

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

***MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN
QUÍMICA-FARMACÉUTICA***



**TÍTULO: PREFACTIBILIDAD PARA IMPLEMENTAR LA TÉCNICA
DE LIOFILIZACIÓN DE LA CEPA *KOCURIA RHIZOPHILIA* ATCC
9341 UTILIZADA EN CONTROL MICROBIOLÓGICO DE
ANTIBIÓTICOS CNDR-MINSA CENTRAL MANAGUA. MARZO -
SEPTIEMBRE 2015.**

Autora:

Bra. Yunieth del Carmen Montes.

Tutores:

MSc. Martha Xiomara Guerrero.

Lic. María Patricia Baca Solís.

Asesor:

Dr. Ángel Balmaceda Echeverría.

Managua; Abril del 2016.

DEDICATORIA

Esta investigación se la dedico al señor creador de todos los seres animados e inanimados, desde el más gigante hasta el microorganismo más pequeño, que aunque no lo creamos tienen un propósito de existir.

A los estudiantes de Química Farmacéutica y la comunidad universitaria que en ocasiones no vemos el sol salir ni la noche terminar y muchas veces tenemos deseos de desistir, pero recuerden al apóstol Pablo que nos dice “todo lo puedo en cristo que me fortalece”.

A mi familia que ha sido mi fuente de inspiración y me dan las fuerzas para continuar día a día.

AGRADECIMIENTO

Le agradezco al señor creador de todas las maravillas en este mundo, que me ha dado en todo momento las cosas más sencillas y más importantes, como es el respirar, el sentir, el vivir.

A mi madre que desde mi nacimiento ha estado conmigo en todo momento, que me ha cuidado y me enseñó a luchar por lo que quiero, por lo que amo y lo que deseo, que me enseñó que la vida es difícil pero que podemos cambiar nuestro futuro, que más que mi madre ha sido mi amiga.

A mi esposo que ha sido la mitad que me hacía falta, que ha estado conmigo en las buenas y en las malas, que me ha acompañado en esta dura travesía, que ha sido mi refugio en mis tribulaciones, que ha sabido entenderme y comprenderme cuando más lo necesitaba.

A mis hermanos que aun sin saber lo que necesitaba ni lo que hacía han sido un pilar fuerte en mi carrera, que aun sin poder ayudarme lo han hecho.

A mi padre que me apoyó y fue mi soporte durante mucho tiempo y aunque ya no está conmigo siempre quiso lo mejor de mí. Sé que hoy estuviese orgulloso de mí.

A mis profesores que con dedicación y esmero me han instruido a lo largo de mi carrera.

A mis apreciadas tutoras MSc. Martha Xiomara Guerrero y Lic. María Patricia Baca, que me han apoyado y guiado con mucha paciencia y cariño, para culminar esta investigación.

A la Lic. Erenia Correa que con mucha dedicación fue de gran ayuda en esta travesía.

A la asociación “MAS CERCA” que fueron un puente con mi becante, que aun sin conocerme se ha interesado en mi situación y fue mi sostén durante toda mi carrera.

RESUMEN

La Liofilización o criodesecación es uno de los métodos más utilizados para la conservación de cepas bacterianas. Es un método de conservación a largo plazo, se basa esencialmente en la paralización del metabolismo celular por falta de agua, que comienza con la congelación a baja temperatura seguida de una evaporación al vacío eliminando por sublimación casi todo el contenido de agua. El presente estudio de carácter descriptivo y de corte transversal, se fundamenta en evaluar la prefactibilidad para implementar la técnica de liofilización aplicada a la cepa *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341, en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia MINSA-Central (CNDR), en el departamento administrativo, *Virología, Parasitología* y del Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos (LNCCM). La investigación se realiza bajo la Guía del Protocolo: “*Red internacional de laboratorios de Microbiología: Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública del mundo en desarrollo, en el año 2004*”; de igual forma el estudio “*Liofilización de la cepa Kocuria rhizophilia ATCC 9341. UNAN-Managua. 2012*”, en los que se mencionan los insumos requeridos para la implementación de la técnica de liofilización. Se comprueba que la técnica de liofilización de la cepa ATCC 9341 es viable y rentable, esto se confirma con los resultados obtenidos. Asimismo dentro de los beneficios están la disponibilidad, accesibilidad, avance tecnológico, científico, bajo costo y menor tiempo de obtención de los liófilos. Además cabe destacar que en el CNDR se cuenta con el equipo y personal calificado para realizar la técnica lo que permite reducir los costos.

Palabras clave: Prefactibilidad, liofilización, cepas, conservación de cepas, *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341.

INDICE

ÍNDICE

Pág.

CAPÍTULO I

1. ASPECTOS GENERALES:

1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos	2
1.3 Planteamiento del problema	3
1.4 Justificación.....	4
1.5 Antecedentes	5

CAPÍTULO II

2. MARCO DE REFERENCIA..... 6

2.1 Métodos de Conservación de Cepas Bacterianas:6

2.1.1 Métodos de conservación:.....7

2.1.1.1.subcultivo:..... 7

2.1.1.2. Mantenimiento con aceite mineral.....8

2.1.1.3. Congelación:9

2.1.1.4 Liofilización.....11

2.2 Liofilización11

2.2.1Concepto 11

2.2.2 Descripción del proceso de Liofilización12

2.2.2.1 Congelación inicial:13

2.2.2.2 Sublimación o desecación primaria:13

2.2.2.3 Desorción o desecación secundaria:13

2.3 Procedimiento de Liofilización según Protocolo de Referencia.....14

2.3.1 Procedimiento para almacenar Cepas15

2.3.2 Procedimiento para la recuperación del Liofilizado.....15

2.3.4 Control de esterilidad y viabilidad de cepas.....	16
2.3.5 Ventajas de la técnica de liofilización	16
2.3.6 Desventajas de la técnica de liofilización.....	17
2.3.7 Aplicaciones de la liofilización	17
2.4 Cepas bacterianas	18
2.4.1 Concepto.....	18
2.4.2. Agrupaciones	18
2.4.3. Cepas de referencia	19
2.4.4. Colecciones de cepas	20
2.4.5. Mantenimiento del Cepario:.....	20
2.5 Aplicaciones de las cepas en la industria farmacéutica:	21
2.6 Descripción del microorganismo en estudio.	21
2.6.1 Cepa <i>Kocuria rhizophilia</i> ATCC 9341	22
2.7. Eritromicina	23
2.7.1. Aplicaciones terapéuticas.....	23
2.7.2 Aplicaciones profilácticas	24
2.8. Estudio de prefactibilidad	24
2.8.1. Módulo de mercado.....	26
2.8.1.1 Objetivos del estudio de mercado	26
2.8.2.Módulo técnico.	27
2.8.3.Módulo de recursos humanos	28
2.8.4. Módulo financiero	28
2.8.5. Módulo económico	29
2.8.6. Módulo social	29
2.8.7 Modelos de comportamiento: costos fijos y variables	30
2.8.8 Análisis de costo beneficio (ACB).....	30

CAPÍTULO III

3. HIPÓTESIS.....	32
-------------------	----

CAPÍTULO IV

4. DISEÑO METODOLOGICO	33
4.1 Descripción del ámbito de estudio	33
4.2 Tipo de estudio	33
4.3 Universo de Estudio	33
4.4 Criterios de inclusión	33
4.5 Criterios de exclusión	33
4.6 Variables de estudio	33
4.6.1 Variables Independientes de estudio	33
4.6.2 Variables Dependientes de estudio	34
4.7 Instrumentos para recolectar la información	34
4.8 procesamiento de la información:	34
4.9 Operacionalización de Variables	35

CAPÍTULO V

5. ORGANIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	37
--	----

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES	64
-----------------------	----

CAPÍTULO VII

7. RECOMENDACIONES	65
--------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

GLOSARIO

I. CAPITULO

INTRODUCCIÓN

La liofilización es un método de conservación a largo plazo. Esta tecnología comienza con el proceso de sustracción del agua a partir del congelamiento inicial sin afectar las propiedades químicas, físicas y biológicas de los productos sometidos a este proceso, siendo una técnica que minimiza el riesgo de cambio genético en las células y las mantiene viables, ventajas que han condicionado su extensa utilización para conservar diversos materiales biológicos, con el fin de lograr un mayor tiempo de conservación.

El estudio, radica en demostrar que la implementación de la técnica de conservación microbiológica liofilización, aplicada a la cepa bacteriana *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341 o mejor conocida como *Micrococcus luteus* es viable y rentable, resultados que son excelentes en el transcurso de esta investigación. Puesto que se comprueba que al implementar esta técnica, el costo del liofilo es mucho menor al producirlo en el CNDR, que el costo de importarlo.

Es recomendable que los mecanismos de conservación brinden seguridad y reduzcan los riesgos de pérdida durante el almacenamiento. La liofilización debe de garantizar la conservación de la cepa en estado puro, viable y estable, durante al menos 10 años (Godínez, 2008). En cuanto al costo en la conservación de cepas se incluyen los costos de personal, equipos, materiales, entre otros.

Este estudio de prefactibilidad demuestra que la liofilización es una técnica que se puede realizar en el CNDR a bajo costo, puesto que se cuenta con el equipo y el personal calificado para llevarse a cabo. De esta forma se reducen los costos de obtención de la cepa y otros de sus beneficios además de su reducido costo están, la durabilidad, disponibilidad de uso de cepas microbiológicas, almacenamiento, distribución, accesibilidad y tiempo de obtención oportuno, etc. En consecuencia se confirma el cumplimiento de los objetivos propuestos.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar la prefactibilidad para implementar la técnica de liofilización de la cepa *kocuria rhizophilia* ATCC 9341, utilizada en control microbiológico de antibióticos, en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR) del Complejo Nacional de Salud Dra. Concepción Palacios (MINSA- central), en el período de marzo a septiembre 2015.

Objetivos específicos:

1. Estimar el costo de la técnica de liofilización aplicada a la cepa *kocuria Rhizophilia* ATCC 9341, realizada en el CNDR.
2. Comparar las principales ventajas y desventajas de la técnica de liofilización con las técnicas de conservación microbiológica utilizadas en el CNDR y el LNCCM.
3. Determinar el costo-beneficio de la técnica de liofilización empleada en control microbiológico del antibiótico eritromicina.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde tiempos remotos los microorganismos han sido empleados como materiales esenciales de trabajo en la obtención de medicamentos (García, 2000), también se utilizan en el control de calidad microbiológico para medir la efectividad de antibióticos, estos microorganismos se comercializan en forma de cepas bacterianas certificadas, con características muy conocidas que garantizan su eficacia y seguridad.

Con el creciente uso de las cepas en numerosos ensayos de laboratorio hace que la demanda de estas haya crecido considerablemente, surgiendo así la necesidad de mantener los cultivos microbianos de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan puras, viables y estables. Dichas cepas deben contar con una técnica adecuada que garantice que se cumplan estas condiciones.

Actualmente en el país se utilizan métodos de conservación de cepas a corto plazo (subcultivo, mantenimiento con aceite mineral), siendo estos no muy eficaces, debido a que no aseguran completamente su conservación; ocasionando la carencia del reactivo estándar biológico (cepas), los que son comprados en el extranjero y en muchas ocasiones se requiere largo tiempo para que puedan llegar al país. Esta problemática posiblemente se deba al sistema burocrático en trámites de aduanaje y a la gestión de compra en el extranjero.

No obstante la técnica de liofilización es una herramienta que constituye una respuesta viable en el desarrollo de la industria farmacéutica, siendo un método de conservación de cepas a largo plazo que no altera la sensibilidad bacteriana por ser una técnica precisa y de alta calidad que asegura la vida útil de los liófilos.

Por lo antes expuesto surge la pregunta: ¿Qué viable y rentable es la implementación de la técnica de conservación microbiológica liofilización aplicada a la cepa ATCC 9341 *Kocuria rhizophilia*, utilizada en el control microbiológico de antibióticos, para el avance tecnológico del país?

JUSTIFICACIÓN

La liofilización es uno de los métodos más empleados para la conservación de cepas bacterianas, perfecto escenario que presenta una extraordinaria alternativa a una consecuente prolongación en el tiempo de vida útil de las cepas, de igual forma permite conservar la calidad microbiológica (provee productos con una estabilidad optima, una solubilidad fácil, rápida, completa y rápida disponibilidad de uso) asegurando el éxito de los análisis. Además, es conveniente para la producción y distribución masiva de los cultivos microbianos.

Teniendo en cuenta la importancia de las cepas de referencia, las cuales permiten conocer el grado de confiabilidad en el control de calidad microbiológica y la necesidad de encontrar una solución a la problemática antes mencionada, esta investigación aporta una herramienta para contribuir al fortalecimiento de la industria farmacéutica, mediante la aplicación de un estudio de prefactibilidad que evalúe la viabilidad y rentabilidad de implementación de la técnica de liofilización de la cepa "*Kocuria rhizophilia*" ATCC 9341 en el país.

La implementación de esta técnica de conservación microbiológica, es muy importante para el avance tecnológico y científico del país, ya que permite disponer de cepas confiables inmediatamente para su uso y a bajo costo. Al mismo tiempo, la cepa "*Kocuria rhizophilia*" liofilizada, establece el primer paso para estructurar un cepario propio que satisfaga las necesidades del país. Además, se cuenta con el equipo y personal calificado en el CNDR-MINSA, lo que permite reducir el costo de la técnica.

Esta investigación pretende motivar la realización de posteriores estudios en el área de control microbiológico de productos farmacéuticos, sanitarios y una gran gama de productos de uso industrial, cuyos beneficiarios comprenden: laboratorios de control de calidad microbiológica de la industria farmacéutica y de alimentos a nivel nacional, laboratorios clínicos, laboratorios de universidades y toda institución que tenga interés en el tema.

ANTECEDENTES

En el año 2008 se realizó un estudio en el Instituto de investigaciones para la industria alimenticia (la Habana Cuba), donde se evaluó la influencia del tiempo de conservación por liofilización en cepas del género *penicillium* de utilidad en la industria alimenticia. Se estudiaron 10 cepas de hongos filamentosos pertenecientes a la especie *penicillium camemberti* conservadas por liofilización entre 10 y 20 años en un banco de cepas, el cual concluyó que el 100 % de las cepas aseguró su supervivencia. No detectándose alteraciones en sus características macro morfológicas y micro morfológicas. Además Los cultivos mantuvieron sus características de crecimiento y actividad enzimática. Confirmándose con los resultados obtenidos la validez del empleo de la técnica de liofilización como método de preservación microbiológica durante un período de tiempo entre 10 y 20 años. (Godínez, 2008)

En Abril del 2012, en la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-Managua) se presentó un estudio monográfico titulado “liofilización de la cepa *kocuria rhizophilia* ATCC 9341 utilizada en pruebas de potencia del antibiótico eritromicina” realizado en las Instalaciones del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Complejo Nacional de Salud Concepción Palacios (CNDR-MINSA central), el objetivo principal de Romero et. al, fue evaluar la viabilidad, pureza y estabilidad de dicha cepa liofilizada, resultando el 100% de los 10 lotes en estudio, puros, viables y estables, además de ser eficaz para realizar pruebas de potencia del antibiótico eritromicina. Lo que demuestra que la técnica de liofilización permite la conservación de la cepa ATCC 9341. (Romero et.al, 2012)

En Nicaragua, en los laboratorios de la industria farmacéutica nacional y oficial actualmente no se cuenta con un método de conservación de cepas a largo plazo (Liofilización) que garantice en su totalidad su eficacia, por lo que se hace necesaria la realización de estudios encaminados a la implementación de la técnica de liofilización bacteriana en el país.

II. CAPITULO

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Métodos de Conservación de Cepas Bacterianas:

El objetivo principal de la preservación de las cepas o de los aislamientos de microorganismos es mantenerlos puros, viables, sin variaciones ni mutaciones, que se asemejen en lo posible al aislamiento inicial. Muchos métodos han sido usados para preservar las bacterias, pero no todos los géneros se comportan en forma similar cuando son sometidos al mismo proceso, inclusive, en ocasiones, cepas de la misma especie pueden responder en forma diferente. (Switzerland, 2004)

Los métodos de conservación de las cepas estándar de control de calidad microbiológico, deben asegurar que las mismas mantengan sus características típicas y que puedan ser reproducibles, ya que todas las cepas que se utilicen en los ensayos deben ser estables genéticamente. El medio utilizado para su conservación debe mantener un mínimo de mutaciones debido a que el subcultivo continuado en el laboratorio puede dar origen a poblaciones con modificaciones de algunas de sus características.

Estas mutaciones pueden evitarse permitiendo también el mínimo crecimiento del microorganismo y aportando óptimas condiciones ambientales para su sobrevivencia, con el menor número de subcultivos. Aumentar el número de resiembras aumenta el riesgo de alteración fenotípica, se recomienda no realizar más de 5 pases desde la cepa original. (Atúñez, 2001)

Otro aspecto a considerar es que la estabilidad genética debe ser controlada regularmente, por ello es importante trabajar con cepas de colección y sustituirlas periódicamente. La paralización del crecimiento de los microorganismos garantiza al máximo la estabilidad genética, al evitar la aparición de generaciones sucesivas. El mejor modo de mantener la bacteria viable durante períodos prolongados de tiempo es la liofilización (Ibarz, 2011).

La selección del método de almacenamiento depende del tiempo que deben permanecer guardados los microorganismos, el equipo y los recursos disponibles del laboratorio. (Perilla, 2004). Cada laboratorio debe mantener una colección de cepas apropiada de acuerdo a sus necesidades. Estas cepas deben almacenarse en forma adecuada para preservar sus características de susceptibilidad antimicrobiana.

Los objetivos de la conservación de los cultivos se pueden resumir en los siguientes aspectos:

- a) Preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas.
- b) Preservar los niveles de su productividad inicial.
- c) Lograr que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad.

2.1.1 Métodos de conservación.

Subcultivos, mantenimiento con aceite de mineral, congelación y liofilización.

2.1.1.1 Subcultivos.

Es el método tradicional y consiste en transferir los aislamientos de un medio de almacenamiento seco a un medio fresco cada determinado período. El intervalo depende del microorganismo y del medio utilizado, una vez desarrollados los cultivos, se mantienen a 4°C durante lapsos que van entre 15 días e incluso hasta dos meses. (Metrix, 2015)

Las mayores desventajas son los riesgos de contaminación, cambios en la numeración, selección de variantes y mutantes, pérdida del aislamiento y el requerir un espacio grande para almacenamiento. (Switzerland, 2004)

El medio debe ser bajo en nutrientes, para obtener una tasa metabólica baja. El almacenamiento es preferible en refrigerador, pero si hay inconveniente, el almacenamiento puede hacerse a temperatura ambiente.

Este es el peor método para conseguir la estabilidad genética y la viabilidad por periodos largos de tiempo, puesto que al estar las células creciendo hay una alternancia de generaciones, y después de un tiempo las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus características. Otro inconveniente que tiene esta técnica es que la contaminación de los cultivos resulta más fácil al tener que manejar los tubos a lo largo del tiempo y también por la posibilidad de entrada de ácaros en los mismos. (Garcia, 2015)

2.1.1.2 Mantenimiento con aceite mineral.

Muchas bacterias pueden ser preservadas por meses cuando al medio de almacenamiento se le adiciona aceite mineral estéril.

Se esteriliza el aceite en calor seco a 180°C por dos horas, en tubos de tapa de rosca, en cantidades de 5 mL por tubo. La contaminación de los cultivos, cuando se utiliza este método, es debida a la mala esterilización del aceite, por esto se recomienda hacer un control de esterilidad al aceite, sembrándolo en agar nutritivo o en agar tripticasa soya. Este método tiene las mismas desventajas del método del subcultivo adicionándole el costo del aceite.

Se recomienda este método en climas tropicales para prevenir la desecación del cultivo e impedir la penetración de ácaros. Es un método fácil de realizar y no requiere de equipos caros. Con esto se consigue también evitar en la medida de lo posible la desecación del medio de cultivo, que podría ser tóxico para las células al aumentar su concentración. Su mayor desventaja es que el microorganismo puede continuar su crecimiento, al menos durante los primeros períodos, y así ocurrir que sobrevivan mutantes capaces de crecer bajo las condiciones adversas que implican la conservación. (Gato, 2010)

2.1.1.3 Congelación (Crio preservación).

Las células son suspendidas en un medio líquido que contenga un agente crioprotector y luego son almacenadas a temperaturas menores a 0°C, temperatura a la cual el agua se congela. De esta forma, al no disponer de agua en forma líquida, las células detienen su crecimiento y disminuyen su tasa metabólica. Las temperaturas típicas varían entre los -20°C y -70°C en refrigeradores mecánicos y en refrigeradores con nitrógeno líquido a -140°C (fase gaseosa) o -196°C (fase líquida- el nitrógeno se evapora continuamente por lo que se debe rellenar regularmente). Las temperaturas más bajas proporcionan la mayor longevidad, estabilidad genética y un espectro de supervivencia alto por grandes períodos de tiempo, sin embargo una descongelación y congelación repetidas de cepas de bacterias reducen la viabilidad celular.

El proceso de congelación se puede clasificar, con base en la temperatura en la que se lleva a cabo:

- Congelación Ordinaria:

Durante la congelación ordinaria se mantienen temperaturas de -5 a -20°C; los microorganismos permanecen viables por uno o dos años.

- Congelación Ultrafría.

El cultivo por congelar se recoge directamente por centrifugación de una suspensión de microorganismos, luego, el cultivo se suspende en un medio con glicerol, la suspensión se coloca en tubos especiales. La congelación ultrafría se efectúa en congeladores mecánicos, a temperaturas entre -50 y -80°C, donde debe controlarse la velocidad de congelación de los microorganismos para mantener su viabilidad y que la cepa no sufra daños irreparables.

