



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**FORMULACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO,
ENRIQUECIDO PARA EL CRECIMIENTO DE *Avibacterium
paragallinarum* CON EL FIN DE PRODUCIR LA VACUNA
CONTRA LA CORIZA INFECCIOSA, EN LA FARMACÉUTICA
FARBIOVET S.A.**

Trabajo de Investigación (Graduación), Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI) presentado como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Santiago Toapaxi Mayorga

Tutora: Ing. Ana Alfaro

Ambato – Ecuador

2012

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor del Trabajo de Investigación (Graduación) sobre el tema: **“FORMULACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO, ENRIQUECIDO PARA EL CRECIMIENTO DE *Avibacterium paragallinarum* CON EL FIN DE PRODUCIR LA VACUNA CONTRA LA CORIZA INFECCIOSA, EN LA FARMACÉUTICA FARBIOVET S.A.”**, elaborado por Eduardo Santiago Toapaxi Mayorga, egresado de la Carrera de Ingeniería Bioquímica, de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, certifico que el trabajo fue realizado por la persona indicada en la Farmacéutica FARBIOVET S.A.

Considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, Septiembre del 2012

.....
Ing. Ana Alfaro
TUTORA

AUTORÍA

El presente trabajo de investigación: “**FORMULACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO, ENRIQUECIDO PARA EL CRECIMIENTO DE *Avibacterium paragallinarum* CON EL FIN DE PRODUCIR LA VACUNA CONTRA LA CORIZA INFECCIOSA, EN LA FARMACÉUTICA FARBIOVET S.A.**”, es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido, efectos legales y académicos que se desprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Ambato, Septiembre del 2012

.....
SANTIAGO TOAPAXI MAYORGA

CI: 180447431-8

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Septiembre del 2012

Para constancia firman:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

A mi Virgencita de Guadalupe, por haberme escuchado todo lo que le he pedido y haberme concedido.

A mis padres, Juanita y Gilmar, por ser mis pilares fundamentales y ejemplo a seguir durante toda mi vida y por ser las personas que más amo en la vida.

A mi hermana, Giovy, por estar conmigo siempre apoyándome y ser mi mejor amiga.

A un ser muy especial en mi vida, Valentino, mi perro, porque fue mi mejor y más fiel amigo y llenarme de mucha felicidad durante todo el tiempo que ha estado conmigo, pero que lamentablemente partió antes de verme graduado.

Santiago Toapaxi Mayorga

AGRADECIMIENTO

A Dios y a la Virgen de Guadalupe por haberme guiado durante toda mi vida por un buen camino.

A mis padres, Juanita y Gilmar, por brindarme su apoyo durante toda mi vida, por darme los mejores consejos en todo momento y sobre todo por portarse conmigo como verdaderos amigos y confiar en mí.

A mi ñaña, Giovy, porque aparte de ser mi hermana es mi amiga y junto a ella hemos vivido momentos de felicidad y tristeza, pero sin embargo, hemos logrado salir adelante sin darnos por vencidos.

A mis abuelitos: Yoly, Papi Abel, Papi Lulo y Mami Eva; a mis tíos: Carmen, Myriam y Vinicio y a mis primos, por estar conmigo en todos los momentos en los que los he necesitado, teniendo en ellos un gran apoyo.

Un agradecimiento muy especial a mis tíos: Rocío y Galo, por apoyarme en gran parte en la realización de mi tesis.

A FARBIOVET S.A. por abrirme sus puertas y permitirme realizar la tesis en sus instalaciones, además de irme formando en el campo profesional, en especial al Dr. Sebastián Coronel, al Q.F. Raúl Defaz y al Ing. Daniel García; por haber compartido sus conocimientos y ayudado en la elaboración de mi tesis, además por brindarme su amistad.

A mis súper amigos: Viole, Vero, Patty, Dianita, Sil, Lore, Belén, Adry P., Cris F. y en especial a mis cuates del alma: Vana, Silvita, Criss Ch. y Marin; con los cuales he vivido experiencias inolvidables, que siempre han estado conmigo en las buenas y en las peores y sobre todo han soportado todas mis locuras y ocurrencias con las cuales les he sacado una sonrisa o una lágrima, pero sobre todo aprendimos lo que es el verdadero valor de la amistad.

A mi Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos que durante 4 años y medio me soportaron y se convirtieron en mi segundo hogar. A aquellos maestros que cada semestre compartieron sus conocimientos sabios e intercambiaron sus ideas, dando lo mejor de ellos para que seamos buenos profesionales, en especial a la Ing. Ana Alfaro por ayudarme en la elaboración de este trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

A. PÁGINAS PRELIMINARES

TEMA	i
APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS EN ANEXOS	xiii
RESUMEN	xviii

B. TEXTO: INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de Investigación	1
1.2 Planteamiento del Problema	1
1.2.1 Contextualización	1
1.2.1.1 Macro	1
1.2.1.2 Meso	2
1.2.1.3 Micro	3
1.2.2 Análisis Crítico	4
1.2.3 Prognosis	5
1.2.4 Formulación del Problema	6
1.2.5 Preguntas Directrices	6
1.2.6 Delimitación del Objeto de Investigación	6
1.3 Justificación	7
1.4 Objetivos	7
1.4.1 Objetivo General	7
1.4.2 Objetivos Específicos	7

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos	9
2.1.1 Historia	9
2.1.2 Etiología	9
2.1.3 Identificación de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	10
2.1.3.1 Características Morfológicas	10
2.1.3.2 Propiedades Fisiológicas	12
Tabla 1. Clasificación de los microorganismos según el metabolismo	12
2.1.3.3 Propiedades Bioquímicas	14
Tabla 2. Propiedades bioquímicas de <i>A. paragallinarum</i> y Otras bacterias Gram negativas patógenas para las aves	14
Tabla 3. Características bioquímicas de <i>A. paragallinarum</i>	16
2.1.3.4 Mantenimiento	16
2.1.3.5 Reclasificación de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	17
Gráfico 1. Relaciones taxonómicas y filogenéticas de <i>Avibacterium</i>	17
2.1.3.6 Clasificación serológica	18
Tabla 4. Serotipos reconocidos actualmente de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	19
2.1.4 <i>Avibacterium paragallinarum</i> agente causal de Coriza Infecciosa	20
2.1.5 Nutrición Microbiana	21
2.1.6 Medios de Cultivo	21
Tabla 5. Compuestos orgánicos de los principales elementos constituyentes de las células microbianas	22
Tabla 6. Clasificación de los medios de cultivo según Varios criterios	23
2.1.6.1 Medios de cultivo Enriquecidos	23
2.1.6.2 Medios de cultivo en los que se desarrolla <i>Avibacterium paragallinarum</i>	24
2.2 Fundamentación Filosófica	25
2.3 Fundamentación Legal	26
2.4 Categorías Fundamentales	27
2.4.1 Marco Conceptual de la Variable Independiente	27
2.4.2 Marco Conceptual de la Variable Dependiente	28
Gráfico 2. Curva de crecimiento microbiano	30
2.5 Hipótesis	31
2.5.1 Hipótesis nula	31
2.5.2 Hipótesis alternativa	31
2.6 Señalamiento de variables de la hipótesis	31

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Enfoque	32
3.2 Modalidad básica de la investigación	32
3.3 Nivel o tipo de investigación	32
3.4 Población y muestra	33
3.4.1 Diseño Experimental	33
Tabla 7. Factores de Estudio	33
Tabla 8. Tratamientos de Estudio	34
3.5 Operacionalización de variables	35
Tabla 9. Operacionalización de variables	35
3.6 Recolección de información	36
3.6.1 Aislamiento y purificación de las cepas de <i>A. paragallinarum</i>	36
3.6.1.1 Tinción Gram	38
3.6.1.2 Determinación de las características morfológicas	38
3.6.1.3 Siembra en estría compuesta	38
3.6.2 Determinación de las características bioquímicas de <i>A. paragallinarum</i>	39
3.6.2.1 Preparación de la galería API NH	39
3.6.2.2 Preparación del inóculo	39
3.6.2.3 Inoculación de la galería	39
3.6.2.4 Lectura de la galería	40
3.6.3 Optimización del crecimiento de <i>A. paragallinarum</i>	41
3.6.3.1 Experimento preliminar	41
3.6.3.1.1 Cuantificación de la biomasa producida	41
3.6.3.2 Preparación del medio líquido	43
3.6.3.2.1 Fuentes del factor V (NAD)	44
3.6.3.2.2 Fuentes del factor X (hemina)	44
3.6.3.2.3 Concentración de Cloruro de Sodio (NaCl)	45
3.6.3.3 Inoculación de <i>A. paragallinarum</i>	45
3.6.4 Determinación de la cinética de crecimiento	46
3.7 Procesamiento y análisis	46
3.7.1 Características bioquímicas de <i>A. paragallinarum</i>	46
3.7.2 Elaboración de curvas de crecimiento	47
3.7.3 Determinación del mejor medio de cultivo líquido enriquecido	47

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Análisis de los resultados	48
4.1.1 Aislamiento y purificación de las cepas de <i>A. paragallinarum</i> serotipo A	48
4.1.1.1 Tinción Gram	48
4.1.1.2 Determinación de las características morfológicas	48

4.1.1.3 Siembra en estría compuesta	49
4.1.2 Determinación de las características bioquímicas de <i>A. paragallinarum</i>	49
4.1.3 Optimización del crecimiento de <i>A. paragallinarum</i>	49
4.1.3.1 Experimento preliminar	49
4.1.3.1.1 Preparación del medio líquido y Cuantificación de la biomasa producida	50
4.1.4 Crecimiento de <i>A. paragallinarum</i> en el medio de cultivo de la farmacéutica FARBIOVET S.A.	52
4.1.5 Determinación del mejor medio de cultivo	52
4.1.6 Cinética de crecimiento	56
4.1.6.1 Curvas de Crecimiento	57
4.2 Interpretación de Datos	58
4.2.1 Aislamiento y purificación de las cepas de <i>A. paragallinarum</i> serotipo A	58
4.2.2 Determinación de las características bioquímicas de <i>A. paragallinarum</i>	59
4.2.3 Optimización del crecimiento de <i>A. paragallinarum</i> serotipo A	59
4.2.4 Cinética de Crecimiento	63
4.2.4.1 Curvas de Crecimiento	65
4.3 Verificación de Hipótesis	66

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones	67
5.2 Recomendaciones	69

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1 Datos Informativos	71
6.2 Antecedentes de la Propuesta	71
6.3 Justificación	73
6.4 Objetivos	74
6.4.1 Objetivo General	74
6.4.2 Objetivos Específicos	74
6.5 Análisis de Factibilidad	74
6.6 Fundamentación	75
6.6.1 Biorreactores	75
6.6.1.1 Sistemas de cultivo	76
Gráfico 3. Esquema de un biorreactor con indicación de	76

los caudales y concentraciones a la entrada y a la salida	
6.6.1.1.1 Biorreactor tipo Batch	77
6.7 Metodología	77
Tabla 14. Modelo Operativo (Plan de acción)	78
6.8 Administración	79
Tabla 15. Administración de la propuesta	79
6.9 Previsión de la evaluación	80
Tabla 16. Previsión de la evaluación	80

C. MATERIALES DE REFERENCIA

1. BIBLIOGRAFÍA	81
2. ANEXOS	88

ANEXOS

ANEXO A: TABLAS DE METODOLGÍA

ANEXO B: TABLAS DE RESULTADOS

Valores de absorbancia y concentración celular (UFC/ml)
Pruebas API NH
Cinética de Crecimiento

ANEXO C: GRÁFICOS

Curvas de Crecimiento
Curva de McFarland
Parámetros cinéticos de los tratamientos

ANEXO D: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

ANEXO E: NORMAS PARA EL REGISTRO, CONTROL,
COMERCIALIZACIÓN Y USO DE PRODUCTOS
VETERINARIOS

ANEXO F: FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS EN ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

ANEXO A

TABLAS DE METODOLOGÍA

Tabla A-1. Reactivos de la galería API NH.

Tabla A-2. Escala de McFarland.

Tabla A-3. Formulación del medio de cultivo de la farmacéutica FARBIOVET S.A.

Tabla A-4. Tabla de lectura de las pruebas API NH.

ANEXO B

TABLAS DE RESULTADOS

Valores de absorbancia y concentración celular (UFC/ml)

Tabla B-1. Valores de absorbancia. Experimento preliminar – Crecimiento *A. paragallinarum*.

Tabla B-2. Curva de McFarland.

Tabla B-3. Valores de Absorbancia. Crecimiento de *A. paragallinarum*.

Tabla B-4. Número aproximado de UFC/ml en los 24 medios de cultivo a diferentes tiempos.

Tabla B-5. Valores promedio de UFC/ml en los 24 medios de cultivo formulados.

Tabla B-6. Valores promedio de concentración celular (UFC/ml) en la fase estacionaria.

Tabla B-7. Valores de Absorbancia. Crecimiento de *A. paragallinarum* en el medio de cultivo de la farmacéutica FARBIOVET S.A.

Tabla B-8. Valores de UFC/ml en el medio de cultivo de la farmacéutica FARBIOVET S.A.

Tabla B-9. Valores promedio de UFC/ml en el medio de cultivo de la farmacéutica FARBIOVET S.A.

Tabla B-10. Valores de UFC/ml en el medio de cultivo de la farmacéutica FARBIOVET S.A. Fase estacionaria.

Tabla B-11. Cantidad de UFC/ml en el mejor medio de cultivo formulado y en el medio de cultivo testigo.

Pruebas API NH

Tabla B-12. Resultados para el reconocimiento de *A. paragallinarum*. (Pruebas API NH).

Tabla B-13. Comparación de las propiedades bioquímicas.

Cinética de Crecimiento

Tabla B-14. Número de generaciones experimentadas por *A. paragallinarum* en los 24 medios de cultivo y en el medio testigo.

Tabla B-15. Tiempos de Generación experimentados por *A. paragallinarum* en los 24 medios de cultivo y en el medio testigo.

Tabla B-16. Velocidad específica de crecimiento experimentada por *A. paragallinarum* en los 24 medios de cultivo y en el medio testigo.

Tabla B-17. Parámetros cinéticos en el mejor medio de cultivo formulado y en el medio de cultivo testigo.

ANEXO D

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Tabla D-1. Análisis de Varianza (ANOVA) para la Concentración Bacteriana en los 24 medios de cultivo.

Tabla D-2. Prueba de Tukey – Factor A para la concentración bacteriana en los 24 medios de cultivo.

Tabla D-3. Prueba de Tukey – Factor B para la concentración bacteriana en los 24 medios de cultivo.

Tabla D-4. Prueba de Tukey – Factor C para la concentración bacteriana en los 24 medios de cultivo.

Tabla D-5. Prueba de Tukey – Interacción AB para la concentración bacteriana en los 24 medios de cultivo.

Tabla D-6. Prueba de Tukey – Interacción AC para la concentración bacteriana en los 24 medios de cultivo.

Tabla D-7. Prueba de Tukey – Interacción ABC para la concentración bacteriana en los 24 medios de cultivo.

Tabla D-8. Prueba T-student. Comparación de los 24 medios de cultivo con el medio testigo.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ANEXO C

GRÁFICOS

Curvas de Crecimiento

Gráfico C-1. Curva de crecimiento. Experimento preliminar.

Gráfico C-2. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 1.

Gráfico C-3. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 2.

Gráfico C-4. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 3.

Gráfico C-5. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 4.

Gráfico C-6. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 5.

Gráfico C-7. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 6.

Gráfico C-8. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 7.

Gráfico C-9. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 8.

Gráfico C-10. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 9.

Gráfico C-11. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 10.

Gráfico C-12. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 11.

Gráfico C-13. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 12.

Gráfico C-14. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 13.

Gráfico C-15. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 14.

Gráfico C-16. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 15.

Gráfico C-17. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 16.

Gráfico C-18. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 17.

Gráfico C-19. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 18.

Gráfico C-20. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 19.

Gráfico C-21. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 20.

Gráfico C-22. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 21.

Gráfico C-23. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 22.

Gráfico C-24. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 23.

Gráfico C-25. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 24.

Gráfico C-26. Curvas de Crecimiento del mejor medio de cultivo formulado y del medio de cultivo testigo.

Curva de McFarland

Gráfico C-27. Curva McFarland.

Parámetros cinéticos de los tratamientos

Gráfico C-28. Número de Generaciones producidas por *A. paragallinarum* en los 24 medios de cultivo formulados y en el medio testigo.

Gráfico C-29. Concentración de *A. paragallinarum* (UFC/ml) en los 24 medios de cultivo formulados y en el medio testigo.

Gráfico C-30. Tiempos de Generación de *A. paragallinarum* en los 24 medios de cultivo formulados y en el medio testigo.

Gráfico C-31. Velocidad Específica de Crecimiento de *A. paragallinarum* en los 24 medios de cultivo formulados y en el medio testigo.

ANEXO D

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Gráfico D-1. Promedio e Intervalos al 95% de Concentración Bacteriana (Factor A).

Gráfico D-2. Promedio e Intervalos al 95% de Concentración Bacteriana (Factor B).

Gráfico D-3. Promedio e Intervalos al 95% de Concentración Bacteriana (Factor C).

Gráfico D-4. Interacción Fuente NAD x Fuente Hemina.

Gráfico D-5. Interacción Fuente NAD x Concentración NaCl.

ANEXO F

FOTOGRAFÍAS

Observaciones Micro y Macroscópicas

Fotografía F-1. Tinción Gram (Gram negativa) y morfología (cocobacilar) de *A. paragallinarum* serotipo A.

Fotografía F-2. Colonias de *A. paragallinarum* serotipo A.

Fotografía F-3. Estría compuesta de *A. paragallinarum* serotipo A.

Fotografía F-4. Galería API NH antes de la inoculación.

Fotografía F-5. Galería API NH inoculada inicialmente.

Fotografía F-6. Galería API NH a las 2 horas de inoculación.

Procedimiento

Fotografía F-7. Área estéril. Elaboración de vacunas.

Fotografía F-8. Cepas de *Avibacterium paragallinarum*.

Fotografía F-9. Preparación de medio de cultivo para el aislamiento de *A. paragallinarum*.

Fotografía F-10. Obtención de sangre desfibrinada.

Fotografía F-11. Placas de agar sangre.

Fotografía F-12. Incubación en el método del frasco con vela.

Fotografía F-13. Preparación de la Curva de McFarland.

Fotografía F-14. Preparación e Inoculación en las pruebas API NH.

Fotografía F-15. Fuentes de NAD.

Fotografía F-16. Fuentes de Hemina.

Fotografía F-17. Preparación de los medios de cultivo enriquecidos.

Fotografía F-18. Inoculación de las cepas de *A. paragallinarum* en los medios de cultivo formulados.

Fotografía F-19. Crecimiento de *A. paragallinarum* en los medios de cultivo.

Fotografía F-20. Medio de cultivo sin inocular (izquierda), medio de cultivo con crecimiento de *A. paragallinarum* (derecha).

Fotografía F-21. Lectura en el espectrofotómetro.

RESUMEN

Este estudio tuvo como finalidad la formulación de un medio de cultivo líquido, enriquecido para el crecimiento de *Avibacterium paragallinarum* con el fin de producir la vacuna contra la Coriza Infecciosa, en la farmacéutica FARBIOVET S.A. ubicada en la ciudad de Sangolquí en la provincia de Pichincha.

En la farmacéutica cultivan actualmente a los 4 diferentes serotipos de la bacteria (A, B, C y Ecuador) por separado, en un medio de cultivo compuesto por: Caldo de soja tríptica (TSB) (37g), peptona de caseína (5g), suero equino (1ml) y agua destilada (1000ml).

En esta investigación se trabajó únicamente con el serotipo A de *A. paragallinarum*, se inició aislando la cepa de un cultivo patrón que contenía la farmacéutica y para verificar que las cepas estuvieron completamente puras y que pertenecían a las cepas en estudio, se aplicó pruebas bioquímicas utilizando la galería API NH (*Neisseria*, *Haemophilus*), arrojando resultados positivos pertenecientes a la bacteria en mención.

Las cepas aisladas, se las cultivaron en un inicio en el medio utilizado en la farmacéutica, para determinar la cinética de crecimiento que presentan.

Debido a los requerimientos nutricionales de *A. paragallinarum*, aparte de el TSB y la peptona de caseína, se trabajó con tres factores para enriquecer el medio de cultivo, entre los cuales estuvieron: fuentes de nicotinamida adenina dinucleotido (NAD) (suero de pollo, suero ovino, extracto de levadura y sin fuente de NAD), fuente de hemina (extracto de sangre autoclavada de pollo, de oveja y sin fuente de hemina) y concentración de cloruro de sodio (NaCl) (1 y 1.5%); los 2 primeros factores reemplazaron al suero equino utilizado en la farmacéutica, además de que se aumentó la cantidad de estos a 3ml por cada 1000ml de medio de cultivo. Resultaron 24

medios de cultivo combinando todos los factores, de los cuales de cada medio se realizó 3 réplicas para obtener datos de concentración bacteriana; unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml) confiables. Estos valores fueron cuantificados mediante espectrofotometría desde el tiempo 0 hasta las 22 horas de incubación, los datos fueron tomados a las 14 horas y de aquí en adelante cada 2 horas. Para la transformación de los valores de absorbancia obtenidos a UFC/ml se utilizó la escala McFarland.

Finalmente mediante el procesamiento de las concentraciones bacterianas de cada medio a través del diseño experimental AxBxC, se obtuvo que el mejor medio de cultivo líquido enriquecido con mayor concentración bacteriana fue el que contenía suero de pollo, extracto de sangre autoclavada de pollo y 1% de NaCl, con una concentración aproximada de 3069643557 UFC/ml que al ser comparada con la concentración obtenida en el medio utilizado en la farmacéutica que fue de 2782528711 UFC/ml aproximadamente se logró un incremento del 10.31% en el medio formulado en esta investigación, indicando que los factores utilizados aportan más nutrientes y de esta manera con el medio obtenido se aportará con mayor concentración bacteriana para la elaboración de la vacuna contra la Coriza Infecciosa y de esta manera aumentar la producción de la misma.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Tema de Investigación

Formulación de un medio de cultivo líquido, enriquecido para el crecimiento de *Avibacterium paragallinarum* con el fin de producir la vacuna contra la Coriza Infecciosa, en la farmacéutica FARBIOVET S.A.

1.2 Planteamiento del problema

Una gran parte de la producción de las industrias farmacéuticas corresponde a vacunas, es el caso de la farmacéutica FARBIOVET S.A.

Las vacunas se elaboran con los mismos microorganismos causantes de la enfermedad a tratar. Para la elaboración de éstas es necesario contar la cantidad de materia prima adecuada, especialmente microorganismos, para que se obtenga la suficiente cantidad de vacunas y con un alto grado de efectividad, satisfaciendo las necesidades de los clientes.

En FARBIOVET S.A. se elabora la vacuna contra la Coriza Infecciosa, a partir de cepas de *Avibacterium paragallinarum*, el objetivo principal de la farmacéutica es aumentar la producción de la vacuna, por tal razón se ha centrado en la investigación de medios de cultivo enriquecidos capaces de incrementar la concentración de *A. paragallinarum*.

1.2.1 Contextualización

1.2.1.1 Macro

A nivel mundial, *Avibacterium paragallinarum* se encuentra distribuida en varios países como: Australia, Bulgaria, Canadá, Egipto, Gran Bretaña, Holanda, India, Indonesia, Iraq, Suiza, China, Japón, Alemania, entre otros, principalmente en

países que tienen una industria avícola muy grande. En Estados Unidos se ha informado la presencia de esta bacteria en California, Alabama y Oregón. Sin embargo, se considera exótica en Nueva Zelanda, único país que parece estar libre de *A. paragallinarum* (Luna, 2010).

Avibacterium paragallinarum es el agente causal de la Coriza Infecciosa, enfermedad del tracto respiratorio superior de los pollos, se caracteriza por producir descarga nasal, estornudo e inflamación nasal (Soriano, *et al.*, 2004).

Esta bacteria se considera como un microorganismo exigente en cuanto se refiere a sus nutrientes y metabolismo. Para aislar esta bacteria, se requiere de medios enriquecidos con factores muy importantes para el desarrollo de la misma y además de condiciones anaeróbicas. Los medios de cultivo enriquecidos son complementados con lípidos corporales, vitaminas específicas, aminoácidos, proteínas y otros elementos claramente definidos como tales (Bailón *et al.*, 2003).

Existen diferentes materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, entre otros. Los hidratos de carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos. El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes.

La mayoría de las cepas de *A. paragallinarum* requieren del factor V que es el nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) para su crecimiento, por lo que se reconocen dos biovars: dependientes e independientes de NAD (Blackall *et al.*, 2005). Algunas también requieren del factor X que corresponde a la hemina (Rojas, 2006). Estos microorganismos crecen mejor en una atmósfera enriquecida con CO₂ del 5 al 10% (Blackall *et al.*, 2005).

1.2.1.2 Meso

Debido a que se han encontrado 9 serovariedades de esta bacteria (A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 y C-4), diferentes en cada país, resulta un poco confuso y complicado el momento de aislarlas y hacerlas crecer en medios de cultivo en gran cantidad, para su posterior utilización en la fabricación de las vacunas, ya que éstas deberán contener principalmente las tres serovariedades fácilmente distinguibles (A, B y C) para conseguir una protección cruzada entre serovariedades en el momento de la vacunación. Es decir, en el caso de que la vacuna se elabore con un solo tipo de serovariedad, el ave se inmuniza solo con esa serovariedad y queda protegida contra sucesivas infecciones por otras cepas distintas pero pertenecientes a esa misma serovariedad, mientras que para las otras serovariedades no estará inmunizada (Rojas, 2006).

En América Latina, la presencia de *A. paragallinarum* ha traído como consecuencia una enfermedad de importancia económica en las parvadas de postura comerciales y reproductoras (Luna, 2010).

En México, Argentina, Guatemala, Brasil se han encontrado cepas de *A. paragallinarum* A, B y C. En Argentina y Brasil se han distinguido cepas A variantes. Las cepas B de Argentina son genéticamente distintas a otras cepas del mundo de cualquier serovariedad, mientras que las cepas C de éste mismo país según investigaciones que se han realizado, no tienen protección cruzada (Luna, 2010). Es por esta razón que cada serotipo requiere diferentes tipos de nutrientes y factores de crecimiento para obtenerlas en mayor cantidad.

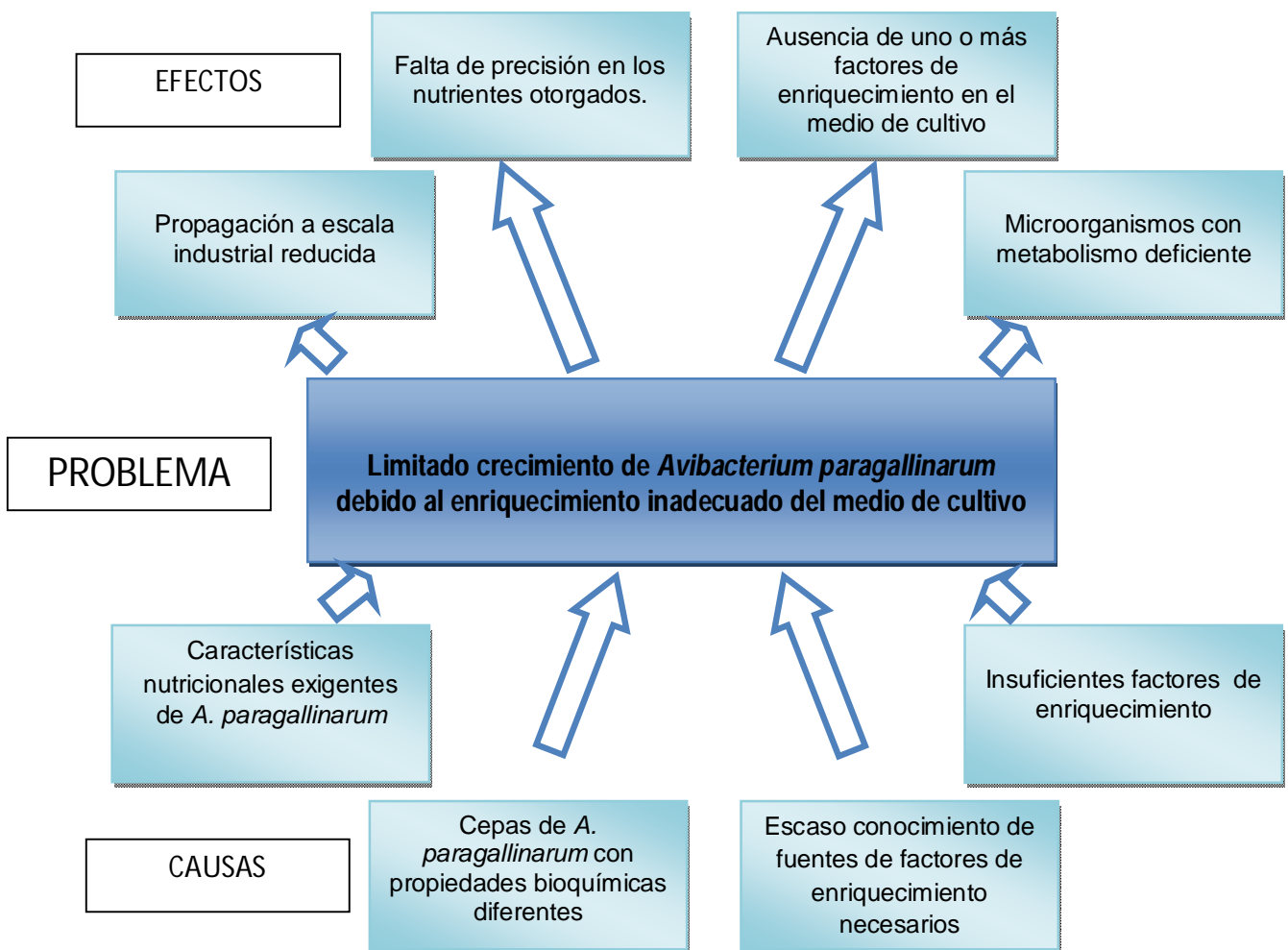
1.2.1.3 Micro

En el Ecuador durante los años 2000 a 2007, se han encontrado los tres tipos de serovariedades, específicamente en las provincias de Chimborazo, Cotopaxi, Manabí, Pichincha y Tungurahua (Cabrera *et al.*, 2010). Sin embargo no existen medios de cultivo enriquecidos específicos en los que cada una de las serovariedades de *A. paragallinarum* se desarrollen en gran cantidad y menor tiempo de incubación.

La farmacéutica FARBIOVET S.A. cuenta con las tres serovariedades de la bacteria y aparte con una cepa denominada Ecuador, con las cuales elaboran la vacuna, a pesar de esto el medio en el que cultivan a las bacterias es el mismo para todos.

Todos esto señala la necesidad de efectuar estudios con aislamientos de serovariedades A, B y C presentes en cada región, sobre todo en cuanto se refiere a los factores y ambiente adecuado necesarios para el desarrollo de cada una, sobre todo para contar con una suficiente y gran cantidad de células bacterianas para poder así definir cuantas cepas deberían usarse en futuras vacunas.

1.2.2 Análisis Crítico



Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

En la actualidad en la empresa farmacéutica FARBIOVET S.A. se cultiva *Avibacterium paragallinarum*, en un medio de cultivo líquido pero con pocos factores de enriquecimiento que afecta la propagación de la biomasa a una gran velocidad y en gran cantidad para su posterior utilización en la elaboración de la vacuna contra la enfermedad aviar Coriza Infecciosa.

Debido a que *A. paragallinarum* presenta características nutricionales exigentes se produce una propagación a escala industrial reducida.

Además las cepas de esta bacteria presentan propiedades bioquímicas diferentes por lo que ocasiona una falta de precisión en los nutrientes otorgados.

Existe un escaso conocimiento sobre las fuentes de factores de enriquecimiento por lo que en el medio de cultivo puede estar ausente uno o más factores nutritivos esenciales para el crecimiento de la bacteria.

La cantidad insuficiente de los factores de enriquecimiento hacen que la bacteria presente un metabolismo deficiente y no cumpla con las respectivas funciones.

Esto conlleva a un limitado crecimiento de *A. paragallinarum* ya que no existe un enriquecimiento adecuado con fuentes ricas en NAD y en hemina en el medio de cultivo en el que se desarrolla la bacteria.

La siguiente investigación se refiere al conocimiento de las diferentes características nutricionales que posee la bacteria *Avibacterium paragallinarum*, en especial de los factores de crecimiento que requiere; con ensayos se planteó probar diferentes fuentes enriquecedoras para el medio en el que se inocule a la bacteria, aumentando la concentración celular.

1.2.3 Prognosis

Si se sigue cultivando a *A. paragallinarum* en un medio de cultivo sin los adecuados factores de enriquecimiento o con aquellos de costos muy elevados, primero los recursos económicos de la farmacéutica se verán afectados y en cuanto al microorganismo, la cantidad de biomasa no aumentará, al igual que su velocidad de crecimiento. Sino se cuenta con estas cepas en gran cantidad no se podrá elaborar la vacuna contra coriza infecciosa o si se lo hace será en cantidades limitadas.

1.2.4 Formulación del problema

¿Cómo formular un medio de cultivo líquido enriquecido para el crecimiento de *Avibacterium paragallinarum* en la empresa farmacéutica FARBIOVET S.A., ubicada en la ciudad de Sangolquí?

1.2.5 Preguntas directrices

- ¿Cuáles son los requerimientos nutricionales de *Avibacterium paragallinarum*?
- ¿Qué factores de crecimiento pueden aumentar la cantidad y velocidad de crecimiento de *Avibacterium paragallinarum*?
- ¿Cuáles son las principales fuentes de extracción de los factores de enriquecimiento requeridos por la bacteria?

1.2.6 Delimitación del objeto de investigación

Campo: Biotecnología.

Área: Microbiología.

Aspecto: Medios de Cultivo.

Temporal: La investigación se efectuó entre los meses de mayo 2011– junio 2012.

Espacial: El presente trabajo investigativo se realizó en la empresa de productos farmacéuticos FARBIOVET S.A., ubicada en la ciudad de Sangolquí

1.3 Justificación

La bacteria *Avibacterium paragallinarum* presenta ciertos requerimientos nutritivos esenciales para su crecimiento y desarrollo en medios de cultivo.

Estas bacterias requieren de ciertos factores de crecimiento como el factor V (NAD) y el factor X (hemina), que son los nutrientes más importantes, requeridos para el metabolismo de *A. paragallinarum*, aunque existen ciertas cepas que son independientes de estos, las mismas que utilizan otros compuestos que le brindan los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo.

En FARBIOVET S.A., el cultivo de *A. paragallinarum* se lo realiza en un medio que contiene: caldo de soja tríptica (TSB), peptona de caseína, agar soja tryticase (TSA), suero equino y agua destilada.

Sin embargo, la empresa requiere que la bacteria crezca a mayor velocidad obteniéndose una gran cantidad de biomasa en menor tiempo, para su posterior utilización en la elaboración de la vacuna contra la enfermedad de Coriza Infecciosa, es por esto que la presente investigación tuvo como finalidad enriquecer el medio de cultivo que se prepara en la empresa con compuestos que contengan los factores de crecimiento y nutrientes necesarios para esta bacteria, así se acelerará el crecimiento y desarrollo de *A. paragallinarum*, logrando optimizar el cultivo de esta bacteria.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

- Formular un medio de cultivo líquido enriquecido para el crecimiento de *Avibacterium paragallinarum*.

1.4.2 Específicos

- Aislar cepas de *Avibacterium pargallinarum* serotipo A mediante siembras en estrías compuestas.
- Caracterizar bioquímicamente la bacteria mediante pruebas API NH.
- Optimizar el crecimiento de *Avibacterium paragallinarum* en base a las distintas fuentes de NAD, hemina y concentración de cloruro de sodio en el medio de cultivo.
- Determinar la cinética de crecimiento de *Avibacterium paragallinarum*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos

2.1.1 Historia

En 1932, De Blicek propuso el nombre de *Bacillus haemoglobinophilus coryza gallinarum* para el agente causal del “catarro contagioso” de los pollos. Luego, en 1934 Eliot, Lewis y Depaplane propusieron el nombre de *Haemophilus gallinarum* para el agente causal de la Coriza Infecciosa.

Varios estudios mostraron el requerimiento de los factores de crecimiento X (hemina) y V (NAD, dinucleótido de adenina nicotinamida) para el cultivo in vitro de *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum* (Luna, 2010). Sin embargo, McGaughey y Page señalaron la independencia del factor X de crecimiento en un número de aislamientos estudiados.

Basados en estudios, Biberstein y White propusieron la especie *H. paragallinarum* para los microorganismos causantes de coriza infecciosa, dependientes del factor V pero independientes del factor X de crecimiento. A partir de entonces, con excepción de un informe, los nuevos aislamientos en brotes de coriza infecciosa se clasifican como *H. paragallinarum*.

