05 de 2015). *SIGMA ALDRICH*. Obtenido de SIGMA ALDRICH: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/mem-media.html>
- Almada, A. (noviembre de 2012). Mayor eficacia en el control de las enfermedades clostridiales de los bovino. (R. V. Argentina, Entrevistador)
- Alvarez, D. J. (2007). Muerte subita asociada a pasteurelosis neumonica en bovinos. *INIFAP*, 1-10.
- Alvarez, J., & Medellín, R. (2005). *Mus Musculus Linnaeus. Vertebrados Superiores Exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales*. México: Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Angen O., M. R. (2003). Taxonomic relationships of the (pasteurella) maemolytica complex as evaluated by dna-dna hybridizations and 16s rrna sequencing. *Syat Bacteriol*, 67-86.
- Anim Health Res. (2007). Mannhenmia haemolytica and bovine respiratory disease. *Anim Health Res*, 117-128.
- Área de Docencia de Salud Pública. (2013). Manual de prácticas de laboratorio de Bacteriología y Microbiología. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7-8.
- Arévalo, A. R., Llanos, A. C., & Flores., J. V. (2003). Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo. *Revista Mexicana de Ingenieria Biomédica*, 57-58.
- ATCC. (28 de 05 de 2015). *ATCC*. Obtenido de ATCC: <http://www.atcc.org/~media/E37E0A84F5F84D938566B185E8CBC9F9.ashx>

- BD Diagnostic Systems. (15 de 07 de 2015). *Bd*. Obtenido de Bd Web site: <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/BA/ES-BA-257107.pdf>
- Bencomo, A. B. (2010). *Manejo sanitario eficiente del ganado bovino: Principales enfermedades*. Nicaragua: INTA-PESA.
- Borsella, M. G. (2006). Neumonías y prevención. *Producir XXI 14*, 33-36.
- Boyce J, L. R. (2004). Pathogenesis of bacterial infectious in animals. *Blackwell Publishing*, 273-294.
- Casella, A. (2002). Neumonía Complejo respiratorio bovino. *Elanco en el campo*, 50-52.
- Casella., A. (2005). Enfermedad respiratoria bovina (ERB). *Enf. infecciosas: bovinos en genera*, 5-7.
- Centro Nacional de Productos Biológicos Instituto Nacional de Salud. (2008). *Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: raton*. Perú: Instituto Nacional de Salud.
- Colectivo de autores. (2004). Microbiología Veterinaria. *Ed. pueblo y educacion*, 46-60.
- Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. (2004). Inmunidad contra la leucotoxina de *pasteurella haemolytica*. *Espatentes*, 1-5.
- Constitución de la República, R.O. 449 (Asamblea Nacional Constituyente 20 de octubre de 2008).
- Coote., J. (2002). Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol*, 137-161.
- Curell Suñol, M. (16 de julio de 2004). *Inmunidad contra la leucotoxina de Pasteurella haemolytica*. Obtenido de http://www.oepm.es/pdf/ES/0000/000/02/21/19/ES-2211982_T3.pdf

- Desmecht, L. Z. (2004). How mannheimia haemolytica defeats host defence through a kiss mechanism. *Department of pathology, faculty of veterinary medicine, university of liege*, 133-156.
- EcuRed. (2014). *Pasteurella*. Obtenido de EcuRed: <http://www.ecured.cu/index.php/Pasteurella>
- Galazka, A. (2000). The Immunological Basis for Immunization Series. *World Health Organization*, 191-207.
- Gamazo, C., Sánchez, S., & Camacho., A. I. (2013). *Microbiología basada en la experimentación*. Barcelona-España: ELSEVIER.
- Gasque, R. (2008). Enciclopedia Bovina. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina. *Enciclopedia Bovina*, 50-63.
- Gentry, M. (1986). Evaluación de la protección contra la pasteurelosis neumónica, en corderos vacunados con diferentes antígenos de Pasteurella haemolytica A1. *Medigraphic*, 763-772.
- Gentry, M. J., Confer, A. W., Weinberg, E. D., & Homer, J. T. (2003). Cytotoxin (leukotoxin) production by Pasteurella haemolytica: requirement for an iron-containing compound. 1919-1925.
- Godia, F., & Lopez., J. (2000). *Ingeniería Bioquímica*. Madrid-España: Síntesis.
- Guemes, C. J. (2010). Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. bovine mannheimiosis etiology prevention and control. *Universidad Nacional Autónoma de México DF.*, 50-62.
- Guillespie SH, H. P. (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology. En H. P. Gillespie SH, *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* (págs. 273-279). England: John Wiley & Sons, Ltd.
- Hernandez, R., Samaniego, M. L., Contreras, J., Jaramillo-Arango, C., Aguilar, F., & Vazquez, J. (2007). Resistencia a antimicrobianos en cepas de mannheimia

haemolytica aisladas de exudado nasal de bovinos productores de leche. *Redalyc.org*, 420-423.