- Congelación con nitrógeno líquido:

El método de conservación por congelación más recomendado es el que utiliza nitrógeno líquido, porque se logran temperaturas de -150 a -196°C. La velocidad de congelación debe ser 1 a 2°C/min hasta alcanzar una temperatura de -30°C, luego 1°C/min hasta -56°C. Después, se colocan las muestras directamente en

nitrógeno líquido para acelerar el proceso de congelación. El metabolismo celular se detiene completamente a partir de los -130°C ; por esta razón, si el microorganismo soporta el proceso de congelación, su viabilidad permanece durante muchos años.

Con este método son innecesarias las resiembras, por lo que se reducen al mínimo el riesgo de contaminación y los cambios genéticos y bioquímicos en el microorganismo. Sin embargo, el costo del equipo requerido es alto y es necesario mantener un suministro constante de nitrógeno, lo que encarece el proceso. Además, es imprescindible tomar previsiones en cuanto a fallas mecánicas y eléctricas para evitar perder toda una colección. (Hernández, 2014). El proceso de congelación por sí sólo no es recomendado para preservar las cepas, debido a que producen daño en las células. Siempre se debe utilizar un crioprotector.

Los almacenamientos criogénicos a bajas temperaturas proporcionan una reducida pérdida de la viabilidad, una alta estabilidad genética y un espectro de supervivencia alto por grandes períodos. Una desventaja que se presenta es el costo del equipo (congelador a -70°C) y la dificultad de transportarlo de un laboratorio a otro. Además se deben tener en cuenta los riesgos que implica almacenar en nitrógeno líquido en el laboratorio, debido a su rápida vaporización. El almacenamiento a -20°C es una alternativa práctica y de fácil acceso para cualquier laboratorio de microbiología. Sin embargo, tiene el inconveniente que algunos microorganismos exigentes como la *Neisseria gonorrhoeae* sólo presenta viabilidad por 2 semanas y los microorganismos de fácil crecimiento hasta por 3 meses.

2.1.1.4 Liofilización.

En este estudio se aborda el método de conservación microbiológica liofilización, puesto que la mayor parte de los microorganismos pueden almacenarse exitosamente después de la liofilización. Los cultivos liofilizados se mantienen mejor a temperatura de 4°C o menos.

2.2 Liofilización

2.2.1 Concepto

La tecnología de liofilización es un segmento muy especializado de la industria. Se utiliza bastante en farmacia, considerada como la técnica más adecuada para la preservación de microorganismos, esta implica el secado bajo condiciones particulares, que comienza con la congelación de un cultivo a baja temperatura seguida de una evaporación (secado) al vacío eliminando por sublimación casi todo el contenido de agua de la suspensión celular sin afectar las propiedades químicas, físicas y biológicas de los productos sometidos a este proceso, con el fin de lograr un mayor tiempo de conservación. (Orrego, 2008)

La liofilización como método de conservación mantiene inalteradas las características propias de las especies microbianas con un alto grado de pureza. El empleo de leche descremada al 20 %, como sustancia lioprotectora contribuye a conservar la viabilidad de esas cepas en niveles adecuados (Burguet, 2012). La ventaja es que la mayoría de los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

El producto obtenido es un polvo o una sustancia porosa, muy higroscópica, que necesita ser conservada en envases herméticamente sellados. Cuando se reconstituye la cantidad de agua evaporada, el producto reproduce muy cercanamente su aspecto y sus propiedades originales. La liofilización es apropiada para la conservación de la mayoría de las bacterias, encontrándose que las Gram-positivas sobreviven mejor que las Gram-negativas cuando se las liofiliza y mantiene en condiciones similares. También se emplea en la conservación de esporas, actinomicetos y muchos hongos incluidas levaduras. No es adecuada para células animales, algas y hongos en fase de micelio.

La técnica consiste en partir de un cultivo de fase estacionaria (donde las células son usualmente más resistentes) resuspendiendo las células con un medio crio protector, del cual se obtenga una alta densidad celular. Unas pocas gotas de

suspensión celular son transferidas a una ampolla, la cual es congelada a aproximadamente $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y deshidratada mediante una sublimación en vacío. El secado continúa hasta llegar a valores de humedad del orden del 1%; luego, la ampolla es sellada bajo vacío. Se debe evitar la formación de radicales libres que se producen por exposición de las células al oxígeno, se asocian con pérdida de viabilidad, de allí la importancia de mantener el vacío. (Romero et al, 2012)

El medio empleado en la liofilización es un factor importante en el proceso. Ejemplo leche descremada en concentraciones del 10 al 20%, suero equino, mezclas de suero, glucosa y extracto de levadura, suero fetal bovino, etc. En algunos casos el efecto protector de la leche descremada es mejorado por el agregado de solutos tales como ácido ascórbico o tiourea. La sacarosa se ha empleado para reemplazar la leche descremada.

En la reconstitución de un tubo liofilizado se logra incrementar la sobrevivencia de los microorganismos si en lugar de agua destilada se agrega caldo nutritivo o el mismo medio que se usó para el crecimiento inicial de las células, de esta forma al mantenerse elevada la presión osmótica durante la rehidratación se logra que la misma proceda en forma lenta. Normalmente la liofilización produce daños en las células, siendo estos en algunos casos reversibles, por lo cual éstas necesitan un tiempo de recuperación que es variable en función del tipo de daño producido.

Liofilización de microorganismos se hace actualmente de forma rutinaria; muchos de ellos se mantienen en medios de cultivos para almacenarse y distribuirse en forma liofilizada, permite el almacenamiento de la bacteria durante varios años. (Ibarz, 2011).

2.2.2 Descripción del proceso de Liofilización

Para una mejor comprensión de la liofilización se hace la descripción de cada una de las etapas presentes en el proceso. Se realiza a temperaturas inferiores a la de solidificación total, o sea, el producto debe estar congelado a temperaturas entre $10\text{ y }15\text{ }^{\circ}\text{C}$ por debajo de su temperatura eutéctica para evitar la formación de coágulos de agua.

2.2.2.1 Congelación inicial:

Es una operación previa y obligatoria. El tiempo de duración depende de varios factores como la cantidad, concentración y naturaleza propia del producto. En líneas generales podemos decir que una congelación adecuada es la base de que el producto liofilizado presente óptimas condiciones de aspectos, conservación de sus propiedades originales y rápida rehidratación. (Orrego, 2008)

2.2.2.2 Sublimación o desecación primaria:

En el secado primario el hielo se retira de la muestra mediante la aplicación de vacío y sublimación desde la fase sólida a la gaseosa. Mientras se disponga de un sistema que constantemente retire este vapor, el proceso de secado por sublimación continuará hasta que se agote el hielo presente. Este papel lo cumple en un liofilizador el condensador, elemento del equipo que ofrece una superficie suficientemente fría como para que el vapor de agua pase nuevamente a la fase sólida. La fuerza impulsora que mantiene la sublimación es el gradiente de presión de vapor entre la superficie congelada del producto y el condensador.

Es en esta etapa de sublimación o desecación primaria en la que la mayor parte del agua libre pasa a vapor. Los parámetros temperatura, presión y tiempo pueden ser modificados independientemente pero están íntimamente relacionados, no es posible modificar, sin que se afecten los otros, por lo que en todo momento deben ser considerados conjuntamente y analizados sus efectos.

2.2.2.3 Desorción o desecación secundaria:

La misión del secado secundario es eliminar las últimas trazas de vapor de agua, evaporando el agua no congelada ligada al producto. Se lleva a cabo a una temperatura inferior a la de desnaturalización del producto y se logra una humedad final hasta valores inferiores al 1 %. (Navarro, 1999).

2.3 Procedimiento de liofilización según protocolo de referencia. (Anexo 2)

- 1- Obtener un cultivo puro, de 18-24 h, en un medio enriquecido, no selectivo (sin antibióticos o sustancias inhibitorias), del microorganismo que se va a liofilizar.
- 2- Realizar una suspensión del microorganismo, utilizando el crecimiento de una caja del cultivo puro por 1 mL de leche descremada estéril (al 20%).
- 3- Coloque la suspensión en el vial o ampollita apropiada de acuerdo con el equipo que se utilice. (Los viales deben ir debidamente marcados de acuerdo con el sistema de identificación que el laboratorio utilice).
- 4- Congele a -70°C .
- 5- Liofilizar los aislamientos (el tiempo de liofilización depende del equipo que se utilice). (Switzerland, 2004)

Según un estudio realizado sobre la implementación del método de conservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril (Método de Castellani) en el laboratorio de Bioanálisis Clínico, POLISAL se identificaron otros factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación estos son:

1. Tipo de microorganismos. Hay algunos microorganismos que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior.
2. Concentración celular. Lo mejor es liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de $10^8 - 10^9$ células/ml en el caso de las bacterias.
3. Temperatura durante la sublimación. Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de -50°C .
4. Grado de deshidratación alcanzado. Debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que es casi despreciable y por lo tanto no es perjudicial.
5. Atmósfera de oxígeno en el tubo. Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células.

6. Condiciones de almacenamiento. La temperatura debe ser constante preferentemente a 18°C y sin bajar de los 0°C. Los liófilos se deben guardar en la oscuridad. (Zapata, 2013).

2.3.1 Procedimiento para almacenar Cepas

Este procedimiento debe realizarse en cabina de bioseguridad II según lo estipulado en los procedimientos estándar de trabajo (POE) del laboratorio.

- 1- Para obtener una buena conservación se debe partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas en un medio no selectivo.
- 2- Dispensar de 1 a 1,5 ml de la leche descremada estéril en un tubo plástico resistente a la congelación (crio viales) de 2 ml.
- 3- Hacer una suspensión densa del microorganismo.
- 4- Rotular el vial con el código correspondiente de la cepa y la fecha de recolección. Los viales deben ser marcados con una tinta que resista bajas temperaturas y almacenados en cajas especiales, debidamente marcadas.
- 5- Colocar el vial en una caja de almacenamiento con tapa resistente al frío.
- 6- Guardar la caja a la temperatura elegida (-20°C a -70°C). (Anexo 8)

2.3.2 Procedimiento para la recuperación del Liofilizado

- 1- Desinfectar el tapón del vial con una gasa impregnada en alcohol y flamear.
- 2- Rehidratar el liofilizado del cultivo con 1 mL de caldo nutritivo estéril.
- 3- Utilizando una jeringa, resuspender y con la misma jeringa retirar la suspensión del vial.
- 4- Sembrar la suspensión en un caldo nutritivo y en medios sólidos de acuerdo con el microorganismo que se va a recuperar. Este procedimiento se hace para la reconstitución general de todo liofilizado bacteriano. (Anexo 9).

2.3.4 Control de esterilidad y viabilidad de cepas

El control debe realizarse antes y después de la liofilización para poder determinar la efectividad del proceso. También debe hacerse un control periódico para determinar el tiempo de viabilidad de cada microorganismo. (Switzerland, 2004)

Para realizar el control de viabilidad y esterilidad de las cepas liofilizadas.

- 1- Emplear el 10% de los viales.
- 2- Reconstituir con 1mL de caldo nutritivo estéril.
- 3- Sembrar en el medio adecuado e incubar por 18 horas.

Se considera buen crecimiento, cuando la cepa crece en dos de los cuatro cuadrantes del medio. (Anexo 10)

2.3.5 Ventajas de la técnica de liofilización

Entre los principales beneficios de este proceso destacan:

1. Proceso idóneo para sustancias termolábiles, La temperatura a que es sometida el producto, está por debajo de aquella a la que muchas sustancias inestables sufren cambios químicos.
2. Debido a la baja temperatura que se opera, la pérdida de los constituyentes volátiles, es mínima, se reduce el peligro de contaminación microbiana y los preparados enzimáticos no sufren alteraciones.
3. Los constituyentes oxidables están protegidos. Se eliminan los fenómenos de oxidación, dado que se opera y envasa a alto vacío.
4. La gran porosidad del producto facilita con rapidez la reconstitución por la adición de agua o del solvente adecuado. Obteniéndose productos de redisolución rápida
5. Al ser despreciable la humedad remanente, el producto puede ser almacenado por tiempo ilimitado, constituyendo productos de larga estabilidad.
6. La forma y características del producto final son esencialmente las originales.

7. Compatible con la elaboración en medio aséptico.
8. Mayor facilidad para el transporte de las cepas.
9. Los beneficios de secado son de 2 a 5 veces mayores que otros métodos de deshidratación (Remington, 2003).

Todas estas particularidades pueden resumirse en: una estabilidad óptima, una solubilidad fácil, rápida y completa; una conservación ilimitada; una buena protección contra las influencias externas nocivas y una rápida disponibilidad de uso. (Navarro, 1999)

2.3.6 Desventajas de la técnica de liofilización

- Es un proceso costoso.
- Alto costo energético.
- Elevado costo de inversión de las instalaciones y equipos.
- Necesidad de personal calificado en la operación y mantenimiento de los equipos.

2.3.7 Aplicaciones de la liofilización

Este método se usa principalmente:

- La industria farmacéutica: Origen Humano: plasma, hemoderivados, leche, huesos, córneas para la obtención de extractos animales vegetales, antibióticos y vitaminas.
 - Microorganismos: Para la creación de vacunas, bacilos lácticos, cultivos tipo (almacenamiento de bacterias, hongos filamentosos, levaduras para fines de patente).
- La industria médica (sueros, antígenos y enzimas).
 - En la industria alimenticia.
 - Para la conservación de restos arqueológicos.
 - Para la recuperación de archivos y documentos.
 - Conserva las flores y plantas.

2.4 Cepas Bacterianas

2.4.1 Concepto

De una manera muy básica puede definirse como un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica. También suele referirse a las cepas como colonias puras de bacterias.

Antes de iniciar un análisis microbiológico es imprescindible contar con cepas de microorganismos que constituyen “el reactivo estándar biológico”. Estos microorganismos normalmente serán los necesarios para la comprobación de los métodos microbiológicos.

Existen sociedades científicas, las colecciones de cultivos tipo, que almacenan una gran diversidad de microorganismos y que los difunden a petición de los investigadores; en dichas colecciones, la atribución taxonómica de cada clon está perfectamente asegurada hasta el nivel de cepa.

La norma "ISO 11133-1:2000", determina que las cepas tienen que ser microorganismos definidos, por lo menos a nivel de género y especie, catalogados, caracterizados y de origen conocido.

El crecimiento y la preparación de los microorganismos determinan el estado fisiológico de las células, los cuales tienen influencia directa en el resultado de los ensayos.

2.4.2. Agrupaciones

Las cepas se pueden agrupar según sus características comunes:

- **Biovar** o biotipo, que son aquellas cepas que tienen características bioquímicas y fisiológicas especiales.
- **Morfovar** o morfotipo, con morfología específica.
- **Serovar** o serotipo, con características antigénicas específicas.
- **Patovar** o patotipo, con propiedades patógenas para ciertos hospedadores.
- **Fagovar** o fagotipo, con especificidad para lisar ciertos bacteriófagos.

2.4.3. Cepas de referencia

Es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes.

Son distribuidas y presentadas comercialmente liofilizadas; los organismos de acreditación son los encargados de considerar válida la fuente de procedencia de la cepa a fin de que se cumpla con el requisito de prevenir mutaciones, deterioro o alteración de las características típicas de las cepas. El número de pases a partir de la cepa de referencia ha de ser limitado, aceptándose hasta cuatro pases como máximo a partir de la cepa original de referencia.

Generalmente para análisis o pruebas microbiológicas, se utilizan cepas de referencia como las ATCC (Anexo 15) y si son cepas domésticas, es necesario tener un historial del organismo que incluye nombre, área de aislamiento, reacciones bioquímicas y patrón de sensibilidad a los antibióticos, forma de almacenaje, fecha de último trasplante, etc.

La mayoría de los procedimientos en microbiología clínica, dependen de que los microorganismos viables en el cultivo sean capaces de mantener sus características, por tal razón estas cepas de referencia deben cumplir requisitos específicos:

- ❖ Características morfológicas, fisiológicas y que sean típicas.
- ❖ Características estables.
- ❖ Reproducibilidad.

Para ayudar en este control, las cepas estándar de control de calidad, son un componente esencial de un proceso de validación.

La norma "ISO 11133-1:2000", establece las normas a tomar en cuenta para definir una cepa referencia las cuales son:

- A.** Que sean microorganismos definidos, al menos a nivel de género y especie.

B. Que se encuentren debidamente catalogados.

C. Con características y origen conocido.

Estas cepas de microorganismos deben tener un origen e identidad conocida así como una estabilidad bioquímica que minimice la variabilidad durante la validación, debida al reactivo biológico.

2.4.4. Colecciones de cepas

Existen varias colecciones de cepas utilizables para el control de calidad. Con obtención directa a partir de una colección nacional e internacional reconocida, con su respectivo Registro y Certificación. Algunos ejemplos son:

- **ATCC:** American Type Culture Collection- Rockville, USA.
- **NCIC:** National Collection of Industrial Bacteria- Survey, Inglaterra
- **JFCC:** Japanese Federation of Culture Collection of Microorganism- Japan
- **CCTM:** Colección Nacional – Lille, Francia
- **RIA:** USSR Reseach Institute for Antibiotics- Moscú, Russia.
- **NCIB:** Colección Nacional industrial – Aberdeen, Escocia
- **DSM:** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen – Gottinger, Alemania.
- **NCTC:** National Collection of type Cultures. Londres.
- **CNCM:** Colecion Nationale de Cultures of Microorganismes. Paris Francia
- **CCTM:** Collection National Cultures of Microorganismes. Institut Pasteur
- **NCYC:** National Collection of Yeast Cultures. Norwik UK.
- **NCIBM:** National Collections of industrial and Marine Bacteria.
- **CECT:** Colección española de cultivos tipos.

2.4.5. Mantenimiento del Cepario:

Se debe tener especial cuidado en el mantenimiento del Cepario, ya que el mismo constituye una ayuda importante en la validación de equipos, materiales, reactivos y habilidad del personal. Debe existir un programa metódico de trasplantes de cepas, archivo de cada uno de los cultivos con sus características bioquímicas, sensibilidad a los antibióticos, origen de la cepa, método de identificación, fecha de siembra y próximo trasplante, etc.

2.5 Aplicaciones de las cepas en la industria farmacéutica:

- ✓ Asegurar la calidad de los resultados de ensayos de laboratorio.
- ✓ Pruebas industriales de potencia antimicrobiana de los diferentes antibióticos fabricados.
- ✓ Pruebas microbiológicas: Límite microbiano.
- ✓ Evaluar la calidad de los medios de cultivo.
- ✓ Promoción de crecimiento bacteriano en microbiología.
- ✓ Validar métodos microbiológicos. (Pruebas de Sensibilidad. componente esencial de un proceso de validación).
- ✓ Para estudios clínicos en medicamentos.
- ✓ Investigaciones clínicas y microbiológicas en universidades.

2.6 Descripción del microorganismo en estudio.

2.6.1 Cepa *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341

Las especies del género *Kocuria* son bacterias cocáceas (con forma esférica) grampositivas pertenecientes a la familia *Micrococcaceae*. Incluye 17 especies de las cuales la mayoría son aerobias estrictas. Son cocáceas agrupadas en racimos o tétradas, de diámetro comprendido entre 0,5 y 3 micrómetros. Tienen una gruesa pared celular que puede abarcar el 50% del material celular. Su genoma es rico en guanina y citosina (GC), típicamente en porcentaje del 65 al 75% de contenido GC. A menudo contienen plásmidos (de tamaño comprendido entre 1 y 100 MDa (macroDalton) que proporcionan al organismo características útiles.

Es catalasa positiva y coagulasa negativa. (Savini, 2010) Forma colonias en medios habituales, como agar sangre de cordero y agar nutriente, como colonias no hemolíticas cremosas, la mayoría de las veces de color blanquecino a amarillento (amarillo brillante) aunque puede haber colonias anaranjadas.

Anteriormente estaban clasificados en el género *Micrococcus*. Este género fue diseccionado en los géneros *Kocuria*, *Micrococcus*, *Nesterenkonia*, *Kytococcus* y *Dermacoccus*, que luego se reorganizó en dos familias (*Micrococcaceae* y *Dermacoccaceae*), ambos pertenecientes al suborden *Micrococcineae*.

Kocuria es parte de la microbiota de la piel de los mamíferos, orofaringe y muchas especies nuevas de estos géneros, establecida en la última década, se sabe que son parte de la biocenosis microbiana del agua, aire, polvo sedimentos, suelos, lodos, y alimentos fermentados, muchas de las especies se han aislados de muestras de origen ambiental y animal (suelos, agua marina, carnes, pollos).

Los casos clínicos de infecciones comprobadas son escasos pero se han descrito en bacteriemias, sepsis asociada a catéter, endocarditis, colecistitis aguda, peritonitis y abscesos, predominantemente en pacientes inmunocomprometidos.

Todos los aislados muestran ser clonal, las cepas aisladas son susceptibles in vitro a una amplia gama de antibióticos, incluyendo todos los β -lactámicos, macrólidos, glicopéptidos y quinolonas ensayadas, con el excepción de la norfloxacin, a la que el aislado se informó como resistente.

La cepa de control de calidad ampliamente utilizado para pruebas de esterilidad y ensayos de variedades de antibióticos y residuos de fungicida, ATCC 9341, que fue designada originalmente como *Sarcina lútea* y más tarde redesignado *Micrococcus lúteos*, se reclasificó recientemente como *K. rhizophilia*.