Hoy se acepta que *H. gallinarum* nunca existió y que la confusión se debió a la descripción errónea de los aislamientos estudiados a causa de limitaciones en las técnicas de laboratorio empleadas (Soriano, *et al.*, 2004).

2.1.2 Etiología

La clasificación taxonómica actual permanece así: superreino, Procaryotae; reino, Eubacteria; división, Gracilicutes; clase, Protobacteria; familia, Pasteurelleceae; género, *Haemophilus (Avibacterium)* y especie: *Avibacterium paragallinarum* (Luna, 2010).

Mediante la caracterización de quinonas respiratorias, y mediante estudios de caracterización genética y fenotípica, sugirieron que *A. paragallinarum* fuera asignado al género *Actinobacillus*. Aunque no se han desarrollado estudios definitivos, es probable Pasteurelleceae (Soriano, *et al.*, 2004).

Luego de estudios realizados se ha llegado a la conclusión de que estas bacterias requieren uno o dos factores de crecimiento: factor X y/o factor V.

Se han encontrado cepas de *A. paragallinarum* NAD independientes y muy similares a las cepas clásicas, esto se ha reportado desde la década de los noventa. Esta capacidad al inicio se relacionaba con un plásmido nativo de la bacteria; sin embargo, Blackall en 1988 sugirió que *A. paragallinarum* no contiene plásmidos nativos.

En el 2003, Terry y sus colegas aislaron y analizaron un plásmido, etiquetado como P250, de esta bacteria, el mismo que codifica los genes involucrados en la producción de hemocina. Este operón produce una proteína que es capaz de matar a un rango de otras bacterias gram negativas. El análisis de la secuencia de este plásmido no reveló ningún gen putativo responsable de la independencia del NAD (Roodt, 2009).

2.1.3 Identificación de *Avibacterium paragallinarum*

2.1.3.1 Características Morfológicas

Las bacterias presentan una amplia diversidad de tamaños, que va desde 0.5 a 2µm y algunas pueden llegar a 10µm. No son visibles por supuesto al ojo humano y se visualizan con microscopio óptico o electrónico. Las bacterias se presentan con una morfología definida que está determinada por su pared rígida. Se pueden presentar como esféricas, ovaladas, denominándose cocos. Si la forma es cilíndrica se denominan bacilos o bastones. Estos bastones pueden ser rectos, curvos o con forma de espiral, en este último caso les conoce como espirilos (Madigan *et al.*, 1999).

Las células bacterianas pueden mantenerse unidas en grupos después de que se han dividido, pero conservando siempre la independencia una célula de otra. Cocos o bacilos pueden agruparse en cadenas, en el caso de los cocos, cuando se presentan así agrupados, se denominan estreptococos. También se pueden presentar como diplococos. Si los planos de división son variados pueden agruparse en tétradas o como racimos, denominándose estafilococos. Los bacilos pueden ser muy cortos, recibiendo el nombre de cocobacilos, otras veces pueden ser muy largos, pudiendo tener una longitud 10 veces superior a su diámetro. Los extremos pueden ser redondeados o rectos, pueden presentarse aislados, en largas cadenas o pueden agruparse en empalizadas o formando letras chinas (Pírez, 2011).

En ocasiones dependiendo de las condiciones del cultivo, una misma especie puede presentar una morfología variable, fenómeno conocido como pleomorfismo (De la Rosa, *et al.*, 1997).

Las bacterias poseen diferentes estructuras, las mismas que pueden ser permanentes o variables.

- Permanentes: Membrana celular, ribosomas, material genético.
- Variables: Pared celular, flagelo, fimbrias o pilis, cápsula, esporas (Pírez, 2011).

Los microorganismos pertenecientes al género *Avibacterium* son cocobacilos gram negativos no esporulados aunque a veces forman filamentos cortos (son pleomórficos). Estos microorganismos crecen mejor en una atmósfera enriquecida con CO₂ del 5 al 10% (Blackall *et al.*, 2005). Son de crecimiento lento y exigente en la naturaleza. Las células bacterianas en 24 horas aparecen como varillas cortas de 1-3µm de largo y 0,4-0,8µm de ancho. Esta bacteria se somete a degeneración en 48 a 60 horas, presentando fragmentos y formas indefinidas (Roodt, 2009).

Se ha estudiado la morfología y las propiedades serológicas y se ha observado que *A. paragallinarum* tiene una estrecha relación entre la forma fenotípica de organismos encapsulados y la formación de colonias iridiscentes así como la relación de organismos no encapsulados con colonias no iridiscentes. Poseen estructuras antigénicas complejas que pueden clasificarse en somáticos y de membrana, hemoaglutinantes y capsulares (Dávila, 2011).

A la fecha esta bacteria se considera inmóvil. Sin embargo, en un estudio reciente basado en pruebas bioquímicas e inmunológicas, se observó motilidad en *A. paragallinarum* bajo ciertas condiciones de cultivo (Soriano, *et al.*, 2004).

2.1.3.2 Propiedades Fisiológicas

Las propiedades fisiológicas se refieren a las funciones que cumplen las células bacterianas principalmente en lo que tiene que ver con su metabolismo.

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos según el metabolismo

Tipos de organismos según el metabolismo		
Fuente de energía	Sustanciadora de electrones	
	Inorgánica (autótrofos)	Orgánica (heterótrofos)
Sustrato oxidable inorgánico (quimiosíntesis)	<p>Organismos quimiolitótrofos o quimioautótrofos.</p> <p>Obtienen energía química a partir de la energía que se desprende las reacciones de óxido de sustancias orgánicas y su fuente de carbono es el CO₂</p>	

Tabla 1. Continuación

<p>Sustrato oxidable orgánico (catabolismo)</p>		<p>Quimiorganótrofos o quimioheterótrofos. Obtienen energía química a partir de energía que se desprende de las reacciones de oxidación de compuestos orgánicos y su fuente de carbono es la materia orgánica.</p>
<p>Luz (fotosíntesis)</p>	<p>Organismos fotolitótrofos o fotoautótrofos. Obtienen energía química a partir de energía luminosa y su fuente de carbono es el CO₂</p>	<p>Organismos fotoorganótrofos o fotoheterótrofos. Organótrofos fotosintéticos por obtener el carbono de sustancias orgánicas.</p>

Fuente: Morales, 2008.

Avibacterium paragallinarum presenta un metabolismo quimiorganotrófico mesofílico (su temperatura óptima de crecimiento está entre 20 y 45°C) y contiene ubiquinona y dismetilmenaquinona como componentes en la cadena respiratoria. Además, presenta una tendencia en la reducción de ubiquinona en favor de la dismetilmenaquinona cuando se cultiva en presencia de fumarato.

Se han identificado receptores de transferrina bacterianos, proteínas de membrana externa homólogas a la Tbp1 y Tbp2 de otros agentes patógenos, que se unen a terminaciones específicas de la ovotransferrina, y permiten la utilización del hierro para su crecimiento (Soriano, *et al.*, 2004).

2.1.3.3 Propiedades Bioquímicas

La identidad de una especie requiere que se conozca de manera detallada su actividad bioquímica, porque otras características no son suficientemente distintivas o diferenciales.

Además de los productos finales de los procesos metabólicos, también es necesario conocer cómo se producen estos cambios, como ocurren las reacciones químicas, cuales enzimas intervienen, cuales son los productos intermediarios además de que se debe reconstruir las secuencias de las reacciones bioquímicas que tienen lugar dentro de la célula. En general el microorganismo se cultiva en medios que contienen una sustancia nutritiva específica o sustrato y después de la incubación del cultivo se examina para ver los cambios químicos que hayan ocurrido (Soriano, *et al.*, 2004).

Bioquímicamente *A. paragallinarum* puede ser diferenciado de otros bacilos gram negativos potencialmente patógenos para las aves (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades bioquímicas de *A. paragallinarum* y otras bacterias Gram negativas patógenas para las aves

Reacción	Agente				
	<i>Avibacterium paragallinarum</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Riemerella anatipestifer</i>	<i>Pasteurella gallinarum</i>	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>
Reducción de nitratos	+	+	-	+	-
Catalasa	-	+	+	+	-
Oxidasa	-	+	+	+	+
Ureasa	-	-	+	-	-
Indol	-	+	-	-	-
β -galactosidasa	+	+/-		+/-	+
Lisina descarboxilasa	-	-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	-		-	-

Fuente: Soriano, *et al.*, 2004.

Las pruebas bioquímicas realizadas en distintos laboratorios indican varios patrones de fermentación (ácido, sin gas) para *A. paragallinarum*, algunas de

estas variaciones pueden deberse a diferencias en el medio de cultivo y procedimientos utilizados (Hitchner, *et al.*, 1980).

Según Blackall 2005, todas las cepas de *A. paragallinarum* fermentan la glucosa, fructosa, manosa, manitol, sorbitol, y dextrina; la mayoría fermentan sacarosa y maltosa, un poco fermentan xilosa, y no fermentan galactosa, trealosa, lactosa, celobiosa, arabinosa, salicina, orinulin. Otras propiedades bioquímicas también son variables dependiendo de los diferentes serotipos, cepas y variantes de la bacteria; entre éstas están la reacción de la ornitina descarboxilasa, fosfatasa alcalina

Características importantes como la capacidad para reducir los nitratos, la fermentación de glucosa sin la producción de gas, la actividad negativa de la oxidasa y la incapacidad para producir indol o hidrolizar urea o gelatina, parecen ser características uniformes en *A. paragallinarum* (Soriano, *et al.*, 2004).

Esta bacteria se puede diferenciar de la mayoría de bacterias Gram negativas de otros géneros, por su incapacidad para producir formazán a partir del clorhidrato de 3,3,5-trifenil-tetrazoilo (TTC). Si bien esta característica todavía no tiene un uso difundido, es un método muy práctico, por lo que es recomendable incluirla en el diagnóstico de esta especie bacteriana (Soriano, *et al.*, 2004).

A continuación, en la Tabla 3, se presentan las propiedades bioquímicas de *A. paragallinarum*.

Tabla 3. Características bioquímicas de *A. paragallinarum*

Característica	Resultado
Catalasa	-
Cultivo Simbiótico	+
Haemólisis	-
Ornitina descarboxilasa	-
Cultivo en agar Mc Conkey	-
Glicerol	-
Glucosa	+
L-Arabinosa	-
D-Arabinosa	-
D-Xilosa	-
meso-Inositol	-
D-Manitol	+
D-Sorbitol	+
Fructosa	+
Galactosa	-
Lactosa	-
Celobiosa	-
Maltosa	+/-
Trealosa	-
Sacarosa	+
Dextrina	+
α -Glucosidasa	-

Fuente: Blackall *et al.*, 2005.

2.1.3.4 Mantenimiento

A. paragallinarum es un microorganismo de requerimientos especiales de atención para la propagación y mantenimiento en el laboratorio. Las cepas pueden mantenerse en placas de agar sangre por semanas. Las cepas incubadas por 24 a 48 horas a 37°C y almacenadas a 4°C seguirán siendo viables hasta 2 semanas si se mantienen en un frasco anaerobio (Hitchner, *et al.*, 1980).

2.1.3.5 Reclasificación de *Avibacterium paragallinarum*

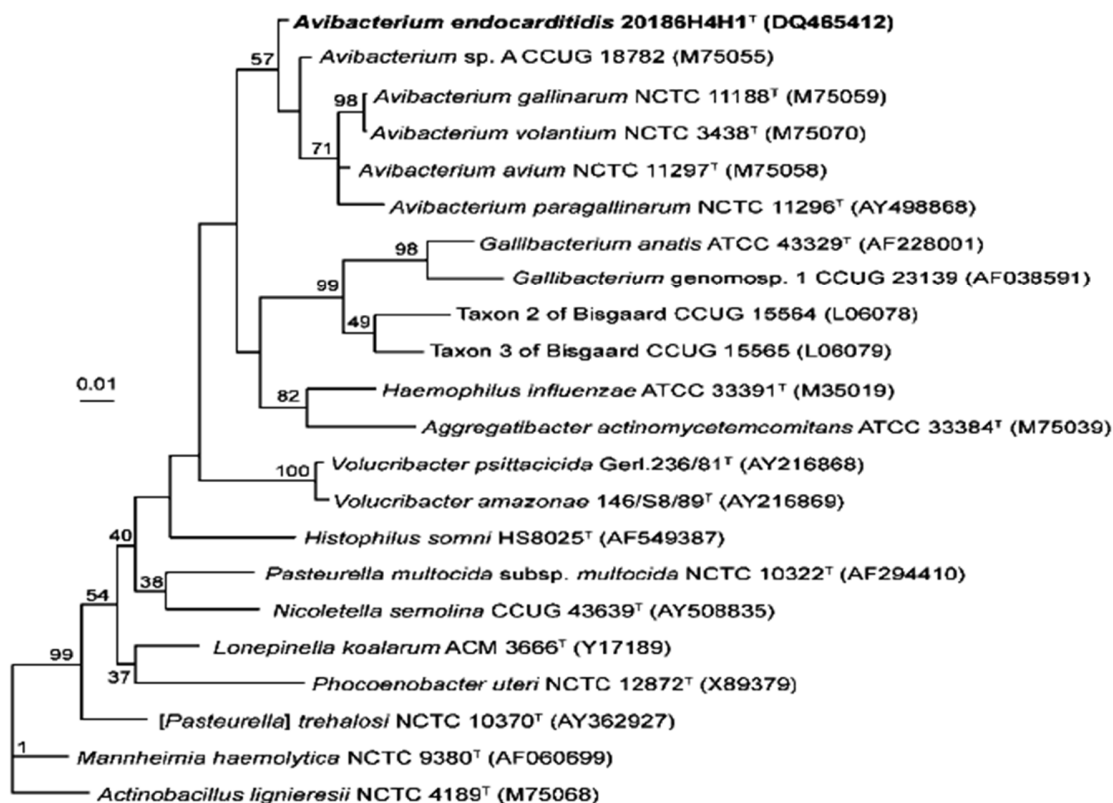
Se ha realizado una caracterización fenotípica de la cepa de *A. paragallinarum*, que es el NAD-dependiente y ocho cepas NAD-independientes. Al complementar secuencias 16rARN se obtuvieron una cepa de *A. paragallinarum* NAD-independiente y cuatro NAD-dependientes. Estas cinco secuencias, así como otros siete taxones de Pasteurellacea fueron sometidas a análisis filogenético. El análisis estableció que *Avibacterium paragallinarum*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella avium* y *Pasteurella volantium* forman un grupo monofilético con un mínimo del 96.8% de similitud. Este grupo también se puede separar mediante pruebas fenotípicas de todos los demás reconocidos y nombrados dentro de Pasteurellaceae.

Como las pruebas genotípicas y fenotípicas apoyan la naturaleza propia e independiente de este grupo, se propone la transferencia de *Pasteurella gallinarum*, *Avibacterium paragallinarum*, *Pasteurella avium* y *Pasteurella volantium* a un nuevo género, *Avibacterium* (Luna, 2010).

Las principales características que separan a las cepas de *A. gallinarum*, *A. paragallinarum*, *A. avium* y *A. volantium*, son la actividad de catalasa (ausente sólo en *A. paragallinarum*) y la producción de ácido de la galactosa (negativo sólo en *A. paragallinarum*), maltosa (negativo sólo en *A. avium*) y manitol (negativo en *A. gallinarum* y *A. avium*) (Blackallet *al.*, 2005).

Esta reclasificación hizo que en el 2005 esta bacteria *Haemophilus paragallinarum* pase a ser *Avibacterium paragallinarum* (Roodt, 2009).

Gráfico 1. Relaciones taxonómicas y filogenéticas de *Avibacterium* (Bisgaard et al., 2007)



2.1.3.6 Clasificación serológica

El sistema de clasificación de *A. paragallinarum* basado serológicamente, que se aplican son el de Page y el de Kume (Roodt, 2009).

Page realizó la primera clasificación serológica en 1962. Detectó tres diferentes serotipos A, B y C para lo cual se usaron pruebas de aglutinación (Blackall, et al., 1995). En 1983 Kume y colaboradores, basándose en la detección de hemoaglutininas en células bacterianas que primeramente se tratan con tiocianato de potasio y luego son sonificadas, detectaron tres serogrupos diferentes, compuestos por siete serotipos diferentes.

Los serogrupos se designaron I, II y III y las serovariedades diferentes fueron llamados HA-1 a HA-7. El serogrupo I consistía los serovares HA-1 a HA-3, el

serogrupo II contenía desde HA-4 a HA-6 y el serogrupo III estaba integrado por el serovar HA-7.

Los serogrupos I, II y III de Kume corresponden a las serovariedades de Page A, C y B respectivamente. Esto condujo posteriormente hacia la propuesta de modificar la nomenclatura régimen de Kume concluyendo con los nueve serotipos actualmente reconocidas (Roodt, 2009).

A continuación, en la Tabla 4, se presentan los nueve serotipos reconocidos de *A. paragallinarum*.

Tabla 4. Serotipos reconocidos actualmente de *A. paragallinarum*

Serovares reconocidos actualmente	Kume	Page
A-1 I	HA-1	A
A-2 I	HA-2	A
A-3 I	HA-3	A
A-4 I	HA-8	**
B-1 III	HA-7	B
C-1 II	HA-4	C
C-2 II	HA-5	C
C-3 II	HA-6	C
C-4 II	HA-9**	**

* Nuevo serotipo identificado, HA-8, dentro del serogrupo I de Kume en 1989

**Blackall identificó un nuevo serotipo, HA-9 dentro del serogrupo II de Kume en 1990

Fuente: Roodt, 2009.

Aparte de los dos esquemas anteriores existe un tercero que corresponde al de Hinz, el cual está basado en la detección de antígenos termoestables, aunque este esquema no ha sido muy utilizado (Blackall, *et al.*, 1995).

2.1.4 *Avibacterium paragallinarum* agente causal de Coriza Infecciosa

La Coriza infecciosa (CI) es una enfermedad respiratoria aguda de pollos causada por la bacteria *A. paragallinarum*. La enfermedad fue reconocida como un síndrome clínico en la década de 1930 y luego se distribuyó en todo el mundo (Wafaa, 2011). El ser humano no es susceptible y por lo tanto la coriza no tiene implicancia para la salud pública.

A. paragallinarum infecta al ave por vía respiratoria y luego de un corto periodo de incubación, entre 1 a 3 días, produce una enfermedad que se manifiesta por inflamación catarral de los senos paranasales.

Dado que esta enfermedad sobrevive únicamente durante 5 horas fuera del ave, el contagio solo se produce a través de los animales infectados, que ya han padecido la enfermedad y que permanecen como portadores de la bacteria en la granja durante prolongado tiempo. Una cepa de *A. paragallinarum* es patógena cuando es capaz de adherirse a las células que tapizan el epitelio respiratorio. El requisito de adherencia al tracto respiratorio tiene estrecha relación con la hemoaglutinación. Es por esto que el antígeno más importante de las cepas patógenas es el hemoaglutinante (AgHem) (Rojas, 2006).

Existen cepas muy virulentas, difusoras e invasivas; otras son patógenas pero de difusión lenta, existiendo también cepas poco patógenas e inclusive se reporta la existencia de cepas de campo totalmente a patógenas (Luna, 2010).

La vacuna contra esa enfermedad contiene cepas inactivadas de *A. paragallinarum* de los diferentes serotipos. Existen agentes inactivantes como el timerosal y la formalina. Además esta contiene ciertos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunitaria del organismo, entre los compuestos que utilizan como adyuvantes están: geles de hidróxido de aluminio y alumbre de cromo, aceite mineral (Blackall *et al.*, 1995).

2.1.5 Nutrición Microbiana

Según Madigan y colaboradores (1999), las células contienen grandes cantidades de pequeñas moléculas así como de macromoléculas. La célula puede obtener la mayoría de las pequeñas moléculas que necesita del exterior o sintetizarlas a partir de moléculas más simples. Las macromoléculas, por el contrario, son siempre sintetizadas en la célula. La totalidad de la masa celular está formada por sustancias con cuatro tipos de átomos: carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno. Estos elementos constituyen el esqueleto de las macromoléculas así como las moléculas orgánicas pequeñas.

Los nutrientes pueden ser divididos en dos clases: macronutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, magnesio, calcio, sodio, hierro) y micronutrientes (cromo, cobalto, cobre, manganeso, molibdeno, níquel, selenio, tungsteno, vanadio, zinc, hierro), los cuales son requeridos en grandes y pequeñas cantidades respectivamente (Krikorian, 1991).

2.1.6 Medios de Cultivo

Un medio de cultivo es un material alimenticio que se usa en el laboratorio para el desarrollo de los microorganismos. Los medios de cultivo deben contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y deben estar exentos de cualquier microorganismo contaminante. Contienen como mínimo: carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas.

En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras.

Los microorganismos requieren para su crecimiento de una fuentes de energía y de materia. En la mayoría de las fermentaciones industriales la fuente de energía y la de materia son la misma, pero es necesario que la fuente de materia contenga todos los elementos constitutivos de la masa celular en las

cantidades requeridas por la composición interna del microorganismo. En la Tabla 5 se presentan los compuestos orgánicos de los principales elementos de la masa celular y su porcentaje en peso seco, las cifras son de carácter general, pero se considera que son representativas de la composición microbiana. La formulación del medio de cultivo debe considerar todos los elementos de la Tabla 5 (Quintero, 1981).

Tabla 5. Compuestos orgánicos de los principales elementos constituyentes de las células microbianas

Elemento	Compuestos Orgánicos	% del peso seco
H	Compuestos orgánicos y agua	8
O	Compuestos orgánicos y agua	20
C	Compuestos orgánicos	50
N	Proteínas, ácidos nucleicos y coenzimas	14
S	Proteínas y algunas coenzimas	1
P	Ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas	3
Mg	Cofactor de reacciones enzimáticas	0.5
Mn	Cofactor de algunas enzimas	0.1
Ca	Cofactor de enzimas (proteasas)	0.5
Fe	Citocromos, proteínas y cofactor de enzimas	0.2
Co	Constituyente de la vitamina B12	0.03
Zn	Constituyente de ciertas enzimas	0.03
Cu	Constituyente de ciertas enzimas	0.03
Mo	Constituyente de ciertas enzimas	0.03

Fuente: Quintero, 1981.

Los medios de cultivo pueden clasificarse de acuerdo a diferentes criterios, como se explican en la Tabla 6.

Tabla 6. Clasificación de los medios de cultivo según varios criterios

Criterio	Clasificación	Composición	Función
Consistencia	Líquidos	No contiene agar	Cultivos puros en lote
	Semisólidos	0.5% de agar	Movilidad de bacterias
	Sólidos	1.5 a 2% de agar	Masas visibles aisladas (colonias)
Composición	Definidos	Composición exacta	Estudios fisiológicos
	Complejos	Desconocimientos de composición exacta	Cultivar bacterias desconocidas o de requerimientos nutricionales complejos
Función	Selectivos	Componentes añadidos	Promueven crecimiento de especies deseadas
	Diferenciales		Distinguir diferentes tipos de bacterias
	Enriquecidos		Microorganismos que requieren un gran número de factores de crecimiento

Fuente: Azahara, 2009.

2.1.6.1 Medios de cultivo Enriquecidos

Están compuestos de un medio base como apoyo del crecimiento al cual se le puede agregar un gran exceso de nutrientes como suplementos nutritivos, por ejemplo: extractos biológicos como: sangre y suero; vitaminas y minerales. Se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales (López, *et al.*, 2006).

Los factores de crecimiento son sustancias orgánicas que no pueden ser sintetizadas por ciertos microorganismos y deben obtenerse del medio ambiente. Existen de 2 tipos principales de factores de crecimiento:

- Los necesarios en cantidades muy pequeñas que funcionan catalíticamente como porciones de sistemas enzimáticos, ejemplo la vitamina B.
- Los necesarios en cantidades grandes, que se incorporan directamente solo con pequeñas modificaciones en el material celular como aminoácidos, purinas, pirimidinas (Bravo, 1988).

2.1.6.2 Medios de cultivo en los que se desarrolla *A. paragallinarum*

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el medio de cultivo. En la actualidad se han formulado más de 10000 medios de cultivo para diferentes bacterias (Azahara, 2009).

El crecimiento de *Avibacterium* requiere medios suplementados con los factores X (hemina) y/o V (NAD) (Blackall, *et al.*, 1995).

La hemina es un pigmento termoestable proporcionado por diversos pigmentos que contienen hierro como la hematina, la bacteria lo utiliza en la síntesis de catalasas, peroxidasas y citocromos ya que suministra los compuestos tetrapirrólicos necesarios (Martínez, 2005).

El NAD es esencial ya que corresponden a una coenzima que participa en las reacciones de óxido reducción del metabolismo, esta coenzima es termolábil y normalmente es producida por varias especies bacterianas, levaduras, tejidos animales y vegetales (Martínez, 2005).

Hay otros factores nutricionales que estimulan el crecimiento de *Avibacterium*, tales como el ácido pantoténico, la tiamina, el uracilo, la purina y la cisteína (López, 2001). También el agregado de 1.0- 1.5% de cloruro de sodio (NaCl) es esencial (Soriano *et al.*, 2004). Algunas cepas tienen mejor crecimiento cuando se agrega suero inactivado de pollo o de caballo al medio de cultivo (Blackall, *et al.*, 1995)

La mayoría de las cepas de *A. paragallinarum* se desarrollan en condiciones de microaerobiosis o anaerobiosis, con incremento en la tensión de CO₂. También son adecuadas las atmósferas producidas por el tradicional método del frasco con vela o el agregado de 5-10% de CO₂ (Blackall, *et al.*, 1995).

Existen diferentes tipos de agar sangre que permiten el crecimiento de *Avibacterium*, como el agar sangre con estrías estafilocócicas y agar sangre para anaerobios.

El agar sangre para anaerobios es un medio enriquecido que permite el crecimiento de una gran mayoría de anaerobios cuyos componentes principales son agar base (p.e. Columbia), 5% de sangre de oveja, extracto de levadura, hemina, vitamina K.

Mientras que el agar sangre con estría estafilocócica, permite identificar a *Avibacterium* como colonias satélites en la estría de *Staphylococcus aureus*, está compuesto por agar sangre con una estría con *S. aureus*. La beta-hemólisis producida por *S. aureus* libera el factor V y X.

La técnica que se utiliza se conoce como “Staphstreak”, que permite cultivar *Avibacterium* y *Staphylococcus* en una misma placa. En este caso *Avibacterium* presenta un patrón de crecimiento característico formando satélites en torno a las colonias de estafilococos, esta propiedad se denomina satelitismo y muestra la necesidad de factores de crecimiento excretados por el estafilococo. Esta necesidad puede considerarse como determinante en el desarrollo de patologías oportunistas por *Avibacterium* (Blackall, *et al.*, 1995).

Finalmente, el agar chocolate es un medio rico en nutrientes, que permite el crecimiento de una gran mayoría de microorganismos, incluidos los muy exigentes como *Avibacterium*. Sus componentes principales son: agar sangre con la sangre lisada (por calentamiento a 80°C), los eritrocitos lisados liberan la hemoglobina y otros nutrientes como el factor X y V (Soriano *et al.*, 2004).

2.2 Fundamentación filosófica

Este trabajo de investigación se fundamentó en un paradigma positivista haciendo referencia al análisis cuantitativo, empírico-analítico, racionalista. Debido a que se cuantificó la cantidad de biomasa producida en los diferentes

medios de cultivo enriquecidos para determinar el medio de cultivo óptimo para *Avibacterium paragallinarum*.

Su finalidad es la de explicar, predecir, controlar fenómenos, verificar teorías, utilizando la recolección y el análisis de datos para comprobar las hipótesis previamente establecidas. El escenario de investigación fue el laboratorio de productos biológicos de la farmacéutica FARBIOVET S.A. con un diseño adecuadamente organizado y sintetizado. Reconoce únicamente como reales los objetos gobernados por leyes universalmente válidas.

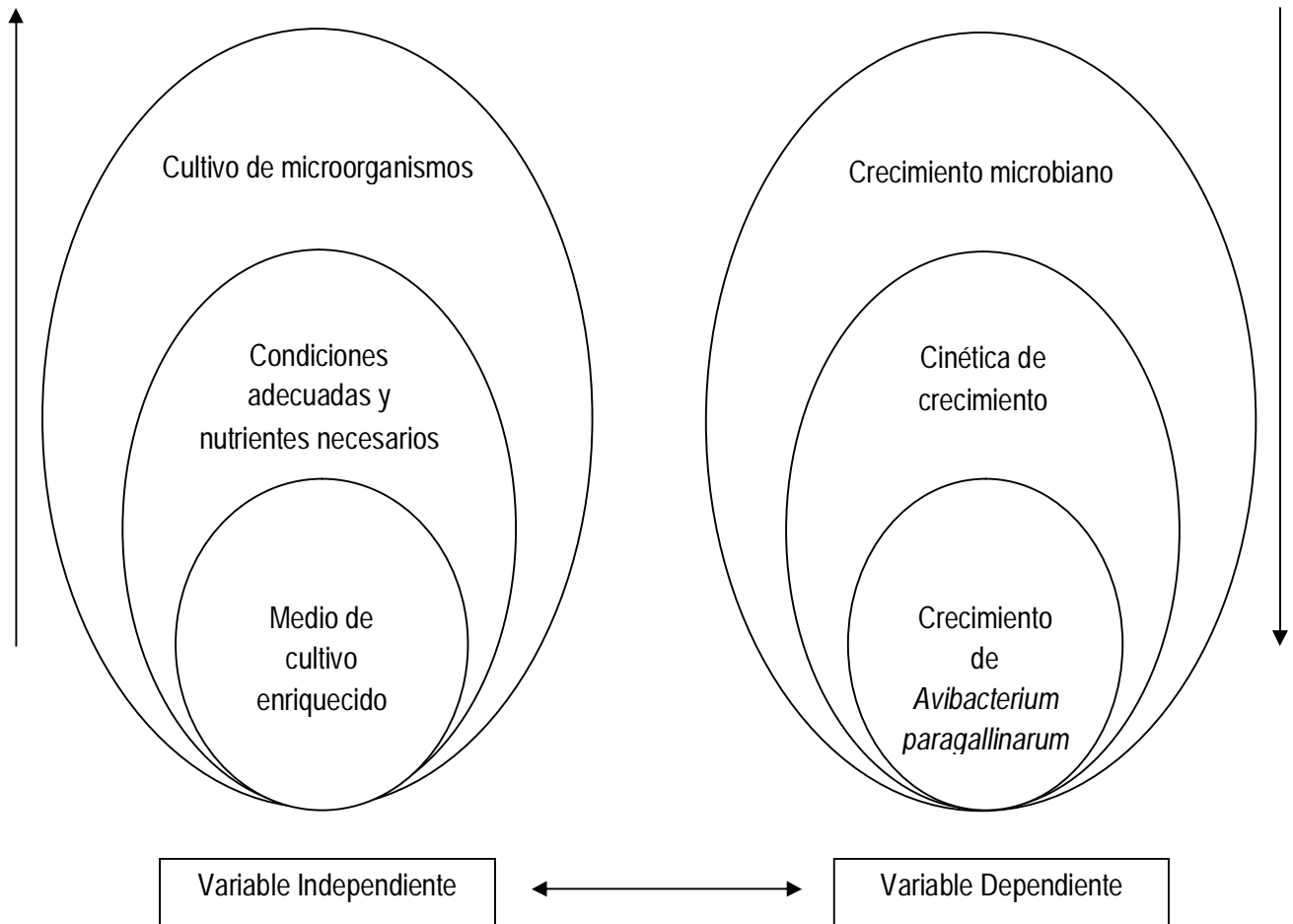
Solo lo demostrable científicamente es acorde con este paradigma, el cual rechaza lo sobre natural. Sus objetivos comprenden la investigación científica, la formulación de leyes y el establecimiento de las causas y efectos de los fenómenos. Entrega una visión interesante de los paradigmas centrados en el conocimiento de causa – consecuencia al momento de comprender el futuro conocimiento.

2.3 Fundamentación legal

Esta investigación se basó en el Art. 400 de la sección segunda Biodiversidad; capítulo segundo Biodiversidad y recursos naturales de la Constitución del Ecuador que menciona que el Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad, cuya administración y gestión se realizará con responsabilidad intergeneracional. Se declara de interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola - silvestre y el patrimonio genético del país (Constitución Política del Ecuador, 2008).

Por otra parte la empresa FARBIOVET se rige en la Decisión 483 que son Normas para el registro, control, comercialización y uso de productos veterinarios, y el estudio realizado se fundamentó específicamente en el Título VI relacionado a los Requisitos para el Control de Productos Veterinarios; Capítulo I Del Protocolo de Producción; Artículo 56 y 57. (Anexo E).

2.4 Categorías fundamentales



Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012.

2.4.1 Marco Conceptual de la Variable Independiente

Para el cultivo correcto de un microorganismo es necesario conocer sus exigencias nutritivas (Corzo, 2009).

Los microorganismos requieren para su desarrollo y actividad celular compuestos que le brinden los nutrientes necesarios. Dependiendo de las cantidades que se requieren, existen macro y micronutrientes. Además necesitan de factores de crecimiento, pero esto es en muy pocas cantidades y solo por algunas células, entre estos están: vitaminas, aminoácidos purinas y pirimidinas (Corzo, 2009).

Para el crecimiento adecuado de los microorganismos también es necesario contar con las condiciones adecuadas para su completo desarrollo, entre estos parámetros están: pH, temperatura, presencia o ausencia de oxígeno (Quintero, 1981).

Todas estas condiciones deben estar presentes en los medios de cultivo, a través de los cuales se logra el crecimiento y multiplicación de los microorganismos, favoreciendo el proceso deseado. Los medios de cultivo son la mezcla de sustancias entre nutrientes y factores de crecimiento y a la vez deben estar exentos de contaminación. Satisface las necesidades nutritivas de los microorganismos y son químicamente definidos o complejos (Merino, 2001).

Existen medios de cultivo enriquecidos los mismos que en su composición contienen factores de enriquecimiento que son compuestos indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes. Las fuentes de enriquecimiento son, por lo general, sangre u otros productos biológicos como leche, huevo, bilis. En ocasiones es posible añadir suplementos artificiales a los medios para producir un enriquecimiento del mismo, por ejemplo polivitex, isovitalex (Bailón *et al.*, 2003).

2.4.2 Marco Conceptual de la Variable Dependiente

El crecimiento microbiano se refiere al aumento o multiplicación de los microorganismos, para poder tener crecimiento es necesario que cumplan varios requisitos tanto de tipo biológico como físico-químico. En primer lugar es necesario tener un cultivo en condiciones adecuadas, es decir, células en estado vegetativo o esporas susceptibles de reproducirse. Para ello es menester conservar adecuadamente las cepas en el laboratorio y es recomendable que cada 3 o 4 meses las cepas almacenadas sean transferidas a nuevos medios (Quintero, 1981).

El crecimiento microbiano puede ser medido como un incremento en la masa microbiana. El número de células o masa celular por unidad de tiempo se

conoce como *velocidad de crecimiento*. Durante el ciclo de división de las células, todos los componentes estructurales de la célula se duplican, el tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos células se denomina *tiempo de generación*, este tiempo varía ampliamente entre los microorganismos, muchas bacterias tienen tiempos de generación de 1-3 horas, pero las conocidas como de crecimiento muy rápido, pueden hacerlo en tan solo 10 minutos, mientras que otras pueden tardar incluso días (Madigan *et al.*, 1999).

Debido a que las bacterias se duplican en cada generación, la población bacteriana a través del tiempo aumentará en forma exponencial de 2.