HIGHLANDER SK. (2001). Molecular genetic analysis of virulence in Mannheimia (Pasteurella) haemolytica. . En H. SK., *Molecular genetic analysis of virulence in Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. (págs. 1128-1150). Biosci.

Highlander Sk., F. N. (2002). La inactivación de la leucotoxina de Pasteurella (Mannheimia) haemolytica causa atenuación parcial de la virulencia en un modelo de desafío en terneros. *Inactivation of Pasteurella (Mannheimia) haemolytica leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model*, 3916-3922.

Highlander, S. K., & Fedorova, N. D. (julio de 2000). *La Inactivación de la Leucotoxina de Pasteurella (Mannheimia) haemolytica Causa Atenuación Parcial de la Virulencia en un Modelo de Desafío en Terneros*. Obtenido de Laboratorios BAGÓ: <http://www.bago.com/bago/bagoarg/biblio/neumo58web.htm>

Jaramillo, C. J., Trigo, F., & Suárez., F. (2009). Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *SCIELO*, 20-23.

Javier Diéguez Casalta; M. Luisa Sanjuán Hernán-Pérez; Eduardo Yus Respaldiza. (2003). *Infecciones respiratorias bovinas: etiología, epidemiología y cuadro clínico*. Compostela: Unidad de Epidemiología y Sanidad Animal, Fac. de Veterinaria, Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios, Universidad de Santiago de Compostela.

Jawetz A., M. B. (2004). Exotoxinas Bacterianas. *Microbiología Medica*, 40-53.

Koneman, E. (2008). *Diagnostico Microbiologico: Texto y Atlas en color*. Bogotá: Médica Panamericana.

Laboratorios Britania. (17 de 05 de 2015). *Britania laboratorios*. Obtenido de <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/triptfosfatocaldo.htm>

Lobo, E. (2007). Sistemas de calidad en vacunas veterinarias . *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*. ISSN 1695-7504 , 1-2.

- Lomonte, B. (2005). Electroforesis en gel de poliacrilamida. *Inmunología general: Manual de laboratorio*, 92-101.
- M. Dirksen, G. G. (2005). *Medicina Interna y Cirugía del Bovino*. Buenos Aires: Intermedica.
- Madigan M.T, M. J. (2008). Principios de enfermedad y epidemiología y mecanismos de patogenicidad microbiana. *Biología de los microorganismos Facultad de farmacia UCV* , 220-234.
- Madigan, M., Martingo, J., & Parker., J. (2004). *Biología de los Microorganismos*. Brock.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark., D. (2009). *Brock Biología de los Microorganismos*. Sevilla: Pearson Educación S.A.
- Malbran, C. (2006). *Identificación, biotipificación y caracterización de cepas de pasteurella multocida aisladas en la argentina*. Buenos aires: Revista argentina de microbiología.
- Manual de la OIE. (2008). Principios de producción de vacunas veterinarias. En OIE, *Manual de la OIE sobre animales terrestres* (págs. 20-23). España: OIE.
- Ministerio de Salud del Perú. (2008). *Guía de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio: Ratón*. Lima: Instituto Nacional de Salud.
- Moore, D. (2005). Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación Bovine neosporosis: general concepts, immunity and perspectives for vaccination. *WorldWideScience.org*, 12-15.
- Morales, J. F. (2000). *Muerte Súbita Asociada a Pasteurelosis Neumónica en Bovinos*. Obtenido de Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal. INIFAP. México:
<http://www.miagropecuaria.com/publicaciones/pfizerasteurelosismuertesubita.pdf>