Es conocida también como *Micrococcus lysodeikticus*, *luteus*, *flavus*, *Sarcina aurantica*, *citrea*, *flava*, *lutea*, *Marganata*, *subflava*, *variabilis*. Está dirigida a ensayos de susceptibilidad de: amoxicilina, ampicilina, clindamicina, ciclacilina, eritromicina, residuos de fungicidas, lincomicina, penicilina, rifamicina, novobiocina, oleandomicina, penicilamina, pruebas de la alimentación, farmacéutica y cuidado personal. (ATCC, 2015).

También es susceptible a: netilmicina, vancomicina, penicilina G, ampicilina, sulbactam, piperacilina, cefalexina, cefuroxima, cefotaxima, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, trimethoprim y es resistente a ciprofloxacina, norfloxacina. (Savini, 2010)

La ATCC 9341, cumple con una función de gran importancia en la farmacología de los medicamentos al igual que muchas otras bacterias, está en particular, funciona como organismo de prueba con el que se mide la potencia antimicrobiana del antibiótico eritromicina. (Jawetz, 2002).

2.7. Eritromicina

La eritromicina es un antibiótico macrólido (inhiben la síntesis bacteriana de proteínas), suele ser bacteriostática. In vitro es más activa en cocos y bacilos grampositivos aerobios. La resistencia cruzada es completa. La prevalencia de resistencia a los macrólidos en aislados estreptocócicos del grupo A se relaciona con el consumo de antibióticos macrólidos dentro de la población. Solo 5% de las cepas sensibles a las penicilinas son resistentes a los macrólidos. Se observa así mismo una actividad antibacteriana útil en *pasteurella multocida*, especies de *borrelia* y *bordetella pertusis*. Los macrólidos suelen ser activos en *campylobacter jejuni*. La eritromicina es activa en *estreptococo pneumoniae* y *legionella pneumophila*. Casi todas las cepas de *C. trachomatis* se inhiben con la eritromicina. (Goodman, 2009)

2.7.1. Aplicaciones terapéuticas

La eritromicina es el fármaco de elección en infecciones por corinebacterias (*difteria*, *sepsis*, *corinebacterial*, *eritrasma*); en infecciones por *chlamydia* neonatales, respiratorias, oculares o genitales y en el tratamiento de neumonía adquirida en la comunidad debido a su espectro de actividad que incluye a los neumococos, micoplasma y *legionella*; en infecciones por clamidias, infecciones urogenitales durante el embarazo, se recomienda como terapéutica de primera línea. (DGIM, 2014)

Antibiótico usado para tratar ciertas infecciones causadas por bacterias, como bronquitis fiebre reumática, enfermedades venéreas y las infecciones del oído, el intestino, La neumonía por chlamydia pneumoniae, tétanos, las vías urinarias y la piel. En pacientes con tos ferina y la profilaxis de familiares y contactos cercanos. (Harrison, 2008)

2.7.2 Aplicaciones profilácticas

La eritromicina es una alternativa eficaz para la profilaxis de recurrencias de fiebre reumática en personas alérgicas a la penicilina. También se usa antes de algunos tipos de cirugía o trabajo dental para prevenir infecciones. (Goodman, 2009)

2.8. Estudio de Prefactibilidad

El estudio de prefactibilidad es el primer intento para examinar el potencial global del proyecto. Para realizar este estudio, es importante tratar de mantener un nivel uniforme de exactitud en todo el análisis y al mismo tiempo darse cuenta de que el propósito de este estudio es obtener estimados que reflejen el “orden correcto de magnitud” de las variables que indicarán si el proyecto es lo suficientemente atractivo para garantizar un trabajo de diseño más detallado.

Durante toda la fase de evaluación, y en particular en la etapa de prefactibilidad, las mediciones de las variables que han estado claramente sesgadas en una dirección son más valiosas que los estimados promedios de las variables que solamente se conocen con mucha incertidumbre. Por lo tanto, en el análisis de prefactibilidad, para evitar la aceptación de proyectos basándose en estimados extremadamente optimistas de los beneficios y costos, se deben utilizar estimados que tiendan a sesgar los beneficios del proyecto de manera descendente dándole al mismo tiempo un sesgo ascendente al estimado de los costos. Si el proyecto todavía sigue siendo atractivo después de esta evaluación, entonces tiene buenas oportunidades de pasar una evaluación más exacta. (Jenkins, 2011)

El estudio de prefactibilidad de cualquier proyecto del sector público normalmente puede cubrir seis áreas diferentes. Estas se pueden resumir de la siguiente manera:

- 1) Módulo de demanda o mercadeo en donde la demanda de bienes y servicios y los precios o las necesidades relativas de los servicios sociales se estiman, cuantifican y justifican.
- 2) Módulo técnico o de Ingeniería en el que los parámetros de insumos de los proyectos se especifican detalladamente y se desarrollan los estimados de costos.
- 3) Módulo de recursos humanos y apoyo administrativo en el que se especifican las necesidades de recursos humanos para la implementación y operación del proyecto y las fuentes de recursos humanos se identifican y cuantifican.
- 4) Módulo financiero y/o presupuesto en el que se evalúan los gastos e ingresos financieros junto con una evaluación de métodos alternativos de financiamiento.
- 5) Módulo económico en el que se hacen los ajustes económicos a los datos financieros y se evalúan los costos y beneficios del proyecto desde el punto de la economía.
- 6) Módulo social en el que se evalúa el proyecto desde el punto de vista de quien recibe los beneficios y quien paga los costos de un proyecto. Cuando sea posible, se debe hacer una cuantificación para determinar cuánto se beneficia o paga cada uno de estos grupos.

2.8.1. Módulo de mercado

Estudio de mercado

La liofilización de cepas bacterianas requiere de un estudio o investigación, es decir se debe obtener una recopilación sistemática de los datos históricos y actuales de oferta y demanda de este producto para el mercado de Nicaragua.

El estudio de mercado es una herramienta de mercadeo que permite y facilita la obtención de datos, resultados de que una u otra forma sean analizados, procesados mediante herramientas estadísticas y así obtener como resultados la aceptación o no y sus implicaciones con un producto dentro del mercado.

En el caso de los monopolios públicos, las políticas gubernamentales mismas pueden ser una variable importante para determinar la demanda del producto.

2.8.1.1 Los Objetivos del estudio de mercado

El estudio de mercado es un instrumento que permite conocer con más precisión la cantidad de consumidores que adquirirán el producto, además el estudio de mercado va a indicar las características y especificaciones del producto. En definitiva muestra quienes son los beneficiados con la liofilización de esta cepa, lo que servirá para dar la orientación correcta a la implementación de esta técnica. Finalmente este estudio ayudará a saber el precio correcto del producto.

El resultado de este módulo, debe ser un conjunto de pronósticos de las siguientes variables del proyecto:

- Precios esperados de bienes
- Subsidios a ser recibidos
- Tendencias del producto en términos de adelantos tecnológicos y el ciclo esperado del producto.
- Se deben identificar todas las restricciones comerciales que no son ocasionadas por las regulaciones gubernamentales y se debe cuantificar su impacto.

2.8.2. Módulo técnico

El estudio técnico tiene por objeto proveer información para cuantificar el monto de las inversiones y de los costos de operación pertinentes a esta área.

Una de las conclusiones de este estudio es que se deberá definir la función de producción que optimice el empleo de los recursos disponibles en la producción del bien o servicio del proyecto. De aquí podrá obtenerse la información de las necesidades de capital, mano de obra y recursos materiales, tanto para la puesta en marcha como para la posterior operación del proyecto.

El resultado del módulo técnico de un estudio de prefactibilidad debe obtener la siguiente información:

- 1) Las cantidades de insumos por tipo que se requerirán para la construcción del proyecto.
- 2) Los precios de estos insumos y sus probables fuentes de suministro.
- 3) Los requisitos de mano de obra por oficio y por el tiempo de construcción del edificio del proyecto.
- 4) Los requisitos de insumos físicos para la operación del proyecto por año y volumen de ventas.
- 5) Las probables fuentes de suministro de estos insumos y los supuestos de precios utilizados para estimar los costos futuros de operación.
- 6) Información sobre la vida tecnológica del proyecto.
- 7) Los requisitos de mano de obra por oficio para la operación del proyecto.
- 8) La naturaleza de los productos del proyecto que tendrán un impacto sobre el medio ambiente que rodea las instalaciones y una evaluación cuantitativa de estos impactos.

2.8.3. Módulo de recursos humanos

Para que la evaluación de un proyecto sea eficaz no debe limitarse a examinar los costos financieros y económicos bajo el supuesto que el proyecto se debe construir y entregar operacionalmente y a tiempo. Esto supone contar con un grado de apoyo administrativo para la implementación de proyectos que en muchos países no existe.

Este módulo debe adaptar los requisitos técnicos y administrativos del proyecto a las restricciones de la oferta de recursos humanos disponibles. Si no se pueden adaptar, entonces no se debe realizar el proyecto.

Para cada proyecto es posible definir la estructura organizativa que más se adapte a los requerimientos de su posterior operación. Conocer esta estructura es fundamental para definir las necesidades de personal calificado para la gestión y, por tanto, estimar con mayor precisión los costos indirectos de la mano de obra ejecutiva.

2.8.4. Módulo financiero

El módulo financiero brinda la primera integración de las variables financieras y técnicas que han sido estimadas por los módulos anteriores.

Los objetivos de esta etapa son ordenar y sistematizar la información de carácter monetario que proporcionaron las etapas anteriores, elaborar los cuadros analíticos y datos adicionales para la evaluación del proyecto y evaluar los antecedentes para determinar su rentabilidad. El cual permita indicar las variables claves que serán utilizadas como aportes a la evaluación económica y social.

La evaluación del proyecto se realiza sobre la estimación del flujo de caja de los costos y beneficios. La existencia de algunas diferencias en ciertas posiciones conceptuales en cuanto a que la rentabilidad del proyecto puede ser distinta de la rentabilidad para el inversionista, por la incidencia del financiamiento, hace que más adelante se dedique un análisis especial al tema.

El resultado de la evaluación se mide por medio de distintos criterios que, más que optativos, son complementarios entre sí.

1.8.5. Módulo económico

El objetivo de la evaluación económica es examinar el proyecto desde el punto de vista de toda la economía para determinar si su implementación mejora el bienestar económico del país. En un sentido muy real, una evaluación económica tiene exactamente la misma naturaleza que un análisis financiero.

El estudio económico financiero constituye la sistematización contable, financiera y económica que permite verificar los resultados que genera el proyecto, al igual que la liquidez que genera para cumplir con obligaciones operacionales y no operacionales.

La finalidad es saber si los recursos económicos que se van a comprometer en esta actividad se haga con la seguridad de recibir al final de un período un excedente o beneficio adicional sobre el monto de recursos inicialmente invertidos. Antes de saber si un proyecto probablemente mejore el bienestar económico de un país, debemos conocer el costo de oportunidad de los recursos que utiliza. El proyecto podría también conducir a beneficios sociales netos que se pueden cuantificar (pero no necesariamente medir en términos monetarios) y los que toman las decisiones pueden considerar que vale la pena el sacrificio económico de este proyecto.

1.8.6. Módulo social

La evaluación social consiste en identificar y siempre que sea posible cuantificar los impactos económicos adicionales del proyecto. Compara los beneficios y costos que una determinada inversión pueda tener para la comunidad de un país en su conjunto. Estos incluyen el impacto de este proyecto sobre el bienestar de grupos particulares de la sociedad, ya que rara vez un proyecto beneficia a todos los habitantes de un país proporcionalmente. (Sapag, 2008)

Cuando se evalúa socialmente un proyecto, lo que se busca es medir los costos que ocasiona y los beneficios que recibe la sociedad como un todo por la realización de un proyecto. Mientras las externalidades positivas corresponden a los beneficios generados por un proyecto y percibidos por agentes económicos distintos a los que pagan por los bienes y servicios que el proyecto ofrece, las externalidades negativas son los costos que asumen miembros de la sociedad distintos a los que se benefician de dichos bienes y servicios.

El impacto ambiental de muchas decisiones de inversión es un claro ejemplo de las externalidades que puede producir un proyecto, al afectar el bienestar de la población.

2.8.7 Modelos de comportamiento: costos fijos y variables

Algunos costos varían directamente con los cambios del volumen de producción; estos se denominan costos variables. Como ejemplos tenemos los gastos en materiales directos y en mano de obra directa. Otros costos permanecen constantes en su valor total para un cierto periodo de tiempo, independientemente del nivel de producción, estos son los costos fijos. (L.Rayburn, 2011)

2.8.8 Análisis de costo beneficio (ACB)

La toma de decisión para implementar una tecnología sanitaria a escala social, está acompañada de una evaluación económica que permita contribuir a interpretar los resultados con mayor fiabilidad, luego de haber analizado y comparado alternativas tecnológicas sanitarias que consumen recursos para obtener beneficios, expresados estos en términos clínicos, bioquímicos, epidemiológicos, financieros u otros.

Uno de los elementos a tener en cuenta, para que el resultado de la evaluación económica sea considerado por los encargados de tomar decisiones, es que estén avaladas por un indicador (valor numérico) que, de algún modo, resuma el resultado final del análisis y pueda ser empleado como una regla de decisión en la distribución de recursos. (Castillo, 2011)

El análisis de costo beneficio se emplea para comparar programas con diferentes resultados, haciendo que el denominador común a comparar sea el dinero, al dar un valor monetario a los beneficios obtenidos.

Por ejemplo, al evaluar la posibilidad de un programa de fluoración del agua potable para prevenir la caries, los costos pueden ser los de fluoración y, el beneficio, mejorar la salud de la población, que en dinero representa lo que se ahorrará al no tener que atender a los que no desarrollarán caries (beneficio monetario). Si el ahorro es US\$ 1,500 000 y los costos US\$ 500 000, entonces el cociente beneficio/costo será ahorros/costos: $US\$ 1500\ 000 / US\$ 500\ 000 = 3$. Por lo tanto, los beneficios monetarios son mayores que los costos monetarios, así el programa será rentable.

La dificultad está en la valoración monetaria de los cambios en el estado de salud. En este caso, los resultados clínicos se traducen en unidades monetarias y requieren que se adjudique un valor monetario a las consecuencias. El ACB se puede expresar como el cociente (beneficio US\$)/costo (US\$). (Loza, 2011)

La ventaja del ACB es que aporta información sobre el beneficio absoluto de los programas y proporciona un valor estimado de los recursos utilizados por cada programa, comparado con los recursos que podría ahorrarse o crear. Entre las desventajas del ACB es que se requiere que la vida humana y la calidad de vida tengan que ser evaluados en unidades monetarias. Esta tarea no es ética, es difícil de asignar valores monetarios y los métodos de hacerlo son complejos.

III. CAPITULO

3. HIPÓTESIS

La implementación de la técnica de conservación microbiológica “liofilización”, aplicada en el CNDR, permite obtener la cepa *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341 utilizada en el análisis de la potencia de antibiótico eritromicina de forma oportuna y a menor costo.

IV. CAPITULO

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Descripción del ámbito de estudio

El estudio se realiza en el Complejo Nacional de Salud Concepción Palacios, en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, ubicado en el Costado Oeste de la Colonia 1 de Mayo, Distrito 7, y en el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos, ubicado en la Calle 15 de Septiembre, de la Texaco Xolotlán 2 1/2 cuadra al Oeste, Managua Nicaragua.

4.2 Tipo de estudio:

Es un estudio descriptivo y de corte transversal (Hernandez Sampieri, 1997), con el objetivo de evaluar si es o no viable la implementación de la técnica de liofilización bacteriana en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia.

4.3 Universo de Estudio

Se toma como población de estudio, la cepa certificada *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341.

4.4 Criterios de inclusión

- Todos los insumos relacionados con la aplicación de la técnica de liofilización de la cepa *kocuria rhizophilia* ATCC 9341.

4.5 Criterios de exclusión

- Todos los insumos que no están relacionados con la técnica de liofilización de la cepa *kocuria rhizophilia* ATCC 9341.
- Cepas que no correspondan a la cepa *kocuria rhizophilia* ATCC 9341.

4.5 Variables de estudio

4.4.1 Variables independientes

- Cepas bacterianas.
- Antibiótico eritromicina.
- Técnicas de conservación de microorganismos.

4.4.2 Variables dependientes

- Costo
- Liofilización.
- Ventajas.
- Desventajas.
- Beneficio.

4.5 Instrumentos para recolectar la información. (Anexo No 4)

- Matrices de síntesis de recolección de datos.
- Matriz de ventajas y desventajas de los métodos de conservación de cepas bacterianas utilizados en el CNDR y el LNCCM.
- Matriz de selección de técnica de conservación.

4.6 Procesamiento de la información:

Herramienta estadística:

- ✓ Microsoft Excel 2013

4.7 Operacionalización de Variables

Variable	Indicador	Valor	Criterio
Costo de los insumos para la implementación de la técnica de liofilización de la cepa <i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341.	Reactivos	Si	Insumo fijo
		No	Insumo variable
	Soluciones	Día Gramos Litros Mililitros Unidad	Unidad de medida.
	Materiales para procesar la cepa	Unidad Caja paquete Frasco Bolsa Rollo Barril	Presentación
	Equipos / depreciación		
	Mobiliario / depreciación	Dólares	Costo por Presentación Costo unitario Costo de inversión. Costo total Costo por liófilo
	Recursos humanos		
	Material de oficina	Días Unidad Gramos Litros Mililitros	Requerimiento Por 100 liófilos
	Servicios básicos CNRD		Requerimiento Por liófilo

Ventajas y desventajas de la técnica de liofilización en comparación con técnicas de conservación microbiológica utilizadas en el CNDR y el LNCCM.	Viabilidad	5 4 3 2 1	Excelente Muy buena Buena Aceptable Deficiente
	Durabilidad		
	Estabilidad genética		
	Riesgo de Contaminación		
	Espacio de almacenamiento		
	Transporte		
	Costo		
Costo / beneficio de la técnica de liofilización.	Costo del liófilo producido en el CNDR	Si__	Mayor Menor Igual
	Costo del liófilo importado	No__	
	Tiempo de obtención del liófilo producido en el CNDR	Días Semanas	Corto
	Tiempo de obtención del liófilo importado	Meses Años	Largo
	Probable fuente de financiamiento	Nacional Extranjera	Organizaciones interesadas en el estudio

V. CAPITULO

ORGANIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

La preservación de cepas microbianas no es tarea fácil y debe garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos, características que coinciden con los objetivos de un buen método de conservación.

Diversas cepas son empleadas como cepas controles, cepas de ensayo, cepas de producción industrial y en su mayoría como materiales de referencia en el aseguramiento del control de calidad microbiológico de los productos farmacéuticos, dichas cepas son utilizadas continuamente en los laboratorios, por lo que se hace necesario conservar las propiedades que le confieren fiabilidad a la hora de ejecutar los análisis en las que son utilizadas.

La liofilización es uno de los métodos más utilizados para conservar la calidad microbiológica de las cepas. Esta técnica se lleva a cabo en tres etapas: primeramente con la congelación inicial de la cepa, seguido de la aplicación de vacío y sublimación del hielo y continuando la tercera etapa de desorción o desecación secundaria, que se inicia antes de terminar la sublimación y continua hasta que la humedad del material biológico es despreciable.

Para una mejor comprensión de la liofilización se hace la descripción de cada una de estas etapas presentes en el proceso, así como las variables y parámetros de gran incidencia en el proceso de producción de cepas (pág.13).

Como resultado de esta investigación, entre otras surge la posibilidad de brindarle a la industria farmacéutica una opción de obtener cepas con alta estabilidad genética y teniendo una duración de vida útil ilimitada que es uno de los factores a tener en cuenta al emplear este método de conservación.

Para su puesta en marcha se necesitan una serie de recursos, equipos y materiales cuyo costo de producción está determinada por estos mismos insumos (Anexo 5). La producción industrial a gran escala tiene la ventaja de aminorar estos costos de producción, y brindar de la misma manera la oportunidad de contar con un gran número de cepas liofilizadas de calidad que puedan ser distribuidas posteriormente.

El presente estudio se realiza en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, Dra. Concepción Palacios (CNDR), en el cual se toman en consideración aspectos de vital importancia tales como: requerimientos de infraestructura industrial y áreas de bioseguridad con los niveles necesarios para cada etapa del proceso, al realizar un análisis de las principales variables, se puede observar que el CNDR constituye una buena opción para la instalación del proyecto ya que cumple las exigencias que demanda implementar esta tecnología y algunos de los factores de mayor peso con los que cuenta son: la disposición de áreas de bioseguridad requeridas, equipos, infraestructura y mercado objetivo como es la industria farmacéutica, no obstante las cepas también se utilizan en otras industrias.

Puesto que los costos tanto de inversión, costo total de la técnica de liofilización de la cepa y el costo unitario por cada liófilo producido, se realizan en base a los precios de compra del CNDR, los cuales están sujetos a la ley de contrataciones del sector público (Anexo 17), en este caso el Ministerio de Salud (MINSa).

Los costos de producción involucran tanto la materia prima, insumos, consumo de servicios públicos, así como la mano de obra necesaria para producir los liófilos entre otros. En estos costos es donde se presenta la descripción de cada uno de los insumos (Anexo No 5).

En tabla 1.1 se muestran los costos de los reactivos necesarios para la producción de 100 liófilos de la cepa kocuria rizophilia ATCC 9341. Reactivos a los cuales se calculó la cantidad de gramos (Anexo 5), tanto para el costo total como para el costo unitario por liófilo de la cepa en estudio.