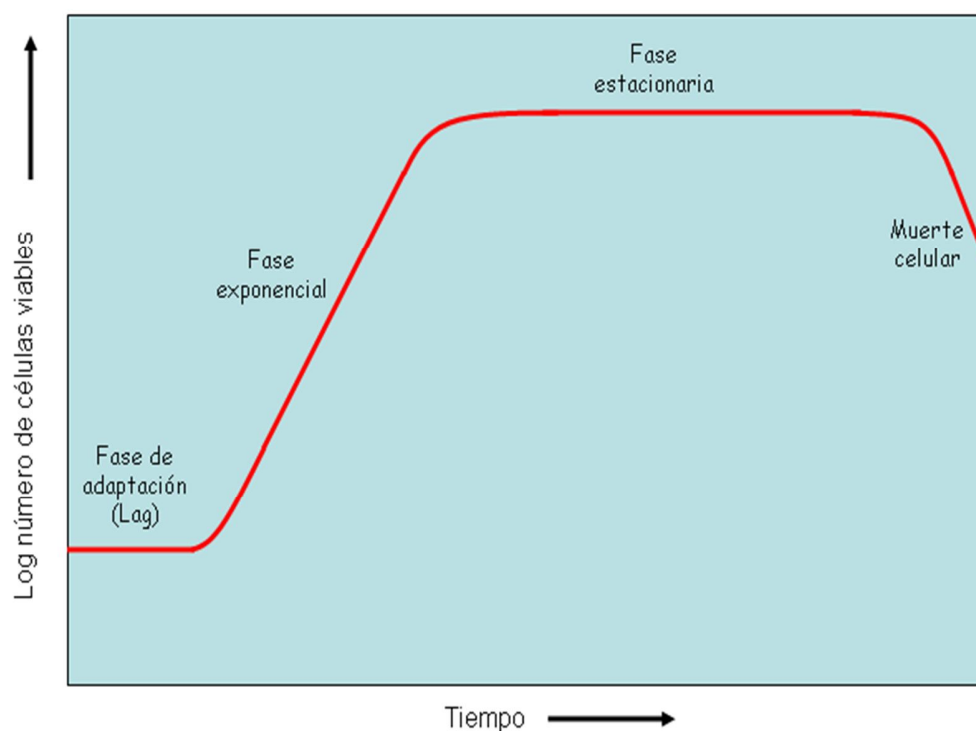
Si se presenta el número de bacterias en función del tiempo, tendremos una curva exponencial (figura 2), pero si se representa el ciclo vital de un grupo de bacterias se tiene cuatro fases:

- Latencia: Las bacterias se adaptan al medio en el que se encuentran, en este período el número de células no varía. El tiempo de adaptación es variable para las diferentes bacterias (Merino, 2001). Para adaptarse a este nuevo medio, es preciso que se sinteticen enzimas que permitan metabolizar los compuestos presentes en el nuevo medio (Madigan *et al.*, 1999).
- Exponencial: Inicia la multiplicación bacteriana, el número de bacterias aumenta exponencialmente (Merino, 2001), pero las velocidades de crecimiento exponencial pueden variar esencialmente, esta velocidad es influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo), así como por las características genéticas del microorganismo en cuestión. En esta etapa se liberan las enzimas y toxinas (Madigan *et al.*, 1999).
- Estacionaria: Existe una competencia por los nutrientes ya que estos disminuyen su concentración y las bacterias dejan de crecer. Algunas bacterias mueren pero otras se dividen por lo que el número de células

se mantiene sin variaciones (Merino, 2001). Aunque en esta fase no tiene lugar crecimiento o existe crecimiento lento, todavía ocurren muchas funciones celulares, incluyendo el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos (Madigan *et al.*, 1999).

- Muerte: El número de bacterias comienza a disminuir debido a que el número de bacterias muertas supera el número de bacterias que se dividen (Merino, 2001).

Gráfico 2. Curva de crecimiento microbiano (Quintero, 1981).



A. paragallinarum es una bacteria que tiene un requerimiento nutricional muy exigente para su crecimiento.

Requiere de ciertos factores de crecimiento como el factor V y el factor X importantes para su desarrollo. Esta bacteria es utilizada para la elaboración de la vacuna contra coriza infecciosa, por lo que se requiere un cultivo a gran escala para su posterior utilización (Soriano *et al.*, 2004).

2.5 Hipótesis

2.5.1 Hipótesis Nula

Las fuentes de NAD, hemina y la concentración de cloruro de sodio no influyen en el crecimiento de *Avibacterium paragallinarum*.

2.5.2 Hipótesis Alternativa

Las fuentes de NAD, hemina y la concentración de cloruro de sodio influyen en el crecimiento de *Avibacterium paragallinarum*.

2.6 Señalamiento de variables de la hipótesis

Variable Independiente:

Medio de cultivo enriquecido

Variable Dependiente:

Crecimiento de *Avibacterium paragallinarum*

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Enfoque

El enfoque de la investigación fue predominantemente cuantitativo, debido a que se utilizó la recolección y el análisis de datos para comprobar las hipótesis establecidas previamente, se basó en la medición de la concentración bacteriana existente en los medios de cultivo formulados y frecuentemente el uso de la estadística para establecer con exactitud el medio de cultivo enriquecido con mayor concentración celular.

3.2 Modalidad básica de la investigación

Experimental: Se manipularon variables experimentales no comprobadas, como fueron las diferentes fuentes de enriquecimiento en condiciones rigurosamente controladas, registrando el aumento o disminución de la concentración bacteriana.

Documental-bibliográfica: Se apoyó en fuentes de carácter documental, consultando en libros, documentos de experimentos realizados anteriormente.

3.3 Nivel o tipo de investigación

Exploratoria: Con el propósito de destacar los aspectos fundamentales de la problemática determinada y encontrar los procedimientos adecuados para elaborar una investigación posterior a la formulación del medio de cultivo enriquecido. Al contar con los resultados obtenidos se simplificará el abrir líneas de investigación en cuanto a la elaboración de vacunas utilizando las cepas de *A. paragallinarum* cultivadas.

3.4 Población y muestra

El inóculo cultivado en cada uno de los mismos se determinó con pruebas preliminares, basándose en la siguiente fórmula para el tamaño de la muestra (UFC/ml):

$$n = \left(\frac{ZS}{E}\right)^2$$

Donde: n= Tamaño de la muestra
Z= Nivel de confiabilidad 95%
S= Desviación estándar
E= Error de muestreo (Herrera, 2010).

Con la cual se obtuvo un tamaño muestral de 38,416 UFC/ml, por lo que se utilizó 1ml de inóculo el mismo que contenía una concentración aproximada de $2,1 \times 10^8$ UFC/ml, cantidad bacteriana suficiente para la investigación.

3.4.1 Diseño Experimental

En los medios de cultivo se variaron tres compuestos de enriquecimiento, que correspondieron a los factores en estudio, los mismos que se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Factores de Estudio

FACTOR	DESCRIPCIÓN	NIVELES
A	Fuentes del factor V (NAD)	a ₀ : Sin fuente de NAD a ₁ : Suero de pollo a ₂ : Suero ovino a ₃ : Extracto de levadura
B	Fuentes del factor X (Hemina)	b ₀ : Sin fuente de hemina b ₁ : Extracto de sangre autoclavada de pollo b ₂ : Extracto de sangre autoclavada de oveja
C	Concentración de NaCl	c ₀ : 1% c ₁ : 1.5%

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Los 24 tratamientos que se realizaron con los diferentes compuestos de enriquecimiento se detallan a continuación en la Tabla 8. Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento.

Tabla 8. Tratamientos de Estudio

Tratamientos		Factores de estudio		
N°	Codificación	Fuente de NAD	Fuente de hemina	Concentración de NaCl
1	a ₀ b ₀ c ₀	Sin fuente de NAD	Sin fuente de hemina	1%
2	a ₀ b ₀ c ₁	Sin fuente de NAD	Sin fuente de hemina	1.5%
3	a ₀ b ₁ c ₀	Sin fuente de NAD	Extracto de sangre de pollo	1%
4	a ₀ b ₁ c ₁	Sin fuente de NAD	Extracto de sangre de pollo	1.5%
5	a ₀ b ₂ c ₀	Sin fuente de NAD	Extracto de sangre de oveja	1%
6	a ₀ b ₂ c ₁	Sin fuente de NAD	Extracto de sangre de oveja	1.5%
7	a ₁ b ₀ c ₀	Suero de pollo	Sin fuente de hemina	1%
8	a ₁ b ₀ c ₁	Suero de pollo	Sin fuente de hemina	1.5%
9	a ₁ b ₁ c ₀	Suero de pollo	Extracto de sangre de pollo	1%
10	a ₁ b ₁ c ₁	Suero de pollo	Extracto de sangre de pollo	1.5%
11	a ₁ b ₂ c ₀	Suero de pollo	Extracto de sangre de oveja	1%
12	a ₁ b ₂ c ₁	Suero de pollo	Extracto de sangre de oveja	1.5%
13	a ₂ b ₀ c ₀	Suero ovino	Sin fuente de hemina	1%
14	a ₂ b ₀ c ₁	Suero ovino	Sin fuente de hemina	1.5%
15	a ₂ b ₁ c ₀	Suero ovino	Extracto de sangre de pollo	1%
16	a ₂ b ₁ c ₁	Suero ovino	Extracto de sangre de pollo	1.5%
17	a ₂ b ₂ c ₀	Suero ovino	Extracto de sangre de oveja	1%
18	a ₂ b ₂ c ₁	Suero ovino	Extracto de sangre de oveja	1.5%
19	a ₃ b ₀ c ₀	Extracto levadura	Sin fuente de hemina	1%
20	a ₃ b ₀ c ₁	Extracto levadura	Sin fuente de hemina	1.5%
21	a ₃ b ₁ c ₀	Extracto levadura	Extracto de sangre de pollo	1%
22	a ₃ b ₁ c ₁	Extracto levadura	Extracto de sangre de pollo	1.5%
23	a ₃ b ₂ c ₀	Extracto levadura	Extracto de sangre de oveja	1%
24	a ₃ b ₂ c ₁	Extracto levadura	Extracto de sangre de oveja	1.5%

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

3.5 Operacionalización de variables

Tabla 9. Operacionalización de variables

HIPÓTESIS	VARIABLE	CONCEPTO	INDICADORES	ÍNDICE	INSTRUMENTOS
Las fuentes de NAD, hemina y la concentración de NaCl influyen en el crecimiento de <i>Avibacterium paragallinarum</i> .	Dependiente	Crecimiento de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	Población bacteriana	Número de ufc/ml	Espectrofotómetro
		Fuentes de NAD	Origen del NAD	ml/ml	Balanza Volumétricos Software estadístico Infostat
	Independiente	Fuentes hemina	de	Sangre autoclavada de distintos animales	ml/ml
		Concentración de NaCl	Diferente porcentaje de NaCl	%	Balanza Volumétricos Software estadístico Infostat

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012.

3.6 Recolección de información

3.6.1 Aislamiento y purificación de las cepas de *A. paragallinarum*

Para aislar las cepas se prepararon medios de agar sangre con agar soya tripticaseína (TSA) y 5% de sangre desfibrinada de ovino (según Soriano, *et al.*, 2004).

La sangre de ovino se recolectó en 4 tubos vacuntiner con anticoagulante (EDTA), aproximadamente 5ml de sangre en cada tubo, éstos se conservaron en refrigeración hasta su utilización.

Para desfibrinar la sangre, se colocó en un matraz erlenmeyer con perlas de vidrio, el número de éstas fue igual al volumen de sangre a desfibrinar, tanto el matraz como las perlas de vidrio estuvieron estériles. A continuación se colocó el matraz sobre un vortex, al cabo de 2 a 3 minutos se observó que el ruido que las perlas hacían al chocar contra las paredes del matraz, se dejó de oír, eso se debió a que la fibrina que se va formando en el proceso de la coagulación, se depositó sobre ellas, atrapándolas. A partir de ese momento se prosiguió el movimiento rotatorio durante 10 minutos, después se filtró la sangre con una gasa estéril (según Wasilauskas, L, *et al.*, 1974).

Se prepararon 100ml de medio de cultivo, por lo que se requirieron 5ml de sangre desfibrinada, el TSA se pesó en la cantidad establecida por el fabricante, es decir 4g y se colocó en un frasco autoclavable con 100ml de agua destilada. Posteriormente, se calentó el medio en una estufa hasta su completa disolución y cambie su coloración a traslúcida.

Posteriormente se autoclavó el medio por media hora a una temperatura de 121°C y una presión de 15 a 20psi, de igual manera se esterilizaron en el autoclave 4 cajas petri y gasas que se utilizaron, una vez transcurrido este tiempo se procedió a enfriar el medio con agua, evitando que éste se solidifique, seguidamente se añadió de forma aséptica la sangre desfibrinada, la cual no fue autoclavada debido a que se desnaturalizan las proteínas y no le brinda las componentes necesarios para el crecimiento de *A. paragallinarum*.

Finalmente éste fue vertido en las cajas petri aproximadamente 25ml en cada una, esto se realizó cerca a un mechero para evitar cualquier tipo de contaminación, después se las dejó hasta que el agar se solidifique.

Para inocular las cepas de *A. paragallinarum* serotipo A, se realizaron diluciones de una cepa patrón, las diluciones fueron desde 10^{-1} hasta 10^{-7} , para esto se utilizó viales de 10ml en los que se colocaron 9ml de agua destilada y se los tapó para evitar la contaminación, estos viales se los autoclavó igualmente por 30 minutos.

Luego con una micropipeta o una jeringuilla se adicionó 1ml de muestra de la cepa patrón, está se colocó en uno de los viales el mismo que correspondió a la dilución 10^{-1} , después, de esta dilución se tomó un volumen de 1ml y se trasvasó al siguiente vial que fue la dilución 10^{-2} y así se continuó hasta llegar a la dilución 10^{-7} .

Las diluciones que se inocularon en las cajas petri fueron las dos últimas, es decir 10^{-6} y 10^{-7} que fueron las que más separadas se formaron las colonias y se pudo utilizar fácilmente. Para la inoculación se utilizó el método de siembra por extensión en superficie, se tomó una muestra de 0,5ml de cada dilución y se colocó en cada caja, teniendo muy cerca el mechero para que no se contamine con otros microorganismos, después se tapó la caja y se hicieron movimientos verticales y horizontales para que la muestra se disperse por toda la caja y las bacterias crezcan homogéneamente.

Las cajas fueron etiquetadas con la dilución a la que correspondían, para evitar cualquier confusión.

Debido a que estas bacterias requieren un ambiente anaerobio enriquecido con 5 -10% de CO_2 , las cajas inoculadas se incubaron con el tradicional método del frasco con vela (según Soriano, *et al.*, 2004). En el interior del frasco se colocó una vela encendida junto a esto estuvieron las cajas petri inoculadas, posteriormente se tapó el frasco y de inmediato la vela se apagó debido a que

se consumió todo el oxígeno presente en el interior del frasco, quedando un ambiente totalmente anaerobio. Finalmente este frasco se colocó en la incubadora a 37°C durante 18 a 24 horas, transcurrido este tiempo se empezó a ver el crecimiento de colonias *A. paragallinarum*.

3.6.1.1 Tinción Gram

Una vez visualizadas las colonias en las cajas inoculadas en agar sangre, dentro de una cámara de flujo laminar y en condiciones asépticas, con un asa de inoculación se tomó cuidadosamente la mitad de una colonia la misma que fue utilizada para realizar la tinción Gram (según el método de Madigan, *et al.*, 1999).

3.6.1.2 Determinación de las características morfológicas

En la misma placa que se realizó la tinción, también se observó la morfología de las bacterias, a través de un microscopio.

3.6.1.3 Siembra en estría compuesta

Una vez comprobado que la bacteria inoculada fue *A. paragallinarum*, se realizó la siembra de éstas en estrías compuestas (según método de Madigan *et al.*, 1999).

El medio de cultivo en el que se realizó la siembra fue agar sangre preparado de la misma forma que se detalló anteriormente.

Se sembraron en 2 cajas petri que igualmente fueron incubadas en el frasco con vela a 37°C durante 24 horas.

Cuando se visualizaron las colonias bacterianas, con un asa de inoculación estéril, se tomó una colonia que estuvo bien separada de las demás y nuevamente se realizó una siembra en estría compuesta, esto se llevó a cabo de igual forma en 2 cajas petri con el fin de que la cepa a utilizar posteriormente estuviese completamente pura.

3.6.2 Determinación de las características bioquímicas de *A. paragallinarum*

3.6.2.1 Preparación de la galería API NH

Para determinar las características bioquímicas se utilizó las pruebas API NH. Este sistema permite la identificación de *Neisseria* y *Haemophilus*.

El sistema incluye 10 microtubos que contienen substratos deshidratados, para realizar 12 tests de identificación (reacciones enzimáticas o fermentaciones de azúcares), así como la investigación de una penicilinasa. Igualmente consta de 10 ampollas de API NaCl 0.85% Medium (2ml), 1 ampolla de reactivo JAMES, 1 ampolla de reactivo ZYM B, 10 cámaras de incubación, 10 hojas de resultados y 1 ficha técnica. Ver la composición de los reactivos en la Tabla A -1 (Anexo A).

3.6.1.2 Preparación del inóculo

Se inició abriendo tres ampollas de API NaCl 0.85% Medium (2ml) y se recolectó el contenido en un tubo estéril, con la ayuda de una asa de siembra, se tomaron varias colonias bien aisladas de las cajas sembradas anteriormente en agar sangre y se realizó una suspensión de turbidez igual a 4 de McFarland (Tabla A-2 - Anexo A), se homogenizó a fondo. Esta suspensión fue utilizada inmediatamente.

3.6.1.3 Inoculación de la galería

Se repartió la suspensión bacteriana en las cúpulas, evitando la formación de burbujas, para ello se inclinó la cámara de incubación hacia adelante y se colocó la pipeta o jeringa en el lado de la cúpula. Se llenó únicamente la parte del tubo de los 7 primeros microtubos (PEN a URE): 50µl aproximadamente. Después se llenó el tubo y la cúpula de los 3 últimos microtubos, LIP/ProA, PAL/GCT, βGAL/IND: 150µl aproximadamente, teniendo cuidado de no crear un menisco convexo.

A continuación se recubrieron los 7 primeros ensayos (PEN a URE) de aceite de parafina o aceite de inmersión.

Se tomaron en cuenta las siguientes notas:

- NOTA 1: La calidad de llenado es muy importante, los tubos excesivos o insuficientemente llenados son fuente de resultados falsamente positivos o negativos.
- NOTA 2: Se eliminará las galerías que presenten reacciones espontáneas después de la inoculación y se repetirá el ensayo en una nueva galería.

Finalmente se cerró la cámara de incubación y se incubó de 2 horas a 2 horas 15 minutos a 36°C en atmósfera aerobia.

3.6.1.4 Lectura de la galería

Las reacciones se leyeron remitiéndose a la Tabla A-4 (Anexo A).

En la galería los 3 últimos tubos son bifuncionales y permiten la realización de 2 reacciones en el mismo tubo:

- 8. LIP (reacción espontánea) / ProA (reacción después de la adición del reactivo).
- 9. PAL (reacción espontánea) / GCT (reacción después de la adición del reactivo).
- 10. β GAL (reacción espontánea) / IND (reacción después de la adición del reactivo).

Se anotaron los resultados de las reacciones: LIP, PAL y β GAL, antes de la adición del reactivo. Seguidamente se añadió una gota de reactivo ZYM B en los microtubos 8 y 9; después de igual manera se añadió una gota de reactivo JAMES en el microtubo 10. Se esperó 3 minutos y se leyeron las reacciones consultando en la Tabla A-4. Si la reacción LIP es positiva, se interpreta la reacción ProA como negativa, se haya o no se haya añadido el reactivo ZYM B.

Si después de 2 horas de incubación, varias reacciones (fermentación, penicilinas) fueran dudosas, se reincubará la galería 2 horas suplementarias y

se leerá de nuevo estas reacciones (en este caso no se volverán a leer los ensayos enzimáticos).

3.6.3 Optimización del crecimiento de *A. paragallinarum*

3.6.3.1 Experimento Preliminar

Un experimento preliminar se realizó para determinar la cinética de crecimiento que presenta *A. paragallinarum* serotipo A, en el cultivo realizado en la farmacéutica FARBIOVET S.A.

Se prepararon 300ml de medio de cultivo de acuerdo a la Tabla A-3 (Anexo A) y se vertieron en 3 viales de 100ml cada uno. Se prepararon 5ml de una suspensión bacteriana en solución salina (0.85% NaCl), con un asa de inoculación se tomó 2 colonias de *A. paragallinarum* aisladas anteriormente y se resuspendieron en la solución salina (suspensión de turbidez igual a 1 de McFarland).

A continuación, 1ml de esta suspensión se inoculó en cada vial que contiene el medio de cultivo estéril. Un vial inoculado, después de transcurrir 24 horas fue conservado como muestra patrón para posterior utilización.

3.6.3.1.1 Cuantificación de la biomasa producida

Para la cuantificación se lo hizo por un método indirecto que correspondió a la espectrofotometría. En la cual se midió la absorbancia (A) de las suspensiones bacterianas, en la que la cantidad de luz absorbida por la muestra dependió de la concentración de la solución, es decir se basa en la Ley de Beer.

Cuantas más células haya más luz se dispersa y más turbia aparece la suspensión. Los resultados se expresaron en valores de absorbancia, las mismas que son proporcionales a la masa celular y también al número de células (Madigan *et al.*, 1999).

La cuantificación bacteriana se basó también en la Escala de McFarland, la misma que proyecta concentraciones aproximadas de bacterias. Para esto se preparó soluciones de cloruro de bario (BaCl_2) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1%, éstas se distribuyeron en 10 tubos correctamente identificados de acuerdo a la Tabla A-2 (Anexo A).

A continuación, las soluciones realizadas en cada tubo se leyeron en el espectrofotómetro utilizando como blanco agua destilada. Las lecturas se hicieron a una longitud de onda de 540nm en el rango visible, la misma que se utilizó para la lectura de los medios de cultivo.

Con los datos de las absorbancias se realizó un gráfico, colocando en las abscisas el número aproximado de bacterias (Tabla A-2) y en las ordenadas las absorbancias registradas. Después se obtuvo la ecuación de la gráfica para posterior interpolación con las absorbancias de los medios de cultivo y poder determinar la concentración de bacterias existentes en los diferentes medios.

Para el caso de las lecturas de los medios de cultivo, se lo realizó inmediatamente después de haber inoculado las bacterias en los medios líquidos, el dato obtenido correspondió a la hora cero, la siguiente lectura se lo realizó a las 15 horas, en este tiempo se supuso que ocurrió la fase exponencial, la cual no fue de mucho interés para esta investigación, la lecturas siguientes se realizaron cada hora hasta que se observaron que los valores permanecieron estables o empezaron a descender; con estos valores se pudo observar en qué tiempo empezó la fase estacionaria, que correspondió a la fase que más interés presenta.

Se ajustó el espectrofotómetro a cero, empleando como blanco cada medio de cultivo realizado pero sin inocular.

El espectrofotómetro utilizado fue el Shimadzu UV-1800, con celdas de cuarzo QS de 10mm, en éstas se colocó las soluciones y los diferentes

medios de cultivo a analizar; las mismas fueron colocadas en el interior del espectrofotómetro individualmente, y a continuación se procedió a la lectura.

Una vez encendido el espectrofotómetro, en la pantalla del mismo se seleccionó la opción “Photometric”, a continuación fue escogida “Photometric 8λ” en donde se pudo elegir la longitud de onda a la que fueron realizadas las lecturas, es decir 540nm.

Primeramente se encendió utilizando el blanco, para esto en una de las celdas fue colocado un volumen adecuado, con el blanco respectivo, aproximadamente 3ml, esta celda fue introducida en el espectrofotómetro seguida de la selección de la opción “Auto zero”, una vez observado en la pantalla que el valor de la absorbancia fue cero, se continuó con la lectura; igualmente colocando en otra celda los medios realizados, introduciendo en el espectrofotómetro y registrando absorbancia que resultaba de cada medio.

3.6.3.2 Preparación del medio líquido

Para la elaboración del medio se basó en la fórmula del medio preparado en la farmacéutica Tabla A-3 (Anexo A), pero sin el suero equino, a éste se le añadió diferentes fuentes de enriquecimiento, entre las cuales estuvieron: fuentes del factor V (NAD), fuentes del factor X (hemina) y cloruro de sodio en diferentes concentraciones.

La cantidad de cada fuente de enriquecimiento colocada en los medios fue: 0.3ml por cada 100ml de medio para el caso de las fuentes de NAD y hemina (según Blackall – Medio del antígeno para la vacuna contra Coriza), mientras que para la concentración de cloruro de sodio (NaCl) fue: 1 y 1.5% p/v.

Un medio general fue preparado de acuerdo a la Tabla A-3, el volumen preparado fue 9600ml tomando en cuenta que eran 24 medios de cultivo a realizar, este volumen fue repartido en alícuotas de 100ml en cada vial de la

siguiente manera: 24 viales correspondieron a los blancos, y los 72 restantes fueron los diferentes medios de cultivo a los que se inocularon con sus respectivas tres réplicas de cada medio.

En primera instancia no fueron añadidas las fuentes de enriquecimiento ya que algunas son termolábiles como es el caso del NAD (Faddin, 2000), éstos se añadieron después de autoclavar el medio general en cada vial. Las concentraciones de cloruro de sodio si fueron añadidas a cada vial de acuerdo al diseño experimental establecido.

3.6.3.2.1 Fuentes del factor V (NAD)

Como fuentes de NAD se utilizaron: suero de pollo, suero ovino y extracto de levadura.

Para obtener el suero de pollo y ovino primeramente se extrajo sangre de los dos animales, aproximadamente 600ml de cada animal, fue recolectada en envases estériles y dejando reposar por una hora, la sangre coaguló y precipitó quedando un sobrenadante que correspondió al suero, para la separación del mismo se absorbió con una jeringa el líquido sobrenadante hasta aproximadamente 1cm antes de la parte del coágulo para evitar su absorción, obteniéndose únicamente suero.

Para mayor precisión, este suero obtenido fue centrifugado a 3000 rpm durante 20 minutos, finalmente el suero formado fue separado del precipitado, el mismo que contenía NAD (Schalam& Beach, 1935).

Para preparar el extracto de levadura se disolvieron 2,5g de levadura en 20ml de agua destilada, dejando reposar durante 15 minutos y filtrando el contenido, el líquido que se obtuvo correspondió al extracto de levadura.

3.6.3.2.2 Fuentes del factor X (hemina)

Como fuentes de hemina se utilizaron: extracto de sangre autoclavada de pollo y de oveja.

Para preparar estos extractos fueron medidos 500ml de coágulo de la sangre y mezclados con 200 ml de suero salino al 0.85%, se hirvieron, y filtraron a través de una gasa y finalmente se autoclavó a 15psi por 30minutos. Este procedimiento fue realizado tanto para la sangre de pollo como para la de oveja y fue una adaptación del método de Rivers and Poole (1921).

3.6.3.2.3 Concentración de Cloruro de Sodio (NaCl)

Las concentraciones de NaCl que se utilizaron fueron de 1 y 1.5% p/v.

Después de la obtención los factores de enriquecimiento y que los medios hayan sido autoclavados en cada vial, se añadieron los factores extraídos de acuerdo al diseño experimental establecido, con la mayor asepsia posible para evitar que la contaminación de los medios. Las fuentes de NAD fueron esterilizadas con filtros milipore de 0.45µm y vertidas en los respectivos medios. Las fuentes de hemina se vertieron directamente con una jeringa ya que estos en su extracción ya fueron autoclavados.

3.6.3.3 Inoculación de *A. paragallinarum*

Para cultivar a las cepas de *A. paragallinarum*, una vez realizadas las pruebas preliminares para la determinación del volumen de inóculo se tomó 1ml de la muestra patrón preparada anteriormente con una pipeta o una jeringa, y se transfirió a cada vial con el respectivo medio de cultivo, se agitó para homogenizar la muestra, igualmente esto se realizó en el área estéril para evitar contaminación.

Posteriormente se llevaron los viales inoculados a la estufa a 37°C para que se produzca la reproducción y crecimiento de las bacterias.

Para la cuantificación de la biomasa producida se siguió el método establecido en el numeral 3.6.3.1.1, pero con la diferencia de que a partir de la segunda lectura a las 14 horas, los valores de absorbancia fueron tomados cada 2 horas.

3.6.4 Determinación de la cinética de crecimiento

Primero se determinó el número de generaciones experimentadas por la población bacteriana (n), mediante la siguiente fórmula:

$$n = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2}$$

Donde: N_0 = Número de microorganismos inicial

N = Número de microorganismos final (GENMIC, 2001).

A continuación se calculó el tiempo de generación o duplicación (g), utilizando la siguiente ecuación:

$$g = \frac{t}{n}$$

Donde: t = Intervalo de tiempo

n = Número de generaciones (Carrillo, 2003).

Finalmente se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ), la misma que se realizó mediante la fórmula descrita a continuación:

$$\mu = \frac{\ln 2}{g}$$

Donde: g = Tiempo de degeneración (Carrillo, 2003).

3.7 Procesamiento y análisis

3.7.1 Características bioquímicas de *A. paragallinarum*

Con los datos que se obtuvieron en las pruebas API respecto a las características bioquímicas de *A. paragallinarum*, se elaboró una tabla de resultados positivos o negativos y se comparó con resultados bibliográficos, para diferenciarlas de otras bacterias patógenas para aves y verificar que corresponde a la bacteria problema, respectivamente.

3.7.2 Elaboración de curvas de crecimiento

Los datos obtenidos de absorbancia se transformaron en datos de concentración celular, basándose en la curva de McFarland como se detalló anteriormente, se elaboraron curvas de crecimiento para cada medio con los valores promedio de las 3 réplicas, para esto se graficó en el eje Y los valores de concentración celular y en el eje X el tiempo.

3.7.3 Determinación del mejor medio de cultivo líquido enriquecido

Para determinar la cantidad de biomasa producida en los diferentes medios de cultivo, se utilizó el diseño experimental A x B x C, con las combinaciones que se muestran en la Tabla 8, con tres repeticiones cada una.

Con los datos de concentración específicamente de la fase estacionaria que fue la de interés ya que es donde la concentración bacteriana permanece constante, se obtuvo un promedio de cada repetición de cada tratamiento y se realizó un análisis de varianza para observar si existen diferencias significativas en la cantidad de biomasa cultivada, dado el caso se procedió a realizar la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 5% para determinar el medio de cultivo enriquecido óptimo para el mayor crecimiento de *A. paragallinarum*. Los datos obtenidos fueron procesados en el software estadístico Infostat.

Luego de obtener el medio de cultivo con mayor crecimiento de biomasa se compararon con la concentración de una muestra testigo que correspondió al medio en el que se cultiva a *A. paragallinarum* actualmente en la empresa FARBIOVET S.A., Tabla A-3 (Anexo A), esto se realizó mediante la prueba paramétrica T-student en el mismo programa estadístico Infostat.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Análisis de los resultados

4.1.1 Aislamiento y purificación de las cepas de *A. paragallinarum* serotipo A

La cepa patrón de *A. paragallinarum* serotipo A de la farmacéutica se cultivó en cuatro cajas petri con Agar sangre (5% de sangre desfibrinada de oveja), según Soriano (2004) este medio es el más usado para el aislamiento de *A. paragallinarum* y según este autor, el tiempo en el que aparecen las colonias es de 16 a 24h.

Las diluciones cultivadas fueron 10^{-6} y 10^{-7} , dos cajas de cada dilución, transcurridas las 24 horas existió una gran cantidad de colonias, las mismas que presentaban un color crema brillante de las que se pudo posteriormente aislar.

4.1.1.1 Tinción Gram

Las colonias que crecieron en las placas con agar sangre resultaron gram negativas ya que después de la tinción presentaron un color rosado, Fotografía F-1 (Anexo F). Esto verificó una característica importante de *A. paragallinarum* ya que según varios autores esta bacteria es gram negativa.

4.1.1.2 Determinación de las características morfológicas.

Durante la tinción también se observó la forma de estas células bacterianas, las mismas que presentaron una estructura cocobacilar, es decir, figuras cilíndricas pero muy cortas, lo que se comprueba claramente en la Fotografía F-1 (Anexo F).

Las colonias que crecieron en las placas de agar presentaron una forma irregular, Fotografía F-2 (Anexo F).

Con estas características se comprobó que las bacterias sembradas pertenecen a *A. paragallinarum*.

4.1.1.3 Siembra en estría compuesta

En la Fotografía F-3 (Anexo F), se observa las estrías compuestas completamente puras, presentando colonias totalmente aisladas.

4.1.2 Determinación de las características bioquímicas de *A. paragallinarum*

Las cepas anteriormente aisladas se sometieron a las pruebas API NH, según la ficha técnica de la galería recomendaba usar cepas cultivadas en agar sangre y en una atmósfera enriquecida con CO₂, ya que de esta manera estas bacterias obtendrán una expresión enzimática óptima para esta galería.

Los cultivos que se utilizaron fueron jóvenes es decir a las 24 horas luego de haberles cultivado para que no pierdan sus propiedades metabólicas.

Los resultados que se obtuvieron a las 2 horas de haber inoculado la galería API NH, se detallan en la Tabla B-12 (Anexo B).

En las Fotografías F-4, F-5 y F-6 (Anexo F), se visualizan claramente las galerías API NH antes de ser inoculadas, inmediatamente después de la inoculación y transcurridas las 2 horas de incubación respectivamente, en éstas se muestra el cambio de color que ocurrió antes y después, dando resultados positivos y negativos para las diferentes pruebas bioquímicas.

4.1.3 Optimización del crecimiento de *A. paragallinarum*

4.1.3.1 Experimento preliminar

En la Tabla B-1 (Anexo B), se observan los datos de absorbancia tomados a una longitud de onda de 540nm desde el tiempo 0 hasta después de 23 horas,

los datos fueron tomados para determinar a qué tiempo ocurre la fase estacionaria que presenta esta bacteria, ya que según Hecheleitner (2001) cada fase de la curva de crecimiento tiene un tiempo aproximado, así la fase de adaptación dura aproximadamente 4 horas, la fase logarítmica termina más o menos a las 12 horas y la fase estacionaria dura alrededor de las 18 a 24 horas.

De acuerdo a esto el primer valor fue tomado inmediatamente después de inocular la bacteria en el medio, el mismo que presentó una absorbancia menor a 1 indicando una concentración muy baja de células bacterianas, a medida que fue transcurriendo el tiempo, las bacterias se fueron reproduciendo hasta que el siguiente valor tomado a las 15 horas de cultivado el medio ya aumentó a valores superiores a 1, los siguientes valores fueron tomados cada hora, los mismos que permanecieron casi constantes variando únicamente en décimas, lo cual indicó que el ciclo de vida de esta bacteria entró a la fase estacionaria.

En el Gráfico C-1 (Anexo C), se observa la curva de crecimiento que se formó con los datos promedio obtenidos de absorbancia, los mismos que empiezan en 0,1780 para el tiempo cero y llegan hasta 1,6155 a las 23 horas de haber sido cultivada la bacteria.

4.1.3.1.1 Preparación del medio líquido y cuantificación de la biomasa producida

Para la cuantificación de biomasa en los medios de cultivo preparados se basó en la Escala de McFarland, mediante la cual se transformó los datos de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro, a una concentración celular aproximada, expresada en UFC/ml. Para esta escala se preparó 10 tubos con las respectivas soluciones de H_2SO_4 al 1% y $BaCl_2$, Los datos de absorbancia obtenidos de estos 10 tubos se presentan en la Tabla B-2 (Anexo B).

En el Gráfico C-27 (Anexo C), se observa la curva de McFarland formada con los datos de absorbancia y los valores aproximados de células bacterianas, esta

gráfica presenta un coeficiente de correlación de 0,99 indicando que los datos registrados estuvieron correctos.

Se formularon 24 medios de cultivo líquidos y enriquecidos diferentes, variando tres factores de crecimiento: Fuente de NAD, fuente de hemina y concentración de NaCl; los mismos que son requeridos por *A. paragallinarum* (Soriano, *et al.*, 2004). Para la toma de los valores de absorbancia de cada medio se basó en el experimento preliminar, el primer valor fue tomado después de haber inoculado (tiempo cero), luego a las 14 horas de haberlos cultivado y de aquí en adelante cada dos horas hasta las 22 horas después de la inoculación.

En la Tabla B-3 (Anexo B), se observa los valores de absorbancia para los diferentes tratamientos, que se obtuvieron durante el crecimiento de *A. paragallinarum*, estos valores van desde 0,159 la absorbancia más baja, hasta 1,735 la más alta.

En el tiempo cero se obtuvieron las absorbancias más bajas de todos los valores tomados ya que aún no existe reproducción bacteriana, pero luego de haber transcurrido 14 horas se visualizó el incremento de las absorbancias demostrando el aumento de la concentración bacteriana, a las 16 horas la absorbancias aún continuaron creciendo pero en menor intensidad que las lecturas anteriores indicando que el período de vida de la bacteria estaba entrando a la fase estacionaria, fase en la que permanece constante el número de células (Carrillo, 2003); las absorbancias tomadas a partir de las 16 hasta las 22 horas correspondieron a la fase en mención porque como se puede ver en la Tabla B-3 (Anexo B), las absorbancias permanecen muy cercanas, variando únicamente en cantidades muy reducidas.

Como se pudo observar en algunos medios de cultivo, las absorbancias fueron más altas que en otros, esto fue debido a las diferentes concentraciones bacterianas existentes en cada medio, demostrando la influencia de los tres factores de crecimiento utilizados en el crecimiento de *A. paragallinarum*.

Mediante la utilización de la escala de McFarland de igual forma los valores de absorbancia obtenidos se transformaron en concentración bacteriana, estos datos se muestran en la Tabla B-4 (Anexo B), los mismos que estuvieron en el rango de 180531513 a 3054762605 UFC/ml aproximadamente.