- Narayanan S., Nagaraja T., Chengappa M., Stewart G.. (2002). Leukotoxins of gram-negative bacteria. En N. T. Narayanan S., *Leukotoxins of gram-negative bacteria*.(págs. 337-356). Vet Microbiol.
- Ospina, M. J., Castaño, R. T., & Zapata., J. C. (2011). *Manual Práctico de Microbiología General*. Manizales-Colombia: Universidad de Caldas.
- Pérez, R. G., & Peris, M. d. (2002). *Microbiología, Bacteriología, Medios de Cultivo, Pruebas Bioquímicas, Microbiología y parasitología General*. España: Paraninfa.
- Pietrasanta, L., & Bilderling., C. V. (12 de 07 de 2015). *Catalina TBM*. Obtenido de Users.df.uba.ar: http://users.df.uba.ar/catalina/TBM/TBM_lab04.pdf
- Pita Fernández, S., Pértega Díaz, S.,. (2010). Significancia estadística y relevancia clínica. *Fisterra.com*, 3-5.
- Prescott. (2008). *Microbiología*. Madrid: Mc Graw Hill.
- Ramos, D., Moroni, H., Martínez, E., & Mendoza, A. (2010). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Patógeno importante en la periodontitis. *Odontol. Sanmarquina*; 13(2), 42-45.
- Ruelas, R. C. (2010). Administración de medicamentos y recomendaciones sanitarias prácticas. En R. C. Ruelas, *Manejo sanitario del ganado* (págs. 13-16). México Sonora: INIFAP.
- Scicchitano, D. S. (2002). Neumonía bacteriana en terneros. *Marca Líquida Agropecuaria*, 20-22.
- SENPLADES. (2013). *Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017*. Quito: SENPLADES.
- SIGMA-ALDRICH. (27 de 05 de 2015). *SIGMA-ALDRICH*. Obtenido de SIGMA-ALDRICH:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t9157?lang=en®ion=E>

Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología. Universidad Central de Caracas Venezuela*, 33-35.

UNAD Colombia. (octubre de 2010). *Tipos de biorreactores*. Obtenido de Universidad Nacional Abierta y a Distancia:
<http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201010/Reactores.pdf>

Universidad de Chile, B. D. (12 de 07 de 2015). *Untitled Document*. Obtenido de Mazingher.sisib.uchile.cl:
http://mazingher.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/cide02/capitulo02/09a.html

Universidad del País Vasco. (21 de enero de 2015). *Patogenia Bacteriana*. Obtenido de Campus Virtual Birtuala:
http://cvb.ehu.es/open_course_ware/castellano/salud/tecnicasmol/tema-4-patogenia-bacteriana.pdf

Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. (2010). *Exotoxinas bacterianas*. Obtenido de Facultad de Ciencias Veterinarias:
<http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Departamentos/Samp/Microbiologia/TOXINAS%20BACTERIANAS.pdf>

vacunas, V. d. (01 de 03 de 2000). *Vaccimonitos*. Obtenido de Scielo:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2000000100004&lng=es&nrm=iso

Walker, J., & Gingold., E. (2009). *Biología Molecular y Biotecnología*. Zaragoza: Acribia.

ANEXOS

Anexo 1. Control de pureza de *Mannheimia haemolytica* semillas de trabajo

Materiales y equipos

- Vial de semilla de trabajo
- TPB
- Alcohol al 70 %
- Tubos de ensayo estéril.
- Equipo de centrifugación
- Balanza manual
- Cabina de bioseguridad 2
- Isopo
- Porta objetos
- Mechero
- Microscopio óptico
- Kit de tinción gram

Procedimiento

Para este control se reconstituye un vial de las semillas de trabajo con TPB y se lo llevo de -80 °C a temperatura ambiente con la ayuda del alcohol al 70 %. Una vez reconstituido el vial y temperado con el medio de cultivo, se toma 1 ml dispensándolo en un tubo de ensayo estéril. A esta muestra se la centrifuga a 3000 rpm por 5 minutos para que la centrifuga marca BECKMAN Model TJ-6 Centrifuge se procedió de la siguiente manera:

- El tubo de ensayo estéril que contiene la muestra se lo peso en la balanza OHAUS TRIPLE BEAM BALANCE poniendo a otro tubo de ensayo con el mismo volumen dentro de los recipientes porta muestra de la centrifuga, volviéndolos a pesar a los recipientes, esto se realiza para que al momento de acoplar al sistema de la centrifugadora no haya desbalances y este equilibrado el peso de las 2 partes de la centrifuga.

- Una vez determinado el peso correcto de los recipientes y balanceada la centrifuga se inicia el proceso.
- Terminada la centrifugación de la muestra se observa claramente el soma bacteriano en el fondo del tubo de ensayo.
- Dentro de la cabina de bioseguridad 2 y con una pipeta estéril se retira el sobrenadante dejando al soma bacteriano intacto en la parte inferior del tubo de ensayo.
- Con un Isopo estéril se toma en la punta del mismo con mucho cuidado todo el soma bacteriano.
- Una vez cargado el Isopo se realiza un frotis sobre una porta objetos desde el centro hacia los bordes de la porta objeto en forma circular.
- Seca la muestra sobre la porta objetos se realiza una tinción gran.