El costo de los reactivos es de 40.4 dólares para realizar la liofilización de 100 cepas, equivalentes a 0.4 dólares por cada liófilo, que corresponde al 3 % del costo total de la técnica, el gasto principal de los reactivos está dado por el costo de la cepa, sin embargo la Organización Panamericana de la Salud (OPS) proporciona las cepas, ventaja de vital importancia, ya que esta organización cuenta con los requerimientos legales necesarios para trasladar materiales biológicos, e incluso, también se obtienen a través del Instituto de Investigaciones del CNDR.

Tabla 1.1: Reactivos para la implementación de la técnica de liofilización de la cepa *kocuria rizophilia*.

NOMBRE DE INSUMO	COSTO TOTAL US\$	COSTO POR LIÓFILO US\$
REACTIVOS		
Cepa kocuria Rhizophilia ATCC 9341. Microbiologics. Fisher Scientific	36.31	0.363
Caldo Nutriente	0.11	0.001
Agar Tripticasa Soya	2.46	0.025
Agar Sangre de carnero	1.31	0.013
Leche descremada 20 %	0.11	0.001
Yodo resublimado	0.03	0.0003
Potasio yoduro neutro al 99.5% para análisis (yoduro de potasio)	0.07	0.0007
Amonio oxalato 1H2O	0.01	0.0001
Safranina O (C.I.50240) para microscopia	0.04	0.0004
SUBTOTAL US\$	40.4	0.40

Fuente: existencia de insumos del CNDR.

Otro insumo costeados son las soluciones, las cuales se calculó la cantidad necesaria en mL, para su posterior uso en la implementación de la técnica de liofilización, de la cepa ATCC 9341, siendo su costo de 19.66 dólares del costo total de la técnica, para 100 liófilos producidos, lo que implica que el costo unitario por liófilo es 0.20 dólares, que representa el 2 % del costo total.

Como se puede apreciar (tabla 1.2) el gasto principal en cuanto a las soluciones está dado por la sangre de carnero con un costo de 18 dólares que representa el 91.5 % del costo total de las soluciones.

Tabla No 1.2: Soluciones para la implementación de la técnica de liofilización de la cepa *kocuria rizophilia*.

NOMBRE DEL INSUMO	COSTO TOTAL US\$	COSTO POR LIÓFILO US\$
SOLUCIONES		
Agua destilada	0.82	0.008
Alcohol Birrectificado (Alcohol etílico 95 %)	0.84	0.008
Sangre de carnero	18.00	0.180
SUBTOTAL US\$	19.66	0.20

Fuente: existencia de insumos del CNDR.

Los materiales para el procesamiento de la cepa, descritos en esta tabla son identificados y calculado; las cantidades necesarias, en las unidades de medida correspondientes para cada insumo (Anexo 5).

Tabla No 1.3: Materiales para procesamiento de la cepa para la implementación de la técnica de liofilización de la cepa *kocuria rizophilia*.

NOMBRE DEL INSUMO	COSTO TOTAL US\$	COSTO POR LIÓFILO US\$
MATERIALES PARA PROCESAMIENTO DE LA CEPA		
Plato petri descartable 100 x 15 mm de Polystyrene estéril	4.78	0.05
Jeringa descartable 05 ml. C/aguja 21g * x 1 ½	0.81	0.01
Tubos de ensayo c/ tapón de rosca de 16*150 mm	4.51	0.05
Viales criogénicos de 2 ml	0.50	0.005
Punta para Micropipeta 1 a 200 ul con filtro	0.15	0.00
Papel aluminio de 25 pies	2.38	0.02

Hojas de Bisturí 23	0.72	0.01
Asa bacteriológica redonda calibrada de 0.001(10 ul) de platino con mango (aguja de calibración calibre 24 longitud 17.6 cms con mango de aluminio 20.3 cms	2.27	0.02
marcador punta Fina color negro	1.45	0.01
Probeta plástica de 25 ml	8.28	0.08
Papel secante para laboratorio 20 cms*304 mts (8"*1000 pies) Kimberly-Clark	0.84	0.01
perlas de vidrio de 4 mm Fisher Scientific	1.73	0.02
Caja para almacenamiento de crioviales, 81 espacios Fisher Brand	17.50	0.18
Papel Krafft de 98 Gramos 36 pulgada de 45 lbs 98gr/m ²	1.17	0.01
Mascarilla descartable contra polvo y partículas volátiles	0.79	0.01
Barra magnética de 12 pulgada Fisher Brand	3.33	0.03
Frascos de congelación rápida (Fast-freeze*flasks 600 mL)	228.44	2.28
Adaptador de matraz (liofilizador), curvo de 45 grados, 0.75 pulg de diámetro. Vidrio Labconco	19.15	0.19
Botella de vidrio sin tapa, 5mL,22x40 mm,13x20mm IDXOD en la boca Weaton Science Products	0.25	0.00
Guante descartables de nitrilo, Medium (Powder-Free Nitrile Disposable Exam Gloves)	2.04	0.02
Espátula de acero inoxidable de 4 cms de 20.3 cms o 8 pulgada extremos planos	2.39	0.02
Cinta indicadora para esterilizar 3M	22.10	0.22
Erlenmeyer de vidrio 2000 ml	20.00	0.20
Fósforos águila	0.04	0.0004
Mechas para mecheros de alcohol	0.02	0.0002
Anteojos protectores	2.94	0.0294
Mechero de alcohol	4.80	0.0480
SUBTOTAL US\$	353.36	3.53

Fuente: existencia de insumos del CNDR.

Este insumo es uno de los de mayor costo requerido en la producción de los liófilos, cabe destacar que solo se calculó las cantidades para 100 liófilos, puesto que al aumentar la producción, varía la cantidad de estos insumos. Entre estos materiales de reposición periódica, se incluyen los utilizados para los estudios de estabilidad acelerada, análisis de control de calidad, necesarios en cada etapa del proceso de producción.

Los materiales de reposición periódica tienen un costo total de 353 dólares del costo total de la técnica, que represente el 27 %, 3.53 dólares por cada liófilo producido. Todos estos insumos fueron tomados en cuenta para un mejor análisis de los costos incurridos en la puesta en marcha de la técnica de liofilización en el complejo nacional de salud Dra. Concepción Palacios.

Tabla No 1.4: Equipos/ depreciación para la implementación de la técnica de liofilización de la cepa kocuria rizophilia.

NOMBRE DEL INSUMO	COSTO TOTAL US\$	COSTO POR LIÓFILO US\$
EQUIPOS/ DEPRECIACIÓN		
Liofilizador Labconco-free zone Triad freeze-ury systems	9.72	0.10
Cabina de Bioseguridad Tipo II (120 V 8 A)cód TB001284	118.45	1.18
congelador -80 Fisher scientific Isotemp (120 V 16 A)	56.26	0.56
Incubadora para laboratorio (120 V 659 W) código TB001495 Serie 41656186 Isotemp	23.17	0.23
Microscopio Binocular con 4 objetivo individual 8 piezas Serie 3M40272 240 v 60hz	11.35	0.11
Micropipeta automática de 10 a 100 ul	0.77	0.01
Termómetro Fisher scientific para incubadora de 18 °C-50 °C certificado con graduación de 0.5 °C 135 mm largo.	1.48	0.01
Termómetros certificado para refrigeradora de -40 °C a 50 °C con respaldo de aluminio	0.99	0.01
Termómetro de -20 a 150 °C	0.45	0.00

Autoclave o esterilización eléctrico y de vapor. Deutsche modelo: ORS-200	11.04	0.11
Hotplates con agitador 11-300-49SHP (120V 60 hz)	6.58	0.07
Balanza Analítica (Ohaus)	13.13	0.13
Baño María 42°C	4.42	0.04
Refrigerador para reactivos. Fogel evaporador 115V 60hz	9.02	0.09
Bandeja de Tinción 12 1/4*7 3/4*2 1/4 Fisher Brand	1.57	0.02
Estabilizador de energía	7.50	0.08
Vortex mixer de 120 V Serie 140522033 Fisher scientific	1.91	0.02
Dispensador de medios. Thermo scientific (Botella con diámetro de 38 mm de 1 a 50ml)	3.00	0.03
Mesa de Trabajo individual	3.60	0.04
Reloj (eléctrico o de intervalos) y/o cronómetro	0.08	0.00
Computadora	7.50	0.08
Impresora laserjet Marca HP modelo P1102w 19 ppm 8MB 1200 DPI 110 V serie VND3Y10670	0.90	0.01
Aire acondicionado	12.19	0.12
SUBTOTAL US\$	305.06	3.05

Fuente: Existencia de insumos del CNDR.

Un factor analizado de gran importancia es la disponibilidad de los equipos para cubrir la producción de las cepas liofilizadas, el cual es decisivo a la hora de la puesta en marcha de la técnica, ventaja con la que se cuenta en el CNDR, ya que se dispone de los equipos necesarios para realizar la técnica. (Anexo 19), lo que implica que los gastos en este rubro equivalen solamente a su depreciación, puesto que en este estudio solo se contempla el costo de la técnica como tal y no de la compra de equipos.

La depreciación de los equipos se hizo según su tiempo de vida útil el cual varía para cada equipo, de esta forma por ejemplo si se incurriera en comprar equipos como una cabina de bioseguridad que cuesta 14,214 dólares o el liofilizador, etc. los costos de producción serían mucho más altos.

El costo total de la depreciación de los equipos es de 305 dólares, esto es durante el tiempo requerido para realizar la técnica, que en promedio es de 15 días, lo que representa el 24 % del costo total de la técnica. Es importante resaltar que los costos de inversión y depreciación de los equipos como el de refrigeración y congelación no cambian significativamente al aumentar su capacidad en el proceso de producción de los liófilos.

Tabla No1.5: Mobiliario/ depreciación para la implementación de la técnica de liofilización de la cepa *Kocuria rhizophila* ATCC 9341.

NOMBRE DEL INSUMO	COSTO TOTAL US\$	COSTO POR LIÓFILO US\$
MOBILIARIO/ DEPRECIACIÓN		
Escritorio	0.78	0.01
Silla secretarial	0.38	0.00
Silla de laboratorio	0.38	0.00
SUBTOTAL US\$	1.54	0.02

Fuente: Existencia de insumos del CNDR.

El costo de mobiliario viene dado por su depreciación, insumos que no están estrictamente relacionados con la técnica de liofilización, pero que indudablemente tienen que contemplarse en la producción de los liófilos, siendo el costo de 1.54 dólares que representa apenas el 0.62 % de la técnica, lo cual implica que su costo no es muy significativo.

Como se ha señalado anteriormente con respecto a los equipos, el costo del mobiliario no implica la compra de estos mismos, sino que solamente estamos hablando del costo que representa la depreciación de estos durante el proceso necesario para la realización de la técnica, que aunque es mínimo contribuye en reducir el costo total de la técnica; siendo una de las ventajas (la disposición de equipos y mobiliario) que posee el CNDR.

Tabla No1.6: Recursos humanos para la implementación de la técnica de liofilización de la cepa *kocuria rizophilia* ATCC 9341.

NOMBRE DEL INSUMO	COSTO TOTAL US\$	COSTO POR LIÓFILO US\$
RECURSOS HUMANOS		
Especialista en salud (Lic. Químico - Farmacéutico)	107	1.1
Técnico de laboratorio en salud (Lic. Bioanálisis o Lic. Químico - Farmacéutico)	97	1.0
SUBTOTAL US\$	204	2.04

Fuente: Nomina (CNDR-MINSA-central, 2015)

La implementación de la técnica en el CNDR, en el área de recursos humanos en sus inicios de producción genera dos empleos a personal calificado, dentro de los que se requieren dos profesionales en salud, estos son; un especialista en salud Químico Farmacéutico y un técnico de laboratorio en salud (Lic. Bioanálisis o Lic. Químico - Farmacéutico) dichos cargos ya estipulados en la nómina salarial de pago del CNDR, cabe destacar que se contempla la contratación del personal, a pesar de que en el CNDR ya se cuenta con personal calificado, debido a que en este estudio no se pretende recargar el trabajo al personal ya contratado. La ampliación del personal está sujeta de las exigencias de producción una vez establecido el cepario en esta institución.

La logística de producción manejada en cuanto a número de días de operación de la técnica en el CNDR, se acondiciona de acuerdo con el nivel de producción establecido, así como el número de recursos humanos requeridos. Puesto que uno de los factores a considerarse en el área de recursos humanos es el tiempo a emplearse por el personal en la preservación inicial, manipulación y control periódico de las cepas, para tal caso en este estudio están costeados 15 días laborales, en los que se toman en cuenta tanto el proceso de producción, así también los análisis preliminares que se le deben realizar a cada lote de producción (Anexo No 10, 11,12 y 13).

El salario estipulado en el CNDR para un nuevo recurso, no incluye algunos beneficios como: la antigüedad, el bono productivo, horas extras que puedan ser necesarias en algún momento dado, entre otros, por lo que el salario neto puede ser cambiante, costos que no afectan significativamente el costo por líófilo. En consecuencia el salario del especialista en salud es de 5,679 córdobas (213.52 UU\$) y el salario del técnico de laboratorio en salud es de 5,165 córdobas (194.2 UU\$), ya que se requiere de quince días de trabajo por lo tanto la inversión en recursos humanos es de 204 dólares por técnica que equivale a 2.04 dólares por cepa liofilizada esto representa el 16 % del costo de la técnica.

Tabla No 1.7: Servicios básicos requeridos para la implementación de la técnica de liofilización de la cepa *kocuria rizophilia* ATCC 9341.

NOMBRE DEL INSUMO	COSTO TOTAL US\$	COSTO POR LIÓFILO US\$
SERVICIOS BÁSICOS		
Agua potable	4.4	0.04
Consumo energético	353	3.53
SUBTOTAL US\$	357.4	3.57

Fuente: Existencia de insumos del CNDR.

En esta tabla se puede observar los gastos administrativos incurridos de los servicios básicos para la puesta en marcha de la técnica de liofilización, en los cuales está cotejado el agua potable y la corriente eléctrica. Debido a la importancia de consumo de energía por parte de los equipos y su complejo funcionamiento para la implementación de la técnica de liofilización se realiza una evaluación en base a los balances de producción y energía respectivos para cada equipo (anexo 6)

El costo energético está dado por el consumo eléctrico de cada equipo necesario para realizar la producción de los liófilos en un periodo de 15 días, este rubro equivale a 353 dólares del costo total de la técnica, lo que representan 3.52 dólares por cada liófilo producido, lo que constituye el 27 % del gasto total de la técnica, siendo así uno de los rubros más costosos.

El consumo de agua potable es mucho menor, debido a que no se invierte grandes cantidades de este rubro, siendo así el costo de 4.37 dólares para la implementación de la técnica, y de 0.04 dólares por liófilo producido respectivamente. Cabe mencionar que los datos de estos insumos son analizados mediante los recibos de pago de servicios básicos proporcionados por el área administrativa del CNDR. Datos que fueron de gran utilidad a la hora de calcular el consumo promedio mensual de estos rubros.

Tabla No 1.8: Material de oficina para la implementación de la técnica de liofilización de la cepa *kocuria rizophilia* ATCC 9341

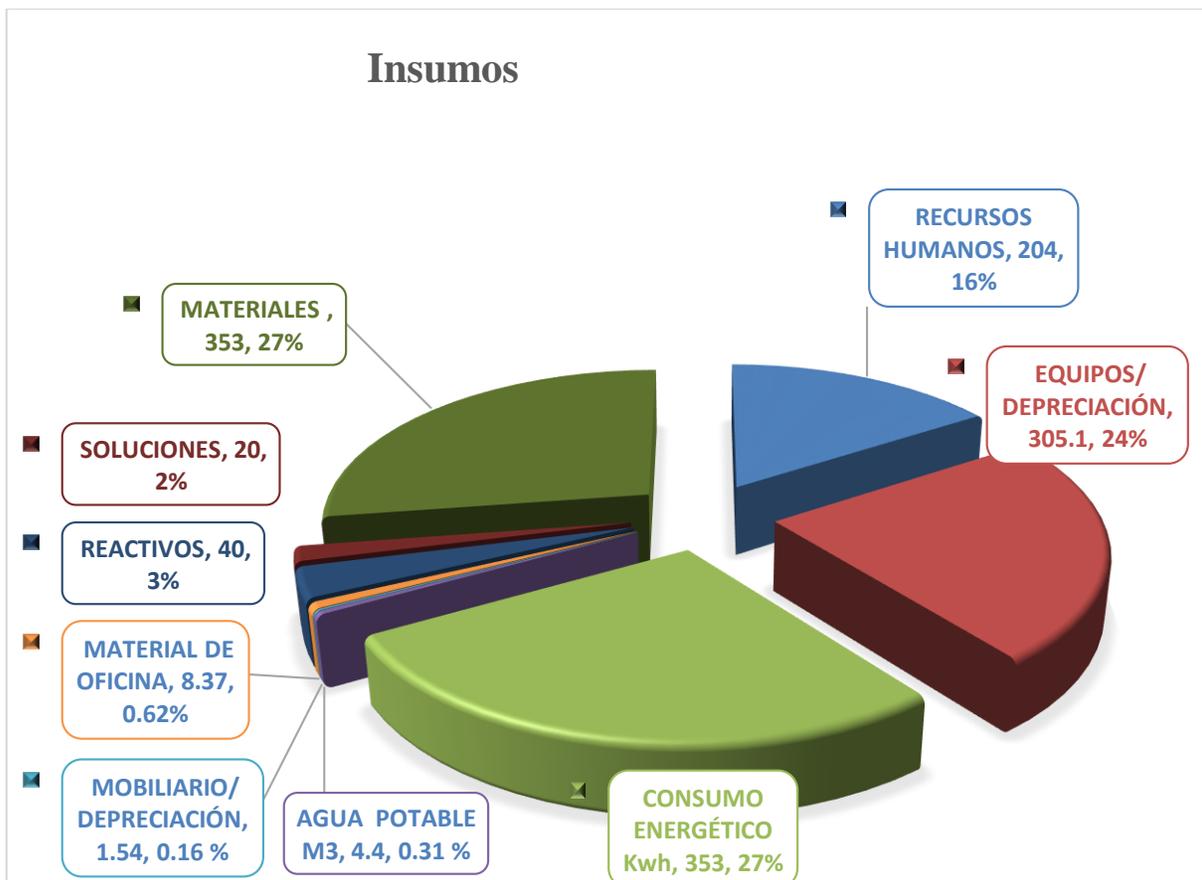
NOMBRE DEL INSUMO	COSTO TOTAL US\$	COSTO POR LIÓFILO US\$
MATERIAL DE OFICINA		
Cartucho de Impresora HP	3.18	0.03
Formato para resultado de análisis	0.01	0.00
Lapicero	0.18	0.002
Calculadora	0.69	0.01
Engrapadora	0.69	0.01
Grapas estándar punta de cincel 26/6	0.05	0.00
Saca grapa	0.07	0.00
Perforadora	0.14	0.00
Regla plástica 30 cm	3.36	0.03
SUBTOTAL US\$	8.37	0.08

Fuente: existencia de insumos (CNDR-MINSA-central, 2015)

La presente tabla muestra los costos de materiales de oficina, los cuales se utilizan a la hora de representar los resultados de cada análisis y aunque no están directamente relacionados con la técnica, se costean promediando su vida útil para una mejor estimación del costo total que se incurre para la producción de cada liófilo. No se incluye el costo total de cada uno de estos insumos, debido a que se pueden utilizar en posteriores procesos de producción de nuevos lotes.

El gasto total del material de oficina es de 8.37 dólares que es el 0.62 % siendo un rubro que genera poco gasto, pero es de gran necesidad al momento de procesar analizar y administrar la información.

Gráfico No. 1: % de costo de los Insumos requeridos para la liofilización de la cepa *kocuria rizophilia* ATCC 9341.



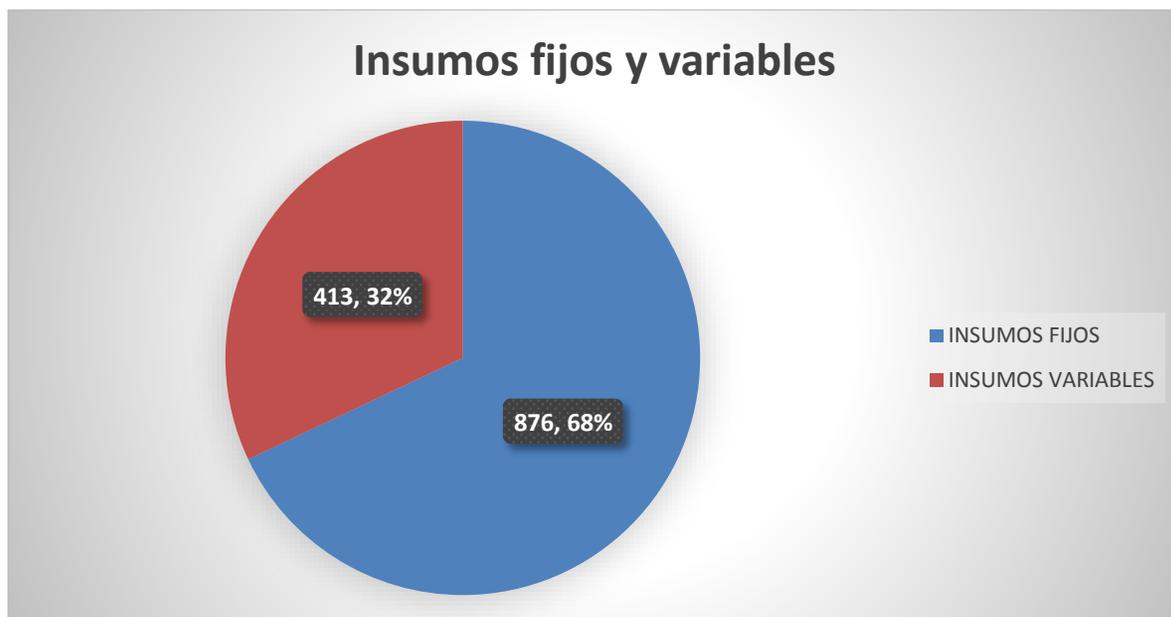
En el presente gráfico, se muestra un resumen de los costos involucrados en la adquisición de insumos, depreciación de equipos, recursos humanos, servicios

básicos, entre otros, para la puesta en marcha de la técnica de liofilización, a partir de la producción de 100 liófilos de la cepa kocuria rhizophilia ATCC 9341.