4.1.4 Crecimiento de *A. paragallinarum* en el medio de cultivo de la farmacéutica FARBIOVET S.A.

Para comparar la efectividad de los medios de cultivo formulados se cultivó a *A. paragallinarum* en el medio utilizado en la farmacéutica. En la Tabla B-7 (Anexo B), se reporta los datos de absorbancia leídos durante el crecimiento de la bacteria. Los valores fueron tomados igualmente utilizando el mismo rango de tiempo usado en la lectura de los 24 tratamientos realizados.

De igual manera estos datos fueron transformados en concentraciones bacterianas, Tabla B-8 (Anexo B).

Para comparar la concentración bacteriana obtenida en el medio de cultivo utilizado en la farmacéutica con la de los 24 medios de cultivo formulados, se determinó una concentración promedio de UFC/ml de las tres réplicas tanto en las concentraciones de los medios formulados como en el medio de cultivo testigo, las mismas que se muestran en las Tabla B-5 y B-9 (Anexo B) respectivamente.

4.1.5 Determinación del mejor medio de cultivo

Para la obtención del mejor medio de cultivo líquido enriquecido, en el que existió mayor cantidad de biomasa, se utilizó los valores correspondientes a la fase estacionaria, los mismos que se presentan en la Tabla B-6 (Anexo B), los datos correspondientes a los promedios del número de UFC/ml en el rango de 16 a 22 horas, de cada réplica de cada tratamiento.

De la misma forma en la Tabla B-10 (Anexo B), se presentan los valores correspondientes a las concentraciones bacterianas en la fase estacionaria pero

pertencientes a las cepas de *A. paragallinarum* cultivadas en el medio utilizado en la farmacéutica; estas concentraciones son muy diferentes a las obtenidas en los 24 medios formulados, en algunos casos mayor y en otros menor.

Para realizar los cálculos estadísticos y determinar el mejor medio de cultivo, de los 24 formulados, se utilizó un diseño factorial A x B x C, como se explicó anteriormente se realizó con los promedios de los datos de la fase estacionaria de cada tratamiento (medio de cultivo).

Una vez procesados los datos en el programa estadístico Infostat, los resultados que se obtuvieron se muestran en las tablas del Anexo D.

El análisis de varianza del experimento se encuentra en la Tabla D-1, en donde señala que el coeficiente de variación es 1.07, indicando que los datos de absorbancia tomados entre cada réplica no son significativos y no existe variación entre ellos. De igual forma muestra que el Factor A (Fuente de NAD), Factor B (Fuente de Hemina) y el Factor C (Concentración de NaCl) presentan diferencia significativa, al igual que las interacciones entre los factores AB, AC y ABC; lo cual indica que estos factores interactúan entre sí para presentar un efecto combinado que influyen significativamente en la concentración bacteriana.

Al aplicar la prueba de Tukey al 5% en el caso del Factor A, en la Tabla D-2 (Anexo D), se observan tres grupos homogéneos, siendo el mejor el nivel el a_1 (suero de pollo), con la cual se obtuvo una media de 2978898926 UFC/ml, seguido del nivel a_2 (suero ovino) y a_3 (extracto de levadura) con los cuales se consiguió una concentración de UFC/ml similar 2913860410 y 2906449112 UFC/ml respectivamente, por último con la menor concentración bacteriana está el nivel a_0 , los medios sin fuente de NAD con una media de 2795454715 UFC/ml, esto se puede verificar claramente en el Gráfico D-1 (Anexo D) donde se visualiza los intervalos al 95% de la concentración bacteriana, en la que el intervalo del nivel a_1 está sobre los demás, los intervalos pertenecientes a los

niveles a_2 y a_3 , están muy cercanos, mientras que el intervalo inferior pertenece al nivel a_0 .

En el caso del Factor B, la prueba de Tukey al 5% se muestra en la Tabla D-3 (Anexo D) y se observa igualmente tres grupos homogéneos, demostrando como mejor al nivel b_1 (extracto de sangre autoclavada de pollo) con una media de 2960990721 UFC/ml, en segundo lugar con una media de 2881377626 UFC/ml el nivel b_2 (extracto de sangre autoclavada de oveja) y por último la ausencia de una fuente de hemina, nivel b_0 , arrojó una media de 2853629026 UFC/ml. En el Gráfico D-2 (Anexo D) se constata que el intervalo de concentración bacteriana más alto es el perteneciente al nivel b_1 , seguido del intervalo del nivel b_2 y en la parte inferior de la gráfica está el intervalo correspondiente al nivel b_0 .

En la Tabla D-4 (Anexo D), se muestra la prueba de Tukey al 5% para el Factor C, mostrando la influencia de este factor en la concentración bacteriana, la mayor cantidad de biomasa se logró en el nivel c_0 (1% de NaCl) con una media aproximada de 2934153944 UFC/ml y en segundo lugar el nivel c_1 (1.5% de NaCl) se obtuvo una media de 2863177637 UFC/ml. Lo que se puede confirmar con el Gráfico D-3 (Anexo D) donde se muestra los intervalos de concentración bacteriana al 95%, existentes en los medios que fueron enriquecidos con el Factor C, en donde se visualiza una marcada diferencia de los intervalos de los dos niveles de este factor.

Para la interacción AB la prueba de Tukey al 5% se muestra en la Tabla D-5 (Anexo D), en la cual se observa 8 grupos homogéneos y demuestra como mejor resultado al tratamiento a_1b_1 (suero de pollo y extracto de sangre autoclavada de pollo) con una media de 3053537115 UFC/ml, los cuales se puede comprobar en el Gráfico D-4 (Anexo D), donde se muestra la interacción entre los factores A y B, en el que se observa claramente que tanto la línea que representa el extracto de sangre autoclavada de pollo como el punto que

corresponde al suero de pollo presentan una elevada preeminencia con respecto a los demás niveles de los dos factores.

En el caso de la interacción AC, en la Tabla D-6 (Anexo D) se muestra la prueba de Tukey al 5% aplicada, donde se visualizan 7 grupos homogéneos obteniéndose una media aproximada de 3005626283 UFC/ml para el caso del tratamiento a_1c_0 (suero de pollo y 1% de NaCl), el cual es el mejor tratamiento, Gráfico D-5 (Anexo D), en el que se muestra una clara evidencia de que la línea que corresponde al 1% de NaCl está sobre la que corresponde al 1.5% indicando mayor concentración bacteriana, al igual que el punto que pertenece al suero de pollo es el más alto de la gráfica ya que existe mayor cantidad de bacterias.

Finalmente para la interacción ABC, la más importante en la determinación del mejor medio de cultivo, la prueba de Tukey al 5% se publica en la Tabla D-7 (Anexo D) y demuestra como mejor resultado el tratamiento $a_1b_1c_0$ (suero de pollo, extracto de sangre autoclavada de pollo y 1% de NaCl) con una media de concentración bacteriana de 3069643557 UFC/ml, siendo ésta la mayor concentración de células que se obtuvo en los 24 medios de cultivo formulados y por lo tanto se convierte en el mejor medio de cultivo líquido y enriquecido.

En esta tabla se visualiza que existen 13 grupos homogéneos con diferentes concentraciones bacterianas, al final de la tabla se tiene el medio de cultivo con menor concentración de bacterias, correspondiente al tratamiento $a_0b_1c_1$ (sin fuente de NAD, extracto de sangre autoclavada de oveja y 1.5% de NaCl) con una media aproximada de 2694293417 UFC/ml.

La prueba t-student, expuesta en la Tabla D-8 (Anexo D) muestra que existe diferencia significativa entre los 24 medios de cultivo formulados y el medio de cultivo testigo, estableciendo de esta manera que en cada medio de cultivo existió una concentración bacteriana diferente a la del medio de cultivo utilizado como testigo, en ciertos casos mayor concentración y en otros menor.

Una notable diferencia en las concentraciones de UFC/ml en los medios de cultivo formulados con la del medio de cultivo testigo se puede observar en el Gráfico C-29, (Anexo C), en el que las diferentes alturas de las barras demuestran la existencia de diferentes concentraciones bacterianas en cada medio de cultivo, se visualiza claramente que la barra de color anaranjado es la que mayor UFC/ml contiene correspondiente a la del mejor medio de cultivo obtenido ($a_1b_1c_0$), mientras que la barra morada pertenece a los UFC/ml en el medio de cultivo testigo, la misma que está por debajo de la mayoría de las barras de los demás medios de cultivo y sobre todo del mejor medio de cultivo resultante.

4.1.6 Cinética de Crecimiento

Debido a que los 24 medios formulados tenían diversos compuestos enriquecedores, las cepas de *A. paragallinarum* crecieron a diferentes parámetros cinéticos.

El Anexo B, Tabla B-14 muestra los valores del número de ciclos de duplicación o generaciones que experimentó *A. paragallinarum* en los diferentes medios de cultivo, se visualiza que las bacterias desarrolladas en el medio de cultivo que resultó ser el mejor (Medio N°9, tratamiento $a_1b_1c_0$) tienen el mayor número de divisiones bacterianas, un valor promedio aproximado de 4.0454 generaciones, comparado con el medio de cultivo testigo en el que hubo 3.7357 generaciones.

La gran diferencia del número de generaciones ocurridas en los diferentes medios de cultivo se evidencia claramente en el Gráfico C-28 (Anexo C), en el que la barra perteneciente al mejor medio de cultivo es la más alta.

En la Tabla B-15 (Anexo B) se observan los tiempos de generación en horas empleados por *A. paragallinarum* en su crecimiento, estos valores van en un rango de 3.9551 a 4.7151 horas, siendo el valor más bajo el menor tiempo que se demoró la bacteria en el medio de cultivo en alcanzar la concentración de biomasa más alta, mientras que el valor más alto corresponde al tiempo

empleado por *A. paragallinarum* en otro medio de cultivo en alcanzar su máxima concentración bacteriana.

El medio de cultivo testigo como se puede observar presenta un tiempo de generación de 4.2830 horas, demostrando que en este medio de cultivo la bacteria tarda más en dividirse que en el mejor medio obtenido. El Gráfico C-30 (Anexo C), expone los tiempos de generación de las bacterias durante su desarrollo en los medios de cultivo, en donde se muestra una notable variación de los valores correspondientes a los diferentes medios.

Para el caso de la velocidad específica de crecimiento los datos se muestran en la Tabla B-16 (Anexo B), los cuales fluctúan entre 0.1470 y 0.1753 UFC h⁻¹, el primero correspondiente al tratamiento a₀b₁c₁ en donde creció menor cantidad de bacterias debido a que su velocidad fue baja y el segundo pertenece al tratamiento a₁b₁c₀ que fue el mejor, ya que su velocidad es la más alta y por lo tanto creció mayor cantidad de bacterias.

El Gráfico C-31 (Anexo G) demuestra la variación en las velocidades específicas de crecimiento de los diferentes medios de cultivo, en donde el medio que resultó mejor presenta la barra más alta que está sobre las demás y lo más importante sobre la barra perteneciente al medio de cultivo testigo.

4.1.6.1 Curvas de Crecimiento

En el Anexo C, se observan las 24 curvas de crecimiento correspondientes a cada uno de los medios de cultivo formulados (Gráficos C-1 – C-25), en las que se parte de una concentración inicial de bacterias en el tiempo cero hasta llegar a una concentración final a las 22 horas.

Fueron graficadas con los datos de UFC/ml promedios de cada tratamiento expuestos en la Tabla B-5 (Anexo B).

En estas curvas se visualizan notablemente que luego del tiempo cero la bacteria experimenta un crecimiento exponencial hasta aproximadamente las

16 horas después de la inoculación en donde empieza la fase estacionaria y la concentración empieza a permanecer constante, es decir las bacterias ya no se multiplican, es por esto que en la gráfica se observa que a partir de este tiempo la curva tienden a una línea horizontal.

4.2 Interpretación de Datos

4.2.1 Aislamiento y purificación de las cepas de *A. paragallinarum* serotipo A

El aislamiento de *A. paragallinarum* serotipo A fue realizado en agar sangre al 5% de sangre desfibrinada de oveja con base de Tripticasa – soja y en un ambiente anaerobio enriquecido con 5-10% de CO₂, este medio aporta muchos factores de enriquecimiento para el crecimiento de las bacterias, especialmente aquellas que son exigentes como es el caso de *A. paragallinarum*.

La base utilizada tiene una fuente proteica (digeridos trépticos, digeridos proteicos de soja) con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales. La aportación de caseína y peptonas de soja le hacen al medio muy nutritivo ya que suministran nitrógeno orgánico, particularmente aminoácidos y péptidos de cadena más larga (Val, 2000). La presencia de estas peptonas permiten el crecimiento de microorganismos exigentes como los de la familia Pasteurelleceae dentro de la cual se encuentra *A. paragallinarum*.

La adición de sangre desfibrinada de oveja enriquece la base, brindando los compuestos necesarios para el desarrollo de la bacteria, mediante el proceso de desfibrinación se removió la fibrina de la sangre, que es el factor que estimula la coagulación de la sangre que interfiere con la preparación y utilización en el medio de cultivo (Laboratorios CEDEVIT, 2005).

Con todas estas características nutricionales y ambientales que se aportaron al medio de cultivo, *A. paragallinarum* creció rápidamente.

4.2.2 Determinación de las características bioquímicas de *A. paragallinarum*

Las características bioquímicas obtenidas en las pruebas API NH fueron comparadas bibliográficamente para comprobar y estar en total seguridad de que la bacteria estaba completamente pura y pertenecía a la cepa a estudiar. Esta comparación se reporta en la Tabla B-13 (Anexo B).

Como se observa la mayoría de las pruebas aplicadas fueron comparadas, las cuales coinciden con los datos bibliográficos.

Cabe destacar que existen ciertas pruebas que son variables para *A. paragallinarum*, arrojando resultados positivos o negativos para la misma prueba, como se puede observar en la tabla, lo que podría ser motivo de confusión en algunas ocasiones. Según Terzolo (2005), estas variaciones se deben a que existen cepas NAD-dependientes y NAD-independientes, aquellas que son NAD-dependientes fermentan la maltosa y no presentan la enzima fosfatasa alcalina, mientras que las NAD-independientes dan resultados contrarios a estas pruebas, por tal razón existen diferentes biovares de esta bacteria.

Además existen otras pruebas bioquímicas que no fueron realizadas que igualmente son variables como la fermentación de la D-ribosa, D-xilosa, L-fucosa, dextrinas (Blackall *et al.*, 2005), manitol y sucrosa (Soriano, *et al.*, 2004).

4.2.3 Optimización del crecimiento de *A. paragallinarum* serotipo A

Para optimizar el crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo se requiere de factores de crecimiento que ayuden a su completo desarrollo y aceleren su velocidad de crecimiento, para obtener una mayor concentración de biomasa que sea útil en aplicaciones posteriores y de gran beneficio. Es por esto que se utilizó diferentes factores enriquecedores para la formulación del medio de cultivo para *A. paragallinarum* serotipo A.

En el experimento preliminar que se realizó, lo que más importó fue determinar el tiempo al que empieza la fase estacionaria, ya que ésta comienza cuando la fase exponencial termina es decir cuando las células bacterianas se han dividido hasta llegar a su máxima concentración, por lo tanto, en la fase estacionaria se tendrá una gran cantidad de biomasa, la cual no variará y habrá limitaciones del crecimiento ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos o porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible (Madigan *et al.*, 1999).

Con la máxima concentración de células de *A. paragallinarum* obtenida, la farmacéutica la utilizará para la elaboración de la vacuna contra la Coriza Infecciosa.

De acuerdo a bibliografía y a lo expuesto anteriormente, *A. paragallinarum* incluyendo a los tres serotipos (A, B y C) es una cepa muy exigente en sus requerimientos nutricionales, mediante estudios realizados en investigaciones anteriores se determinó que esta bacteria requería principalmente los factores V y X (NAD y Hemina respectivamente), para su desarrollo (Blackall *et al.*, 1995), pero en base a estudios posteriores concluyeron que solo requería el factor V, sin embargo en esta investigación para los medios formulados se utilizaron fuentes de NAD y fuentes de hemina.

En los 24 medios formulados la cantidad de biomasa de *A. paragallinarum* resultó variada en la mayoría de los medios.

De acuerdo a los resultados obtenidos se demostró primeramente que las cepas de *A. paragallinarum* serotipo A cultivadas, fueron NAD-dependientes ya que en los medios que no contenían fuentes de NAD las concentraciones bacterianas fueron las más bajas, mientras que aquellos que las que si contenían alcanzaron concentraciones superiores y con gran diferencia. Tanto los sueros de sangre de pollo y oveja como el extracto de lavadura demostraron ser fuentes ricas en NAD según los datos obtenidos de concentración bacteriana.

El NAD es una coenzima que se encuentra intacta en el interior de los glóbulos rojos o eritrocitos (Faddin, 2000) y para su extracción es necesario provocar la lisis de los mismos, es por eso que se centrifugó a altas velocidades la sangre, para que se rompan los eritrocitos quedando libres sus componentes internos, de esta manera, debido a que el NAD es menos denso que los demás componentes liberados (Lamb *et al.*, 1999) asciende al suero sanguíneo obtenido después de la centrifugación, quedando esta coenzima libre y disponible en el suero sanguíneo.

Igualmente esta coenzima está presente en el extracto de levadura, solución donde fue descubierta esta coenzima (Coenzima. Com, 1998).

Debido a que la mayor concentración bacteriana se logró con el suero de pollo, se concluyó que presenta más cantidad de NAD que el suero ovino y que el extracto de levadura. Según Roodt (2009), esta bacteria requiere NAD exógeno para su crecimiento ya que es incapaz de sintetizar y reciclar su propio NAD.

En cuanto a la utilización del factor X (hemina), importante para la síntesis de de enzimas respiratorias (Martínez, 2005), según investigaciones anteriores se ha expuesto que *A. paragallinarum* no requiere de este factor para su crecimiento, pero en esta investigación realizada se demostró que estas cepas en las condiciones que se les cultivó si requirieron de este factor.

A. paragallinarum es una bacteria anaerobia facultativa (Blackall *et al.*, 2005) que se desarrolla en ambientes en presencia o ausencia de oxígeno, cabe destacar que es preferible que crezca en ambientes enriquecidos con CO₂, para que desarrolle su metabolismo normalmente y crezca más rápido, pero debido a que no se contaba con una incubadora con inyección de CO₂ para un ambiente anaerobio, los cultivos formulados se mantuvieron en una incubadora normal, es decir en ambiente aerobio, por lo que la bacteria requirió del factor X para su crecimiento.

La hemina igualmente se encuentra en el interior de los eritrocitos de la sangre, por tal razón para su extracción, se provocó la lisis de éstos mediante el proceso de ósmosis con solución salina, seguida de un hervido para desnaturalizar toda las proteínas resultantes de la lisis de los eritrocitos, posteriormente el autoclavado ayudó a eliminar la contaminación restante dejando libre únicamente la hemina ya que este factor es termoestable (Faddin, 2000) y por ende resiste a las altas temperaturas.

El mejor medio de cultivo obtenido resultó mejor con el extracto de sangre autoclavada de pollo, indicando el requerimiento de este factor para su crecimiento y además que esta fuente de hemina contiene mayor cantidad de la misma al compararla con la otra fuente que fue el extracto de sangre autoclavada de oveja la cual arrojó resultados de concentración muy baja similar a los datos obtenidos con aquellas que no contenían fuente de hemina.

El NaCl proporciona los electrolitos esenciales para el desarrollo de *A. paragallinarum*, sin embargo de acuerdo a los datos obtenidos demuestra que mientras mayor es la concentración de NaCl, la concentración bacteriana disminuye en los medios de cultivo, lo que lleva a una conclusión de que las concentraciones utilizadas impedían el crecimiento de *A. paragallinarum*, provocando lisis celular por ósmosis, debido a las altas concentraciones de NaCl.

Esto se puede verificar con los datos de concentración bacteriana obtenidos en los 24 medios de cultivo, ya que el mejor medio de cultivo resultante fue el que contenía 1% de NaCl, mientras que aquellos que contenían 1.5% de NaCl alcanzaron menor cantidad de bacterias.

Los medios que contenían como fuente de hemina, el extracto de sangre autoclavada de oveja resultaban con menor concentración bacteriana incluso menos que aquellos que no contenían fuente de hemina, debido a que poseían una concentración de NaCl muy alta (1.5%) y éste provocaba la destrucción celular.

De todo lo expuesto anteriormente, como ya se explicó el mejor medio de cultivo resultó el medio que contenía: suero de pollo, extracto de sangre autoclavada de pollo y 1% de NaCl ($a_1b_1c_0$). Esto indica que la fuente de NAD, de hemina y la concentración de NaCl utilizadas, fueron las mejores.

La concentración de bacterias obtenida en este medio enriquecido formulado al comparar con la concentración obtenida en el medio utilizado en la farmacéutica, se nota una clara diferencia, siendo el medio formulado en esta investigación mucho mejor que el utilizado en la farmacéutica.

En la Tabla B-11 (Anexo B) se exponen los datos de concentración obtenidas en los dos medios de cultivo.

Como se puede observar en el medio de cultivo del tratamiento $a_1b_1c_0$, presentó una concentración bacteriana promedio de 3069643557 UFC/ml aproximadamente, mientras que con el medio de cultivo testigo se obtuvo una concentración de 2782528711 UFC/ml, es necesario resaltar que estas concentraciones de biomasa son el promedio de las concentraciones obtenidas durante la fase estacionaria (16 – 22 h).

De esta manera con el mejor medio de cultivo líquido enriquecido resultante, se incrementó el 10.31% en la concentración de bacterias, a pesar de que en el medio de cultivo testigo también se utiliza fuentes enriquecedoras como el suero equino pero en menor cantidad, tan solo 1ml por cada litro de medio de cultivo, pero en esta investigación se aumentó el volumen de fuente enriquecedora, a 3ml en lo que se trataba de fuentes de NAD y hemina. Sin embargo, con el estudio realizado se demostró que el suero de pollo aporta mayor cantidad de nutrientes (NAD) que el suero equino, para el desarrollo de *A. paragallinarum*.

4.2.4 Cinética de Crecimiento

La cinética describe las velocidades a las que ocurre las diferentes reacciones bioquímicas durante el crecimiento microbiano, en la cual influyen ciertos

factores como: el tipo de microorganismo, la cantidad de sustrato, biodisponibilidad, macro y micronutrientes y condiciones ambientales (Madigan *et al.*, 1999).

Diferentes parámetros cinéticos fueron medidos durante el crecimiento de *A. paragallinarum*.

Las bacterias cultivadas en el mejor medio líquido resultante obtuvieron los mejores valores de parámetros cinéticos en comparación con los obtenidos por *A. paragallinarum* en el medio de cultivo testigo. En la Tabla B-17 (Anexo B) se presenta un resumen de los parámetros cinéticos de *A. paragallinarum*.

Como se puede observar los valores de los parámetros cinéticos son diferentes tanto en el medio de cultivo del tratamiento $a_1b_1c_0$ como en el medio de cultivo testigo.

En cuanto al número de generaciones se observa que *A. paragallinarum* presenta más divisiones celulares en el medio formulado en el tratamiento $a_1b_1c_0$ que en el testigo, aumentó 0.3097 generaciones, aproximadamente un incremento del 8.28%.

En el tiempo de generación se puede visualizar que las bacterias del mejor medio resultante ($a_1b_1c_0$) tardan menos en dividirse que las que crecieron en el medio de cultivo testigo, un aproximado de 0.3279 horas menos, lo que representa el 7.65%.

La velocidad específica de crecimiento que es la más importante, se observa que existe una diferencia de $0.0134 \text{ UFC h}^{-1}$, siendo el medio del tratamiento $a_1b_1c_0$ en el que *A. paragallinarum* creció más rápido que las del medio de cultivo testigo, la velocidad incrementó aproximadamente 8.28%, un porcentaje similar al del número de generaciones.

Estos valores fueron determinados con las concentraciones bacterianas de la fase exponencial, que es donde la bacteria aumenta exponencialmente

(Madigan *et al.*, 1999). Para efectos de cálculo se tomaron únicamente los tres primeros valores de concentración de 0 a 16 horas, ya que no se contaba con más valores para la fase exponencial debido a que para la determinación del mejor medio de cultivo solo se necesitaban valores de la fase estacionaria.

4.2.4.1 Curvas de Crecimiento

Una curva de crecimiento se tiene con el número de bacterias que se van desarrollando a medida que incrementa el tiempo de incubación, cuando los microorganismos se cultivan en un medio discontinuo (batch) que es generalmente en un sistema cerrado en el que no se regenera el medio (Gómez, 2009).

En el Grafico C-26 (Anexo C) se muestra las curvas de crecimiento del mejor medio de cultivo obtenido y el medio de cultivo testigo

Como se puede observar la curva de crecimiento de color azul está sobre la de color rojo, indicando que existe mayor concentración bacteriana a los mismos tiempos de inoculación, que fueron a los que les iba leyendo las absorbancias.

Esto demuestra que los factores de enriquecimiento utilizados en el medio de cultivo formulado y que resultó el mejor, aportan con mayor cantidad de nutrientes que los utilizados en el medio de cultivo empleado en la farmacéutica FARBIOVET S.A. para el desarrollo de *A. paragallinarum* y debido a la gran disponibilidad de los nutrientes, las bacterias sufren mayor cantidad de divisiones celulares obteniéndose así mayor cantidad de UFC/ml de medio de cultivo.

Por tal motivo se tendrá mayor cantidad de biomasa (cepas de *A. paragallinarum* serotipo A), para la elaboración de la vacuna contra la coriza infecciosa, pudiendo ésta aumentar su producción. Con el medio formulado se contará con una concentración de cepas aproximadamente de $3,06 \times 10^9$ UFC/ml, por este motivo se logrará adelanto de la empresa, satisfaciendo las necesidades de los clientes generando un mercado potencial.

4.3 Verificación de Hipótesis

De acuerdo a los resultados obtenidos se rechaza la hipótesis nula que señala que las fuentes de NAD, hemina y la concentración de cloruro de sodio no influyen en el crecimiento de *A. paragallinarum*, ya que como se puede ver en el apartado 4.1, específicamente el 4.1.5 las fuentes de NAD, las fuentes y las concentraciones de NaCl presentan resultados efectivos en la concentración de *A. paragallinarum* en los diferentes medios de cultivo, resultando ser compuestos enriquecedores para esta bacteria.

Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa la cual expone que las fuentes de NAD, hemina y la concentración de NaCl influyen en el crecimiento de *A. paragallinarum*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- En esta investigación se formuló un medio de cultivo líquido enriquecido en el que las cepas de *Avibacterium paragallinarum* serotipo A, se desarrollaron con normalidad, aprovechando cada uno de los factores de enriquecimiento utilizados en la formulación y así cumplieron con su metabolismo, obteniéndose resultados positivos en cuanto al crecimiento de las cepas y a la asimilación de los diferentes nutrientes.

Con este medio de cultivo se logró incrementar la concentración de biomasa (UFC/ml) y la velocidad de crecimiento (UFC h^{-1}) de la bacteria, al comparar con el medio utilizado en la farmacéutica FARBIOVET S.A. y de esta manera se podrá elaborar la vacuna contra Coriza Infecciosa en el mismo tiempo que tardan en la farmacéutica en fabricarla pero en mayor cantidad, trayendo consigo un aumento en la productividad y sobre todo la rentabilidad de la farmacéutica.

- El cultivo en Agar sangre con agar tripticasa – soja y 5% de sangre desfibrinada de oveja en un ambiente anaerobio enriquecido con 5 – 10% de CO_2 permitió el aislamiento y purificación de las cepas de *A. paragallinarum* serotipo A.

Con la técnica de siembra por extensión en superficie de las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} se obtuvieron cepas completamente puras; sin embargo, debido a que se trata de una bacteria morfológicamente similar a otras la técnica de Tinción Gram permitió verificar que correspondían a bacterias Gram negativas.

- Las pruebas API NH confirmaron que la cepa con la que trabaja la farmacéutica para la elaboración de la vacuna y con la que se realizó la investigación corresponde a *A. paragallinarum*. Entre los resultados más significativos propios de esta bacteria y que pudieron ser comparados bibliográficamente estuvieron: fermentación de la glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa, ausencia de la reacción de la ornitina descarboxilasa y fosfatasa alcalina, incapacidad para hidrolizar la urea y para producir indol.
- Los 24 medios de cultivo aplicados como tratamientos permiten el crecimiento de *A. paragallinarum*.

Las concentraciones de 21 medios de cultivo resultaron superiores a la del medio de cultivo testigo, indicando la presencia de los nutrientes necesarios para la bacteria. Tan solo 3 medios de cultivo presentaron una concentración menor a la del testigo mostrando que no contenían fuentes de enriquecimiento o que solo tenían una de ellas pero que no era la adecuada para el microorganismo.

El medio con mayor concentración bacteriana fue el que contenía: suero de pollo como fuente de NAD (0,3ml), extracto de sangre autoclavada de pollo como fuente de hemina (0,3ml) y 1% de NaCl; presentó una concentración aproximada de $3,06 \times 10^9$ UFC/ml.

- Debido a que se han formulado medios complejos, las cepas de *A. paragallinarum* serotipo A, presentaron distintos parámetros cinéticos.

Esta bacteria presentó sus 4 fases de crecimiento en un rango de tiempo de 0 a 24 horas aproximadamente, cumpliendo con cada una ellas.

En cuanto a la velocidad específica de crecimiento los valores estuvieron en un rango de 0.1470 y 0.1753 UFC h⁻¹, pertenecientes a los cultivos con menor y mayor cantidad de UFC/ml respectivamente. De igual manera el número de generaciones estuvo entre 3.3934 y 4.0454, indicando que se dividieron menos y más células bacterianas respectivamente en los diferentes medios de cultivo. Finalmente, este parámetro conlleva al tiempo de generación los mismos que oscilaron entre 3.9551 a 4.7151 horas, tardándose las bacterias en dividirse en unos cultivos menos tiempo que en otros.

5.2 Recomendaciones

- Determinar la cantidad de NAD y hemina existentes en el suero de pollo y en el extracto de sangre autoclavada de pollo respectivamente, mediante técnicas espectrofotométricas, para cuantificar el porcentaje en peso o en moles consumidos durante el crecimiento de *A. paragallinarum*.
- Investigar fuentes ricas en NAD principalmente, debido a los resultados de los tratamientos analizados en esta investigación, y en hemina, para mantenerlas en condiciones aerobias si fuera necesario, que permitan el aumento de la población de *A. paragallinarum* en los medios de cultivo.
- Formular medios de cultivo líquidos enriquecidos para los serotipos B, C y Ecuador de *A. paragallinarum* para de igual manera, aumentar la concentración bacteriana de estas cepas en los cultivos y formular correctamente la vacuna contra la Coriza Infecciosa.
- Cultivar a *A. paragallinarum* en ambientes anaerobios en incubadoras con inyección de CO₂ debido a que esta bacteria bibliográficamente se conoce que es anaeróbica facultativa.

- Tomar más valores de absorbancia durante la fase exponencial para contar con varios valores de concentración celular y los cálculos de los parámetros cinéticos sea más exactos.
- Llevar el mejor medio de cultivo líquido enriquecido obtenido a nivel de laboratorio a una escala industrial, en un biorreactor con inyección de CO₂ lo que permitirá el incremento de la biomasa.

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1 Datos Informativos

- 1 Título:** Cultivo a escala industrial de las cepas de *Avibacterium paragallinarum* serotipo A, en un medio líquido enriquecido, en un biorreactor tipo batch (discontinuo).
- 2 Unidad Ejecutora:** Farmacéutica FARBIOVET S.A.
- 3 Beneficiario:** Farmacéutica FARBIOVET S.A.
- 4 Director del Proyecto:** Ing. Ana Alfaro
- 5. Personal Operativo:** Egdo. Santiago Toapaxi Mayorga
- 6 Tiempo de Duración:** 5 meses
- 7 Fecha de Inicio:** Julio 2012
- 8 Lugar de Ejecución:** Farmacéutica FARBIOVET S.A.
- 9 Costo:** \$1500

6.2 Antecedentes de la Propuesta

La producción industrial de los derivados de la biotecnología ha sido posible en buena medida gracias al desarrollo de las técnicas de cultivo celular en gran escala. Dichas técnicas han permitido el establecimiento de las condiciones para el cultivo de células microbianas para la síntesis de toda una gama de metabolitos de interés en los diferentes sectores de la industria (química, farmacéutica, textil, de alimentos, etc.). El núcleo principal de estas técnicas de

cultivo es el fermentador o biorreactor, que es el sistema en donde se promueve el crecimiento de organismos para la síntesis de diversos productos biotecnológicos (Galindo *et al.*, 2007).

En los últimos años se han logrado avances significativos en el diseño de biorreactores, así como en el grado de control que se ejerce durante el proceso de fermentación. Los biorreactores han permitido al operador controlar el estado del medio de cultivo, el cual determina el crecimiento y producción de un microorganismo (Cuellas, 2007).

Para la elaboración de la vacuna contra la coriza infecciosa se ha cultivado a *Avibacterium paragallinarum* en biorreactores empleando caldos de cultivo y cultivos de tejidos aviarios con diversos suplementos como es el caso de la infusión cerebro – corazón, la infusión de carne de pollo y el medio Casman según lo menciona Blackall y Terzolo (1995).

Según Rojas (2006), las vacunas elaboradas con cepas de *A. paragallinarum* crecidas en caldos de cultivo han sido las más utilizadas ya que han demostrado conferir mayor protección, es por esto que han cultivado a la bacteria en medios líquidos, en fermentadores, en los que se las ha mantenido de modo tal, que conserven inalterados sus atributos de virulencia, para ello las cepas han permanecido en un mínimo de subcultivos desde que se ha realizado su primer aislamiento hasta que crecen en el biorreactor.

Mediante el cultivo en los biorreactores se han controlado diversas condiciones: volumen de inóculo inicial, pH, temperatura, porcentaje de cloruro de sodio, nivel de hierro libre, atmósfera y tiempo de incubación; para que las cepas se desarrollen normalmente y cumplan con su metabolismo.

En la farmacéutica FARBIOVET S.A. se cultiva a *A. paragallinarum* en un biorreactor batch de 100L de capacidad, que contiene doble chaqueta, un agitador en forma de ancla que puede ir de 0 – 100rpm, permite una incubación entre 18 y 50°C, además posee válvulas de toma de muestras, punto de

inoculación, ingreso de CO₂, fuga de gases, control de presión interna (0 a 60psi), ciclo de esterilización, enfriamiento y estabilización del medio de cultivo en circuito cerrado (FARBIOVET, 2008).

6.3 Justificación

Las cepas de *A. paragallinarum* en los últimos años han sido cultivadas a escala industrial en medios ricos en nutrientes, debido a las exigentes características nutricionales que presenta la bacteria.

En FARBIOVET S.A. requieren cultivar esta bacteria en gran cantidad para la fabricación de la vacuna contra la coriza infecciosa, la misma que es elaborada con los tres serotipos de *A. paragallinarum* (A, B y C) además de un cuarto serotipo denominado por la empresa como cepa Ecuador.

Con esta investigación se pretende cultivar al serotipo A de *A. paragallinarum*, a una escala industrial en un biorreactor tipo batch, en un medio líquido enriquecido con suero de pollo, extracto de sangre autoclavada de pollo (en el caso de ser cultivada en condiciones aerobias) y 1% de NaCl, debido a que en la investigación anterior, resultó ser el medio en el que mayor concentración de biomasa se obtuvo, variando los compuestos enriquecedores utilizados en la farmacéutica como es el suero equino, por la dificultad de encontrarlo comúnmente a parte de su costo que es elevado a diferencia del suero de pollo utilizado en este estudio.

La importancia de este estudio radica en obtener mayor concentración bacteriana en la misma cantidad de medio de cultivo y, por lo tanto, se contará con más biomasa para la elaboración de las vacunas, con esto se disminuirá dos factores importantes en la industria farmacéutica como son el tiempo y los costos de producción, aumentando así la rentabilidad, confiabilidad y eficacia de la empresa al producir mayor cantidad de vacunas, asegurando una buena calidad y línea de proceso, satisfaciendo las necesidades del cliente.

6.4 Objetivos

6.4.1 Objetivo General

- Cultivar a escala industrial las cepas de *Avibacterium paragallinarum* serotipo A en un biorreactor batch.

6.4.2 Objetivos Específicos

- Obtener biomasa pura y en gran cantidad para la realización de la vacuna contra coriza infecciosa.
- Comprobar el incremento de la concentración de biomasa en el biorreactor mediante técnicas espectrofotométricas.
- Comparar los resultados obtenidos de la concentración de biomasa en el medio líquido propuesto frente a la concentración en el medio de cultivo de la farmacéutica.
- Establecer el medio de cultivo más efectivo a escala industrial en la elaboración de la vacuna contra coriza infecciosa en base a criterios como productividad y rentabilidad.