Con este tipo de muestreo se logra observar muy claramente al soma bacteriano sin errores de tinción determinando que el cultivo está en condiciones pura y se procede a conservar mediante cryobak y TPB más glicerina al 1:1.

Anexo 2. Reconstitución de viales de trabajo y prueba en medios de cultivo experimentales

Materiales y equipos

- L-Glutamina sintética
- Magnesio sulfato de 7H₂O
- MEM
- L-cisteína
- Sulfato ferroso 7H₂O
- Sulfato de manganeso H₂O
- Clorhidrato de tiamina (vit B1)
- Cloruro de sodio
- Triptosa
- Extracto de levadura
- Dextrosa mono hidrato
- Sodio bicarbonato
- TPB
- Hierro
- Calcio
- Tiamina
- BHI
- Balanza electrónica
- Frascos de vidrio
- Autoclave
- Cabina de bioseguridad 2
- Incubadora 2
- Millex 0,22
- Jeringuilla de 20 ml.
- Vial de semilla de trabajo.
- Alcohol al 70 %
- Equipo de bioseguridad personal
- Microscopio óptico

- Cámara de Hausser scientific
- Porta y cubre objetos
- Aceite de inmersión
- Kit de tinción gram.
- Isopos
- Cajas petri con agar sangre

Procedimiento

En busca de un medio de cultivo ideal se realiza una experimentación a baja escala, mediante la bibliografía le ida se detectan varios elementos en las formulaciones para potenciar el crecimiento de *Mannheimia Haemolytica* y la producción de la leucotoxina de interés.

Anexo 3. Actividades previas a la inyección intraperitoneal

Se puede observar cómo se debe realizar la sujeción del ratón y el equipo de bioseguridad que se debe usar, todo bajo las normas de producción y manufactura adecuados, en la gráfica adjunta se observa el resultado de la inyección a los ratones, en estos 4 ratones representa el 100% de efectividad de esa hora del medio de cultivo porque cada ratón representa el 25% de la experimentación.

Registro fotográfico de las actividades previas a la inyección intraperitoneal a ratones



Anexo 4. Resultados de la selección del medio de cultivo eficiente precursor de la generación de leucotoxina.

Registro fotográfico de la prueba en medios de cultivo



Fuente: la investigación.

Elaborado por: Guayasamín, 2015.

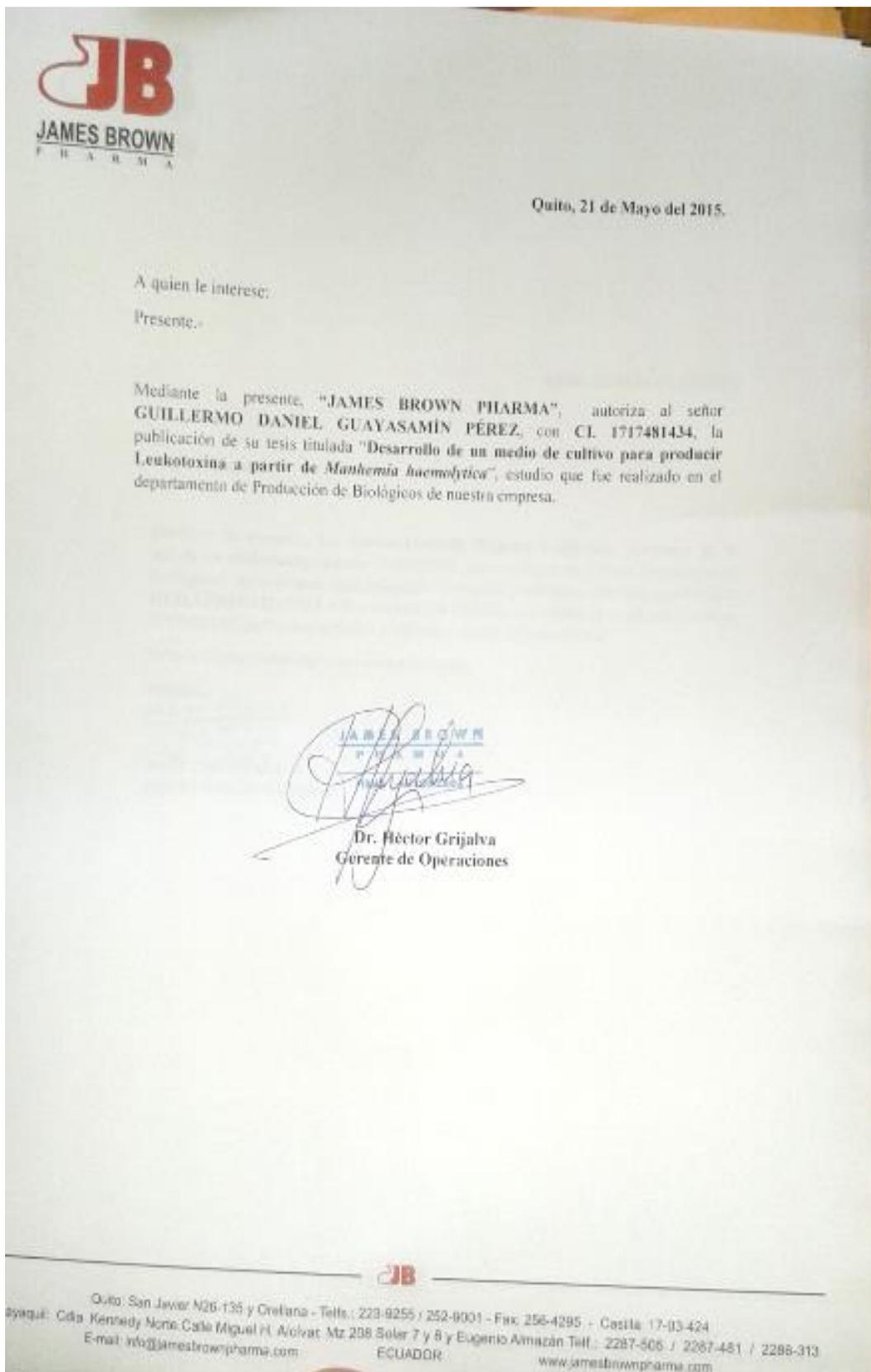
Se observa a pequeña escala la formulación de los medios de cultivo eficaces y en los birreactores el escalamiento a la industrialización que se observa el medio de cultivo enriquecido con hierro y ala derecha el medio de cultivo enriquecido con el complejo vitamínico B,