El mayor costo que se incurre es el consumo energético, como lo dicta la teoría al igual que los materiales para procesar la cepa, con un 27 %, seguido de la depreciación de los equipos, que representa un 24 %, el costo de recursos humanos con un 16 %, rubros que indudablemente aumentan los costos. Con porcentajes más bajos, pero no menos importantes, se encuentran los reactivos, soluciones, material de oficina, agua potable y la depreciación del mobiliario.

Es de gran importancia resaltar que estos datos solo son aplicables para el CNDR, porque como se ha explicado anteriormente el CNDR ya cuenta con la infraestructura y el equipo necesario para ponerse en marcha este proyecto, en el caso de querer iniciar desde cero los gastos de inversión serian elevadísimos, se tendría que pensar primero en el diseño, la infraestructura, compra de equipos, materiales de oficina etc. Además se debe de remarcar en el hecho de que estos costos implican la producción de 100 liófilos, en el caso de una producción a gran escala los gastos se reducirían aún más.

Gráfico No. 2: % de Insumos fijos e insumos variables requeridos para la liofilización de la cepa *kocuria rizophilia* ATCC 9341.



Para analizar los costos incurridos en el proceso de producción de la de la técnica de liofilización de la cepa *Kocuria* ATCC 9341, se calculan las cantidades de cada insumo correspondientes a este proceso, dichos insumos se catalogan en insumos fijos e insumos variables (Anexo 7), insumos que fueron previamente identificados para un mejor análisis del costo de implementación de la liofilización en el CNDR. Siendo el costo total de insumos fijos de 876 dólares para realizar la técnica, esto es para producir 100 cepas liofilizadas, lo que quiere decir que el costo total de los insumos fijos es de 8.76 dólares por cada cepa liofilizada, que equivalen al 68 por ciento del costo total que se incurre en el proceso de producción por cada liófilo utilizando la tecnología de liofilización.

Los insumos fijos representan el mayor costo lo cual implica que independientemente del volumen de producción se tienen que incurrir en estos gastos. El costo total de los costos fijos se reduce grandemente debido a que los insumos fijos, como son los equipos, el mobiliario, material de oficina, así como la infraestructura son rubros que implican un alto costo, pero con los que ya cuenta el CNDR.

En el gráfico número 2, se puede observar que el costo total de los insumos variables es de 4.13 dólares que equivalen al 32 por ciento del costo total de la técnica por cada liófilo de la cepa *Kocuria* ATCC 9341. En donde el mayor costo que se incurre es en materiales para procesamiento de la cepa, en los cuales se incluyen platos Petri, tubos de ensayo, viales, entre otros (Anexo 5) con un porcentaje de 27.4 % (Gráfico. 1), seguido de los reactivos y soluciones con un menor porcentaje, lo cual indica que a mayor volumen de producción aumentara los costos variables.

En este estudio se evalúan los costos fijos y variables para la producción de 100 liófilos de cepa *Kocuria rhizophilia*. En donde los costos fijos permanecen constante independientemente del volumen de producción y Los costos variables se modifican a medida que aumente la producción.

Tabla No 2: Estimación del Costo de la técnica de liofilización de la cepa *kocuria rizophilia* ATCC 9341.

NOMBRE DEL INSUMO	COSTO POR PRESENTACIÓN US\$	COSTO TOTAL US\$	COSTO POR LIÓFILO US\$
Reactivos	369	40	0.40
Soluciones	419	20	0.20
Materiales para procesamiento de la cepa	2,945	353	3.53
Recursos humanos	407.7	204	2.04
Equipos/ depreciación	36,139.2	305.1	3.05
Consumo energético	353	353	3.53
Agua potable	8.74	4.37	0.04
Mobiliario/ depreciación	184.23	1.54	0.02
Material de oficina	59.02	8.37	0.08
t o t a l US\$	40.885	1,290	12.90

Tablas de resultados

La evaluación económica del presente estudio, permite evaluar la rentabilidad del proyecto, mediante los principales indicadores de evaluación. El costo total de la técnica está dado por la sumatoria del costo de los insumos fijos más los insumos variables (Anexo 7) contemplado en 15 días de trabajo, los cuales son necesarios para realizar los análisis indicados en el protocolo de referencia (Anexo 2) a cada lote producido de la cepa, así también pruebas de control de calidad a los medios de cultivo.

El costo total para llevar acabo la técnica de liofilización en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, Dra. Concepción Palacios, en base a 100 viales liofilizados de la cepa kocuria rizophilia ATCC 9341 en condiciones viables, puras y estables, es de 1,290 dólares. Técnica realizable a pesar de su elevado costo en comparación con métodos de conservación tradicionales. Obteniendo resultados satisfactorios, puesto que el coste concerniente a cada liófilo es de 12.9 dólares, lo que implica que es más económico que los costos de importación por cada liófilo.

Para un mejor análisis en el costo de inversión se incluyen todos los insumos cotejados, tanto insumos fijos como variables, representados por el costo por presentación de cada insumo, en el cual se incluyen también los costos de cada

equipo, aunque ya se encuentren en el CNDR, puesto que el estudio de prefactibilidad abarca el coste de dichos insumos.

El costo de inversión para la implementación de la técnica es de 40,885 dólares, en los cuales se incluye el costo de la compra de equipos así como los otros rubros contemplados en el costo de la técnica (Tabla No 2), sin embargo no se incluye el costo de la infraestructura, debido a que el CNDR ya cuenta con la infraestructura necesaria para la puesta en marcha de la técnica de liofilización.

El elevado costo de los equipos dificulta su implementación en muchas instituciones; en el caso del CNDR los costos se reducen, porque ya se cuenta con los equipos necesarios y áreas con los niveles necesarios de bioseguridad para llevar a cabo la técnica (Anexo 19). Si se comprara todo el equipo necesario para la puesta en marcha desde cero, los costos de producción fueran muchísimo mayor al costo de importación al inicio del proyecto y no se obtendría los mismos beneficio económicos al realizar esta técnica. Por lo tanto la técnica de liofilización de la cepa **kocuria rizophilia** ATCC 9341, es desde el punto de vista económico y tecnológico factible y rentable para su implementación en el CNDR.

Cabe destacar que el costo total de la técnica contempla solo la producción de 100 líofilos, estos costos disminuyen si se produce a gran escala, o se producen todas las cepas recomendadas para el control de calidad microbiológica de medicamentos. (Anexo 15)

En el caso de la *cepa kocuria rizophilia* ATCC 9341, está dirigida a pruebas de potencia del antibiótico eritromicina, esta se tomó como población de estudio, puesto que anteriormente en un estudio (Liofilización de la cepa *kocuria rizophilia* ATCC 9341, en el CNDR) se demuestra que la técnica es realizable bajo las condiciones que presenta el país.

Tabla No 3. Métodos de conservación de cepas bacterianas utilizados en el CNDR y el LNCCM.

Comparación de diferentes métodos de conservación.		
Método	Ventajas	Desventajas
Subcultivo	Almacenamiento puede hacerse en refrigerador o temperatura ambiente.	Periodos cortos. Riesgos de: contaminación, cambios en la numeración, selección de variantes y mutantes, pérdida del aislamiento. Espacio grande para almacenamiento.
Mantenimiento con aceite mineral	Método fácil de realizar y no requiere de equipos caros.	Igual que el subcultivo adicionarle el costo del aceite. El microorganismo puede continuar su crecimiento, que lleven a mutantes, cambios genéticos.
Congelación	Las temperaturas más bajas proporcionan la mayor longevidad, estabilidad genética y un espectro de supervivencia alto por grandes períodos de tiempo. No requiere mucha mano de obra. Los equipos utilizados son fáciles de mantener. Técnica sencilla. Se puede usar por períodos largos o cortos de tiempo. Son innecesarias las resiembras. Mínimo riesgos de contaminación cambios genéticos y bioquímicos en el microorganismo.	Por si sola causa daño a las células, requiere de crio protectores. Si hay falla eléctrica o mecánica puede perderse todo el trabajo. Nitrógeno se evapora debe reemplazarse regularmente. Equipo costosos. Dificultad de transporte
Liofilización	Periodos largos de conservación. Idóneo para sustancias termolábiles. La mayoría de los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente. Productos de redisolución rápida, larga estabilidad. La forma y características del producto final son esencialmente las originales. Se elaboran en medio asépticos. Mayor facilidad para el transporte. Estabilidad óptima. Solubilidad fácil, rápida y completa. Conservación ilimitada. Buena protección contra las influencias externas nocivas. Rápida disponibilidad de uso.	Costosa, •Alto costo energético. •Elevado costo de inversión de las instalaciones y equipos. • Necesidad de personal calificado en la operación y mantenimiento de los equipos.

Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de conservación.

Con frecuencia la elección de la técnica más adecuada para conservar cultivos microbianos resulta difícil, pues deben tomarse en consideración los criterios de viabilidad y pureza de las cepas, cambios poblacionales y genéticos, número y valor de los cultivos, costo, suministro y transporte de cepas, así como la frecuencia del uso de los cultivos.

El método de conservación que se elija debe garantizar la supervivencia de al menos el 70 % de las células por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original como sea posible, conserve las propiedades de importancia de los cultivos y minimice la ocurrencia de los eventos genéticos. De igual manera debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable.

Diversas técnicas se encuentran disponibles para la conservación de microorganismos y para eso debe considerarse lo recomendado por la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC), (Alemán, 2013) la cual enuncia que por seguridad y para minimizar la probabilidad de pérdida de viabilidad de las cepas, cada una debe ser mantenida por al menos dos métodos diferentes (Terragno, 2010), debido a que no existe ningún método de conservación perfecto, cada técnica tiene sus ventajas y desventajas, dependiendo su elección de las condiciones específicas de cada laboratorio.

Como podemos apreciar en la tabla anterior se pueden observar las principales ventajas y desventajas de los diferentes métodos de conservación de microorganismos utilizados en el CNDR y el LNCCM empleados para el control de calidad microbiológico, entre ellos se encuentra el sub cultivo, mantenimiento con aceite mineral, congelación y liofilización. De los métodos antes mencionados, solo el subcultivo se realiza en el LNCCM.

Además de comparar las ventajas y desventajas, en el presente estudio se valoran siete principales variables que son algunas de las características de las técnicas, estas son: la viabilidad, durabilidad, estabilidad genética, riesgo de contaminación,

espacio de almacenamiento, transporte (distribución) y costo, parámetros que ayudan a elegir la mejor tecnología a usar para la preservación de cepas.

El período de tiempo específico durante el que un cultivo permanecerá viable depende del tipo de almacenamiento y de la cepa bacteriana. Muchos microorganismos requieren frecuentemente métodos especiales de conservación para asegurar la viabilidad y pureza. La muerte celular durante el almacenamiento es inevitable; no obstante, se debe reducir al máximo.

La liofilización y la criopreservación; son los mejores métodos para minimizar el riesgo de cambios genéticos (Terragno, 2010), lo que resulta en una óptima viabilidad. No obstante el subcultivo es uno de los métodos menos recomendados para conseguir la estabilidad genética y la viabilidad por periodos largos de tiempo.

La tecnología se decide básicamente en función de las cantidades requeridas, la pureza exigida, el perfil de consumo y el tiempo de conservación. Las cepas liofilizadas presentan mayor durabilidad (tiempo de conservación), puesto que si se empacan y almacenan cuidadosamente pueden durar largos periodos de tiempo (de 10 a 20 años aproximadamente) (Godínez, 2008), sin embargo la criopreservación (congelación), también provee cepas con larga durabilidad si se utiliza nitrógeno líquido, la congelación a temperaturas muy bajas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ el tiempo aproximado es de 1 a 10 años, no obstante la congelación estándar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, solo dura aproximadamente 2 a 3 años, así mismo el subcultivo, y el aceite mineral son métodos de corta duración ya que conservan las cepas en periodos de una semana a quince días en el caso del subcultivo y el aceite mineral de semanas a dos meses (Hernández, 2014)

Preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades es uno de los objetivos de un buen método de conservación. La liofilización es el método preferido cuando se trata de conservar agentes farmacéuticos activos, cepas o extractos bacterianos, puesto que resultan en líofilos de alta estabilidad genética, durante un largo periodo de tiempo. Al realizar la comparación de los métodos de conservación el sub cultivo y el aceite mineral

pueden presentar variabilidad de las características fisiológicas de las cepas, repercutiendo en mutaciones de los cultivos bacterianos.

Los métodos de conservación para microorganismos se agrupan teniendo en cuenta factores de tiempo, características fisiológicas y riesgo de contaminación de la cepa. El subcultivo y el aceite mineral se reconocen como métodos de conservación a corto plazo, se basan en transferir el cultivo del medio seco a uno fresco. Una de las desventajas de estos dos métodos es el elevado riesgo de contaminación de las cepas, presentando una calificación deficiente.

La congelación presenta menor riesgo de contaminación que los métodos ya descritos, sin embargo se debe tener cuidado con fallas eléctricas o mecánicas ya que se podrían perder todos los cultivos, mientras que la liofilización presenta una buena protección contra las influencias externas nocivas, disminuyendo grandemente el riesgo de contaminación.

Una vez liofilizadas las cepas pueden almacenarse a una temperatura de 4 °C o inferior e incluso a temperatura ambiente y el espacio de almacenamiento es reducido, en cambio el subcultivo, así como el aceite mineral y la congelación, requieren de grandes espacios para almacenar los cultivos microbianos, lo que resulta en una desventaja, siendo su puntuación deficiente.

Una característica muy importante es lograr que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad. Esto último puede ser un factor esencial en la selección de un método de preservación. La liofilización al igual que el subcultivo y el aceite mineral, no necesitan cadena de refrigeración para su distribución (transporte), en cambio la congelación presenta desventajas en cuanto a este parámetro, ya que necesita cadenas de refrigeración lo que dificulta su distribución.

Para la puesta en marcha de la técnica de liofilización, su funcionamiento es relativamente más costoso que los otros métodos, no obstante dichos costos pueden ser asumidos por la ventaja de obtener liófilos de alta calidad, al igual que la liofilización, la congelación es un proceso costoso debido a los altos costos de

energía y equipos, siendo el subcultivo y el aceite mineral mucho más económicos.

Posterior a la revisión bibliográfica he propuesto un cuadro que resume los principales variables para valorar la efectividad de una técnica de conservación.

La escala de calificación de las técnicas de conservación tiene una puntuación de acuerdo a su eficacia como método de conservación (Anexo 4, tabla 6.1) que va desde 1 para una técnica deficiente hasta 5 puntos para una técnica excelente (Ardila, 2007), con respecto de su durabilidad o tiempo de conservación de las cepas, estabilidad genética de las cepas almacenadas, riesgo de contaminación, espacio de almacenamiento de las cepas, transporte o distribución de las mismas, costo de la técnica y la viabilidad de la cepa reconstituida.(tabla 4.1)

Tabla 4.1 Matriz de selección de técnica de conservación.

variable	Técnica de almacenamiento.			
	Subcultivo	Aceite mineral	Congelación	Liofilización
Viabilidad	1	1	3	5
Durabilidad (Tiempo de conservación)	1	1	4	5
Estabilidad genética.	1	1	4	5
Riesgo de Contaminación	1	1	4	5
Espacio de almacenamiento	2	2	2	5
Transporte (Distribución)	4	4	1	5
Costo	5	4	1	1
Total	15	14	20	31

La liofilización se califica como una técnica excelente debido a su capacidad de producir liófilos de alta estabilidad genética, durante un largo periodo de tiempo, fáciles de almacenar y de transportar a pesar de su alto costo. Las otras técnicas de almacenamiento se califican como muy buenas, buenas o deficientes porque presentan algunas desventajas como es el caso de la congelación que a pesar de ser una técnica de almacenamiento por un largo periodo de tiempo que preserva las características originales, posee la desventaja de ser difícil de transportar, además de su elevado costo. (Ardila, 2007)

Tabla No 5: Costo- Beneficio de la cepa Importada V/S la cepa producida en el CNDR.

Cepa. Producida en el CNDR	Costo US\$ por liófilo producido	Cepa. importada	Costo US\$ por liófilo importado	Ahorro US\$ por liófilo producido V/S liófilo importado	Beneficio/costo	% de ahorro de costo por liófilo producido V/S liófilo importado
<i>kocuria Rhizophilia</i> ATCC 9341 (MINSA-CNDR)	12.9	1-<i>kocuria Rhizophilia</i> ATCC 9341	222	209.1	16	94.2
		2- <i>kocuria Rhizophilia</i> CECT 9341	229.9	217	17	95.6
		3- <i>kocuria Rhizophilia</i> ATCC 9341 (microbiologics, fishers científico)	50.2	37.3	3	74.2

Fuentes. (ATCC, 2015), CECT, Fishers scientific

La relación costo/ beneficio como su nombre lo indica es un método de evaluación que señala la relación que existe entre los ingresos y egresos. Dicho análisis permite evaluar la rentabilidad de un programa de carácter social (Pág. 27).

Los indicadores de evaluación son una herramienta de gran utilidad para la toma de decisiones ya que un análisis que se anticipe al futuro puede evitar posibles desviaciones y problemas a largo plazo. En la tabla número 5 se presenta el comportamiento del análisis de costo/ beneficio (ACB), en estos resultados se puede observar el costo – beneficio de la producción de la cepa ATCC 9341 en el CNDR en comparación de tener que comprar el reactivo estándar biológico en el extranjero.

Para este estudio se realiza la relación costo beneficio en la que se utiliza la formula siguiente para una mejor comprensión del análisis.

El cociente beneficio/costo: ahorros US\$/costos US\$

Formula que se traduce en términos monetarios.

En estos resultados se puede observar que la cepa ***kocuria Rhizophilia ATCC 9341*** producida en el **CNDR - MINSA central**, es:

- Dieciséis veces más económica que la cepa número uno: ***kocuria Rhizophilia ATCC 9341***, siendo así el porcentaje de ahorro del costo por liófilo producido de 94.2 %.
- Diecisiete veces más económica que la cepa número dos: ***kocuria Rhizophilia CECT 9341*** con un porcentaje de ahorro del costo por liófilo producido de 95.6 %.
- Y tres veces más económica que la cepa número tres: ***kocuria Rhizophilia ATCC 9341 (microbiologics, fishers scientific)***, con 74.2 %, de ahorro del costo por liófilo producido.

Comparando el costo unitario del liófilo producido en el CNDR de 12.90 dólares con respecto a la importación de las cepas fuera del país, cuyo costo oscila entre 50 dólares y 222 dólares, costo que varía según el laboratorio que la produce; se

puede concluir que el costo del liófilo producido en el CNDR es mucho más económico.

Con este estudio se obtienen resultados excelentes, puesto que al comparar los costos de los liófilos producidos con respecto a los liófilos importados, se puede evaluar que es más factible producir éstos que importarlos. Sin embargo aunque el costo de producir los liófilos fuese igual a los costos de importación, los beneficios superan en gran manera los costos de tener que comprar la cepa en el extranjero.

Debido a que el propósito de este estudio es presentar una evaluación técnica y económica, los resultados obtenidos, demuestran que sumado a los de beneficios como la biodisponibilidad, el avance tecnológico, el desarrollo económico y científico que ofrece desarrollar la técnica de liofilización de la cepa en el país. En primer lugar los costos de producción son más bajos que los costos que se tendrían que incurrir en importar la cepa, siendo el % de ahorro del costo por liófilo producido desde un 74.2% hasta un 95% en relación al costo del liófilo importado disminuyendo grandemente los costos.

La implementación de la técnica de liofilización en el CNDR permite la disponibilidad de cepas inmediatamente para su uso, permitiendo así, la fiabilidad del proceso de control de calidad microbiológico para los productos farmacéuticos, lo cual resulta en productos de alta calidad para el consumo.

En la industria farmacéutica el tiempo de obtención de cualquier producto farmacéutico es fundamental. Cuando se importan cepas liofilizadas el tiempo de obtención es más largo por el sistema burocrático, la gestión de compra y los tramites de aduánaje, puesto que son materiales biológicos que implican muchas regulaciones sanitarias (Cofepris, 2015) y personal calificado para su transporte. Al producir la cepa en Nicaragua se da respuesta a la carencia que pueda surgir en algún momento dado (Anexo 19), puesto que el tiempo de obtención es corto e incluso una vez implementada la técnica en el CNDR, dicha cepa se encuentra disponible en tiempo oportuno.

La liofilización garantiza la accesibilidad de cepas (reactivo estándar biológico) almacenadas y disponibles en todo momento. La accesibilidad incluye la obtención de la cepa en todo momento a bajo costo, fácil de obtener en un periodo de tiempo razonable, inmediatamente para su uso e inclusive aunque los costos de producción fueran iguales a los costos de importación, la implementación de la técnica siempre resulta factible desde el punto de vista de accesibilidad, puesto que en todo momento se encuentra disponible.

El avance tecnológico va a la par del avance económico del país, la industria farmacéutica se beneficia con la producción y distribución masiva de cepas liofilizadas, puesto que el almacenamiento es reducido y se pueden producir infinidad de lotes de diversas cepas, que pueden ser usadas en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética, etc.