6.5 Análisis de Factibilidad

La investigación a desarrollarse es de tipo investigativo y tecnológico, ya que con esto se logrará un cultivo a escala industrial de *A. paragallinarum* serotipo A, en un medio de cultivo enriquecido con una mayor concentración de biomasa.

Además el análisis de factibilidad también es de carácter económico ya que al obtener mayor concentración bacteriana en un determinado volumen de medio de cultivo aumentará la cantidad de las vacunas elaboradas con esta bacteria y, por lo tanto, incrementará la rentabilidad de la farmacéutica.

En lo que se refiere al análisis financiero de esta propuesta, es necesario un estudio de costos de lo que se invertirá. Este análisis se lo realizará

conjuntamente con la farmacéutica FARBIOVET S.A. comparando con los costos que invierten en la realización de su medio de cultivo.

Con la propuesta planteada se pretende y se calcula un ahorro significativo para la farmacéutica.

6.6 Fundamentación

6.6.1 Biorreactores

Un biorreactor es un sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. En este sistema se lleva a cabo un proceso químico (bioproceso) que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Este proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. Los biorreactores son comúnmente cilíndricos usualmente fabricados en acero inoxidable (Cuellas, 2007).

La función principal de un biorreactor es permitir el crecimiento o la formación óptima de productos, o ambos. Además, tiene como objetivo garantizar una condición estéril, que permita únicamente el cultivo de la especie biológica de interés.

Los biorreactores pueden variar en tamaño, desde 0.1-10 L (laboratorio) hasta 400000L (industrial). Las dimensiones dependen de su proceso y operación (Galindo *et al.*, 2007).

El bioproceso que ocurre en el interior del biorreactor debe ser controlado constantemente, para esto, la mayoría de los biorreactores proveen todos los servicios necesarios para el control, incluyendo mezclado, termotización, suministro de oxígeno (si es un proceso aeróbico) o de CO₂ (en un proceso anaeróbico), entradas para adición de nutrientes, sensores para conocer el cambio de las variables del cultivo como: temperatura, oxígeno disuelto, pH, concentración celular, entre otros (Galindo *et al.*, 2007).

6.6.1.1 Sistemas de Cultivo

Existen dos principales sistemas de cultivo que se puede utilizar en los biorreactores, esto se refiere a la forma de operarlos, esto es forma continua o discontinua (batch).

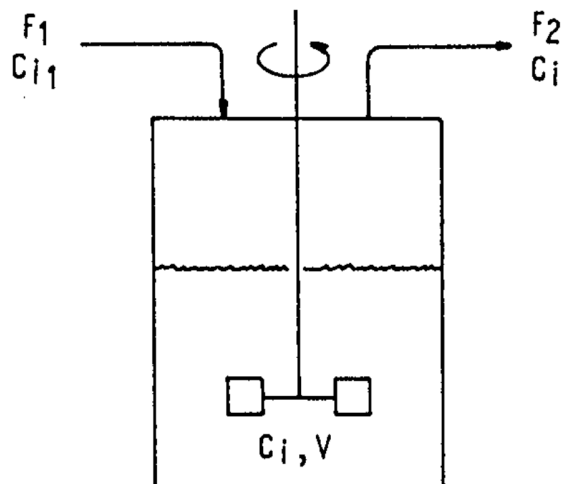
Para un componente cualquiera del cultivo, incluida la biomasa, se puede plantear el siguiente balance de materia en el biorreactor (Gráfico 3):

Velocidad de acumulación = Velocidad de ingreso - Velocidad de salida + Velocidad de formación - Velocidad de consumo

$$\frac{d(V C_i)}{dt} = F_1 C_{i1} - F_2 C_i + V r_{fi} - V r_{ci}$$

Donde V es el volumen de cultivo, F_1 es caudal de alimentación, F_2 el de salida, C_{i1} la concentración del componente "i" en la alimentación y C_i la concentración en el caudal de salida, la que, si el cultivo está bien mezclado, se puede asumir idéntica a la que hay dentro del biorreactor. Los restantes términos, r_{fi} y r_{ci} se refieren a la velocidad de formación y consumo del componente "i" respectivamente (Ertola *et al.*, 2011).

Gráfico 3. Esquema de un biorreactor con indicación de los caudales y concentraciones a la entrada y a la salida.



6.6.1.1.1 Biorreactor tipo Batch

Conocido también como biorreactor discontinuo, es el más utilizado por su sencillez. Se trata de sistemas cerrados en los que no se varían externamente las condiciones iniciales, lo que supone que la composición del medio va variando continuamente en el tiempo conforme se desarrolla el cultivo (Cuellas, 2007).

Una vez inoculado el medio, la concentración de biomasa aumenta a expensas de los nutrientes y cuando el sustrato que limita el crecimiento se agota, finaliza el batch (Ertola *et al.*, 2011).

6.7 Metodología

Para el cultivo de *A. paragallinarum* serotipo A, en un medio líquido enriquecido con suero de pollo, extracto de sangre autoclavada de pollo, 1% de NaCl y una atmósfera enriquecida con 5 – 10% de CO₂ en un biorreactor batch, se seguirá el siguiente modelo operativo:

Tabla 14. Modelo Operativo (Plan de acción)

Fases	Metas	Actividades	Responsables	Recursos	Presupuesto	Tiempo
1. Formulación de la propuesta	Cultivo a escala industrial de las cepas de <i>Avibacterium paragallinarum</i> serotipo A, en un medio líquido enriquecido, en un biorreactor tipo batch.	Revisión bibliográfica	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$150	2 meses
2. Desarrollo preliminar de la propuesta	Cronograma de la propuesta.	Cultivo a escala piloto de <i>A. paragallinarum</i>	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$200	1mes
3. Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta.	Cultivo de <i>A. paragallinarum</i> en 50L de medio de cultivo a 37°C por 24 horas a un pH de 7.0 con una agitación de 30rpm y con una inyección de CO ₂ del 5 al 10%	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$400	1 mes
4. Evaluación de la propuesta	Comprobación del cultivo en el biorreactor.	Comprobación de la efectividad del cultivo de <i>A. paragallinarum</i> en el medio propuesto con respecto al medio de la farmacéutica	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$650	1 mes

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012.

6.8 Administración

La ejecución de la propuesta estará coordinada por los responsables del proyecto Ing. Ana Alfaro y Egdo. Santiago Toapaxi Mayorga.

Tabla 15. Administración de la Propuesta

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
<p>Concentración de las cepas de <i>A. paragallinarum</i> serotipo A en el medio de cultivo propuesto, en el biorreactor tipo batch</p>	<p>Cultivo de <i>A. paragallinarum</i> en un biorreactor en un medio de cultivo con pocas y costosas fuentes enriquecedoras</p>	<p>Altas concentraciones de biomasa completamente puras. Optimización de los recursos de la farmacéutica FARBIOVET en la elaboración de la vacuna</p>	<p>Obtención de biomasa pura y en gran cantidad. Comprobación del incremento de la concentración de biomasa en el biorreactor Comparación de los resultados obtenidos de la concentración de biomasa en el medio propuesto frente a la concentración en el medio de la farmacéutica. Establecimiento del medio de cultivo más efectivo a escala industrial en base a criterios como productividad y rentabilidad.</p>	<p>Investigador: Santiago Toapaxi, Ing. Ana Alfaro</p>

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012.

6.9 Previsión de la Evaluación

Tabla 16. Previsión de la Evaluación

Preguntas Básicas	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	<ul style="list-style-type: none">– Sector científico.– Farmacéutica FARBIOVET S.A.
¿Por qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none">– Para mejorar la producción de la vacuna de la coriza infecciosa, optimizando los recursos económicos y de tiempo de la farmacéutica.
¿Para qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none">– Aumentar la concentración bacteriana utilizando la misma cantidad de medio de cultivo y el mismo tiempo de producción.
¿Qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none">– Tecnología utilizada.– Materias primas.– Resultados obtenidos.
¿Quién evalúa?	<ul style="list-style-type: none">– Director del proyecto.– Tutor.– Calificadores.
¿Cuándo evaluar?	<ul style="list-style-type: none">– Todo el tiempo desde las pruebas preliminares, hasta la comprobación de la efectividad del cultivo de <i>A. paragallinarum</i> serotipo A en el medio propuesto, con respecto al medio utilizado en la farmacéutica.
¿Cómo evaluar?	<ul style="list-style-type: none">– Mediante análisis de laboratorio y comprobaciones estadísticas de los resultados obtenidos.
¿Con qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none">– Experimentación.– Normas establecidas.

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012.

BIBLIOGRAFÍA

- BISGAARD, Magne; CHRISTENSEN, Jeans; BOJESEN, Anders & CHRISTENSEN, Henrik. 2007. *Avibacterium endocarditis* sp. nov., isolated from valvular endocarditis in chickens. Great Britain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57. Págs. 1729 – 1734.
- BLACKALL, P. J.; CHRISTENSEN, H.; BECKENHAM, T.; BLACKALL, L. & BISGAARD, M. 2005. *Reclassification of Pasteurella gallinarum, [Haemophilus] paragallinarum, Pasteurella avium and Pasteurella volantium as Avibacterium gallinarum gen. nov., comb. nov., Avibacterium paragallinarum comb.nov., Avibacterium avium comb. nov. and Avibacterium volantium comb. nov.* Great Britain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55. Págs. 353 – 362.
- BLACKALL, P. J. & REID, G. G. 1986. *Comparison of Adjuvants for an Inactivated Infectious Coryza Vaccine*. Vol. 31. Págs. 59 – 63.
- BLACKALL, P. J. & REID, G. G. 1986. *Further Efficacy Studies on Inactivated, Aluminum – Hydroxide – Absorbed vaccines against Infectious Coryza*. Avian Diseases. Queensland Departament of Primary Industries, Animal Research. Australia. Págs. 527 – 532.
- BLACKALL, P. J. & TERZOLO, H. 1995. *Coriza infecciosa: revisión de métodos de diagnóstico y vacunas*. Revista Argentina de Microbiología. Argentina. Págs. 156 – 171.
- BRAVO, Blanca. 1988. *Texto de Microbiología*. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Ecuador. Págs. 29 – 35.
- CHARLTON, Bruce; CHANNING-SANTIAGO, Sally; BICKFORD, Arthur; CARDONA, Carol; CHIN, Richard; COOPER, George; DROUNAL, Robert; JEFFREY, Joan; METEYER, Carol; SHIVAPRASAD, H. & WALKER, Richard. *Preliminary Characterization of a Pleomorphic Gram – Negative Rod Associated with Avian Respiratory Disease*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. California. 1993. Págs. 47 – 51.
- CUELLAS, Anahí. 2007. *Biorreactores Teoría*. Universidad Nacional de Quilmes. Argentina. Págs. 5 – 49.
- DAVIS, Richard; RIMLER, Richard & SHOTTS, Emmett. 1976. *Efficacy Studies an Haemophilus gallinarum Bacterin preparations*. Vol. 37. Págs. 218 – 221.

DE LA ROSA, Manuel & PRIETO, José. 1997. *Microbiología en Ciencias de la Salud. Conceptos y Aplicaciones*. Editorial EDIDE, S.L. Segunda Edición. Madrid. Págs. 10 – 18.

FADDIN, Jean. (2000). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Argentina. Págs. 422 – 424.

GARCÍA, J. A. & PICAZO, J. J. 2000. *Compendio de Microbiología Médica*. Tema 18, Géneros *Haemophilus*, *Bordetella* y *Gardnedella*. Editorial Harcourt. España. Pág. 178.

KUME, Katsumi; SAWATA, Akira & NAKASE, Yasukiyo. 1987. *Immunologic Relationship between Page's and Sawata's Serotype Strains of Haemophilus paragallinarum*. Vol. 41. Págs. 757 – 760.

MADIGAN, Michael, MARTINKO, John & PARKER, Jack. 1999. *Brock. Biología de los Microorganismos*. Octava Edición. Editorial Pearson Educación S.A. Madrid – España. Págs. 57, 110 – 117, 150 – 161.

MATSUMOTO, M. & YAMAMOTO, R. 1970. *A broth bacterin against infectious coryza: Immunogenicity of various preparations*. Department of Epidemiology and Preventive Medicine University of California. Págs. 109 – 117.

QUINTERO, Rodolfo. 1981. *Ingeniería Bioquímica. Concepto y Aplicaciones*. Primera Edición. Editorial Siluetas S. A. México. Págs. 27 – 38.

SORIANO, Edgardo & TERZOLO, Horacio. 2004. *Haemophilus paragallinarum: Etiología de la coriza infecciosa*. México. Págs. 245 – 258.

WAAFA, A. & ABD, El – Ghany. 2011. *Evaluation of Autogenous Avibacterium paragallinarum Bacterins in Chickens*. El Cairo – Egipto. International Journal of Poultry Science 10 (1) Págs. 56 – 61.

YAMAMOTO. R. 1980. Infectious Coryza. In: Hitchner, S.B., C.H. Domermuch, H.G. Purchase & J.E. Williams, Insolation and Identification of Avian Pathogens (American Association of Avian Pathologist, College Station, Texas). Págs. 16 – 18.

ZANELLA, Antonio. 2007. *Poultry Disease. Manual – Characteristics and Control of Infections*. Editorial Fatros. p.a. Italia. Págs. 58 – 59.

Internet

ARCOS, Martha; OSSA, Faisury & DÍAZ, Tifo. 2004. *Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal Fibrobacter succinogenes*. Revista Corpoica. Volumen N°5. Bogotá. Disponible en:

http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/9CriopreservacinFibrobacter_pp60-63_RevCorpo_v5n1.pdf

BAILÓN, Lucía; GONZÁLEZ, Roberto & CERVANTES, Armando. 2003. *Atlas de pruebas bioquímicas para Identificar Bacterias*. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en:

<http://enlinea.zaragoza.unam.mx/didacta/quimica/atlas/atlas.pdf>

BARRIENTOS, Benjamín. 2011. *Bacteriología en el complejo respiratorio de las aves. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación*. México. Disponible en:

<http://ediporc.polnetwork.biz/noticias/bacteriologia-en-el-complejo-respiratorio-de-las-aves>

CABRERA, Arturo; MORALES, Vladimir; SAGADO, Selene; BLACKALL, Patrick & SORIANO, Edgardo. 2010. *Hemagglutinin serotyping of Avibacterium paragallinarum isolates from Ecuador*. Disponible en:

<http://resources.metapress.com/pdf-preview.axd?code=426248357680185k&size=largest>

CABRERA, Azahara. 2009. *Medios de Cultivo y Tinción de Gram*. Disponible en:

<http://www.csi->

[csif.es/andalucia/modules/mod_ense/revista/pdf/Numero_16/AZAHARA_CABRERA_2.pdf](http://www.csi-csif.es/andalucia/modules/mod_ense/revista/pdf/Numero_16/AZAHARA_CABRERA_2.pdf)

CARRILLO, Leonor. 2003. *Vida y muerte de los microorganismos*. Microbiología Agrícola. Capítulo 2. Disponible en:

<http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap2.pdf>

CEDEVIT, Laboratorios. 2005. *Sangre desfibrinada de carnero*. Guatemala. Disponible en:

http://www.trensa.com/cedivet/cedivet_ns.html

DÁVILA, Elmer. 2011. *Vacunas e Inmunidad contra Coriza Infecciosa*. Sistema de revisiones en investigación veterinaria de San Marcos. Disponible en:

http://www.unmsm.edu.pe/veterinaria/files/Articulo_davila_Final.pdf

ERTOLA, Rodolfo; YANTORNO, Oswaldo & MIGNONE, Carlos. 2011. *Sistemas de Cultivo y Aspectos Generales de Biorreactores*. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA. Disponible en:

www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/cap7_mi.pdf

GALINDO, Enrique; PEÑA, Carlos & SERRANO, Leobardo. 2007. *Domesticar microorganismos en un biorreactor: los restos del bioingeniero*. Academia Mexicana de Ciencias. México. Disponible en:

http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_12.pdf

GARCÍA, Yolanda. 2011. *Análisis Microbiológicos. Medios de cultivo: tipos*. Disponible en:

<http://www.mailxmail.com/curso-analisis-clinicos/analisis-microbiologicos-medios-cultivo-tipos>

GENMIC (Grupo de Investigación de Genética y Microbiología). 2001. *Crecimiento Celular*. Microbiología Industrial. Departamento de producción Agraria. Universidad Pública de Navarra. España. Disponible en:

<http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-2.htm>

GÓMEZ, Jesús. (2009). *Crecimiento Microbiano. Nutrición, metabolismo, crecimiento y control de microorganismo*. Disponible en:

<http://www.slideshare.net/jochoa/6crecimiento-microbiano-1719474>

HECHENLEITNER, Marcela. (2001). *Fisiología Bacteriana*. Área de Microbiología. Disponible en:

<http://es.scribd.com/doc/7000565/Fisiologia-bacteriana>

KRIKORIAN, A. 1991. *Medios de Cultivo: generalidades, composición y preparación*. En: Cultivos de tejidos en la agricultura. Colombia. Disponible en:

http://webapp.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo3_parte1.pdf

LabRat. 2005. *Avibacterium paragallinarum*. Disponible en:

<http://www.thelabrat.com/restriction/sources/Haemophilusgallinarum.shtml>

LAMB, J; INGRAM, C; JONHSTON, I & PITMAN, R. (1999). *Fundamentos de Fisiología. Tema 8: Funciones y composición de la sangre*. Disponible en:

http://www.culturacientifica.org/textosudc/fisio_xeral_tema_8.pdf

LÓPEZ, Leonor & Torres, Carola. 2006. *Medios de Cultivo*. Universidad Nacional del Nordeste. Disponible en:

<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>

LUNA, Ángel. 2010. Tesis: *Evaluación de dos bacterinas en gallinas de postura, mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y protección ante un desafío con Avibacterium paragallinarum en Tehuacan, Puebla. Veracruz*. Disponible en:

<http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/714/1/Luna%20Trinidad%20Angel.pdf>

MAC LAB, S. A. de C. V. 2011. Agar soya tripticaseína. México. Disponible en:

<http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20SOYA%20TRIPTICASEINA.pdf>

MARÍNEZ, Isis. 2005. Tesis: *Caracterización de aislamientos de Haemophilus influenzae en Cuba*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Disponible en:

www.bibliociencias.cu/gsd/collect/tesis/index/assoc/...dir/doc.pdf

MORALES, Andrea, CHÁVEZ, Lisbeth, HERRERA, Nathaly, ZAMBRANO, Cynthia & MURILLO, Luis. 2010. *Requerimientos Nutricionales. Factores intrínsecos y extrínsecos que afectan al crecimiento microbiano*. Disponible en:

<http://es.scribd.com/doc/35570367/Requerimientos-Nutricionales-Microbianos>

PÍREZ, María. 2011. *Morfología Bacteriana*. Madrid. Disponible en:

http://www.educa2.madrid.org/cms_tools/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/09.-%20Morfologia%20y%20estructura%20bacteriana.pdf

ROODT, Yolandi. 2009. *Towards unravelling the genome of Avibacterium paragallinarum*. South Africa. Disponible en:

<http://etd.uovs.ac.za/ETD-db/theses/available/etd-11222010-124046/unrestricted/RoodtY.pdf>

ROJAS, Pedro. 2006. *Agente Etiológico de Coriza y Manejo*. Colombia. Disponible en:

<http://patologiaaviaruptc.blogspot.com/2006/11/agente-etiologico-de-coriza-y-manejo.html>

SCHALM, O. & BEACH, J. 1935. *Cultural requirements of the Fowl Corzya Bacillus*. Universidad de California. Disponible en:

<http://jb.asm.org/cgi/reprint/31/2/161.pdf>

TERZOLO, Horacio (2005). *Revisión sobre Coriza Infecciosa (Parte I)*. INTA Balcarce. Disponible en:

http://www.vet-uy.com/articulos/artic_avic/050/008/avic008.htm

VAL, Dani. 2000. *Elaboración de Medios de Cultivo*. Universidad Autónoma de Baja California. Laboratorio de Microbiología. Práctica #4. Disponible en:
http://danival.org/600%20microbio/6000notasmicro/medioscult/medios_as.html

WASILAUSKAS, Benedict; FLOYD, Julia & ROBERTS, Richard. 1974. *Use of Sodium Polyanethol Sulfonate in the Preparation of 5% Sheep Blood Agar Plates*. Departments of Pathology and Microbiology, Bowman Gray School of Medicine, and Clinical Microbiology Laboratory, North Carolina Baptist Hospital.U.S.A. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186600/pdf/applmicro00013-01113.pdf>

ANEXOS

ANEXO A

TABLAS DE

METODOLOGÍA

Tabla A-1. Reactivos de la galería API NH

Reactivo	Composición	
API NaCl 0.85% (2ml)	Cloruro sódico	8.5g
	Agua desmineralizada	1000ml
JAMES 5ml	R1: HCl 1N	100ml
	R2: Componente J 2183 confidencial	0.66g
ZYM B 8ml	Fast Blue (materia activa)	0.12g
	Metanol	40ml
	Dimetilsulfóxido (DMSO)	60ml

Fuente: Ficha técnica de la galería API NH

Tabla A-2. Escala de McFarland

Clave del Tubo	BaCl ₂ 1% (ml)	H ₂ SO ₄ 1% (ml)	N° aproximado de bacterias x 10 ⁶ /ml
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

Fuente: (Arcos, *et al.*, 2004)

Tabla A-3. Formulación del medio de cultivo de la farmacéutica FARBIOVET S.A.

Compuesto	Cantidad
Caldo de soya tríptica (TSB)	37g
Peptona de caseína	5g
Suero equino	1ml
Agua destilada	1000ml

Fuente: FARBIOVET, 2011

Tabla A-4. Tabla de lectura de pruebas API NH

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	CANT (mg/cúp.)	REACCIONES	RESULTADO	
				NEGATIVO	POSITIVO
1) <u>PEN</u>	Benzilpenicilina potásica	1.36	PENicilinasas	azul (ausencia de penicilinasas)	amarillo amarillo - verdoso amarillo - azulado (presencia de penicilinasas)
2) <u>GLU</u> 3) <u>FRU</u> 4) <u>MAL</u> 5) <u>SAC</u>	D - glucosa D - fructosa D - maltosa D - sacarosa	0.5 0.1 0.1 0.5	acidificación (GLUcosa) acidificación (FRUctosa) acidificación (MALtosa) acidificación (SACarosa)	rojo rojo-anaranjado	amarillo naranja
6) <u>ODC</u>	L - ornitina	0.552	Omitina DeCarboxilasa	amarillo - verdoso gris - verdoso	azul
7) <u>URE</u>	urea	0.41	UREasa	amarillo	rosa - violeta
8a) <u>LIP I</u>	5-bromo-3-indoxil-caprato	0.033	LIPasa	incoloro gris pálido	azul (+ precipitado)
9a) <u>PAL I</u>	4-nitrofenil-fosfato 2CHA	0.038	Fosfatasa Alcalina	incoloro amarillo pálido	amarillo
10a) <u>βGAL I</u>	4 - nitrofenil - βD - galactopiranosida	0.04	β GALactosidasa	incoloro	amarillo
8b) <u>ProA I</u>	L - prolina - 4 - metoxi - β - naftilamida	0.056	ProlinaArimidasa si LIP es +, ProA es siempre -	amarillo naranja pálido (marrón si LIP +)	anaranjado
9b) <u>GGT I</u>	γ - glutamil - 4 - metoxi - β - naftilamida	0.049	Gamma - Glutamil - Transferasa	amarillo naranja pálido (amarillo-anaranjado si PAL +)	anaranjado
10b) <u>IND I</u>	L- triptófano	0.036	INDole	incoloro	rosa

Fuente: Ficha técnica de la galería API NH

ANEXO B

TABLAS DE

RESULTADOS

**Valores de
Absorbancia y
Concentración
Celular
(UFC/ml)**

Tabla B-1. Valores de Absorbancia. Experimento preliminar – Crecimiento A. *paragallinarum*

Tiempo (h)	Muestra 1	Muestra 2	Promedio
0	0,182	0,174	0,1780
15	1,442	1,435	1,4385
16	1,501	1,488	1,4945
17	1,537	1,543	1,5400
18	1,569	1,588	1,5785
19	1,597	1,649	1,6230
20	1,619	1,655	1,6370
21	1,649	1,656	1,6525
22	1,631	1,642	1,6365
23	1,617	1,614	1,6155

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-2. Curva de McFarland

Tubo	N° aproximado de bacterias x 10⁶/ml	Absorbancia
1	300	0,347
2	600	0,552
3	900	0,759
4	1200	0,892
5	1500	1,001
6	1800	1,169
7	2100	1,311
8	2400	1,423
9	2700	1,572
10	3000	1,648

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-3. Valores de Absorbancia. Crecimiento de *A. paragallinarum*

Tratamientos		Tiempo (h)					
		0	14	16	18	20	22
$a_0b_0c_0$	R1	0,159	1,583	1,588	1,575	1,564	1,565
	R2	0,161	1,548	1,550	1,557	1,547	1,537
	R3	0,158	1,522	1,598	1,599	1,583	1,557
$a_0b_0c_1$	R1	0,159	1,427	1,583	1,601	1,575	1,576
	R2	0,168	1,556	1,570	1,569	1,556	1,553
	R3	0,164	1,457	1,579	1,583	1,568	1,571
$a_0b_1c_0$	R1	0,171	1,693	1,698	1,683	1,687	1,675
	R2	0,175	1,652	1,679	1,660	1,645	1,622
	R3	0,178	1,688	1,678	1,673	1,664	1,659
$a_0b_1c_1$	R1	0,165	1,665	1,683	1,687	1,674	1,675
	R2	0,168	1,622	1,640	1,626	1,620	1,613
	R3	0,171	1,644	1,647	1,633	1,630	1,621
$a_0b_2c_0$	R1	0,165	1,575	1,700	1,698	1,693	1,688
	R2	0,170	1,572	1,692	1,695	1,579	1,574
	R3	0,161	1,542	1,690	1,685	1,541	1,561
$a_0b_2c_1$	R1	0,161	1,516	1,595	1,598	1,578	1,583
	R2	0,155	1,550	1,554	1,563	1,548	1,528
	R3	0,158	1,546	1,569	1,552	1,550	1,543
$a_1b_0c_0$	R1	0,191	1,612	1,710	1,728	1,705	1,695
	R2	0,188	1,605	1,704	1,715	1,712	1,699
	R3	0,185	1,599	1,700	1,710	1,699	1,696
$a_1b_0c_1$	R1	0,177	1,588	1,664	1,667	1,679	1,654
	R2	0,172	1,579	1,658	1,655	1,655	1,656
	R3	0,179	1,578	1,678	1,670	1,652	1,639
$a_1b_1c_0$	R1	0,194	1,682	1,750	1,760	1,748	1,732
	R2	0,187	1,657	1,766	1,741	1,738	1,735
	R3	0,195	1,645	1,732	1,739	1,735	1,729
$a_1b_1c_1$	R1	0,184	1,637	1,737	1,740	1,729	1,730
	R2	0,191	1,645	1,723	1,731	1,719	1,725
	R3	0,195	1,619	1,718	1,725	1,723	1,721
$a_1b_2c_0$	R1	0,187	1,542	1,679	1,714	1,712	1,698
	R2	0,183	1,579	1,645	1,698	1,695	1,693
	R3	0,191	1,575	1,636	1,691	1,690	1,689
$a_1b_2c_1$	R1	0,178	1,526	1,681	1,690	1,664	1,678
	R2	0,180	1,541	1,678	1,675	1,658	1,667
	R3	0,183	1,519	1,665	1,683	1,654	1,661

Tabla B-3. Continuación

a₂b₀c₀	R1	0,179	1,521	1,680	1,706	1,672	1,693
	R2	0,182	1,512	1,675	1,697	1,683	1,682
	R3	0,184	1,550	1,678	1,686	1,678	1,678
a₂b₀c₁	R1	0,163	1,622	1,645	1,644	1,646	1,641
	R2	0,159	1,610	1,634	1,639	1,637	1,628
	R3	0,161	1,598	1,625	1,633	1,629	1,631
a₂b₁c₀	R1	0,190	1,707	1,709	1,709	1,684	1,683
	R2	0,187	1,699	1,700	1,697	1,672	1,673
	R3	0,184	1,695	1,696	1,685	1,678	1,665
a₂b₁c₁	R1	0,183	1,674	1,684	1,691	1,680	1,684
	R2	0,181	1,653	1,667	1,672	1,668	1,670
	R3	0,175	1,655	1,678	1,665	1,653	1,652
a₂b₂c₀	R1	0,177	1,692	1,694	1,684	1,662	1,695
	R2	0,175	1,684	1,672	1,676	1,656	1,653
	R3	0,181	1,671	1,663	1,667	1,659	1,656
a₂b₂c₁	R1	0,170	1,651	1,664	1,678	1,648	1,665
	R2	0,165	1,645	1,659	1,666	1,659	1,657
	R3	0,177	1,632	1,651	1,658	1,645	1,649
a₃b₀c₀	R1	0,176	1,661	1,672	1,682	1,651	1,679
	R2	0,172	1,654	1,658	1,677	1,668	1,678
	R3	0,182	1,639	1,655	1,669	1,656	1,659
a₃b₀c₁	R1	0,159	1,608	1,616	1,653	1,648	1,629
	R2	0,162	1,589	1,598	1,634	1,631	1,633
	R3	0,167	1,592	1,589	1,598	1,595	1,597
a₃b₁c₀	R1	0,182	1,710	1,719	1,742	1,702	1,734
	R2	0,190	1,703	1,728	1,735	1,713	1,719
	R3	0,194	1,694	1,710	1,729	1,718	1,716
a₃b₁c₁	R1	0,163	1,618	1,693	1,687	1,633	1,634
	R2	0,172	1,627	1,685	1,684	1,628	1,625
	R3	0,168	1,609	1,678	1,673	1,641	1,636
a₃b₂c₀	R1	0,185	1,519	1,698	1,695	1,655	1,691
	R2	0,179	1,528	1,687	1,688	1,662	1,664
	R3	0,177	1,521	1,689	1,684	1,670	1,668
a₃b₂c₁	R1	0,157	1,640	1,641	1,664	1,647	1,669
	R2	0,164	1,625	1,627	1,653	1,639	1,638
	R3	0,167	1,633	1,638	1,639	1,625	1,619

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-4. Número aproximado de UFC/ml en los 24 medios de cultivo a diferentes tiempos

Tratamientos		Tiempo (h)					
		0	14	16	18	20	22
$a_0b_0c_0$	R1	256161765	2735434874	2745939076	2718628151	2695518908	2697619748
	R2	251960084	2661905462	2666107143	2680813025	2659804622	2638796218
	R3	258262605	2607283613	2766947479	2769048319	2735434874	2680813025
$a_0b_0c_1$	R1	256161765	2407703782	2735434874	2773250000	2718628151	2720728992
	R2	237254202	2678712185	2708123950	2706023109	2678712185	2672409664
	R3	245657563	2470728992	2727031513	2735434874	2703922269	2710224790
$a_0b_1c_0$	R1	230951681	2966527311	2977031513	2945518908	2953922269	2928712185
	R2	222548319	2880392857	2937115546	2897199580	2865686975	2817367647
	R3	216245798	2956023109	2935014706	2924510504	2905602941	2895098739
$a_0b_1c_1$	R1	243556723	2907703782	2945518908	2953922269	2926611345	2928712185
	R2	237254202	2817367647	2855182773	2825771008	2813165966	2798460084
	R3	230951681	2863586134	2869888655	2840476891	2834174370	2815266807
$a_0b_2c_0$	R1	243556723	2718628151	2981233193	2977031513	2966527311	2956023109
	R2	233052521	2712325630	2964426471	2970728992	2727031513	2716527311
	R3	251960084	2649300420	2960224790	2949720588	2647199580	2689216387
$a_0b_2c_1$	R1	251960084	2594678571	2760644958	2766947479	2724930672	2735434874
	R2	264565126	2666107143	2674510504	2693418067	2661905462	2619888655
	R3	258262605	2657703782	2706023109	2670308824	2666107143	2651401261
$a_1b_0c_0$	R1	188934874	2796359244	3002241597	3040056723	2991737395	2970728992
	R2	195237395	2781653361	2989636555	3012745798	3006443277	2979132353
	R3	201539916	2769048319	2981233193	3002241597	2979132353	2972829832
$a_1b_0c_1$	R1	218346639	2745939076	2905602941	2911905462	2937115546	2884594538
	R2	228850840	2727031513	2892997899	2886695378	2886695378	2888796218
	R3	214144958	2724930672	2935014706	2918207983	2880392857	2853081933

Tabla B-4. Continuación

a₁b₁c₀	R1	182632353	2943418067	3086275210	3107283613	3082073529	3048460084
	R2	197338235	2890897059	3119888655	3067367647	3061065126	3054762605
	R3	180531513	2865686975	3048460084	3063165966	3054762605	3042157563
a₁b₁c₁	R1	203640756	2848880252	3058964286	3065266807	3042157563	3044258403
	R2	188934874	2865686975	3029552521	3046359244	3021149160	3033754202
	R3	180531513	2811065126	3019048319	3033754202	3029552521	3025350840
a₁b₂c₀	R1	197338235	2649300420	2937115546	3010644958	3006443277	2977031513
	R2	205741597	2727031513	2865686975	2977031513	2970728992	2966527311
	R3	188934874	2718628151	2846779412	2962325630	2960224790	2958123950
a₁b₂c₁	R1	216245798	2615686975	2941317227	2960224790	2905602941	2935014706
	R2	212044118	2647199580	2935014706	2928712185	2892997899	2911905462
	R3	205741597	2600981092	2907703782	2945518908	2884594538	2899300420
a₂b₀c₀	R1	214144958	2605182773	2939216387	2993838235	2922409664	2966527311
	R2	207842437	2586275210	2928712185	2974930672	2945518908	2943418067
	R3	203640756	2666107143	2935014706	2951821429	2935014706	2935014706
a₂b₀c₁	R1	247758403	2817367647	2865686975	2863586134	2867787815	2857283613
	R2	256161765	2792157563	2842577731	2853081933	2848880252	2829972689
	R3	251960084	2766947479	2823670168	2840476891	2832073529	2836275210
a₂b₁c₀	R1	191035714	2995939076	3000140756	3000140756	2947619748	2945518908
	R2	197338235	2979132353	2981233193	2974930672	2922409664	2924510504
	R3	203640756	2970728992	2972829832	2949720588	2935014706	2907703782
a₂b₁c₁	R1	205741597	2926611345	2947619748	2962325630	2939216387	2947619748
	R2	209943277	2882493697	2911905462	2922409664	2914006303	2918207983
	R3	222548319	2886695378	2935014706	2907703782	2882493697	2880392857

Tabla B-4. Continuación

$a_2b_2c_0$	R1	218346639	2964426471	2968628151	2947619748	2901401261	2970728992
	R2	222548319	2947619748	2922409664	2930813025	2888796218	2882493697
	R3	209943277	2920308824	2903502101	2911905462	2895098739	2888796218
$a_2b_2c_1$	R1	233052521	2878292017	2905602941	2935014706	2871989496	2907703782
	R2	243556723	2865686975	2895098739	2909804622	2895098739	2890897059
	R3	218346639	2838376050	2878292017	2892997899	2865686975	2874090336
$a_3b_0c_0$	R1	220447479	2899300420	2922409664	2943418067	2878292017	2937115546
	R2	228850840	2884594538	2892997899	2932913866	2914006303	2935014706
	R3	207842437	2853081933	2886695378	2916107143	2888796218	2895098739
$a_3b_0c_1$	R1	256161765	2787955882	2804762605	2882493697	2871989496	2832073529
	R2	249859244	2748039916	2766947479	2842577731	2836275210	2840476891
	R3	239355042	2754342437	2748039916	2766947479	2760644958	2764846639
$a_3b_1c_0$	R1	207842437	3002241597	3021149160	3069468487	2985434874	3052661765
	R2	191035714	2987535714	3040056723	3054762605	3008544118	3021149160
	R3	182632353	2968628151	3002241597	3042157563	3019048319	3014846639
$a_3b_1c_1$	R1	247758403	2808964286	2966527311	2953922269	2840476891	2842577731
	R2	228850840	2827871849	2949720588	2947619748	2829972689	2823670168
	R3	237254202	2790056723	2935014706	2924510504	2857283613	2846779412
$a_3b_2c_0$	R1	201539916	2600981092	2977031513	2970728992	2886695378	2962325630
	R2	214144958	2619888655	2953922269	2956023109	2901401261	2905602941
	R3	218346639	2605182773	2958123950	2947619748	2918207983	2914006303
$a_3b_2c_1$	R1	260363445	2855182773	2857283613	2905602941	2869888655	2916107143
	R2	245657563	2823670168	2827871849	2882493697	2853081933	2850981092
	R3	239355042	2840476891	2850981092	2853081933	2823670168	2811065126

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-5. Valores promedio de UFC/ml en los 24 medios de cultivo formulados

Tratamientos	Tiempo (h)					
	0	14	16	18	20	22
a₀b₀c₀	255461485	2668207983	2726331232	2722829832	2696919468	2672409664
a₀b₀c₁	246357843	2519048319	2723530112	2738235994	2700420868	2701121148
a₀b₁c₀	223248599	2934314426	2949720588	2922409664	2908404062	2880392857
a₀b₁c₁	237254202	2862885854	2890196779	2873390056	2857983894	2847479692
a₀b₂c₀	242856443	2693418067	2968628151	2965827031	2780252801	2787255602
a₀b₂c₁	258262605	2639496499	2713726190	2710224790	2684314426	2668908263
a₁b₀c₀	195237395	2782353641	2991037115	3018348039	2992437675	2974230392
a₁b₀c₁	220447479	2732633754	2911205182	2905602941	2901401261	2875490896
a₁b₁c₀	186834034	2900000700	3084874650	3079272409	3065967087	3048460084
a₁b₁c₁	191035714	2841877451	3035855042	3048460084	3030953081	3034454482
a₁b₂c₀	197338235	2698320028	2883193978	2983334034	2979132353	2967227591
a₁b₂c₁	211343838	2621289216	2928011905	2944818627	2894398459	2915406863
a₂b₀c₀	208542717	2619188375	2934314426	2973530112	2934314426	2948320028
a₂b₀c₁	251960084	2792157563	2843978291	2852381653	2849580532	2841177171
a₂b₁c₀	197338235	2981933473	2984734594	2974930672	2935014706	2925911064
a₂b₁c₁	212744398	2898600140	2931513305	2930813025	2911905462	2915406863
a₂b₂c₀	216946078	2944118347	2931513305	2930112745	2895098739	2914006303
a₂b₂c₁	231651961	2860785014	2892997899	2912605742	2877591737	2890897059
a₃b₀c₀	219046919	2878992297	2900700980	2930813025	2893698179	2922409664
a₃b₀c₁	248458683	2763446078	2773250000	2830672969	2822969888	2812465686
a₃b₁c₀	193836835	2986135154	3021149160	3055462885	3004342437	3029552521
a₃b₁c₁	237954482	2808964286	2950420868	2942017507	2842577731	2837675770
a₃b₂c₀	211343838	2608684174	2963025910	2958123950	2902101541	2927311625
a₃b₂c₁	248458683	2839776611	2845378852	2880392857	2848880252	2859384454

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-6. Valores promedio de concentración celular (UFC/ml) en la fase estacionaria

N°	Tratamientos	R1	R2	R3	Promedio
1	a ₀ b ₀ c ₀	2714426471	2661380252	2738060924	2704622549
2	a ₀ b ₀ c ₁	2737010504	2691317227	2719153361	2715827031
3	a ₀ b ₁ c ₀	2951296218	2879342437	2915056723	2915231793
4	a ₀ b ₁ c ₁	2938691176	2823144958	2839951681	2867262605
5	a ₀ b ₂ c ₀	2970203782	2844678571	2811590336	2875490896
6	a ₀ b ₂ c ₁	2746989496	2662430672	2673460084	2694293417
7	a ₁ b ₀ c ₀	3001191176	2996989496	2983859244	2994013305
8	a ₁ b ₀ c ₁	2909804622	2888796218	2896674370	2898425070
9	a ₁ b ₁ c ₀	3081023109	3075771008	3052136555	3069643557
10	a ₁ b ₁ c ₁	3052661765	3032703782	3026926471	3037430672
11	a ₁ b ₂ c ₀	2982808824	2944993697	2931863445	2953221989
12	a ₁ b ₂ c ₁	2935539916	2917157563	2909279412	2920658964
13	a ₂ b ₀ c ₀	2955497899	2948144958	2939216387	2947619748
14	a ₂ b ₀ c ₁	2863586134	2843628151	2833123950	2846779412
15	a ₂ b ₁ c ₀	2973355042	2950771008	2941317227	2955147759
16	a ₂ b ₁ c ₁	2949195378	2916632353	2901401261	2922409664
17	a ₂ b ₂ c ₀	2947094538	2906128151	2899825630	2917682773
18	a ₂ b ₂ c ₁	2905077731	2897724790	2877766807	2893523109
19	a ₃ b ₀ c ₀	2920308824	2918733193	2896674370	2911905462
20	a ₃ b ₀ c ₁	2847829832	2821569328	2760119748	2809839636
21	a ₃ b ₁ c ₀	3032178571	3031128151	3019573529	3027626751
22	a ₃ b ₁ c ₁	2900876050	2887745798	2890897059	2893172969
23	a ₃ b ₂ c ₀	2949195378	2929237395	2934489496	2937640756
24	a ₃ b ₂ c ₁	2887220588	2853607143	2834699580	2858509104

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-7. Valores de Absorbancia. Crecimiento de *A. paragallinarum* en el medio de cultivo de la farmacéutica FARBIOVET S.A.