Anexo 5. Preparación de Frotis Fijos para Tinciones:

Realizar un frotis fijo de cada uno de los cultivos proporcionados. b) Utilizar laminillas limpias y marcadas para su identificación, con el lápiz grasoso marcar el área donde se va a colocar la muestra. c) La metodología para realizar el frotis bacteriano dependerá si el cultivo se encuentra en medio sólido o líquido. a) Cultivo en líquido: con un asa bacteriológica previamente flameada y fría, se introduce en el cultivo bacteriano se coloca en el portaobjetos y se difunde en el área marcada y se fija al calor. b) Cultivo en medio sólido: se coloca una gota de agua destilada estéril en el portaobjetos, se recolecta una colonia de medio sólido y se mezcla, realizando un extendido uniforme. Se debe extender la gota sobre el portaobjetos de forma que el resultado sea una capa fina. Debe evitarse preparar un frotis demasiado grueso. e) Dejar secar las preparaciones (frotis) a temperatura ambiente. f) Cuando se haya secado el frotis pasar el portaobjetos por la llama del mechero con la capa del frotis hacia arriba, no aplicar calor en forma excesiva ya que estropearía la morfología normal y la estructura de los microorganismos que se van a teñir. Procedimiento para la tinción de Gram:

1. Preparar frotis fijos a partir de cada uno de los cultivos bacterianos
2. Agregar sobre la preparación cristal violeta durante 30 segundos.
3. Lavar con agua destilada
4. Añadir lugol durante 30 segundos.
5. Lavar con agua destilada 11/52 Manual de Prácticas de Laboratorio Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Subdirección Académica Área de Docencia de Salud Pública
6. Decolorar con alcohol-cetona por 5 a 10 segundos.
7. Lavar con agua destilada
8. Agregar safranina durante 30 segundos. 9. Lavar, secar y observar al microscopio con aceite de inmersión y con el objetivo de 100X (Área de Docencia de Salud Pública, 2013, págs. 7-8).

Anexo 6. Cartas de la empresa James Brown Pharma



Quito, 21 de Mayo del 2015.

A quien interese:

Mediante la presente, Yo, Carlos Oswaldo Palacios Valdivieso, portador de la cédula de ciudadanía número 1713920781, en mi calidad de Jefe de Producción de Biológicos; certifico que: "Los ensayos realizados y los datos obtenidos por el señor GUILLERMO DANIEL GUAYASAMIN PÉREZ, con cédula de ciudadanía número 1717481434 fueron desarrollados y obtenidos dentro de nuestra área.

Es todo cuanto puedo decir en honor a la verdad.

Saludos,

JAMES BROWN
PHARMA

Carlos Palacios
Médico Carlos Palacios
Jefe del Área de Biológicos