Ahora bien desde la perspectiva social en un principio se generan 2 empleos a personal calificado una variable de suma importancia. Al emplear la técnica de liofilización, se pronostica que se pueda ampliar su personal una vez consolidada la producción de cepas en la industria. Además se ofrece a la sociedad (población) la opción de contar con cepas totalmente confiables inmediatamente para su uso.

A nivel ambiental el CNDR utiliza un sistema de esterilización de reactivos, materiales biológicos (Anexo No 19) para su posterior descarte, disminuyendo la posible contaminación del medio ambiente y por ende también disminuye el riesgo de contaminación del personal que interactúa con dichos materiales biológicos, brindando seguridad en las diferentes áreas de trabajo.

En el área técnica se cuenta con el respaldo y el conocimiento del laboratorio del CNDR en las áreas de virología y parasitología, además de contar con el equipo liofilizador, congelador entre otros y las áreas de bioseguridad establecidas en las buenas prácticas de manufactura que son necesarias para este proceso de liofilización de cepas bacterianas. El CNDR cuenta con un buen respaldo y soporte técnico de toda su maquinaria.

Económicamente hablando se permite disminuir pérdidas económicas en bienes tangibles del reactivo estándar biológico, puesto que producirlo es más factible, además de que los tiempos de liofilización para esta cepa son los mismos independientemente de su producción, es decir que en este estudio solo se contempla la producción de 100 liófilos, los cuales pueden ser producidos a gran escala y de tal forma también disminuyen considerablemente los costos. Sin embargo, se pueden presentar cambios en los costos de los liófilos no muy significativos debido a externalidades como la devaluación de la moneda del 5 % de inflación anual.

Desde el punto de vista de mercado, aunque esta técnica es muy antigua y en Nicaragua la experiencia en liofilización data del año 2000 en el laboratorio del CNDR, a nivel nacional esta técnica puede ser considerada como de reciente aplicación y poca utilización, puesto que la liofilización en esta Institución es aplicada con fines de investigación y para la producción de Test de, leptospira, Test de Chagas, Test de Dengue, Test de Influenza y mono suero de Chicungunya en los cuales los virus y bacterias correspondientes para la elaboración de dichos Test (para el oportuno diagnóstico de enfermedades) se utiliza la tecnología de liofilización; más no para distribuir cepas bacterianas al laboratorio nacional de control de calidad de medicamentos (LNCCM), el cual tiene que garantizar la calidad de los análisis que se realizan de todos los productos farmacéuticos. Es de vital importancia garantizar el reactivo estándar biológico (cepas) principalmente.

La tecnología de liofilización le imparte un gran valor agregado a los liófilos, además de ofrecer una serie de ventajas en comparación con métodos tradicionales utilizados actualmente en la industria farmacéutica.

La variable financiera señala que el CNDR, requiere una gran inversión monetaria, por lo cual es conveniente presentar el proyecto a organizaciones interesadas en el tópico de liofilización bacteriana. La probable fuente de financiamiento del proyecto en este caso es extranjera, está representada por la OPS, por tanto es una motivación de su autora para iniciar este estudio debido al interés que

presenta la OPS en invertir en este proyecto. En el año 2012 se realiza una primera experiencia al liofilizar la cepa bacteriana kocuria rhizophilia ATCC 9341 en el CNDR, por tal razón surge una propuesta atractiva de implementación de esta técnica en dicha institución, así realizar control de calidad microbiológico.

VI. CAPITULO

CONCLUSIONES

- 1) El costo total de la técnica de liofilización realizada en el CNDR es de 1,290 dólares, así mismo el costo unitario es de 12.9 dólares para la producción de 100 liófilos de la cepa *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341. Los insumos fijos representan el 68 % y los insumos variables el 32. % del costo total de la técnica.
- 2) La liofilización es una técnica de conservación de cepas excelente, proporciona liófilos de alta estabilidad genética, durante largos periodos de tiempo, fácil de almacenar y de transportar a pesar de su alto costo, son muchas las ventajas en comparación con los métodos de subcultivo, aceite mineral y congelación.
- 3) La relación costo – beneficio es garante para la implementación de la técnica de liofilización en el CNDR es factible, puesto que los costos de producción son más bajos, que los costos de importación.

VII. CAPITULO

RECOMENDACIONES

A Instituciones públicas de Salud (MINSA), Universidades, Laboratorios de Industrias Farmacéutica, Estudiantes y gremio en general:

1. Fomentar la continuación por parte de la UNAN- MANAGUA, la realización de investigaciones acerca de la técnica de liofilización, hasta lograr que esta sea parte de las prácticas industriales del país.
2. Verificar la técnica de liofilización de las cepas bacterianas de mayor interés en el laboratorio nacional de control de calidad de medicamentos, para la elaboración de un Cepario nacional, con el fin de fortalecer el control de calidad microbiológica de medicamentos.
3. Elaborar un proyecto de sistema de acreditación de la técnica de liofilización de cepas bacterianas en el país.
4. Realizar intercambio tecnológico o capacitación al personal con países avanzados en el tópico de liofilización bacteriana.
5. Se recomienda continuar realizando estudios de factibilidad, con el fin de poner en práctica la liofilización a nivel oficial y su implementación en la industria nacional.

BIBLIOGRAFÍA

- (s.f.). *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*.
- Alemán. (2013). Conservación de microorganismos. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología.*, 129 - 139. Recuperado el Marzo de 2016, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156130032005000300006&lng=es
- Ardila, P. (2007). *Estudio de prefactibilidad técnica y económica para el montaje de una planta de uchuva*. BucaramangaUniversidad Industrial Santander.
- ATCC. (2015). <http://www.atcc.org/products/all/9341-MINI-PACK.aspx>. Obtenido de <http://www.atcc.org/products/all/9341-MINI-PACK.aspx>
- Atúñez, C. J. (2001). *validacion de Métodos Analíticos*. Monografias de AEFI, Asociacion Española de Farmacéuticos de la Industria, A.E.F.I, Métodos en Microbiología, Barcelona.
- Baca, B. (2013). *Liofilización, una herramienta en la creación del cepario Nacional*. Managua.
- Burguet, S. G. (2012). Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC, ciencias biologicas*, 43(3), 1 - 4.
- Castillo, e. a. (2011). Proposals of decision rules in economic assessment of health. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 360-367.
- CNDR-MINSA-central. (2015). *Existencias de insumos*. Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Complejo Nacional de Salud Concepción Palacios, Managua.
- CNDR-MINSA-central. (2015). *Nomina de pago de salario del personal*, Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Complejo Nacional de Salud Concepción Palacios , Managua.

- Cofepris. (2015). *Comision federal para la proteccion contra riesgos sanitarios*.
Obtenido de www.cofepris.gob.mx
- DGIM, M. d. (2014). *Formulario Nacional de Medicamentos* (Septima ed.).
Managua, Nicaragua.
- García. (2000). La conservación de cepas microbianas. 12-6.
- Garcia, U. (2015). *La concerbacion ce cepas bacterianas*. Valencia. Recuperado el
2016, de cect@uv.es. <http://www.uv.es/cect>
- Gato, j. (septiembre de 2010). metodos de concervacion y formulacion de
trichoderma harzianum rifai. *Fitosanidad v. 14 n.3*.
- Godínez. (2008). influencia del tiempo de concervacion por liofilizacion en cepas
del genero penicilinum en la industria alimentaria.
- Goodman, G. (2009). *manual de farmacologia y terapeutica*. Mexico, D.F.:
McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A de C.V.
- Harrison. (2008). *principios de medicina interna* (Vol. 1). McGraw.Hill.
- Hernandez Sampieri, R. F. (1997). *Metodología de la Investigación*. México: Mc
Graw Hill.
- Hernández, e. a. (2014). *Selección de un método para la conservación y
preservación de actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la
universidad tecnológica*. Pereira, PEREIRA.
- Ibarz, A. L. (2011). Diagnóstico de laboratorio de las Meningitis Bacterianas
causadas por Neisseria meningitidis. *Manual de procedimientos de
laboratorio de la red SIREVA II*, 63. São Paulo, Brasil.
- Jawetz, M. y. (2002). *"Microbiologia Medica"* (17va ed.). Manual Moderno.
- Jenkins, G. P. (2011). *Analisis de Costo-Beneficio de las desiciones de inversion*.
Chicago: Harvard Institute for International Development.

- L.Rayburn. (2011). *Contabilidad Analítica y de costos I*. Barcelona (España): Oceano/ Centrum.
- Loza, C. e. (2011). BASIC PRINCIPLES AND METHODOLOGICAL CONSIDERATIONS OF. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* , 520.
- Lozada, e. a. (2011). *Evaluación y valoración financiera de tecnologías de liofilización en Colombia por medio de la* (Vol. VII). Colombia, Bogotá.
- Metrix. (2015). <http://www.metrixlab.mx/Metrix2.0/>. Obtenido de <http://www.metrixlab.mx/no-cat/preservacion-de-microorganismos/>
- Microbiologia, A. L. (1999). *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 41, 37.
- Navarro. (1999). *La Liofilización de Productos Farmacéuticos*. Conferencia de Tecnología Farmacéutica I.
- Orrego, C. (2008). *Congelacion y Liofilización de alimentos* (1ra ed.). Manizales, Caldas, Colombia: Tizan Ltda.
- Perilla, e. a. (2004). *Manual de Laboratorio para la Identificación yPrueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae.*. Atlanta, Georgia, EUA.
- Remintong, G. A. (2003). *Remintong Farmacia* (Vol. 2).
- Romero, N. (abril de 2012). Liofilizacion de la cepa *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341. *Monografía*, 6. Managua, Nicaragua: UNAN-Managua.
- Sapag, N. C. (2008). *Preparacion y Evaluacion de Proyectos* (5 ed.). Bogota, Colombia: Mc Graw Hill.
- Savini, C. M. (2010). Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus kocuria. *Journal of Medical Microbiology*, 1395 - 1402.

Switzerland, e. a. (2004). *Instituto nacional de salud-Red Nacional de laboratorios: Manual para la vigilancia del S. Pneumoniae y H Influenzae*. Colombia.

Terragno, M. S. (2010). *Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos* (3 ed.). Argentina.

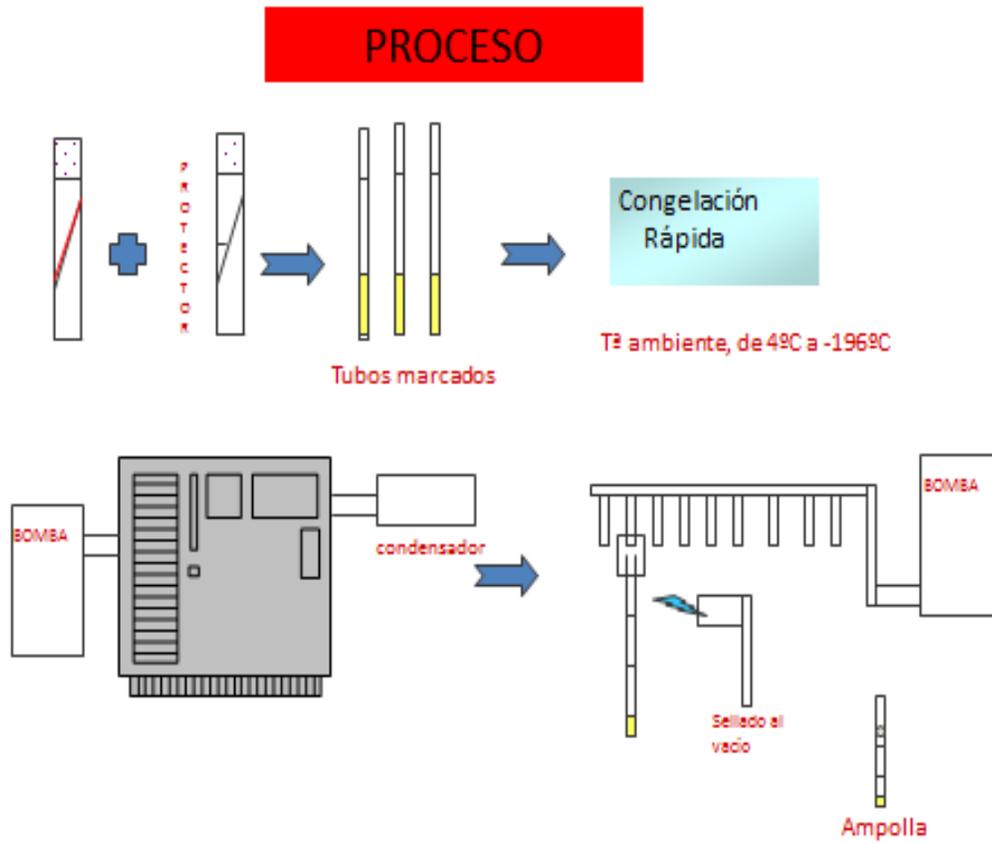
Thermo Fisher Scientific Inc. (02 de 2015). *Almacenamiento de muestras bacterianas para una viabilidad óptima*. Obtenido de <https://www.thermoscientific.es>

USP 36.(2014); NF 32, Vol 1.

Zapata, R. M. (2013). *Implementacion del Método de conservacion dehongos filamentosos en agua destilada esteril(Método de Castellani) en el laboratorio de Bioanálisis Clínico, POLISAL*. Monografía, UNAN-Managua.

ANEXOS

Esquema del proceso de Liofilización



Fuente: Navarro R. 2012.

Protocolo de Referencia

Instituto Nacional de Salud	Versión N° 4	Página 162 de 177
Red Nacional de Laboratorios		Fecha de revisión: Junio de 2004
Grupo: Microbiología		Fecha de creación: 1994
Manual para la vigilancia de <i>S. pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i> .		Aprobado por: Subdirectora de investigación.

2. Métodos de preservación de larga duración.

Liofilización.

Generalidades:

La liofilización es un proceso por el cual el vapor de agua es removido directamente del producto congelado, por medio de sublimación. El sistema se ha utilizado por muchos años para preservar una gran cantidad de materiales biológicos que son sensibles al calor. La naturaleza no destructiva de esta técnica se ha demostrado por la viabilidad observada con virus y microorganismos liofilizados.

Para la liofilización los microorganismos se resuspenden en un medio apropiado que les sirve de soporte y reduce el daño producido por la congelación, se almacenan los viales, se congelan y se exponen a un sistema de vacío, donde el agua es removida y convertida en vapor, sin pasar por el estado líquido. El resultado es un producto soluble en agua que puede ser fácilmente rehidratado.

Preparación de las cepas bacterianas:

Medio de soporte:

En general todos los aislamientos bacterianos se pueden liofilizar utilizando como medio de soporte leche descremada al 20 %. Existen algunas excepciones como son especies de los géneros: *Campylobacter*, *Helicobacter* sp y *Neisseria gonorrhoeae*, que no resisten la liofilización.

Procedimiento:

- Obtenga un cultivo puro, de 18-24 h, en un medio enriquecido, no selectivo (sin antibióticos o sustancias inhibidoras), del microorganismo que se va a liofilizar.
- Realice una suspensión del microorganismo, utilizando el crecimiento de una caja del cultivo puro por 1 ml de leche descremada estéril (al 20 %).
- Coloque la suspensión en el vial o ampolleta apropiada de acuerdo con el equipo que se utilice.

Los viales deben ir debidamente marcados de acuerdo con el sistema de identificación que el laboratorio utilice.

- Congele a -70°C .
- Liofilice los aislamientos (el tiempo de liofilización depende del equipo utilizado).

Liofilización de grupos específicos.

Neisseria: para la liofilización se utiliza un medio que contenga caldo de Tripticasa Soya con lactosa al 6%. El resto del proceso se realiza de igual manera.

Anaerobios: en general la ATCC usa un crioprotector compuesto por:

- Caldo Tripticasa 1.5 g
- Sacarosa 10.0 g
- Albumina bovina fracción V 5.0 g
- Agua destilada 100 ml

Almacenamiento de los viales

Los viales sellados con la grafa metálica deben ser almacenados en refrigeración entre 2 a 8°C .

Recuperación del liofilizado

Desinfecte el tapón del vial con gasa impregnada con alcohol y flamee. Rehidrate el liofilizado del cultivo con 1 ml de caldo nutritivo estéril, utilizando una jeringa, resuspenda y con la misma jeringa retire la suspensión del vial. Siembre la suspensión en un caldo nutritivo y en medios sólidos de acuerdo con el microorganismo que se va a recuperar.

Control de esterilidad y de viabilidad de las cepas

El control debe realizarse antes y después de la liofilización para poder determinar la efectividad del proceso. También debe hacerse un control periódico para determinar el tiempo de viabilidad de cada microorganismo.

Para realizar el control de viabilidad y esterilidad de las cepas liofilizadas, debe emplearse el 10 % de los viales, reconstituir con 1 ml de caldo nutritivo estéril, sembrar en el medio adecuado e incubar por 18 horas. Se considera buen crecimiento, cuando la cepa crece en dos de los cuatro cuadrantes del medio.

Medio de leche descremada

Descripción.

La leche descremada se usa como un medio completo, o como ingrediente de otro medio especial, para la propagación de microorganismos en productos lácteos. El polvo de leche descremada es un polvo desecado a partir de grandes volúmenes de leche descremada, es soluble y fácil de preparar. La leche descremada al 20% es usada como crioprotector para conservar microorganismos aeróbicos y anaeróbicos a -70°C así como para el proceso de liofilización de la mayoría de los microorganismos incluyendo levaduras y hongos.

Composición química.

Bacto-skimmilk Difco 0032 es un producto estandarizado, recomendado como medio de cultivo que cuando se reconstituye equivale a leche desnatada fresca.

Preparación.

- Disuelva 20 gramos del medio deshidratado en 100 ml de agua destilada o desionizada.
- Distribuya 10 ml en tubos de tapa de rosca de 150/15 mm.
- Esterilice a 116°C por 10 minutos.

Tenga cuidado en evitar sobrecalentamiento o que la leche tome un color caramelo ya que de esta manera no conserva los microorganismos. La duración del medio es de 2 meses. El pH del medio debe mantenerse a $6,1 \pm 0,2$.

Control de calidad

Para el control de esterilidad, incube un tubo durante 48 horas y luego realice la siembra en agar sangre de cordero al 5%.

Procedimiento para almacenar las cepas.

Este procedimiento debe realizarse en cabina de bioseguridad II

- Para obtener una buena conservación se debe partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas en un medio no selectivo.
- Dispense de 1 a 1,5 ml de la leche descremada estéril en un tubo plástico resistente a la congelación (crioviales) 2 ml.
- Haga una suspensión densa del microorganismo.
 - Para *S. Pneumoniae*, utilice una caja de crecimiento por vial
 - Para *H. influenzae*, utilice ½ caja de crecimiento por vial
- Rotule el vial con el código correspondiente de la cepa y la fecha de recolección.

Los viales deben ser marcados con una tinta que resista bajas temperaturas y almacenados en cajas especiales, debidamente marcadas.

- Coloque el criovial en una caja de almacenamiento con tapa resistente al frío.
- Guarde la caja a la temperatura elegida (-20°C a -70° C).
- Para almacenar el nitrógeno líquido (-140°C o -196°C), se utilizan las escalerillas grapadas.

Cuando desee recuperar el microorganismo a partir del criovial, tenga en cuenta que la descongelación debe ser un proceso rápido, debido a que su prolongación produce daño en las células y disminuye la viabilidad del microorganismo. Proceda de la siguiente manera:

- Saque el criovial de la congelación.
- Tome con un asa estéril flameada y caliente, una pequeña parte del material congelado, con el fin de no descongelar todo el vial.
 - Siembre el microorganismo en los medios de cultivo necesarios para su recuperación en el menor tiempo posible.
- Guarde inmediatamente el criovial a – 70°C

Insumos para preparación de Medios de cultivo.

- + Nombre del medio de cultivo: **Agar Trypticasa Soya.**
- + Cantidad pesada: 40 g.
- + Volumen de agua destilada: 1000 ml.
- + Ajustar pH
- + Esterilizar en autoclave: 15 minutos.
- + Temperatura de esterilización: 121 °C.
- + Enfriar en baño María a 45 °C.
- + Verter en placas de Petri estériles.
- + Control de esterilidad: (Incubar) 24 hrs a 35 °C.

- + Nombre del medio de cultivo: **Agar Sangre de carnero.**
- + Cantidad pesada: 40 g de ATS.
- + Aforar con agua destilada: 1000 ml.
- + Ajustar pH
- + Esterilizar en autoclave: 15 minutos.
- + Temperatura de esterilización: 121 °C.
- + Enfriar en baño María a 45 °C.
- + Añadir la Sangre de carnero: 50 ml.
- + Mantener en baño María el medio preparado, solo el tiempo estrictamente necesario de 40 – 45 °C.
- + Verter en placas de Petri estériles.
- + Control de esterilidad: (Incubar) 24 hrs a 35 °C

- + Nombre del medio de cultivo: **Caldo Nutritivo.**
- + Cantidad pesada: 2.4 g.
- + Volumen de agua destilada: 300 ml.
- + Ajustar pH
- + Esterilizar en autoclave: 15 minutos.
- + Temperatura de esterilización: 121 °C.
- + Enfriar en baño María a 45 °C.
- + Verter en placas de Petri estériles.
- + Control de esterilidad: (Incubar) 24 hrs a 35 °C.

- + Nombre del medio de cultivo: **Leche descremada 20%.**
- + Cantidad pesada: 30-5 g.
- + Volumen de agua destilada: 1000 ml.
- + Ajustar pH
- + Esterilizar en autoclave: 15 minutos.
- + Temperatura de esterilización: 121 °C.
- + Enfriar en baño María a 45 °C.
- + Control de esterilidad: (Incubar) 24 hrs a 35 °C.