Tiempo (h)	R1	R2	R3
0	0,181	0,185	0,179
14	1,577	1,566	1,581
16	1,602	1,613	1,595
18	1,612	1,625	1,582
20	1,616	1,628	1,587
22	1,600	1,620	1,585

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-8. Valores de UFC/ml en el medio de cultivo de la farmacéutica FARBIOVET

Tiempo (h)	R1	R2	R3
0	209943277	201539916	214144958
14	2722829832	2699720588	2731233193
16	2775350840	2798460084	2760644958
18	2796359244	2823670168	2733334034
20	2804762605	2829972689	2743838235
22	2771149160	2813165966	2739636555

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-9. Valores promedio de UFC/ml en el medio de cultivo de la farmacéutica FARBIOVET S.A.

Tiempo (h)	UFC/ml
0	208542717
14	2717927871
16	2778151961
18	2784454482
20	2792857843
22	2774650560

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-10. Valores de UFC/ml en el medio de cultivo de la farmacéutica FARBIOVET. Fase estacionaria

Tiempo (h)	R1	R2	R3	Promedio
16	2775350840	2798460084	2760644958	2778151961
18	2796359244	2823670168	2733334034	2784454482
20	2804762605	2829972689	2743838235	2792857843
22	2771149160	2813165966	2739636555	2774650560

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-11. Cantidad de UFC/ml en el mejor medio de cultivo formulado y en el medio de cultivo testigo

Tiempo (h)	Trat. a ₁ b ₁ c ₀	Testigo
0	186834034	208542717
14	2900000700	2717927871
16	3084874650	2778151961
18	3079272409	2784454482
20	3065967087	2792857843
22	3048460084	2774650560

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Pruebas

API NH

**Tabla B-12. Resultados para el reconocimiento de *A. paragallinarum*.
(Pruebas API NH)**

TESTS	COLOR	RESULTADO
1) PEN	Azul	-
2) GLU	Amarillo	+
3) FRU	Amarillo	+
4) MAL	Amarillo	+
5) SAC	Naranja	+
6) ODC	Verde	-
7) URE	Amarillo	-
8a) LIP	Incoloro	-
9a) PAL	Amarillo pálido	-
10a) β GAL	Amarillo pálido	-
8b) Pro A	Amarillo	-
9b) GGT	Amarillo	-
10b) IND	Incoloro	-

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-13. Comparación de las propiedades bioquímicas

TESTS	DATO EXPERIMENTAL	DATO BIBLIOGRÁFICO
Glucosa	+	+ ^a
Fructosa	+	+ ^a
Maltosa	+	+/- ^a
Sacarosa	+	+ ^a
Ornitina descarboxilasa	-	- ^b
Ureasa	-	- ^b
Indole	-	- ^b
Fosfatasa alcalina	-	+/- ^a

Fuente: ^a Blackall *et al.*, 2005.

^b Soriano, *et al.*, 2004.

Cinética de Crecimiento

Tabla B-14. Número de generaciones experimentadas por *A. paragallinarum* en los 24 medios de cultivo y en el medio testigo

N°	n
1	3,4158
2	3,4667
3	3,7239
4	3,6067
5	3,6116
6	3,3934
7	3,9373
8	3,7231
9	4,0454
10	3,9902
11	3,8689
12	3,7923
13	3,8146
14	3,4966
15	3,9189
16	3,7845
17	3,7562
18	3,6425
19	3,7271
20	3,4805
21	3,9622
22	3,6322
23	3,8094
24	3,5175
Testigo	3,7357

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-15. Tiempos de Generación experimentados por *A. paragallinarum* en los 24 medios de cultivo y en el medio testigo

N°	T (h)
1	4,6841
2	4,6154
3	4,2966
4	4,4362
5	4,4301
6	4,7151
7	4,0637
8	4,2975
9	3,9551
10	4,0098
11	4,1355
12	4,2191
13	4,1944
14	4,5758
15	4,0828
16	4,2278
17	4,2596
18	4,3925
19	4,2929
20	4,5970
21	4,0382
22	4,4051
23	4,2001
24	4,5486
Testigo	4,2830

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-16. Velocidad específica de crecimiento experimentada por *A. paragallinarum* en los 24 medios de cultivo y en el medio testigo

N°	μ (UFC h⁻¹)
1	0,1480
2	0,1502
3	0,1613
4	0,1562
5	0,1565
6	0,1470
7	0,1706
8	0,1613
9	0,1753
10	0,1729
11	0,1676
12	0,1643
13	0,1653
14	0,1515
15	0,1698
16	0,1639
17	0,1627
18	0,1578
19	0,1615
20	0,1508
21	0,1716
22	0,1574
23	0,1650
24	0,1524
Testigo	0,1618

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Tabla B-17. Parámetros cinéticos en el mejor medio de cultivo formulado y en el medio de cultivo testigo

Parámetros Cinéticos	Trat. a₁b₁c₀	Testigo
Número de Generaciones	4,0454	3,7357
Tiempo de Generación	3,9551 h	4,2830 h
Velocidad Específica de Crecimiento	0,1753 UFC h ⁻¹	0,1618 UFC h ⁻¹

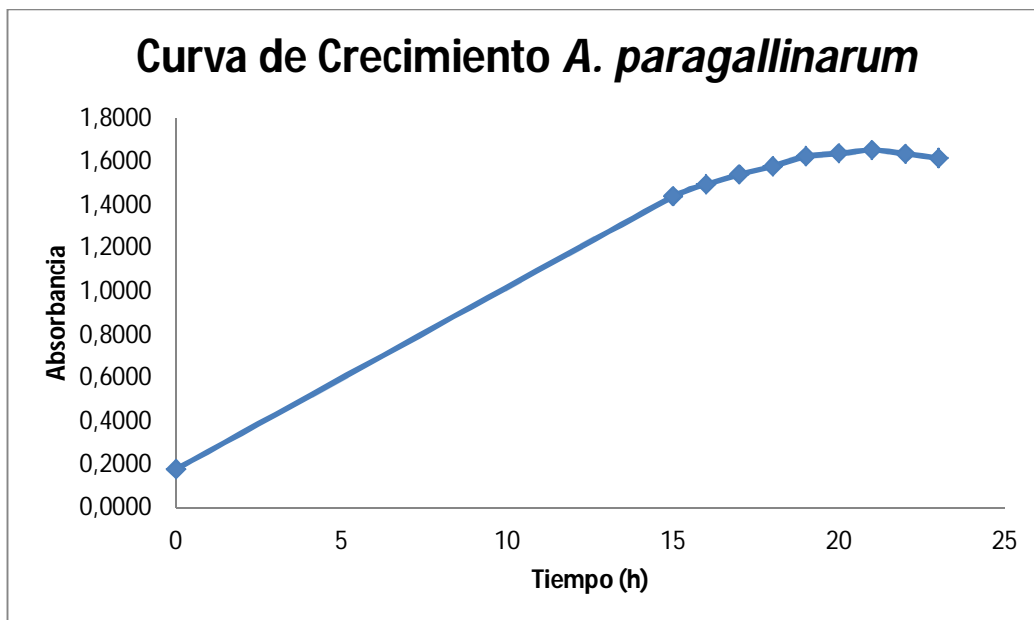
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

ANEXO C

GRÁFICOS

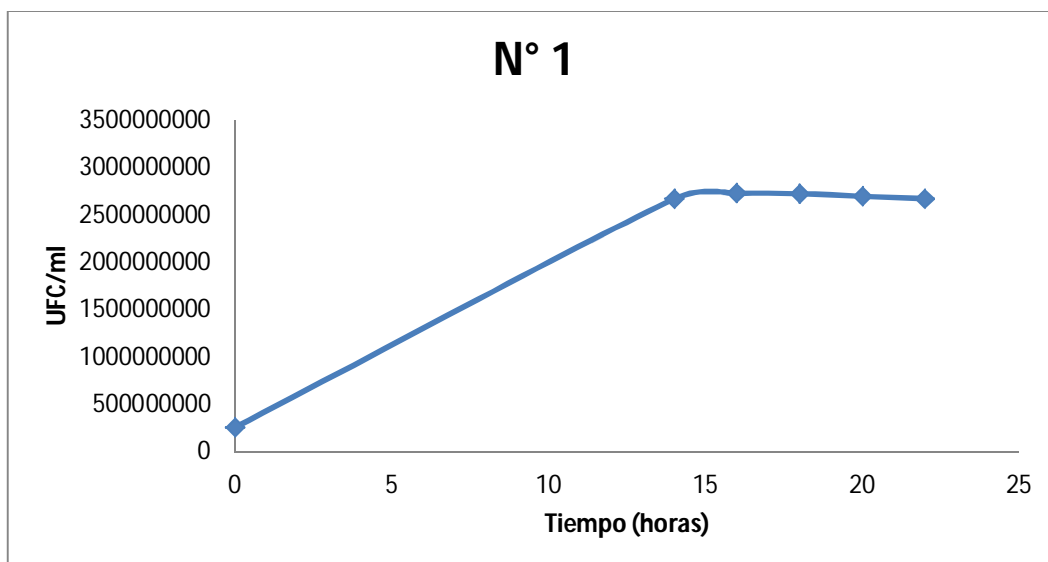
Curvas de crecimiento

Gráfico C-1. Curva de crecimiento. Experimento preliminar



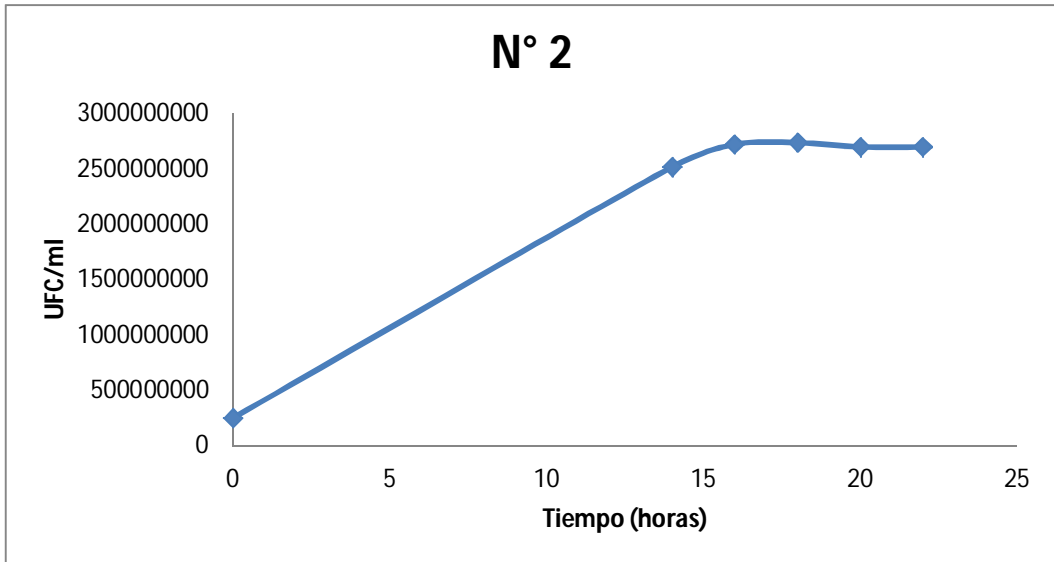
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-2. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 1



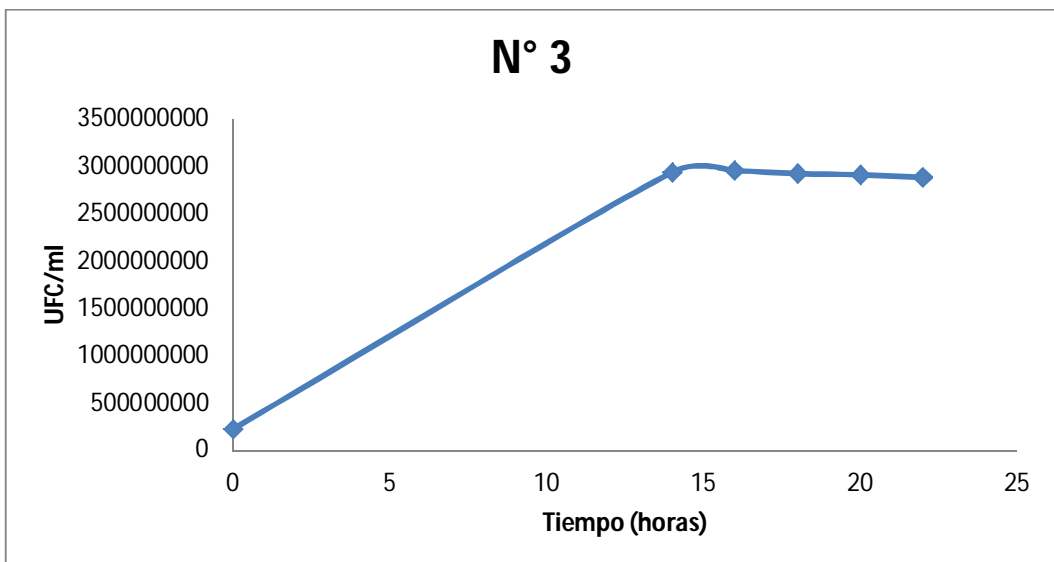
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-3. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 2



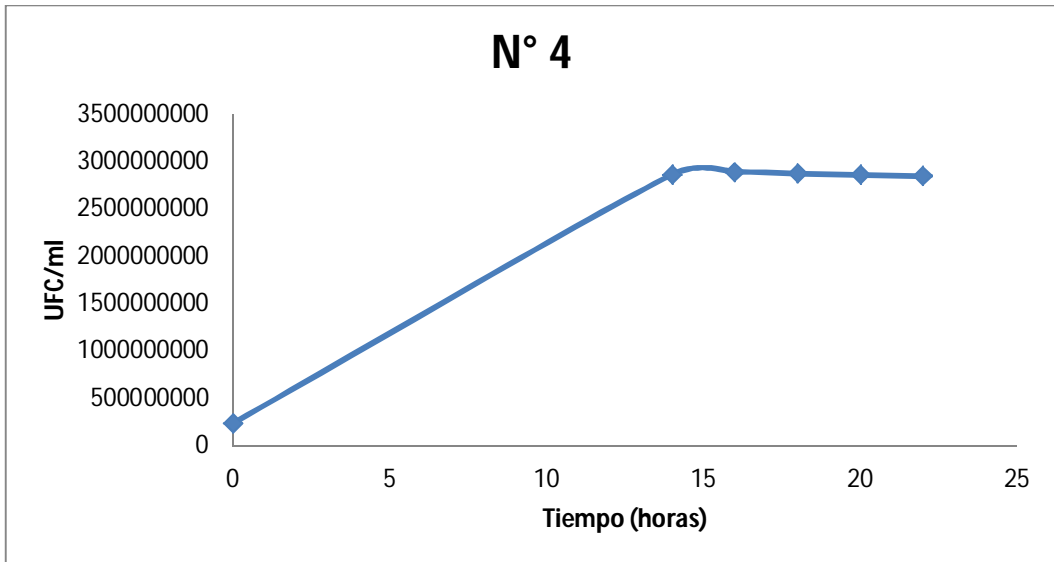
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-4. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 3



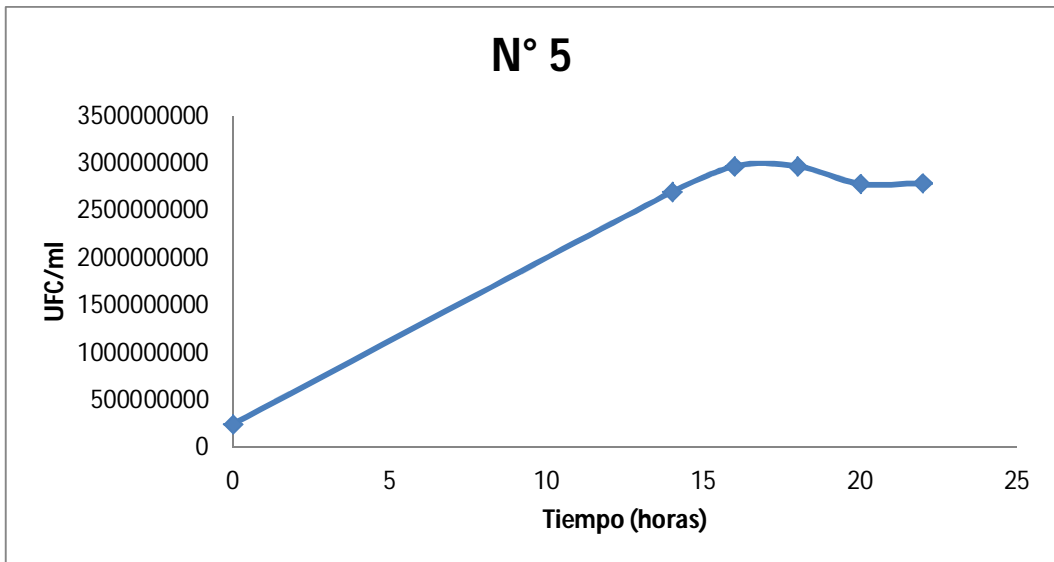
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-5. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 4



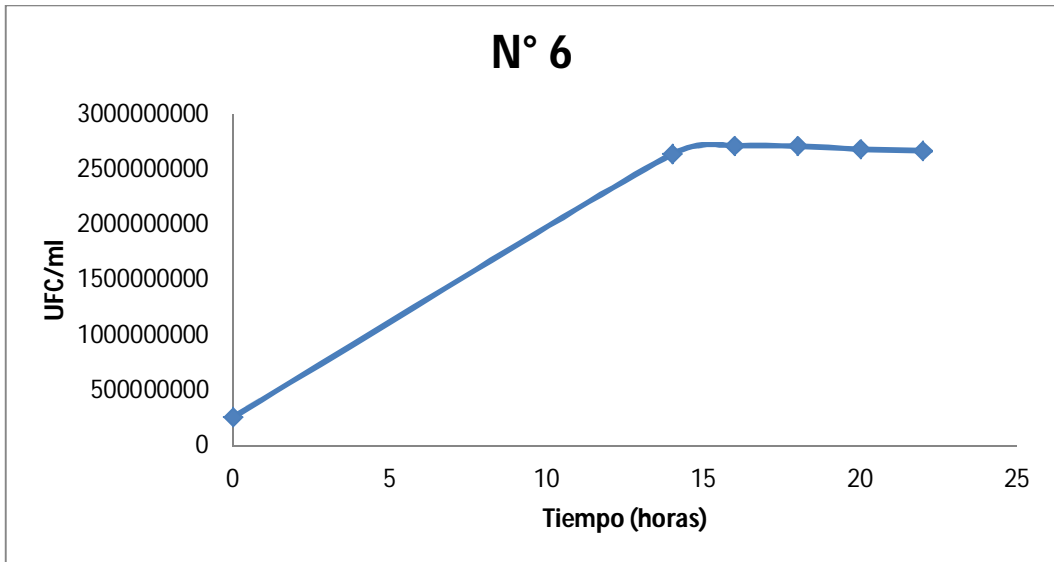
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-6. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 5



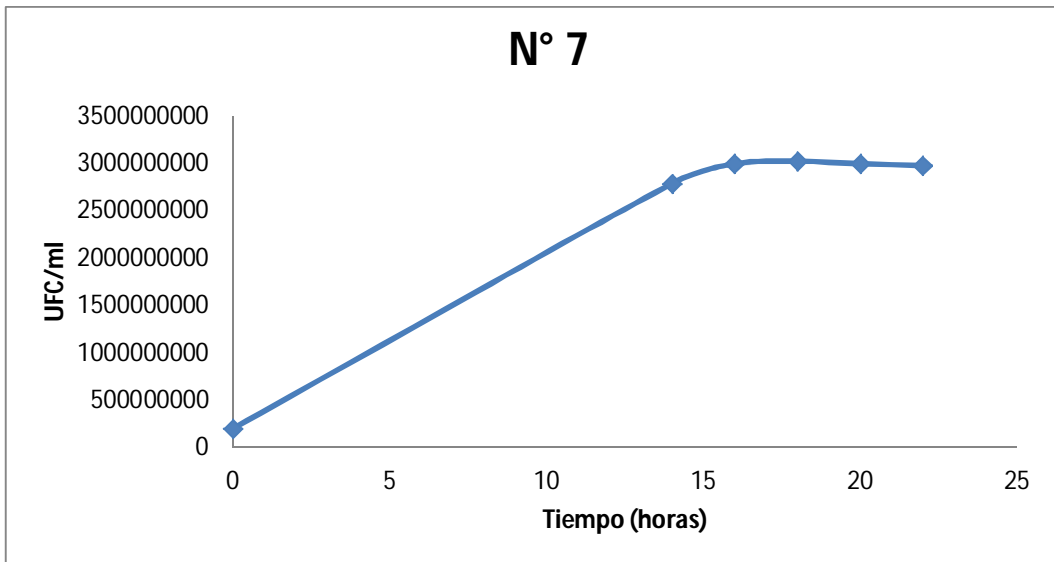
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-7. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 6



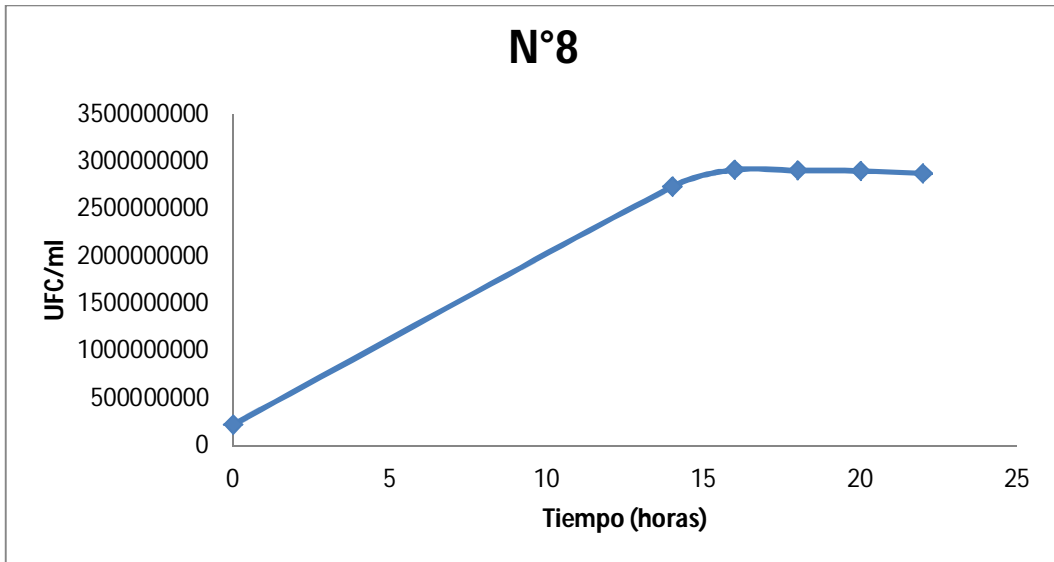
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-8. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 7



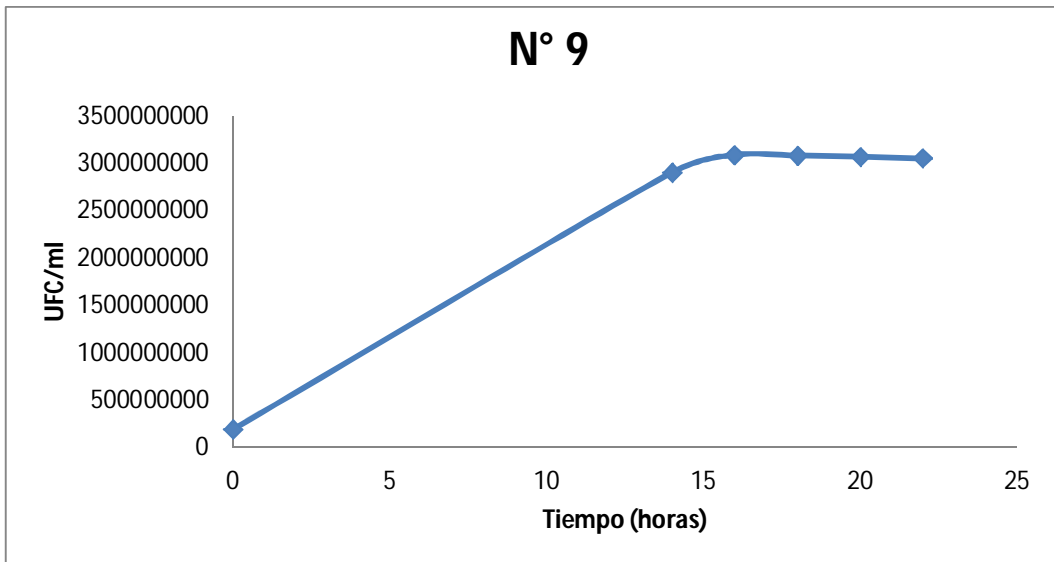
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-9. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 8



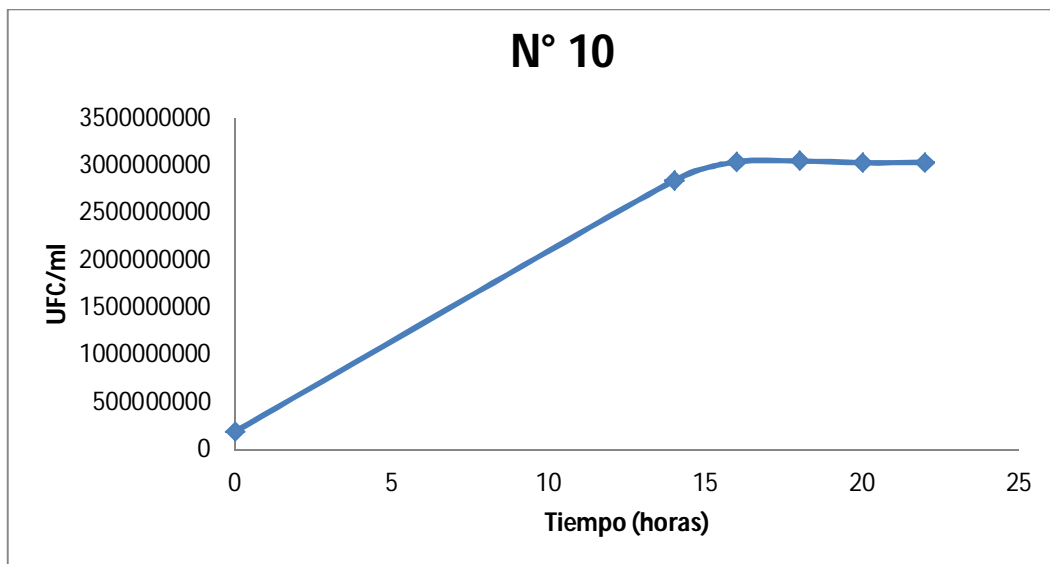
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-10. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 9



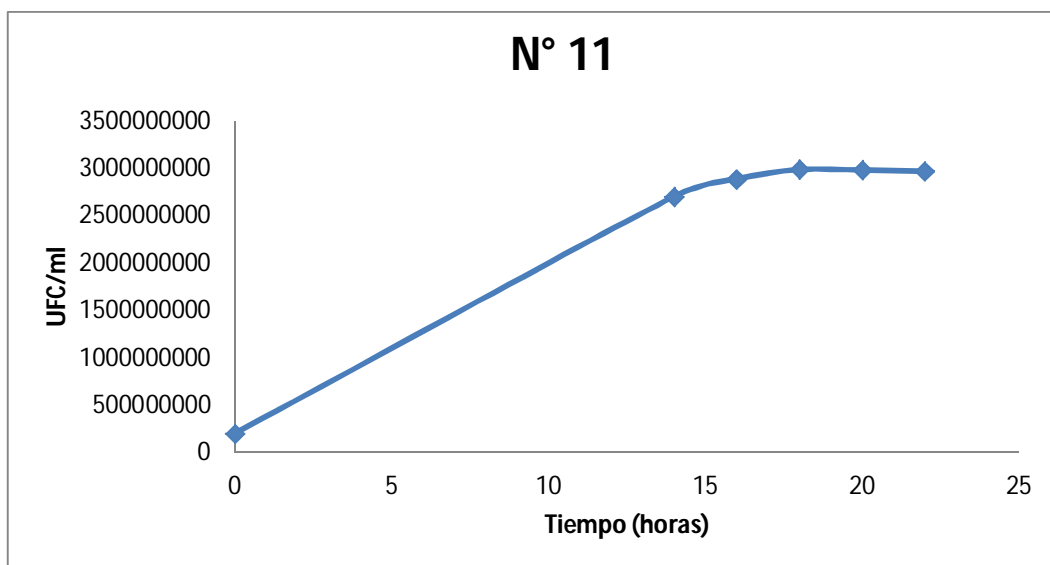
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-11. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 10



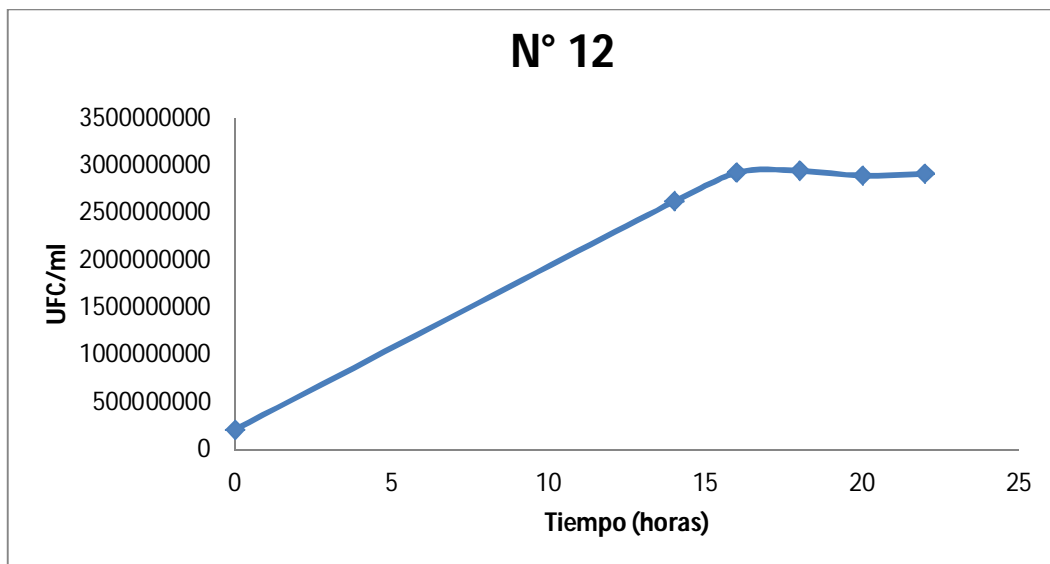
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-12. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 11



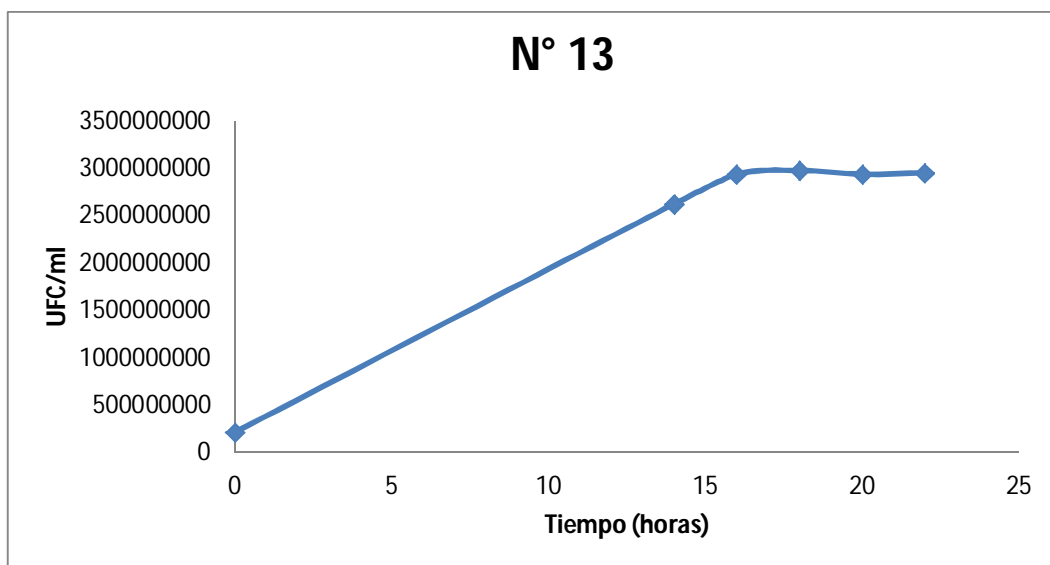
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-13. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 12