Tabla No 3: Insumos fijos matriz de síntesis de recolección de datos.

ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341			
INSUMOS FIJOS	COSTO POR PRESENTACIÓN	COSTO TOTAL	COSTO POR LIÓFILO
T O T A L US\$			

Tabla No 4: Insumos variables matriz de síntesis de recolección de datos.

ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341			
INSUMOS VARIABLES	COSTO POR PRESENTACIÓN	COSTO TOTAL	COSTO POR LIÓFILO
T O T A L US\$			

Tabla No 5. Matriz de ventajas y desventajas de los métodos de conservación de cepas bacterianas utilizados en el CNDR y el LNCCM.

Comparación de diferentes métodos de conservación.		
Método	Ventajas	Desventajas
Subcultivo		
Mantenimiento con aceite mineral		
Congelación		
Liofilización		

Tabla 6. Matriz de selección de técnica de conservación.

variable	Puntuación de la técnica de almacenamiento.			
	Subcultivo	Aceite mineral	Congelación	Liofilización
Durabilidad (Tiempo de conservación)				
Estabilidad genética.				
Riesgo de Contaminación				
Espacio de almacenamiento				
Transporte (Distribución)				
Costo				
Total				

Tabla 6.1. Escala de calificación de las técnicas de conservación.

Calificación de las técnicas de conservación.	
Puntuación	Calificación
5	Excelente
4	Muy buena
3	Buena
2	Aceptable
1	Deficiente

Insumos requeridos para la implementación de la técnica de liofilización de la cepa *kocuria rizophilia* ATCC 9341.

Tabla No 7: Reactivos.

ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341								
NOMBRE DEL INSUMO	Unidad Medida	Presentación	Costo Presentación US\$	Costo Unitario US\$	Requerimiento 100 Liófilos	Costo total US\$	Requerimiento por liófilo	Costo por liófilo US\$
REACTIVOS								
Cepa kocuria Rhizophilia ATCC 9341. Microbiologics. Fisher Scientific	und	2 pack	72.62	36.3	1	36.3	0.01	0.363
Caldo Nutriente	g	Fco de 500g	54.51	0.11	1.0	0.11	0.01	0.001
Agar Trypticosa Soya	g	Fco de 500g	54.40	0.11	23	2.46	0.23	0.025
Agar Sangre de carnero	g	Fco de 500g	54.40	0.11	12	1.31	0.12	0.013
Leche descremada 20 %	g	Fco de 500g	19.25	0.0385	2.8	0.11	0.03	0.001
Yodo resublimado	g	FCO/ 100	15.64	0.16	0.18	0.03	0.002	0.0003
Potasio yoduro neutro al 99.5% para análisis (yoduro de potasio)	g	FCO/ 250	46.71	0.19	0.36	0.07	0.004	0.0007
Amonio oxalato 1H2O	g	FCO/ 250	21.15	0.08	0.14	0.01	0.00	0.0001
Safranina O (C.I.50240) para microscopia	g	FCO/ 100	30.19	0.30	0.12	0.04	0.001	0.0004
SUBTOTAL US\$			368.88			40.4		0.40

Fuente: Existencias de insumos CNDR.

Tabla No 8: Soluciones.

ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341								
NOMBRE DEL INSUMO	Unidad de Medida	Presentación	Costo Presentación US\$	Costo Unitario US\$	Requerimiento 100 Liófilos	Costo total US\$	Requerimiento por liófilo	Costo por liófilo US\$
SOLUCIONES								
Agua destilada	mL	FCO/4L	2.20	0.0006	1492	0.82	14.9	0.008
Alcohol Birrectificado (Alcohol etílico 95 %)	mL	Barril/225 L	357.15	0.002	531.78	0.84	5.32	0.008
Sangre de carnero	mL	Fco 50 mL	60.00	1.20	15	18.0	0.15	0.18
SUBTOTAL US\$			419.35			19.6		0.2

Fuente: Existencias de insumos CNDR.

Tabla No 9: Materiales para procesamiento de la cepa.

ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341								
NOMBRE DEL INSUMO	Unidad Medida	Presentación	Costo Presentación US\$	Costo Unitario US\$	Requerimiento 100 Liófilos	Costo total US\$	Requerimiento por liófilo	Costo por liófilo US\$
MATERIALES PARA PROCESAMIENTO DE LA CEPA								
Plato petri descartable 100 x 15 mm de Polystyrene estéril	und	Caja// 420 und	71.7	0.17	28	4.78	0.28	0.05

Jeringa descartable 05 ml. C/aguja 21g * x 1 1/2	und	Caja/1 00 und	2.9	0.03	28	0.81	0.28	0.01
Tubos de ensayo c/ tapón de rosca de 16*150 mm de vidrio	und	Caja/1 00 und	25.0	0.25	18	4.51	0.18	0.05
Viales criogénicos de 2 ml	und	Caja/5 00 und	2.3	0.005	110	0.50	1.10	0.005
Punta para Micropipeta 1 a 200 ul con filtro	und	Bolsa /1000 und	9.7	0.01	15	0.15	0.15	0.00
Papel aluminio de 25 pies	und	Rollo	1.2	1.19	2	2.38	0.02	0.02
Hojas de Bisturí · 23	und	Caja/1 00 und	2.6	0.03	28	0.72	0.28	0.01
Asa bacteriológica calibrada de 0.001(10 ul) con mango	und	paq/1 2 und	27.2	2.27	1	2.27	0.01	0.02
marcador punta Fina color negro	und	Caja/6 und	8.7	1.45	1	1.45	0.01	0.01
Probeta plástica de 25 ml	und	Caja/1 0und	82.8	8.28	1	8.28	0.01	0.08
Papel secante para laboratorio 20 cms*304 mts (8"*1000 pies) Kimberly-Clark	und	Caja/1 0 Rollo	8.4	0.84	1	0.84	0.01	0.01
perlas de vidrio de 4 mm Fisher Scientific	Onzas	Fco/16 onzas	13.8	0.87	2	1.73	0.02	0.02
Caja para almacenamiento de crioviales, 81 espacios Fisher Brand	und	Caja/4 und	35.0	8.75	2	17.5	0.02	0.18

Papel Krafft de 98 Gramos 36 pulgada de 45 lbs 98gr/m²	und	Rollo	46.9	46.92	0.02 5	1.17	0.00 03	0.01
Mascarilla descartable contra polvo y partículas volátiles	und	Caja/5 0 und	1.3	0.03	30	0.79	0.30	0.01
Barra magnética de 12 pulgada Fisher Brand	und	Caja/1 0und	33.3	3.33	1	3.33	0.01	0.03
Frascos de congelación rápida (Fast-freeze*flasks 600 mL)	und	Caja/1 0und	2,284.4	228.44	1	228. 44	0.01	2.28
Adaptador de matraz (lío filizador), curvo de 45 grados, 0.75 pulg de diámetro. Vidrio Labconco	und	Pack	19.2	19.15	1	19.1 5	0.01	0.19
Botella de vidrio sin tapa, 5mL, 22x40 mm, 13x20mm IDXOD en la boca. Weaton Science Products	und	Caja/1 44 und	36.0	0.25	1	0.25	0.01	0.00
Guante descartables de nitrilo, Medium (Powder- Free Nitrile Disposable Exam Gloves)	PA R	Caja/1 000 und	68.13	0.07	30	2.04	0.30	0.02
Espátula de acero inoxidable de 4 cms de 20.3 cms o 8 pulgada extremos planos	und	Caja/6 und	14.3	2.39	1	2.39	0.01	0.02
Cinta indicadora para esterilizar 3M	und	Caja/1 und	22.1	22.10	1	22.1	0.01	0.22
Erlenmeyer de vidrio 2000 ml	und	Caja/6 und	120.0	20.00	1	20.0	0.01	0.20

Fósforos águila	und	Caja/4 0 und	1.6	0.04	1	0.04	0.01	0.000 4
Mechas para mecheros de alcohol	und	Caja/1 2 und	0.2	0.02	1	0.02	0.01	0.000 2
Anteojos protectores	und	Caja/1 und	1.5	1.47	2	2.94	0.02	0.029 4
Mechero de alcohol	und	Caja/1 und	4.8	4.80	1	4.80	0.01	0.048 0
SUBTOTAL US\$			2,945			353. 36		3.53

Fuente: Existencias de insumos CNDR.

Tabla No 10: Equipos/ depreciación

ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341								
NOMBRE DEL INSUMO	Unidad Medida	Presentación	Costo Presentación US\$	Costo Unitario US\$	Requerimiento 100 Liófilos	Costo total US\$	Requerimiento por liófilo US\$	Costo por liófilo US\$
EQUIPOS/ DEPRECIACIÓN								
Liofilizador Labconco-free zone Triad freeze-ury systems	día	caja/1 Und	1,167	0.65	15	9.72	0.15	0.10
Cabina de Bioseguridad Tipo II (120 V 8 A)código TB001284	día	caja/1 Und	14,214	7.90	15	118.45	0.15	1.18

congelador -80 Fisher scientific Isotemp -120V 16A	día	caja/1 Und	6,752	3.75	15	56.26	0.15	0.56
Incubadora para laboratorio (120 V 659 W) código TB001495 Serie 41656186 Isotemp	día	caja/1 Und	2,780	1.54	15	23.17	0.15	0.23
Microscopio Binocular con 4 objetivo individual 8 piezas Serie 3M40272 240 v 60hz	día	caja/1 Und	1,362	0.76	15	11.35	0.15	0.11
Micropipeta automática de 10 a 100 ul	día	caja/1 Und	55.09	0.05	15	0.77	0.15	0.01
Termómetro Fisher scientific para incubadora de 18 °C - 50 °C certificado con graduación de 0.5 °C con 135 mm de largo.	día	caja/1 Und	35.59	0.10	15	1.48	0.15	0.01
Termómetros certificado para refrigeradora de -40 °C a 50 °C con respaldo de aluminio	día	caja/1 Und	23.79	0.07	15	0.99	0.15	0.01
Termómetro de -20 a 150 gc	día	caja/1 Und	10.68	0.03	15	0.45	0.15	0.00
Autoclave o esterilización eléctrico y de vapor. Deutsche modelo: ORS-200	día	caja/1 Und	1,325	0.74	15	11.04	0.15	0.11
Hotplates con agitador 11-300-49SHP (120V 60 hz)	día	caja/1 Und	789	0.44	15	6.58	0.15	0.07
Balanza Analítica (Ohaus)	día	caja/1 Und	1,575	0.88	15	13.13	0.15	0.13

Baño María 42°C	día	caja/1 Und	530	0.29	15	4.42	0.15	0.04
Refrigerador para reactivos. Fogel motor evaporador 115 V 60 hz	día	caja/1 Und	1,082	0.60	15	9.02	0.15	0.09
Bandeja de Tinción 12 1/4*7 3/4*2 1/4 Fisher Brand	día	paq/1 und	37.70	0.10	15	1.57	0.15	0.02
Estabilizador de energía	día	caja/1 Und	900.0	0.50	15	7.50	0.15	0.08
Vortex mixer de 120 V Serie 140522033 Fisher scientific	día	caja/1 Und	228.6	0.13	15	1.91	0.15	0.02
Dispensador de medios. thermo scientific (Botella con diámetro de 38 mm de 1 a 50ml)	día	caja/1 Und	360.4	0.20	15	3.00	0.15	0.03
Mesa de Trabajo individual	día	caja/1 Und	432	0.24	15	3.60	0.15	0.04
Reloj (eléctrico o de intervalos) y/o cronómetro	día	caja/1 Und	9.00	0.01	15	0.08	0.15	0.00
Computadora	día	caja/1 Und	900.00	0.50	15	7.50	0.15	0.08
Impresora laserjet Marca HP modelo P1102w 19 ppm 8MB 1200 DPI 110 V serie VND3Y10670	día	caja/1 Und	107.95	0.06	15	0.90	0.15	0.01
Aire acondicionado	día	caja/1 Und	1,463	0.81	15	12.19	0.15	0.12
SUBTOTAL US\$			36,139			305.06		3.05

Fuente: Existencias de insumos CNDR.

Tabla No 11: Mobiliario/ depreciación.

ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341								
NOMBRE DEL INSUMO	Unidad de Medida	Presentación	Costo Presentación US\$	Costo Unitario US\$	Requerimiento 100 Liófilos	Costo total US\$	Requerimiento por liófilo	Costo por liófilo US\$
Mobiliario/ Depreciación								
Escritorio	día	caja/1 Und	93.99	0.05	15	0.78	0.15	0.01
Silla secretarial	día	caja/1 Und	45.12	0.03	15	0.38	0.15	0.00
Silla de laboratorio	día	caja/1 Und	45.12	0.03	15	0.38	0.15	0.00
SUBTOTAL			184.3			1.54		0.02

Fuente: Existencias de insumos CNDR.

Tabla No 10: Recursos humanos

ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341								
NOMBRE DEL INSUMO	Unidad Medida	Presentación	Costo Presentación	Costo Unitario US\$	Requerimiento 100 Liófilos	Costo total US\$	Requerimiento por liófilo US\$	Costo por liófilo US\$
RECURSOS HUMANOS								
Especialista en salud (Lic. Químico – Farmacéutico)	día	mes	214	7.12	15	107	0.15	1.1
Técnico de laboratorio en salud (Lic. Bioanálisis o Lic. Químico – Farmacéutico)	día	mes	194	6.47	15	97	0.15	1.0
SUBTOTAL US\$			407.7			204		2.04

Fuente: Nomina de personal CNDR.

Tabla No 11: Servicios básicos

ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341								
NOMBRE DEL INSUMO	Unidad Medida	Presentación	Costo Presentación US\$	Costo Unitario US\$	Requerimiento 100 Liófilos	Costo total US\$	Requerimiento por liófilo	Costo por liófilo US\$
Servicios básicos								
Agua potable m ³	día	30	8.74	0.29	15	4.37	0.15	0.04
UBTOTAL US\$			8.74			4		0.04

Fuente: recibo de agua del CNDR.

Tabla No 12: Material de oficina

ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341								
NOMBRE DEL INSUMO	Unidad Medida	Presentación	Costo Presentación	Costo Unitario US\$	Requerimiento 100 Liófilos	Costo total US\$	Requerimiento por liófilo	Costo por liófilo US\$
MATERIAL DE OFICINA								
Cartucho HP C6578d 19 ml tricolor - 78 Impresora HP Laserjet 920C	und	Caja/1 und	38.1	3.18	1	3.18	0.01	0.03
Formato para resultado de análisis	und	Caja/100 und	0.03	0.0003	28	0.01	0.28	0.00
Lapicero	und	Caja/12 und	1.1	0.09	2	0.18	0.02	0.02
Calculadora	Und	Caja/1 und	8.2	0.69	1	0.69	0.01	0.01
Engrapadora	Und	Caja/1 und	8.3	0.69	1	0.69	0.01	0.01
Grapas estándar punta de cincel 26/6	Und	Caja/5000 und	0.6	0.05	1	0.05	0.01	0.00
Saca grapa	Und	Caja/1 und	0.8	0.07	1	0.07	0.01	0.00
Perforadora	Und	Caja/1 und	1.7	0.14	1	0.14	0.01	0.00
Regla plástica 30 cm	Und	Caja/100 und	0.1	0.12	28	3.36	0.28	0.03
SUBTOTAL US\$			59.0			8.37		0.8

Fuente: Existencias de insumos CNDR.

Costo energético para la implementación de la técnica de liofilización de la cepa *kocuria rizophilia* ATCC 9341.

Tabla No 13: Equipos/ consumo energético

ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341									
NOMBRE DEL INSUMO	V	A	W	KW	KWH	Requerimiento 100 Liófilos Hrs	Costo total US\$	Requerimiento por liófilo	Costo por liófilo US\$
EQUIPOS/ CONSUMO ENERGÉTICO									
Liofilizador Labconco-free zone "Triad" freeze-ury systems	220	12	2640	2.64	0.74	3	2.2176	0.03	0.022
Cabina de Bioseguridad Tipo II (120 V 8 A)código TB001284	120	8	960	0.96	0.27	1.5	0.4032	0.02	0.004
congelador -80 Fisher scientific Isotemp (120V 16 A)	120	16	1920	1.92	0.54	360	193.54	3.6	1.935
Incubadora para laboratorio (120 V 659 W) código TB001495 Serie 41656186 Isotemp	230	4	920	0.92	0.26	312	80.372	3.12	0.804
Microscopio Binocular con 4 objetivo individual 8	110	4	440	0.44	0.12	90	11.088	0.9	0.111

piezas Serie 3M40272 110 60hz									
Autoclave eléctrico y de vapor. Deutsche modelo: ORS-200	120	6	720	0.72	0.20	0.5	0.1008	0.00 5	0.001
Hotplates con agitador 11-300- 49SHP (120V 60 hz)	115	4	460	0.46	0.13	3	0.3864	0.03	0.004
Balanza Analítica (Ohaus)	110	1.5	165	0.16 5	0.05	0.25	0.0115 5	0.00 3	0.000
Baño María 42°C	120	8	960	0.96	0.27	3	0.8064	0.03	0.008
Refrigerador Fogel motor evaporador 115 V 60 hz	115	4	460	0.46	0.13	360	46.368	3.6	0.464
Vortex mixer de 120 V Serie 140522033 Fisher scientific	120	6	720	0.72	0.20	0.5	0.1008	0.00 5	0.001
Dispensador de medios. thermo scientific	115	1.5	173	0.17	0.05	2	0.0966	0.02	0.001
Aire acondicionado	115	1.5	173	0.17	0.05	360	17.388	3.6	0.174
SUBTOTAL US\$					3.00		353		3.53

Fuente: Existencias de insumos CNDR.

V: Voltios

A: Amperio

W: Watt

KW: Kilo watt

KWH: Kilo watt por hora

Hrs: horas

El costo del Kwh de cada equipo para la puesta en marcha de la tecnica de liofilización, está dado por la multiplicación del costo unitario del Kwh que es 0.28 US\$ por los Kwh que consume cada equipo respectivamente.

Insumos fijos y variables

Tabla No 14: Insumos fijos

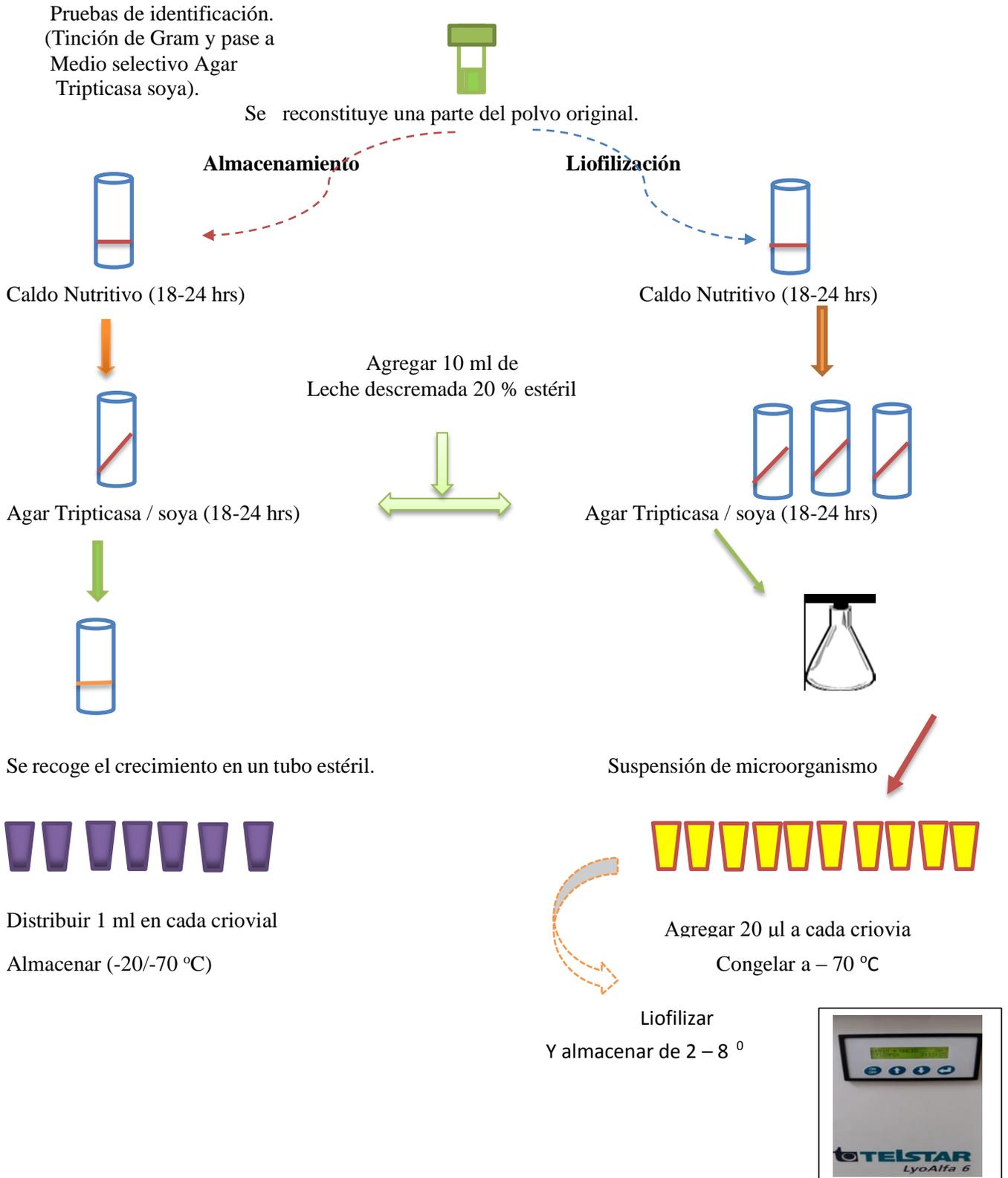
ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341			
INSUMOS FIJOS	COSTO POR PRESENTACIÓN US\$	COSTO TOTAL US\$	COSTO POR LIÓFILO US\$
RECURSOS HUMANOS	407.7	204	2.04
EQUIPOS/ DEPRECIACIÓN	36,139.20	305.1	3.05
CONSUMO ENERGÉTICO Kwh	353	353	3.53
AGUA POTABLE M³	8.74	4.4	0.04
MOBILIARIO/ DEPRECIACIÓN	184.23	1.54	0.02
MATERIAL DE OFICINA	59.02	8.37	0.08
T O T A L US\$	37,152	876	8.76

Tabla No 15: Insumos variables

ESTIMACION DE COSTOS EN US\$ PARA 100 VIALES LIOFILIZADOS DE LA CEPA <i>KOCURIA RHIZOPHILIA</i> ATCC 9341			
INSUMOS VARIABLES	COSTO POR PRESENTACIÓN US\$	COSTO TOTAL US\$	COSTO POR LIÓFILO US\$
REACTIVOS	369	40	0.4
SOLUCIONES	419	20	0.2
MATERIALES PARA PROCESAMIENTO DE LA CEPA	2,945	353	3.53
T O T A L US\$	3,733	413	4.13

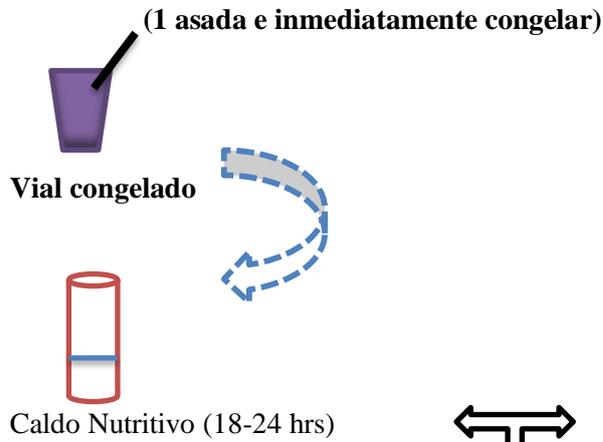
Pasos para la liofilización y almacenamiento de la cepa *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341.