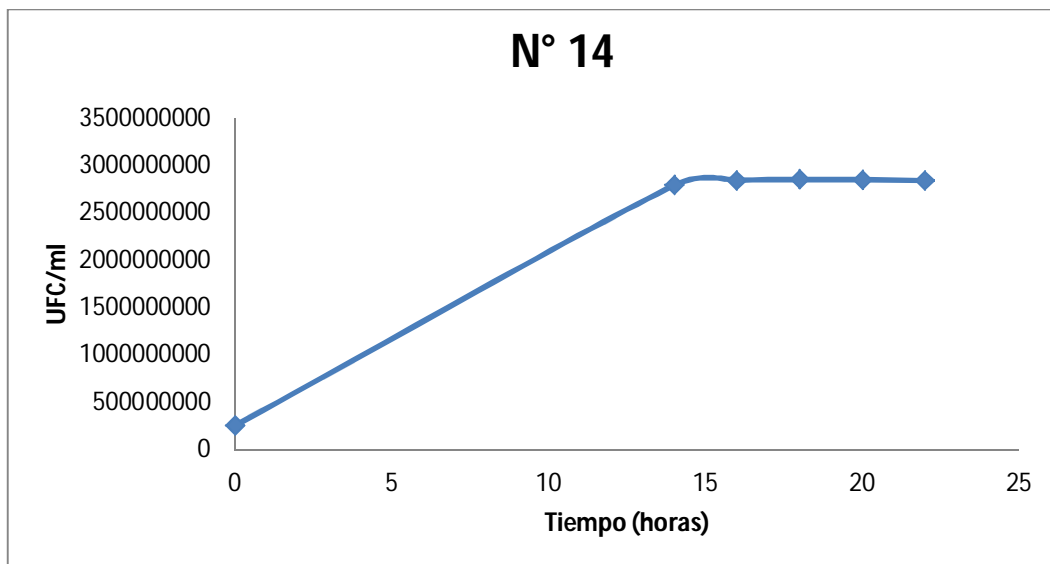
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-14. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 13



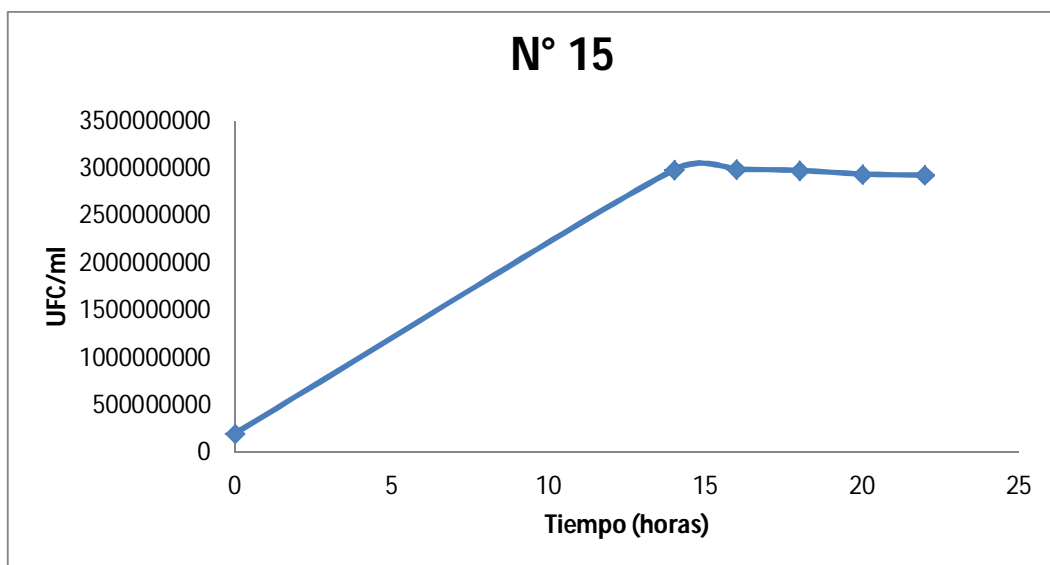
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-15. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 14



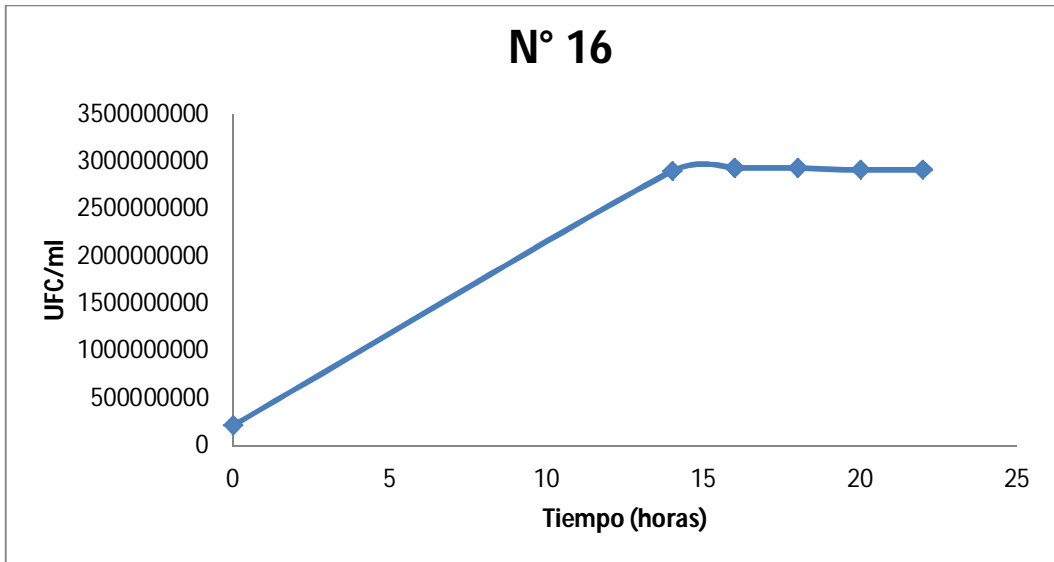
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-16. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 15



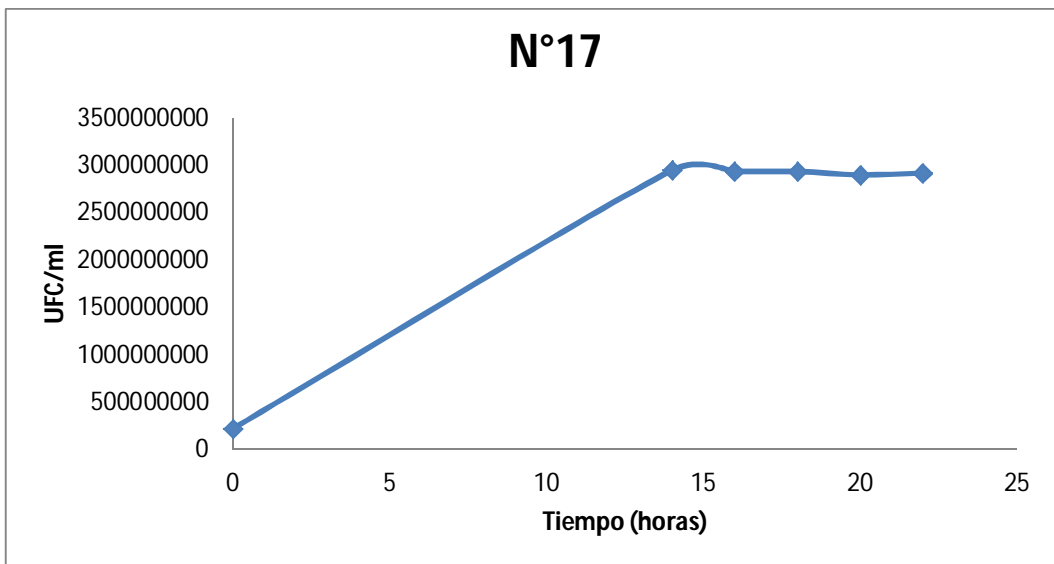
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-17. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 16



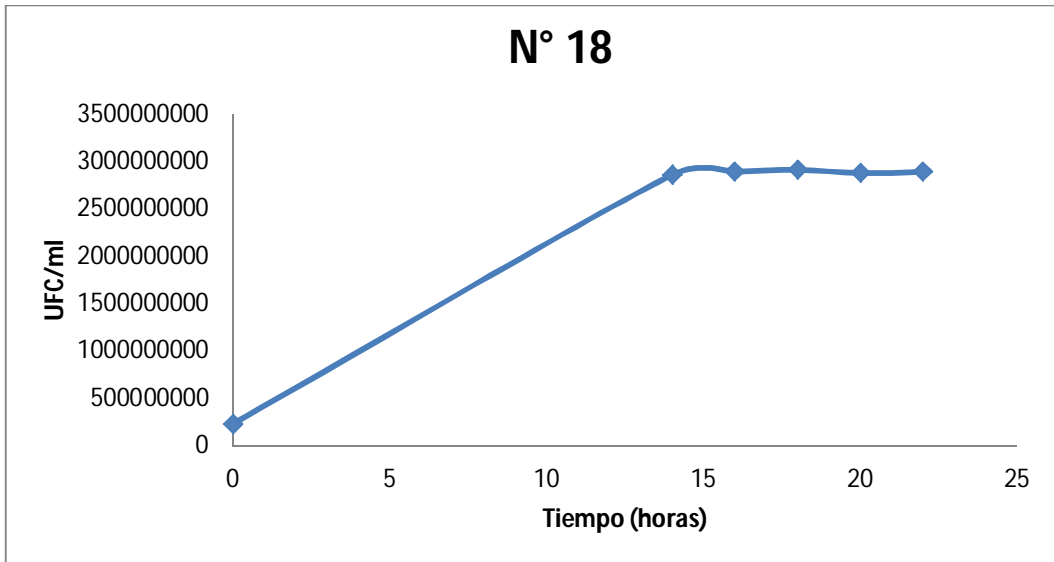
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-18. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 17



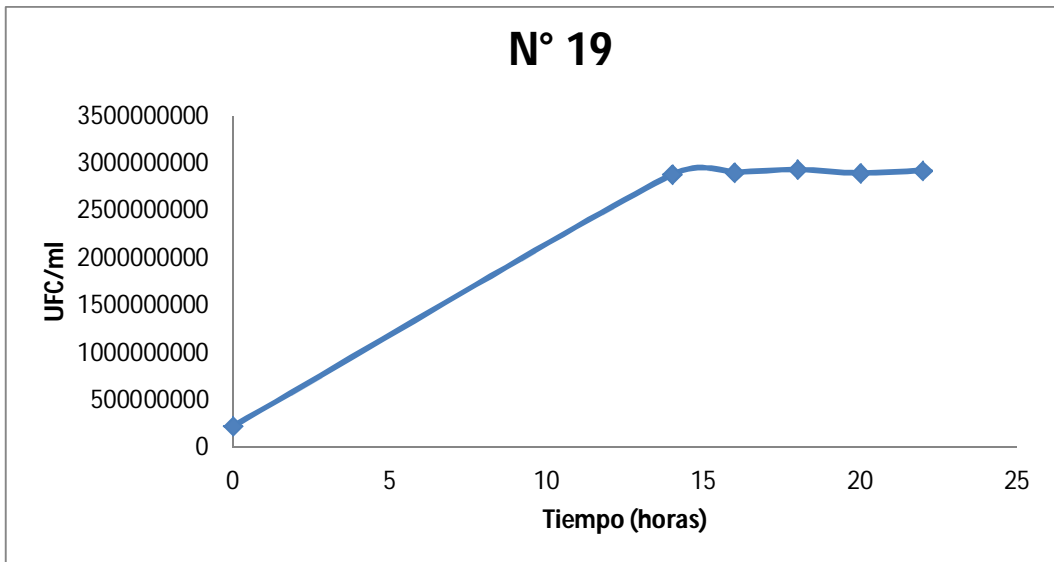
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-19. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 18



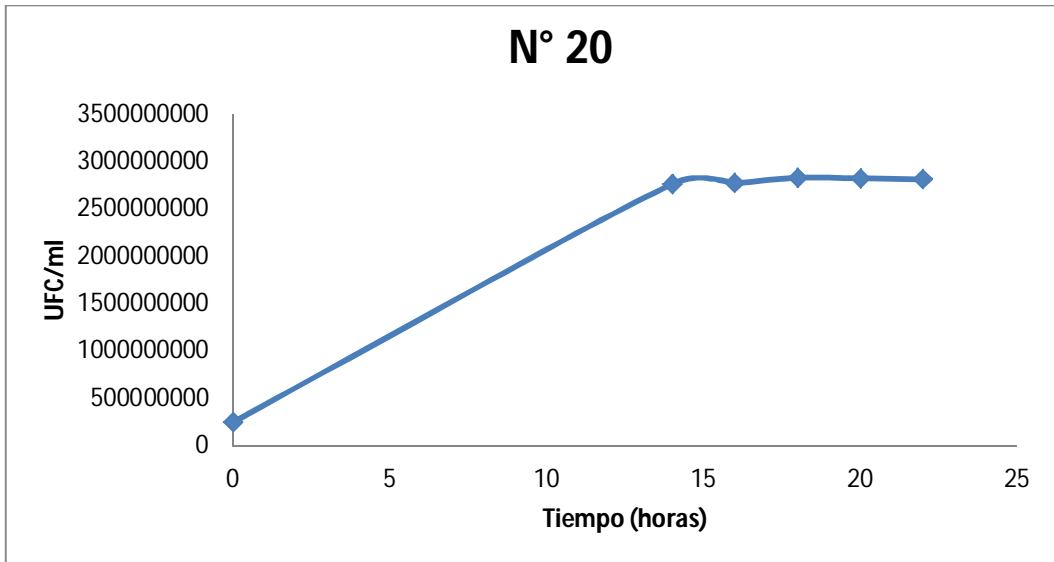
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-20. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 19



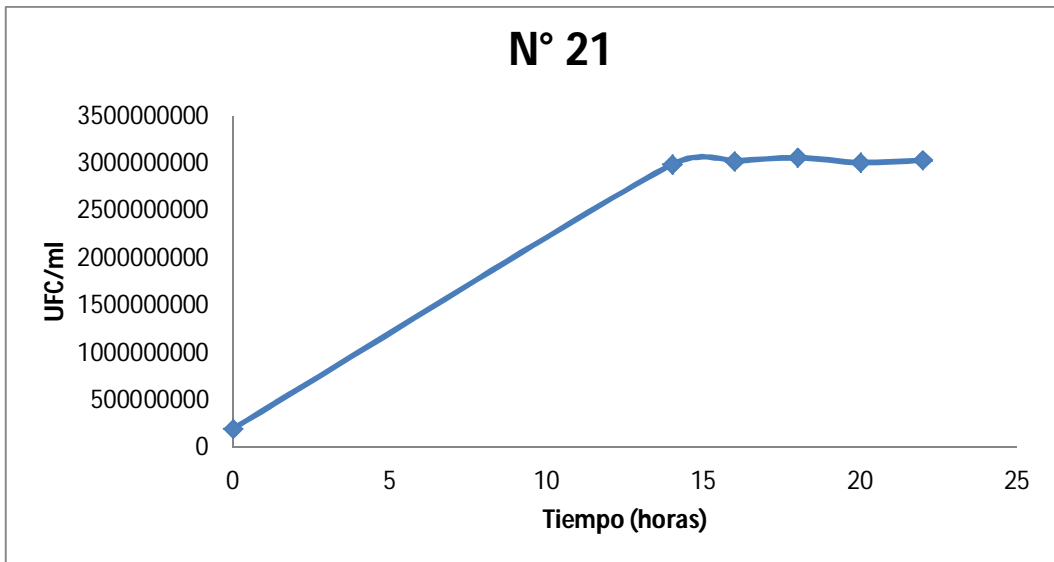
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-21. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 20



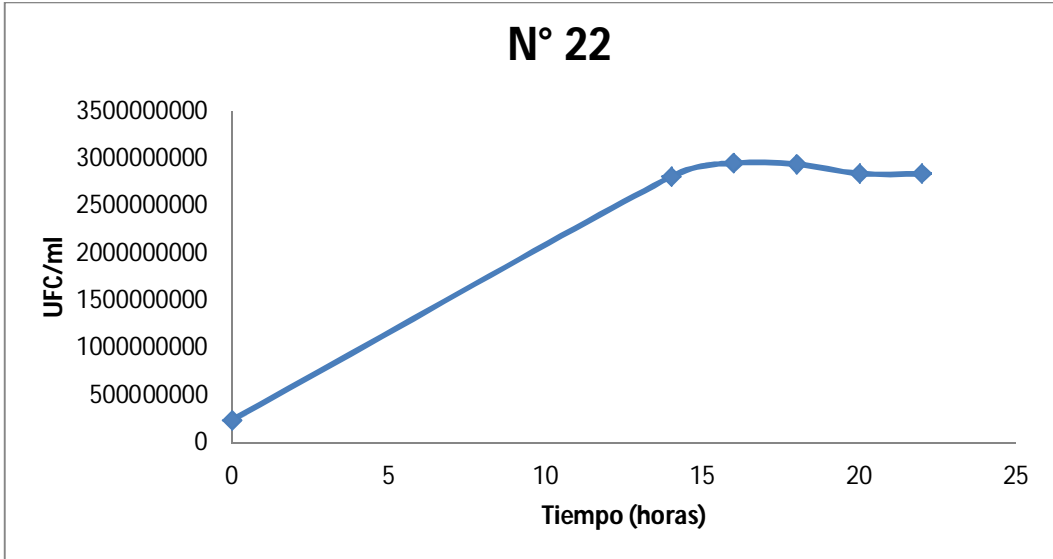
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-22. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 21



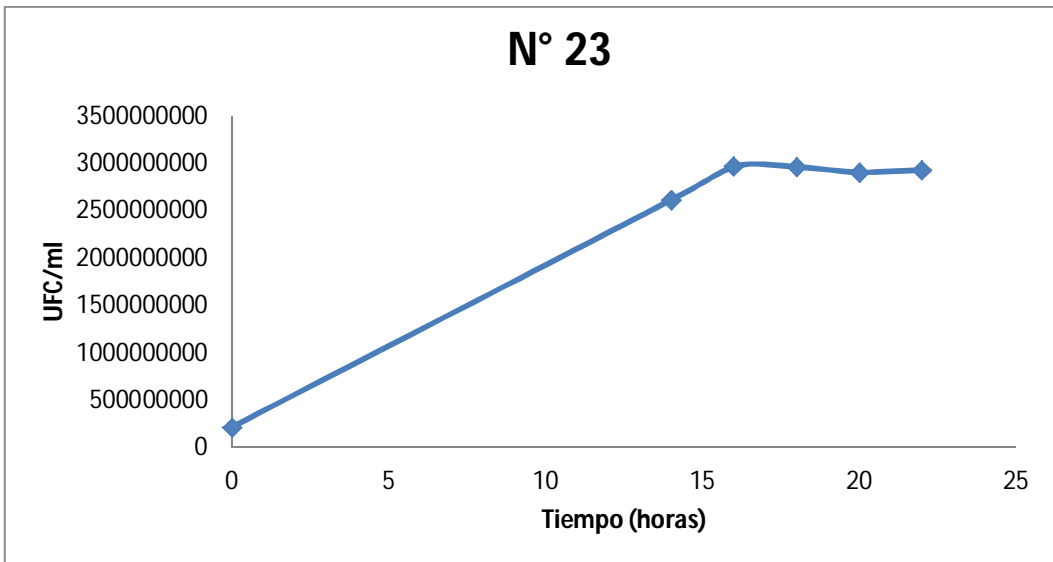
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-23. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 22



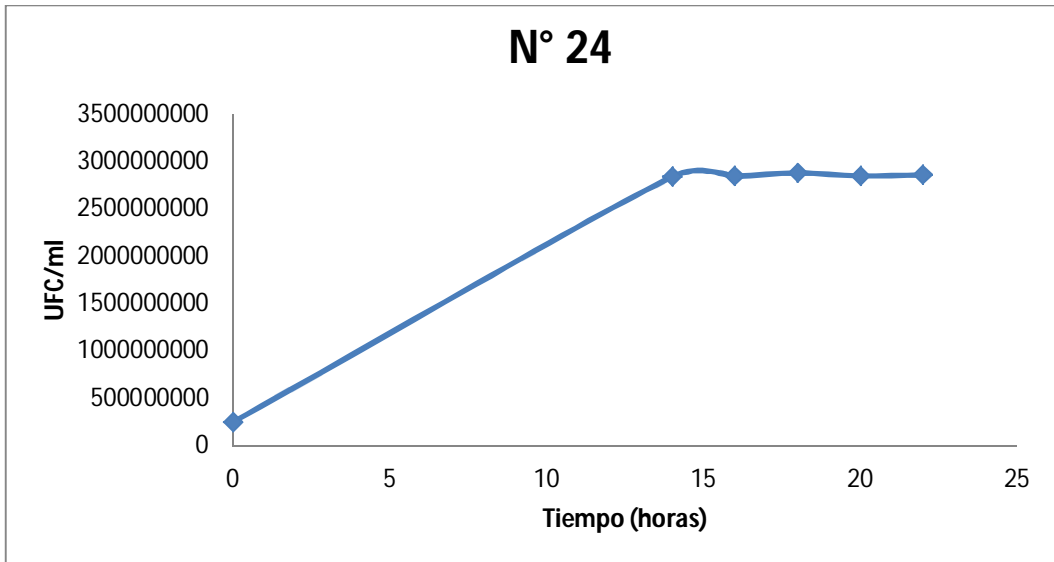
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-24. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 23



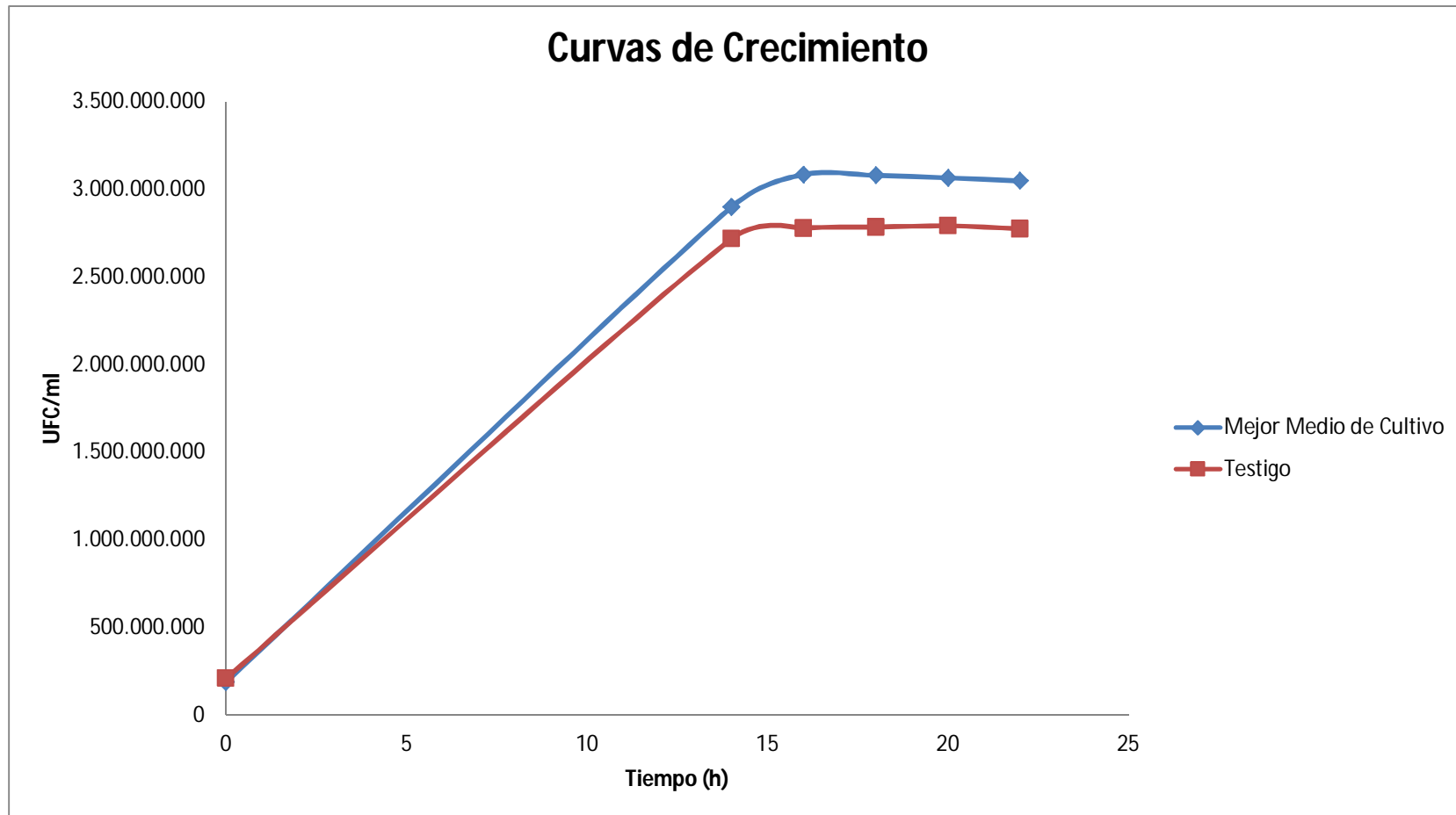
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-25. Curva de crecimiento. Medio de cultivo N° 24



Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

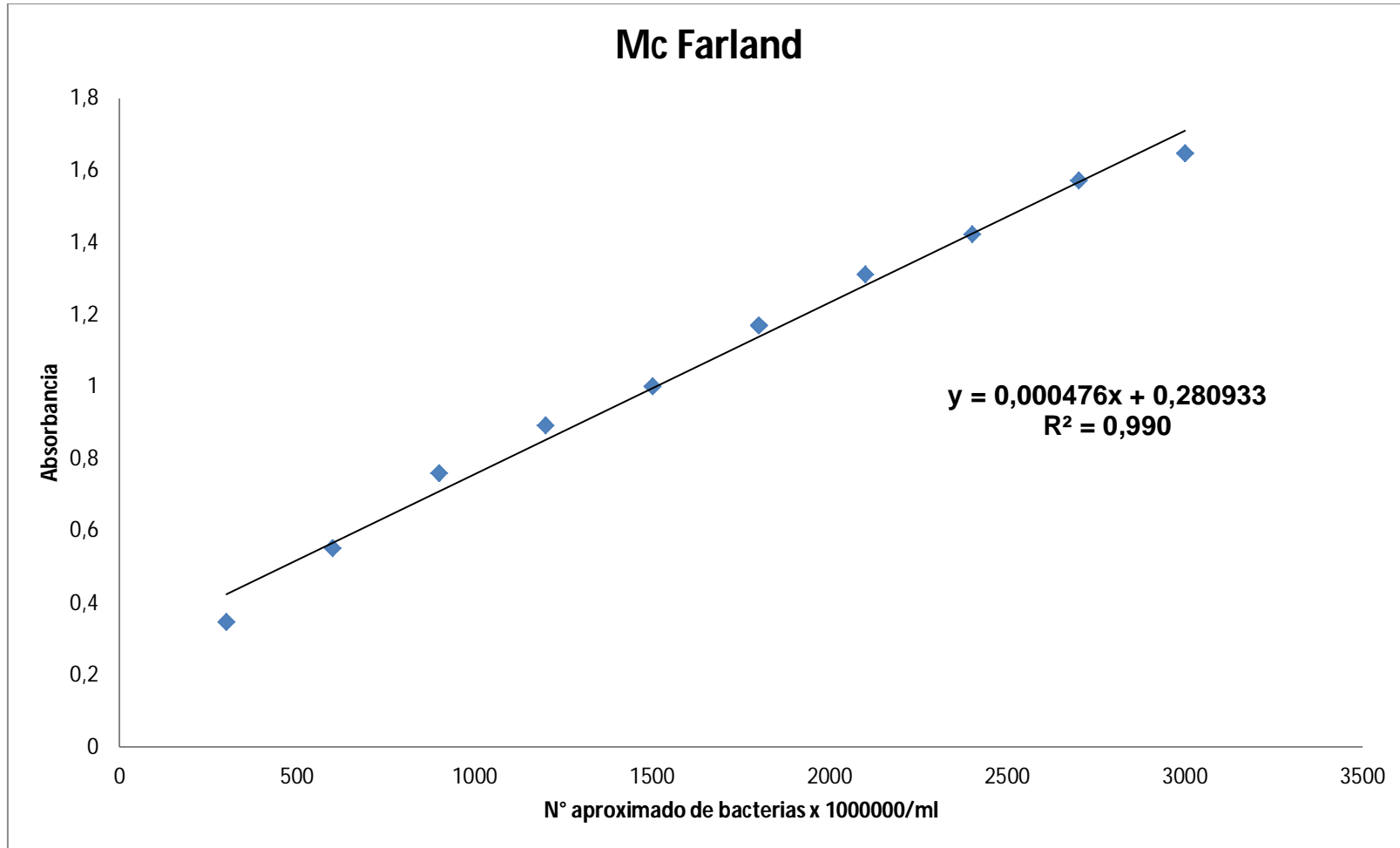
Gráfico C-26. Curvas de Crecimiento del mejor medio de cultivo formulado y del medio de cultivo testigo



Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Curva de McFarland

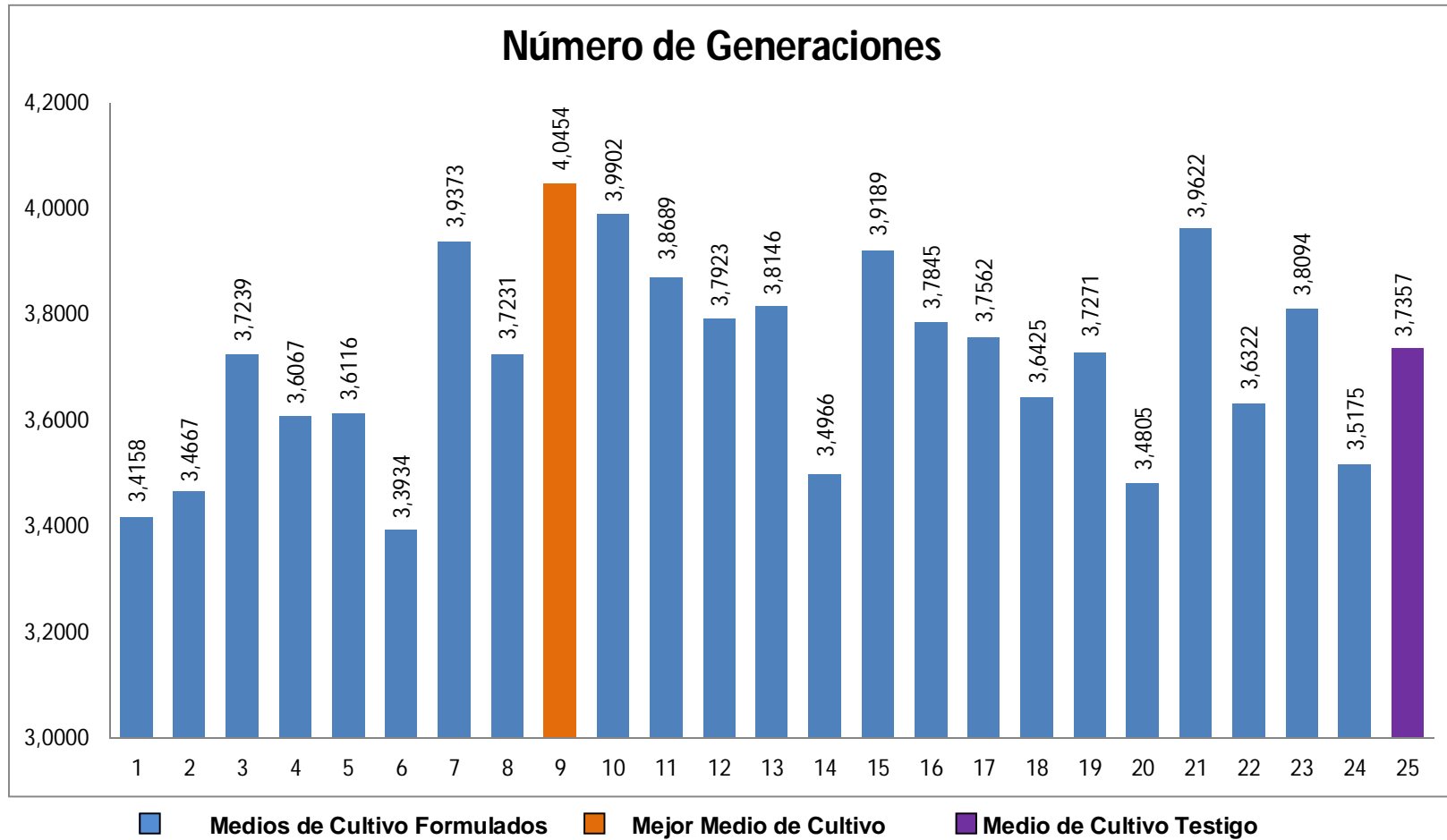
Gráfico C-27. Curva McFarland



Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

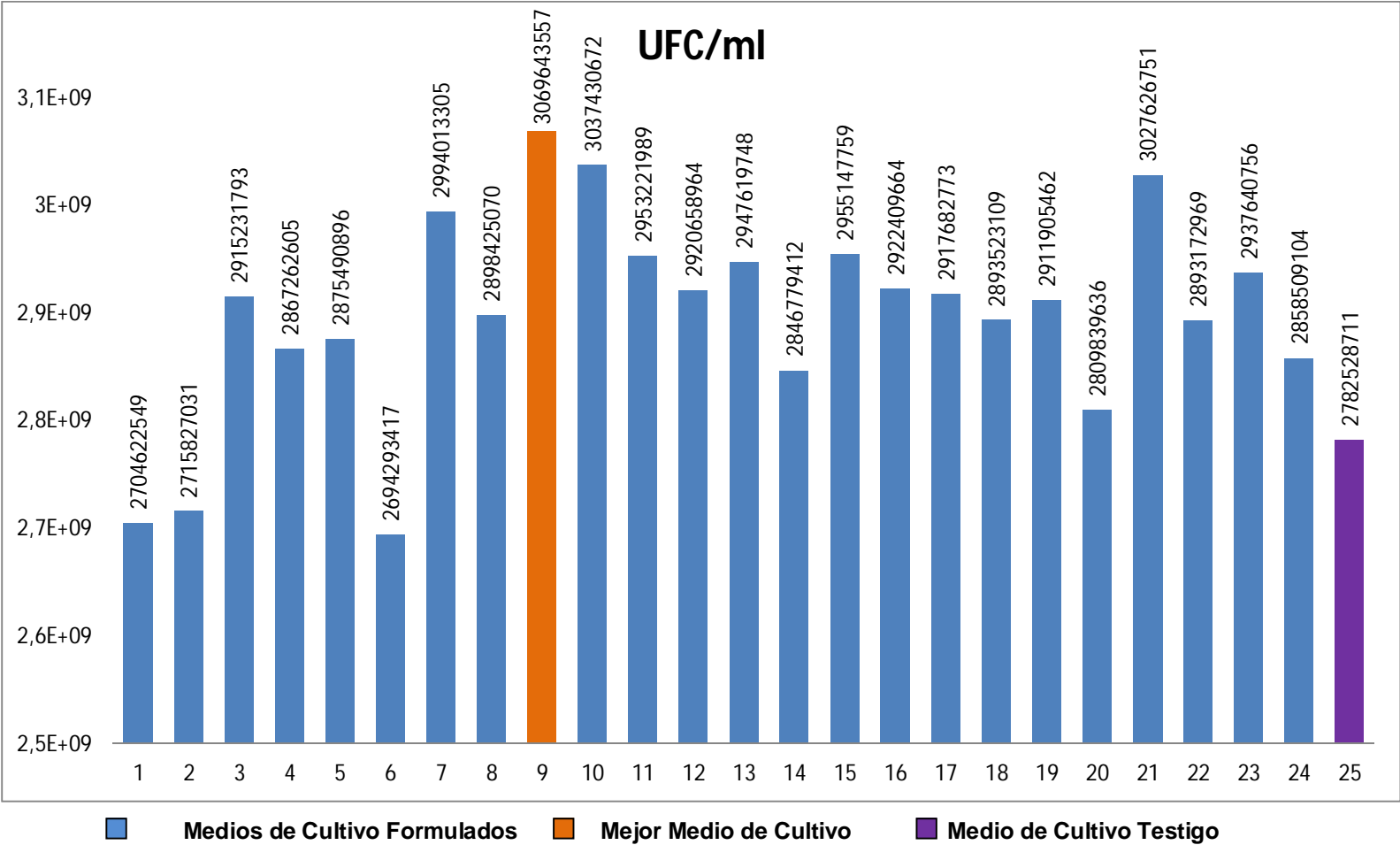
**Parámetros
cinéticos de
los
tratamientos**