Polvo liofilizado de cepa original *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341.

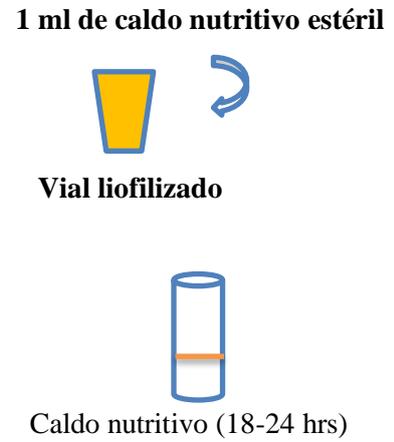


Recuperación de la cepa bacteriana *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341 del almacenado y liofilizado.

Recuperación almacenado.



Recuperación liofilizado.



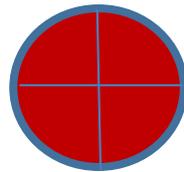
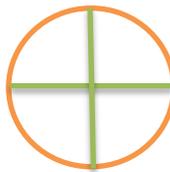
Pruebas de identificación

Viabilidad

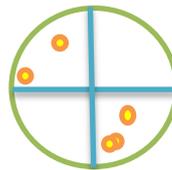
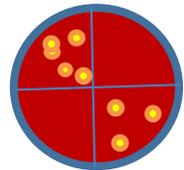
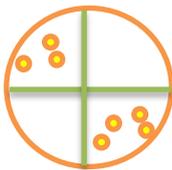
Pureza

Estabilidad

1- 6 meses.

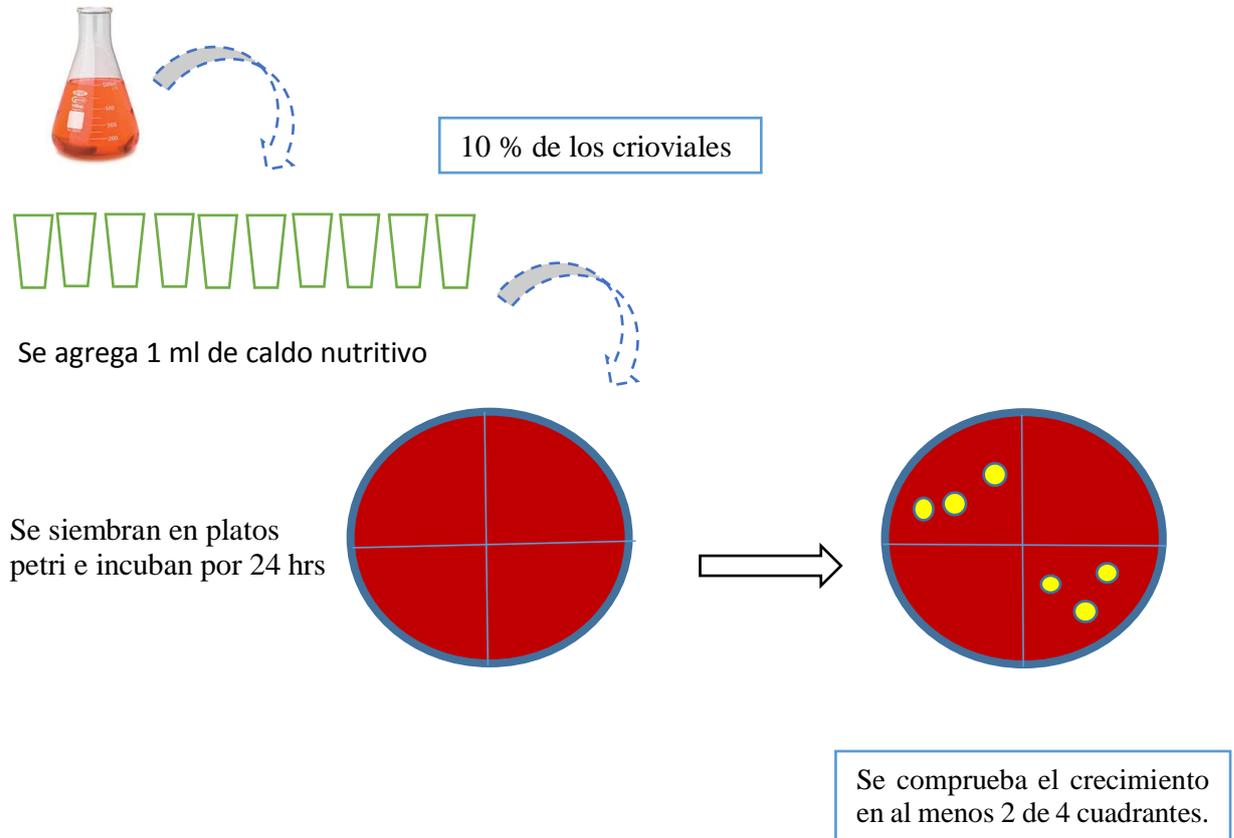


Se incuban 18 – 24 hrs,



Se verifica crecimiento en 2 de 4 cuadrantes

Esquema prueba de viabilidad de liofilizados.



Esquema prueba de Pureza de Liofilizados.

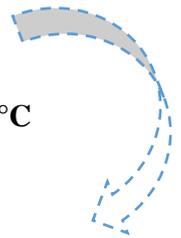
Alícuota Cepa USP y/o Liofilizados



Se le agrega 1 ml de C. N

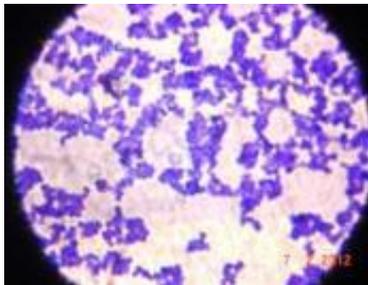


Paso a Medio Inclinado



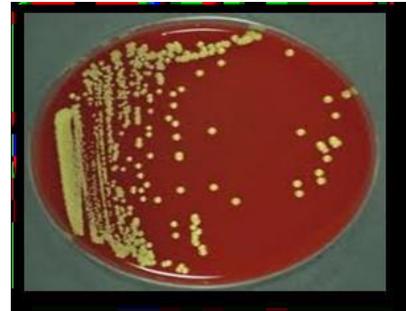
Incubar 24 a 37 °C

Incubar 24 h a 37 °C



Tinción de Gram

Micrococcus luteus



Agar Sangre de Carnero

Procedimiento de estabilidad acelerada de liofilizados:

1er día: Incubación de 7 crioviales sin reconstituir 37°C 24 horas.

2do día: Reconstitución 1° criovial e incubación 35°C 24 horas.

3er día: - Pase consecutivo con asa estéril del 1° criovial a plato Tripticasa Soya e incubación 35°C 24 horas.

- Reconstitución 2° criovial e incubación 35°C 24 horas.

4to día: -Lectura crecimiento 1° criovial.

- Pase consecutivo con asa estéril 2° criovial a plato Tripticasa Soya e incubación 35°C 24 horas.

- Reconstitución 3° criovial e incubación 35°C por 24 horas.

5to día: - Lectura crecimiento 2° criovial.

- Pase consecutivo con asa estéril 3° criovial a plato Tripticasa Soya e incubación 35°C por 24 horas.

- Reconstitución 4° criovial e incubación 35°C por 24 horas.

6to día: - Lectura crecimiento 3° criovial.

- Pase consecutivo con asa estéril 4° criovial a plato Tripticasa Soya e incubación 35°C 24 horas.

- Reconstitución 5° criovial e incubación 35°C por 24 horas.

7mo día: - Lectura crecimiento 4 ° criovial.

- Pase consecutivo con asa estéril 5° criovial plato Tripticasa Soya e incubación 35°C por 24 horas.

- Reconstitución 6° criovial e incubación 35°C por 24 horas.

8vo día: - Lectura crecimiento 5° criovial.

- Pase consecutivo con asa estéril 6° criovial a plato Tripticasa Soya e incubación 35°C 24 horas.

- Reconstitución 7° criovial e incubación 35°C por 24 horas.

9no día: - Lectura crecimiento 6 ° criovial.

- Pase consecutivo con asa estéril 7° criovial a plato Tripticasa Soya e incubación 35°C por 24 horas.

10mo día: - Lectura crecimiento 7° criovial.

Notas:

Para la reconstitución de los crioviales se utiliza 1 ml de Caldo Nutriente estéril.

Los platos de Tripticasa Soya previamente se dividen en 4 cuadrantes haciendo uso de bisturís estériles.

Insumos tinción de Gram.

Cristal Violeta 3 %



A: 2 g Cristal Violeta 3 %
20 mL alcohol.

B: 0.8 g Oxalato de Amonio
80 mL agua.

Cristal Violeta 3
100 mL solución.

Lugol 1%



1 g Yodo Resublimado
100 mL agua destilada.
solución.

2 g Yoduro de Potasio
100 mL agua destilada.

Lugol 1%
(Aforé) 300 mL

Safranina 0.25 %



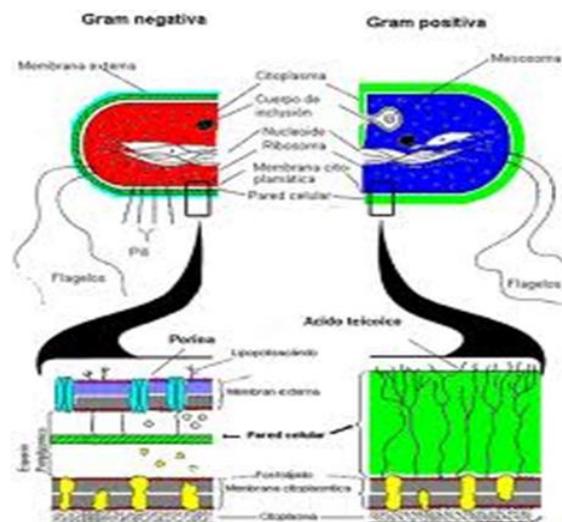
0,25 g Safranina
1mL alcohol
99 mL agua destilada

Safranina 0.25 %
100 mL solución

Alcohol Etílico 95 %

Procedimiento tinción de Gram.

- ✚ Agregar 2 gotas de agua destilada a cada lado del porta objeto. Homogenizar la muestra con el agua y extender.
- ✚ Dejar secar al aire, Fijar el frotis al calor de la llama.
- ✚ Adicionar por 1 minuto cristal violeta.
- ✚ lavar con agua y escurrir.
- ✚ Cubra con solución de lugol por 1 minuto de manera que cubra todo el extendido.
- ✚ Lave con agua y escurra.
- ✚ Decolore con alcohol etílico 95 % hasta que no aparezca color en el lavado. Escurra y seque la lámina.
- ✚ Adicionar por 30 segundos safranina, solo si la tinción es de contraste.
- ✚ Lave con agua, escurra y deje secar la preparación.
- ✚ Observar en el microscopio.



**Listado de cepas ATCC sugeridas para el control de calidad
microbiológico.**

Microorganismos	ATCC
<i>Campylobacter jejuni</i>	33290
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Escherichia coli</i>	35218
<i>Proteus vulgaris</i>	8482
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	27853
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028
<i>Shigella sonnei</i>	9290
<i>Shigella sonnei</i>	25911
<i>Shigella flexnerii</i>	12022
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Steptococcus pyogenes</i>	19615
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619
<i>Streptococcus faecalis</i>	19433
<i>Haemophilus influenzae</i>	49247
<i>Haemophilus influenzae</i>	49766
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	49226
<i>Micrococcus Luteus</i>	9341
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	43894
<i>Bacteroides fragilis</i>	23745
<i>Clostridium perfringes</i>	3624
<i>Clostridium sporogenes</i>	19404

Distribución salarial del personal de salud.

Mano de obra/ profesión.	Salario (córdobas)
Especialista en salud	Lic. Químico - farmacéutico
Salario básico	4,847.56
Condiciones anormales 20 % salario	969.51
Bono productivo	1225
Cotización	363
Salario neto	5,817
INSS patronal	17% del salario neto
Salario Total.	5,679.09

Fuente: Nómina de personal CNDR.

Mano de obra/ profesión.	Salario (córdobas)
Técnico de laboratorio en salud	Lic. Químico – farmacéutico o Lic. Bioanálisis
Salario básico	4,391.23
Condiciones anormales 20 % salario	878.23
Bono productivo	225
Cotización	329.33
Salario neto	4940.08
INSS patronal	17% del salario neto
Salario Total.	5,165.08

Fuente: Nómina de personal CNDR.

Ley de contrataciones administrativas del sector público.

Ley No. 737, aprobada el 19 de Octubre del 2010

Publicada en las Gacetas Nos.213 y 214 del 8 y 9 de Noviembre del 2010.

Capítulo I

Disposiciones generales.

Art.2 Definiciones.

Licitación: es el procedimiento administrativo de carácter concursal mediante el cual el órgano o entidad del sector público realiza un llamado público, convocando a los interesados para que, sujetándose al pliego de bases y condiciones, formulen propuestas, de entre las cuales seleccionara y aceptara la mejor oferta.

Mejor oferta: es la oferta que mejor se ajusta una vez aplicados los factores establecidos en el pliego de bases y condiciones. En el evento que el proceso de selección tenga por objeto un bien o servicio estandarizado y de común utilización, el único criterio de selección será el **menor precio ofrecido**.

Art.6 Principios que rigen la contratación administrativa.

5. Principio de vigencia tecnológica: los bienes, servicios o ejecución de obras deben reunir las condiciones de calidad y modernidad tecnológica necesarias para cumplir con efectividad los fines para los que son requeridos, desde el mismo momento en que son adquiridos o contratados, y por un determinado y razonable tiempo de duración, con posibilidad de adecuarse, integrarse y actualizarse, si fuera el caso de los avances científicos.

Capítulo IV

Procedimientos de contratación.

Sección primera

Disposiciones generales.

Art. 27 Procedimientos de contratación.

1. Por Licitación: Procedimientos de licitación son los siguientes:
 - a) Licitación pública: contrataciones que superen los tres millones de córdobas.
 - b) Licitación selectiva: contrataciones cuyos montos sean superiores a quinientos mil córdobas y hasta 3 millones de córdobas.
2. Contratación simplificada.
3. Contrataciones menores.
4. Por concurso.

Art. 28 Actualización de montos.

Los montos establecidos en el artículo precedente, serán actualizados por acuerdo ministerial emitidos por el ministerio de Hacienda y crédito público cada vez que la tasa de inflación acumulada, determinada por la autoridad competente, alcance un porcentaje del 10 % a partir de la entrada en vigencia de la presente ley.

Imágenes del liofilizador del CNDR.



CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Para resguardar la identidad de las personas de las cuales se tomó los datos para este estudio se formuló una serie de medidas para dicho fin entre ellas:

- ✚ En la entrevista de recolección de datos no se tomó el nombre ni dirección de las personas involucradas, solamente lleva el número que se le sea asignado durante la investigación.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO

ENTREVISTA



La siguiente entrevista está dirigida al personal administrativo y personal encargado del laboratorio, del Complejo Nacional de Salud Concepción Palacios, en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, con el objetivo de recopilar información de acerca de los equipos, personal, obtención de cepas bacterianas e infraestructura.

Entrevista # .

1. ¿Qué métodos de conservación de cepas se practica en el CNDR?
R:
2. ¿Se practica la liofilización en el CNDR?
R:
3. ¿Desde cuándo se practica la liofilización en el CNDR?
R:
4. ¿Que se liofiliza en el CNDR?
R:
5. ¿Se cuenta en el CNDR con los equipos necesario para realizar la liofilización?
R:
6. ¿Se cuenta en el CNDR con el personal necesario para realizar la liofilización?
R:
7. ¿Cuánto personal se necesita para llevar a cabo todo el proceso de liofilización?
R:
8. ¿Se cuenta en el CNDR con la infraestructura y niveles de bioseguridad necesarios para realizar la liofilización?
R:
9. ¿En dónde se almacenan los liófilos?
R:
10. ¿Cómo se descartan los desechos?
R:
11. ¿Cómo se obtiene las cepas?
R:
12. ¿Las cepas bacterianas se encuentran disponibles en todo momento para su uso?
R:

Firma.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA

RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO



ENTREVISTA

La siguiente entrevista está dirigida al personal administrativo y personal encargado del laboratorio, del Complejo Nacional de Salud Concepción Palacios, en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, con el objetivo de recopilar información de acerca de los equipos, personal, obtención de cepas bacterianas e infraestructura.

1. ¿Qué métodos de conservación de cepas se practica en el CNDR?
R: Subcultivo, mantenimiento con aceite mineral, crio preservación, liofilización.
2. Se practica la liofilización en el CNDR?
R: Si
3. ¿Desde cuándo se practica la liofilización en el CNDR?
R: desde el año 2000.
4. ¿Que se liofiliza en el CNDR?
R: se liofiliza en el área de virología antigena para diagnóstico de dengue, antígeno de línea celular para influenza y dengue. También se liofilizan en el área de parasitología, cepas de bacterias, sueros de salmonella, brucella, E coli, leptospira, chagas, leishmania, riketsia. Se liofiliza no para control microbiológico, sino para fines de investigación.
5. ¿Se cuenta en el CNDR con los equipos necesario para realizar la liofilización?
R: Si.
6. ¿Se cuenta en el CNDR con el personal necesario para realizar la liofilización?
R: Si.
7. ¿Cuánto personal se necesita para llevar a cabo todo el proceso de liofilización?
R: Se requieren 2 o 3 recursos, dependiendo de la cantidad de lotes a liofilizar.
8. ¿Se cuenta en el CNDR con la infraestructura y niveles de bioseguridad necesarios para realizar la liofilización?
R: Si.
9. ¿En dónde se almacenan los liófilos?
R: Se almacena en congelador Se almacena a temperatura ambiente.
10. ¿Cómo se descartan los desechos?
R: Se esterilizan en autoclaves para su posterior descarte.
11. ¿Cómo se obtiene las cepas?
R: A través de donaciones por parte de la OPS, para fines de investigación y por medio de instituto de investigación.
12. ¿Las cepas bacterianas se encuentran disponibles en todo momento para su uso?
R: No, en algunas ocasiones hay carencia de los reactivos biológicos, por esta razón no están disponibles en todo momento.

Firma.

GLOSARIO

ACB: análisis de costo beneficio.

Costo: es un término asociado para medir los esfuerzos asociados con la fabricación de un bien o la prestación de un servicio. Representa el valor monetario del material, mano de obra y gastos generales empleados. No existe ningún “costo verdadero” de un bien o servicio. Los costos incurridos para todos los productos o servicios se deben distribuir entre los mismos. Es posible que dos analistas no lleguen a la misma distribución de costos cuando existe más de un producto o servicio. Al referirse a los costos, se incluye la valoración en términos monetarios de todos los recursos relevantes implicados en el uso de las tecnologías por evaluar.

CNDR: Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia.

Esterilización: eliminación del número total de microorganismos de una superficie, solución, etc.

Incubar: dejar los cultivos reposar en un tiempo pertinente y en condiciones determinantes para el crecimiento de los microorganismos.

Insumos: son todos los materiales, equipos, Personal, infraestructura, etc., que se requieren para la producción o puesta en marcha de un bien o servicio.

LNCCM: Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos.

Nivel Oficial: se considera como nivel oficial el laboratorio nacional de control de calidad de medicamentos.

MINSA: Ministerio de Salud.