Gráfico C-28. Número de Generaciones producidas por *A. paragallinarum* en los 24 medios de cultivo formulados y en el medio testigo



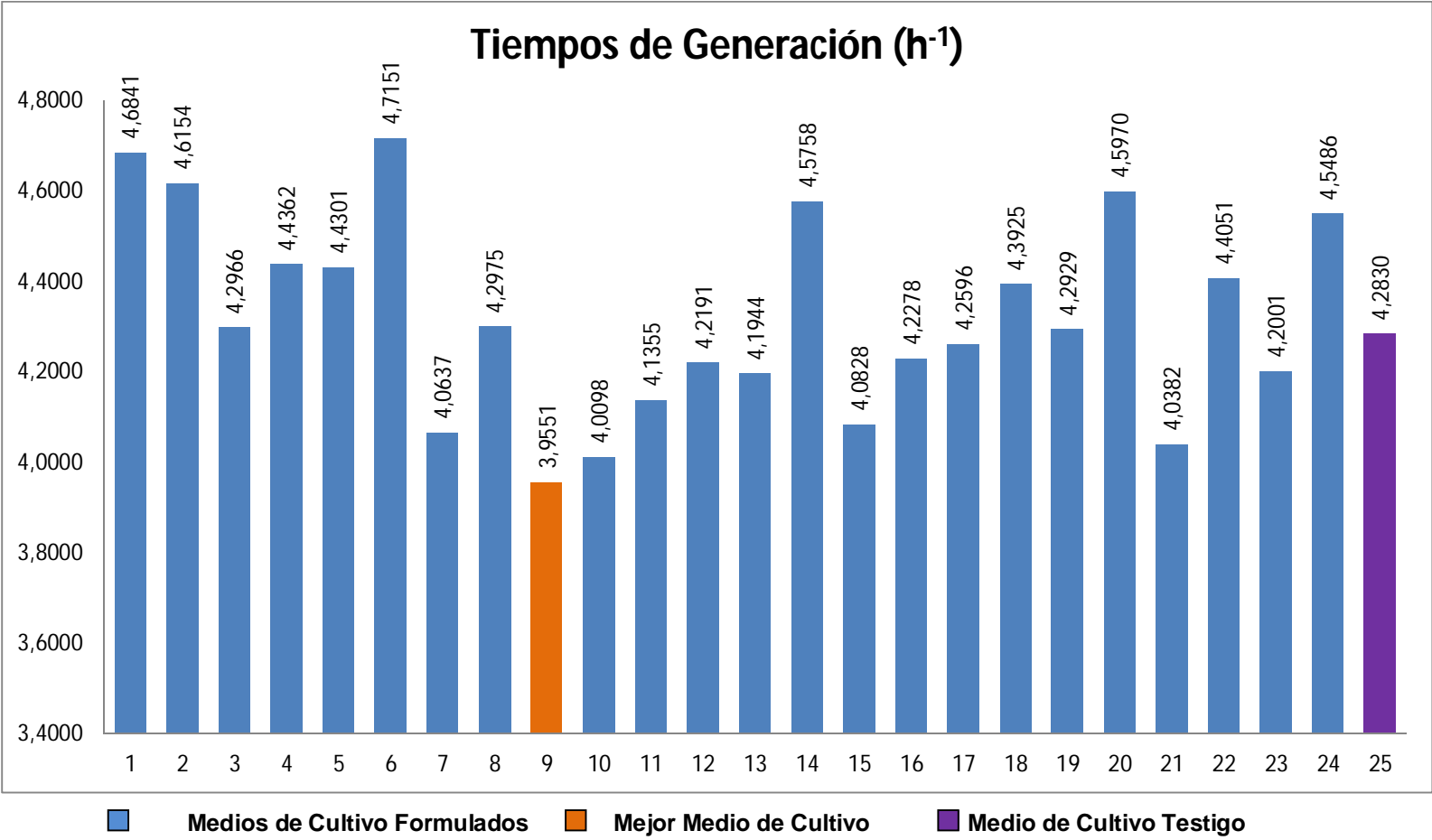
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-29. Concentración de *A. paragallinarum* (UFC/ml) en los 24 medios de cultivo formulados y en el medio testigo



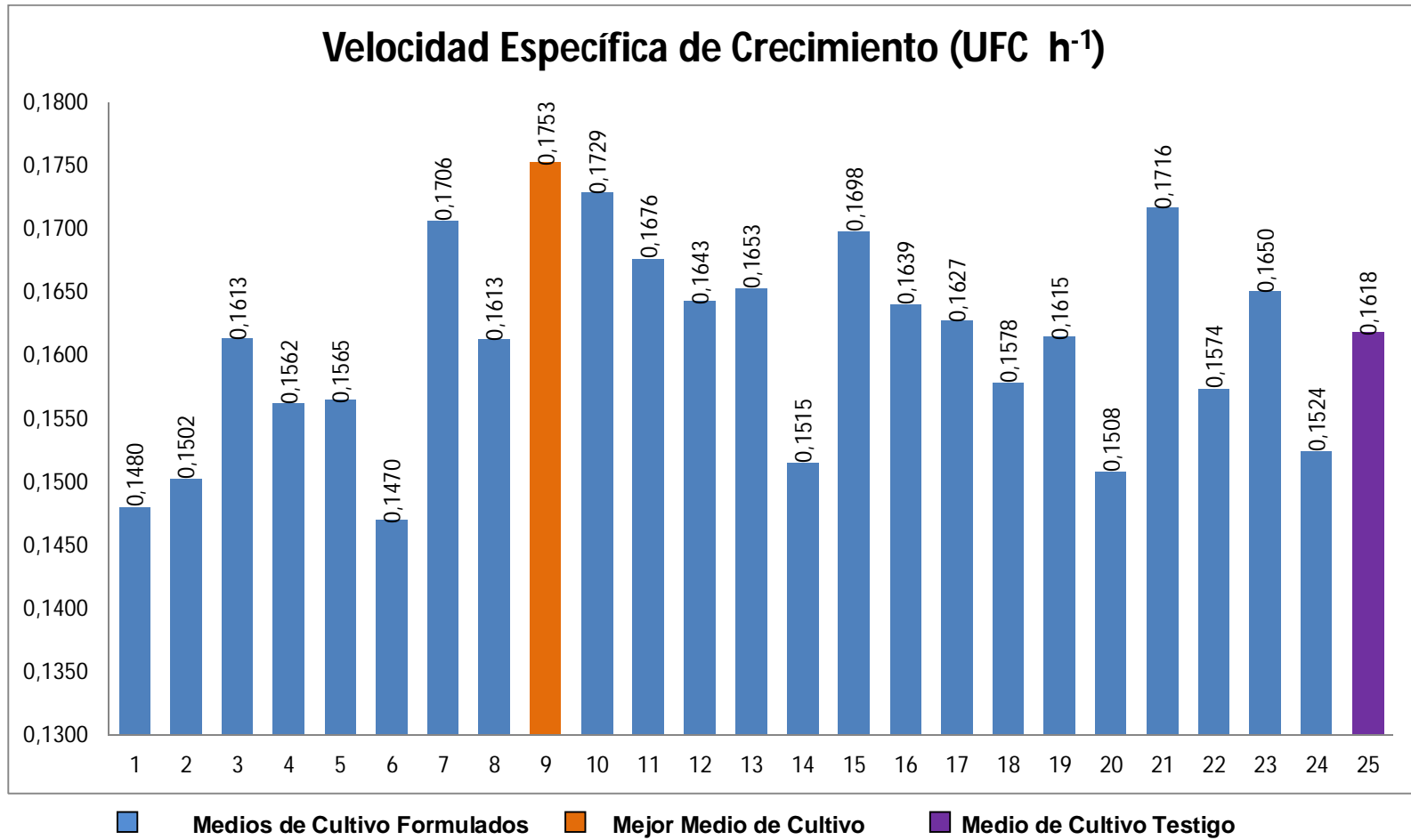
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-30. Tiempos de Generación de *A. paragallinarum* en los 24 medios de cultivo formulados y en el medio testigo



Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

Gráfico C-31. Velocidad Específica de Crecimiento de *A. paragallinarum* en los 24 medios de cultivo formulados y en el medio testigo



Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012

ANEXO D

ANÁLISIS

ESTADÍSTICOS

Tabla D-1. Análisis de Varianza para la Concentración Bacteriana en los 24 medios de cultivo

Variable	N	R ²	CV
UFC/ml	72	0,93	1,07

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	Razón de Varianza	Valor p
Modelo	638333240136508000	23	27753619136369900	28,94	<0,0001
A	312864097383840000	3	104288032461280000	108,75	<0,0001
B	149078105367916000	2	74539052683958100	77,72	<0,0001
C	90677451080353600	1	90677451080353600	94,55	<0,0001
A*B	36777701346485100	6	6129616891080840	6,39	0,0001
A*C	8193147847549220	3	2731049282516410	2,85	0,0472
B*C	916757650558416	2	458378825279208	0,48	0,623
A*B*C	39825979459805100	6	6637663243300860	6,92	<0,0001
Error	46032567404047000	48	959011820917645		
Total	68436580754555000	71			

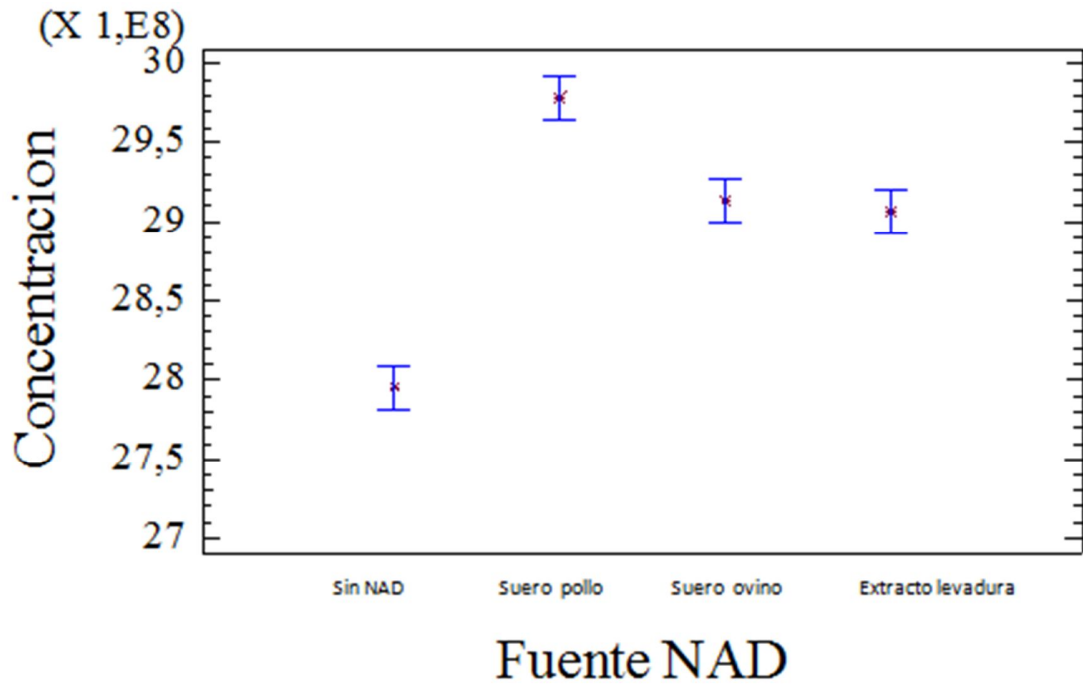
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012 (Infostat)

Tabla D-2. Prueba de Tukey – Factor A para la Concentración Bacteriana en los 24 medios de cultivo

Fuente NAD	Media UFC/ml	n	S.E.	
a ₁	2978898926,28	18	7299207,80	A
a ₂	2913860410,83	18	7299207,80	B
a ₃	2906449112,94	18	7299207,80	B
a ₀	2795454715,17	18	7299207,80	C

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012 (Infostat)

Gráfico D-1. Promedios e Intervalos al 95% de Concentración Bacteriana (Factor A)



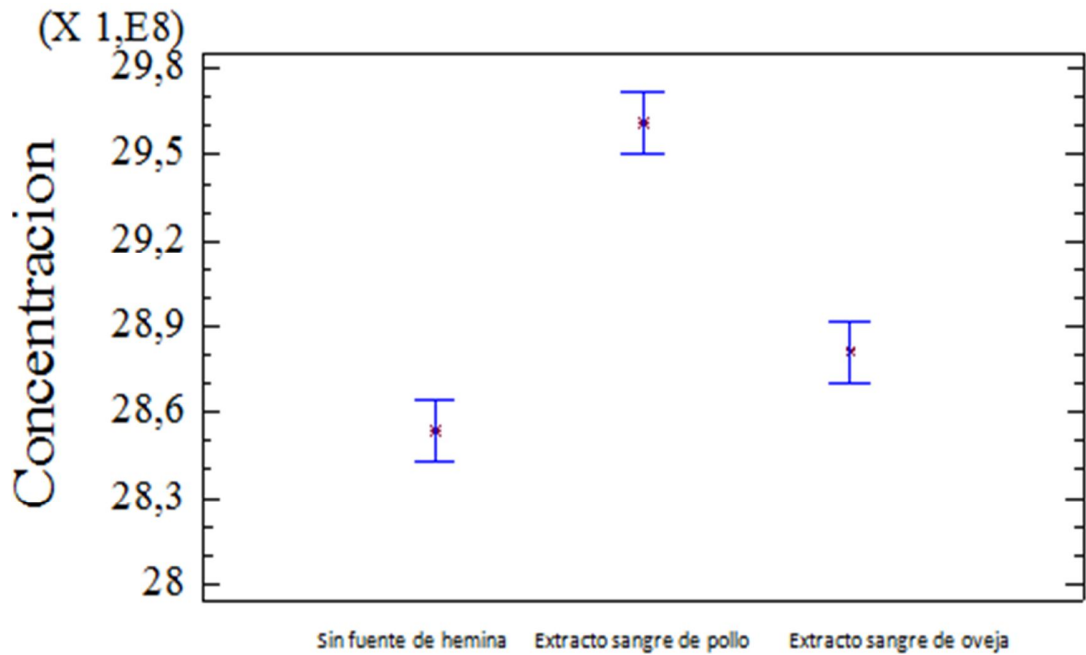
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012 (Infostat)

Tabla D-3. Prueba de Tukey – Factor B para la Concentración Bacteriana en los 24 medios de cultivo

Fuente Hemina	Media UFC/ml	n	S.E.	
b ₁	2960990721,25	24	6321299,38	A
b ₂	2881377626,04	24	6321299,38	B
b ₀	2853629026,63	24	6321299,38	C

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012 (Infostat)

Gráfico D-2. Promedios e Intervalos al 95% de Concentración Bacteriana (Factor B)



Fuente Hemina

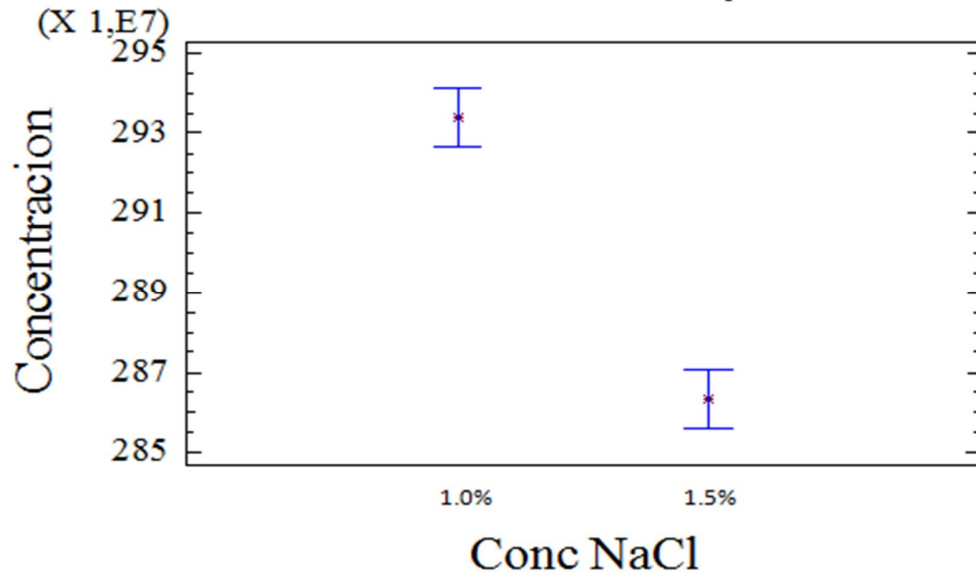
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012 (Infostat)

Tabla D-4. Prueba de Tukey – Factor C para la Concentración Bacteriana en los 24 medios de cultivo

Concentración NaCl	Media UFC/ml	n	S.E.	
C ₀	2934153944,86	36	5161319,33	A
C ₁	2863177637,75	36	5161319,33	B

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012 (Infostat)

Gráfico D-3. Promedios e Intervalos al 95% de Concentración Bacteriana (Factor C)

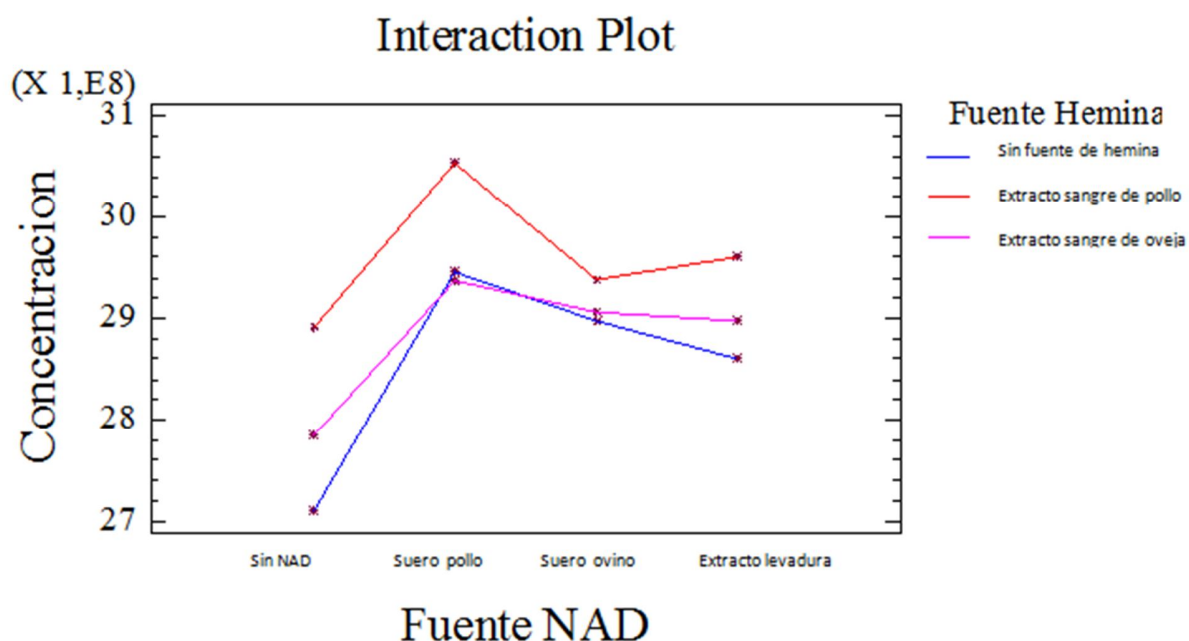


Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012 (Infostat)

Tabla D-5. Prueba de Tukey – Interacción AB para la Concentración Bacteriana en los 24 medios de cultivo

Fuente					
NAD	Fuente Hemina	Media UFC/ml	n	S.E.	
a ₁	b ₁	3053537115,00	6	12642598,76	A
a ₃	b ₂	2960399859,67	6	12642598,76	B
a ₁	b ₀	2946219187,67	6	12642598,76	B C
a ₂	b ₁	2938778711,50	6	12642598,76	B C
a ₁	b ₂	2936940476,17	6	12642598,76	B C
a ₂	b ₂	2905602941,17	6	12642598,76	B C D
a ₃	b ₂	2898074930,00	6	12642598,76	C D
a ₂	b ₀	2897199579,83	6	12642598,76	C D
a ₀	b ₁	2891247198,83	6	12642598,76	C D
a ₃	b ₀	2860872549,17	6	12642598,76	D
a ₀	b ₂	2784892156,83	6	12642598,76	E
a ₀	b ₀	2710224789,83	6	12642598,76	F

Gráfico D-4. Interacción Fuente NAD x Fuente Hemina



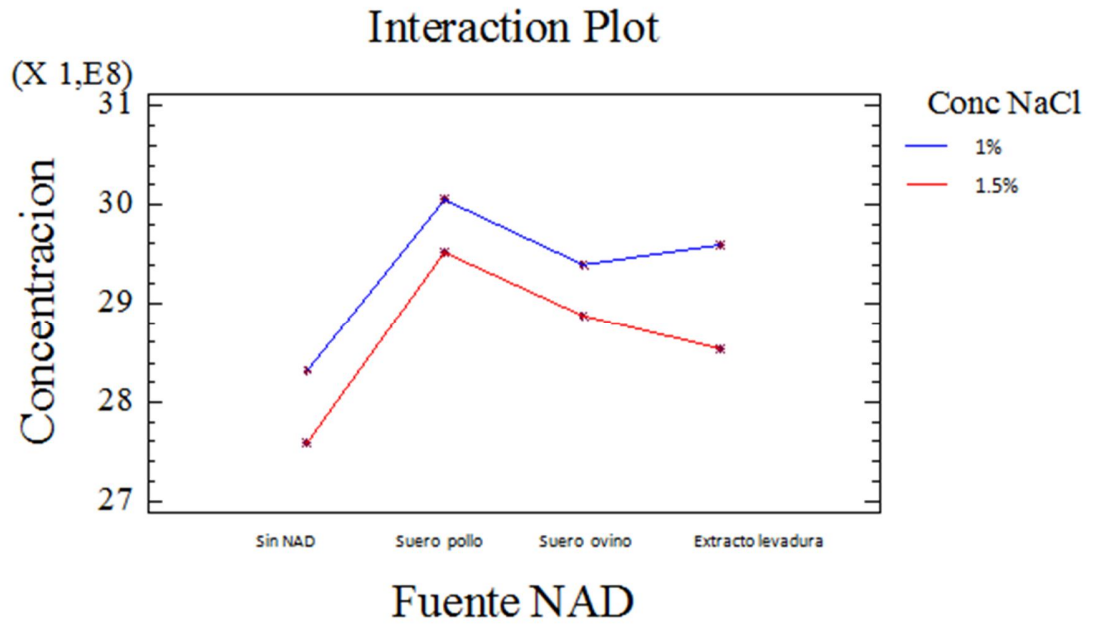
Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012 (Infostat)

Tabla D-6. Prueba de Tukey – Interacción AC para la Concentración Bacteriana en los 24 medios de cultivo

Fuente NAD	Conc. NaCl	Media UFC/ml	n	S.E.	
a ₁	C ₀	3005626283,78	9	10322638,66	A
a ₃	C ₀	2959057656,33	9	10322638,66	B
a ₁	C ₁	2952171568,78	9	10322638,66	B
a ₂	C ₀	2940150093,33	9	10322638,66	B
a ₂	C ₁	2887570728,33	9	10322638,66	C
a ₃	C ₁	2853840569,56	9	10322638,66	C D
a ₀	C ₀	2831781746,00	9	10322638,66	D
a ₀	C ₁	2759127684,33	9	10322638,66	E

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012 (Infostat)

Gráfico D-5. Interacción Fuente NAD x Concentración NaCl



Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012 (Infostat)

Tabla D-7. Prueba de Tukey – Interacción ABC para la Concentración Bacteriana en los 24 medios de cultivo

N°	Fuente NAD	Fuente Hemina	Conc. NaCl	Media UFC/ml	n	S.E.	
9	a ₁	b ₁	c ₁	3069643557,33	3	17879334,63	A
10	a ₁	b ₁	c ₂	3037430672,67	3	17879334,63	A B
21	a ₃	b ₁	c ₁	3027626750,33	3	17879334,63	A B C
7	a ₁	b ₀	c ₁	2994013305,33	3	17879334,63	A B C D
15	a ₂	b ₁	c ₁	2955147759,00	3	17879334,63	B C D E
11	a ₁	b ₂	c ₁	2953221988,67	3	17879334,63	B C D E
13	a ₂	b ₀	c ₁	2947619748,00	3	17879334,63	B C D E
23	a ₃	b ₂	c ₁	2937640756,33	3	17879334,63	C D E F
16	a ₂	b ₁	c ₂	2922409664,00	3	17879334,63	D E F
12	a ₁	b ₂	c ₂	2920658963,67	3	17879334,63	D E F
17	a ₂	b ₂	c ₁	2917682773,00	3	17879334,63	D E F
3	a ₀	b ₁	c ₁	2915231792,67	3	17879334,63	D E F
19	a ₃	b ₀	c ₁	2911905462,33	3	17879334,63	D E F
8	a ₁	b ₀	c ₂	2898425070,00	3	17879334,63	D E F G
18	a ₂	b ₂	c ₂	2893523109,33	3	17879334,63	E F G
22	a ₃	b ₁	c ₂	2893172969,00	3	17879334,63	E F G
5	a ₀	b ₂	c ₁	2875490896,33	3	17879334,63	E F G
4	a ₀	b ₁	c ₂	2867262605,00	3	17879334,63	E F G
24	a ₃	b ₂	c ₂	2858509103,67	3	17879334,63	E F G
14	a ₂	b ₀	c ₂	2846779411,67	3	17879334,63	F G
20	a ₃	b ₀	c ₂	2809839636,00	3	17879334,63	G H
2	a ₀	b ₀	c ₂	2715827030,67	3	17879334,63	H I
1	a ₀	b ₀	c ₁	2704622549,00	3	17879334,63	I
6	a ₀	b ₂	c ₂	2694293417,33	3	17879334,63	I

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012 (Infostat)

Tabla D-8. Prueba T-student. Comparación de los 24 medios de cultivo con el medio testigo

Medios formulados	Medio farmacéutica	P(Var. Hom.)	T	p
1	Testigo	0,0915	-5,90	0,0011
2	Testigo	0,2043	-6,65	0,0006
3	Testigo	0,0631	8,86	0,0001
4	Testigo	0,1981	8,36	0,0002
5	Testigo	0,0014	1,75	0,1785
6	Testigo	0,1397	-7,72	0,0002
7	Testigo	0,2094	21,27	<0,0001
8	Testigo	0,2921	13,09	<0,0001
9	Testigo	0,2763	31,79	<0,0001
10	Testigo	0,9421	46,12	<0,0001
11	Testigo	0,0157	7,13	0,0057
12	Testigo	0,1424	12,17	<0,0001
13	Testigo	0,2017	16,39	<0,0001
14	Testigo	0,4826	13,54	<0,0001
15	Testigo	0,0622	11,47	<0,0001
16	Testigo	0,697	21,57	<0,0001
17	Testigo	0,246	14,37	<0,0001
18	Testigo	0,3574	13,45	<0,0001
19	Testigo	0,2286	13,41	<0,0001
20	Testigo	0,0883	2,04	0,087
21	Testigo	0,1414	21,54	<0,0001
22	Testigo	0,0073	3,57	0,0374
23	Testigo	0,0655	10,49	<0,0001
24	Testigo	0,0105	4,46	0,021

Elaborado por: Santiago Toapaxi Mayorga, 2012 (Infostat)

ANEXO E

**NORMAS PARA EL
REGISTRO, CONTROL,
COMERCIALIZACIÓN Y
USO DE PRODUCTOS
VETERINARIOS**

TÍTULO VI
REQUISITOS PARA EL CONTROL DE PRODUCTOS VETERINARIOS

CAPÍTULO II
DE LA CALIDAD DE LOS PRODUCTOS VETERINARIOS

Artículo 60.- Todo producto veterinario (farmacológico, biológico y alimentos medicados) deberá satisfacer las siguientes normas de control de calidad:

a) Calidad y cantidad de las materias primas usadas

- Cumplimiento de las exigencias que precisen las Normas de referencia internacional citadas en el Anexo I; para el o los principios activos así como para los excipientes, cuando dichos compuestos estén incluidos.
- Cuando los compuestos no estén incluidos en farmacopeas reconocidas por los Países Miembros, se deberá presentar un resumen sobre su origen y sistema de obtención, utilizando denominaciones exactas en los términos químicos o biológicos, con clara definición de los requisitos para la determinación de calidad, de manera que permita la identificación y cuantificación de su composición química, físico-química y biológica, en forma constante y científicamente satisfactoria. En este caso se acompañará de una monografía.

b) Calidad del producto:

- Los controles del producto terminado deberán demostrar las condiciones químicas, físico-químicas y biológicas de sus componentes, en cantidad y calidad de acuerdo con la formulación y dentro de los márgenes aceptados, según el tipo y características del producto. Cuando no sea posible obtener el montaje de la técnica de control específica del producto terminado, la Autoridad Nacional Competente podrá establecer el control de calidad intermedio, durante el proceso de elaboración.

ANEXO F

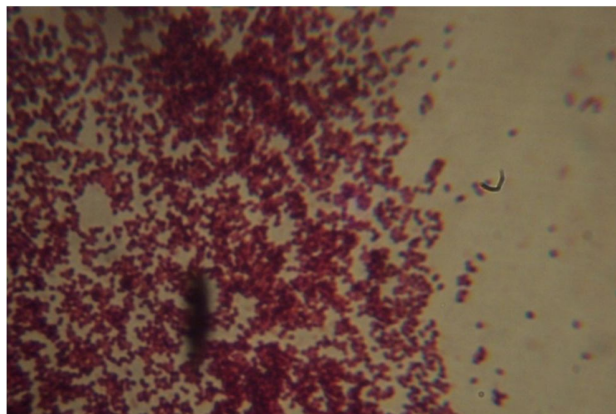
FOTOGRAFÍAS

Observaciones

Micro y

Macroscópicas

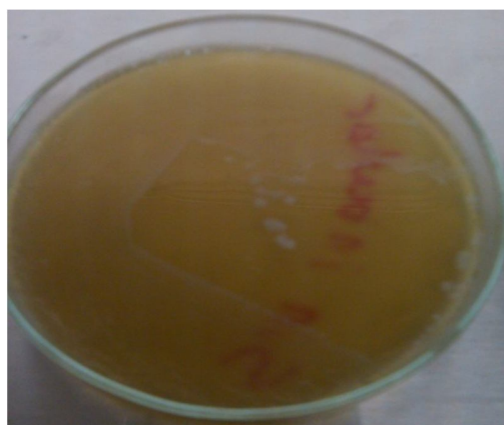
Fotografía F-1. Tinción Gram (Gram negativa) y morfología (cocobacilar) de *A. paragallinarum* serotipo A



Fotografía F-2. Colonias de *A. paragallinarum* serotipo A (Irregulares)



Fotografía F-3. Estría compuesta de *A. paragallinarum* serotipo A



Fotografía F-4. Galería API NH antes de la inoculación



Fotografía F-5. Galería API NH inoculada inicialmente



Fotografía F-6. Galería API NH a las 2 horas de inoculación



Procedimiento

Fotografía F-7. Área estéril. Elaboración de vacunas.



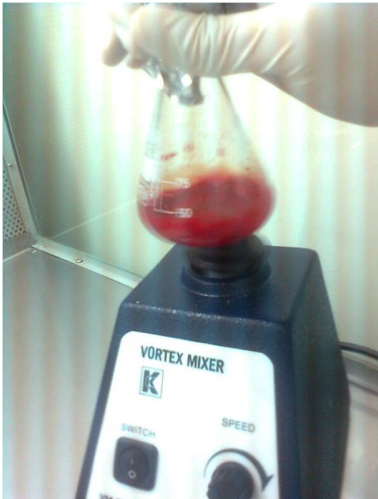
Fotografía F-8. Cepas de *Avibacterium paragallinarum*



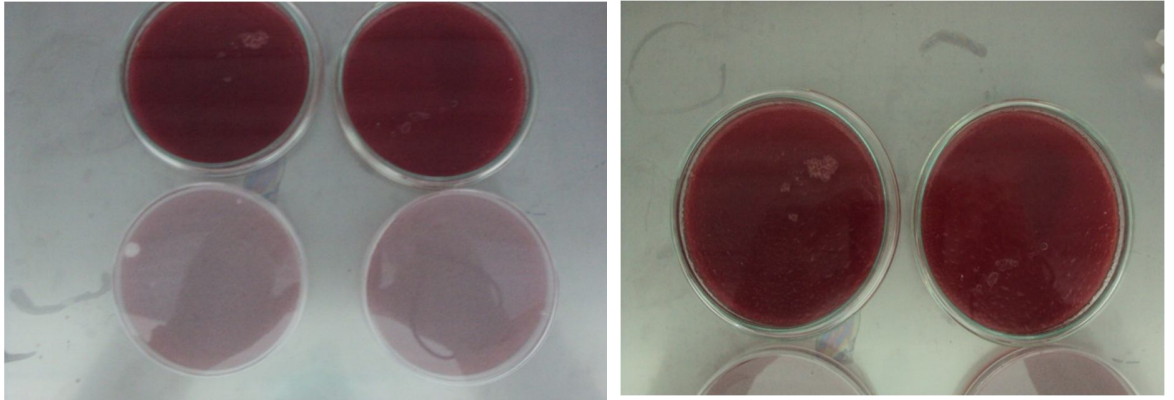
Fotografía F-9. Preparación de medio de cultivo para el aislamiento de *A. paragallinarum*



Fotografía F-10. Obtención de sangre desfibrinada



Fotografía F-11. Placas de agar sangre



Fotografía F-12. Incubación en el método del frasco con vela



Fotografía F-13. Preparación de la Curva de McFarland



Fotografía F-14. Preparación e Inoculación en las pruebas API NH



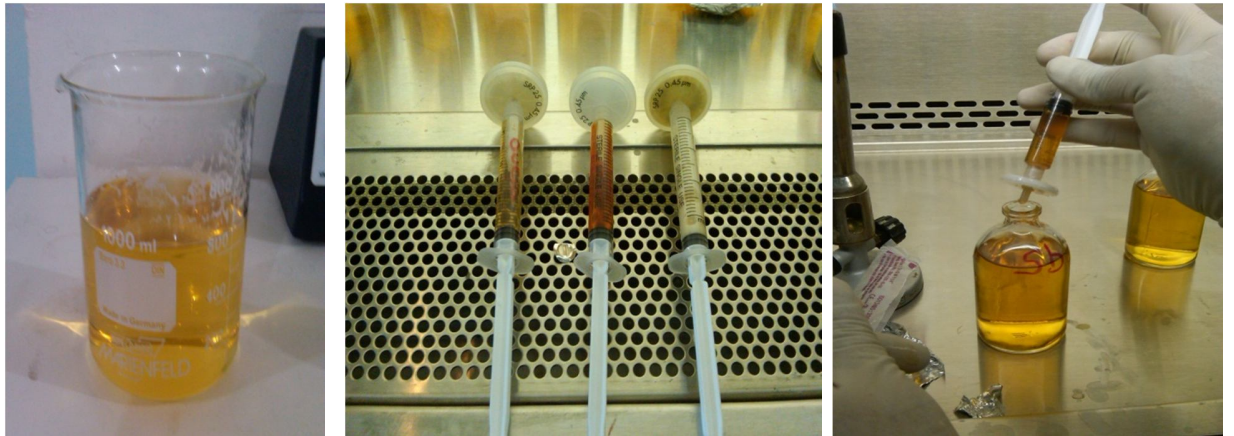
Fotografía F-15. Fuentes de NAD



Fotografía F-16. Fuentes de Hemina



Fotografía F-17. Preparación de los medios de cultivo enriquecidos



Fotografía F-18. Inoculación de las cepas de *A. paragallinarum* en los medios de cultivo formulados



Fotografía F-19. Crecimiento de *A. paragallinarum* en los medios de cultivo



Fotografía F-20. Medio de cultivo sin inocular (izquierda), medio de cultivo con crecimiento de *A. paragallinarum* (derecha)



Fotografía F-21. Lectura en el espectrofotómetro

