

78
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"INFLUENCIA DE ALGUNOS FACTORES FISICOS Y
QUIMICOS QUE AFECTAN LA POTENCIA DEL PPD"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

MARIO LUNA HERNANDEZ



México, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
CAPITULO I	
GENERALIDADES	3
OBJETIVO	14
CAPITULO II	
MATERIAL Y METODOS	15
CAPITULO III	
CALCULO DE POTENCIA DEL PPD.	21
CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSION	33
CAPITULO V	
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFIA	52
ANEXOS.....	55

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El presente trabajo se enfocó básicamente en realizar una pequeña parte del exhaustivo control de calidad a que son sometidos los biológicos producidos en el Instituto Nacional de Higiene (INH).

Para este caso particular el biológico al cual se le aplicó dicho control es el PPD (derivado proteínico purificado) destinado a la prueba de Mantoux.

El control que se realizó a este producto consistió en efectuar determinaciones de potencia al término de su envasado, ya que este producto se recibe a una concentración de 50,000 UT/ml y el Instituto lo envasa y distribuye a una concentración mínima de 2 UT/0.1 ml.

Para llevar acabo dicho control se tomaron en cuenta factores Físicos como temperatura, tipo de envase y Químicos: variación en la composición del PPD.

Se efectuaron determinaciones de potencia cada mes durante seis meses (que es el tiempo de caducidad de este producto) utilizando los métodos y cálculos que se explican más adelante y que fueron motivo de estudio y discusión en este trabajo.

CAPITULO I
GENERALIDADES

GENERALIDADES

- 1.- ANTECEDENTES HISTORICOS
- 2.- DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS
- 3.- TUBERCULINA ANTIGUA Y PPD.
- 4.- METODO DE PRODUCCION DEL PPD.

GENERALIDADES

1.- ANTECEDENTES HISTORICOS

El hallazgo de tuberculosis evidente en los huesos de algunas momias egipcias indican que la tuberculosis es una enfermedad antigua. Es una enfermedad característica de las civilizaciones donde la gente vive hacinada en condiciones subóptimas de higiene.

Los hechos más evidentes de la existencia de la tuberculosis desde la antigüedad más remota se conoce por las exploraciones arqueológicas que han permitido descubrir momias con cifosis, así como huesos humanos y de animales con alteraciones que pueden considerarse de origen tuberculoso.

Se sabe que los chinos e hindúes antiguos curaban a los tuberculosos mediante reposo y tratamiento higiénico dietético. Entre los hindúes era llamada "enfermedad real".(1)

De los antiguos pueblos de la Mesopotamia datan las primeras descripciones de las diversas enfermedades, en una mezcla de racionalismo empírico y misticismo curativo.

Lo que ahora designamos tuberculosis era atribuido por los médicos asirios y babilónicos al demonio Asakku, y

sus síntomas los describían con exactitud;

El enfermo tose frecuentemente, su esputo es espeso y algunas veces contiene sangre, la respiración da sonido de flauta, suda mucho y el corazón está muy inquieto.

Sólo se tiene un conocimiento más profundo cuando llegamos a Hipócrates, el primer médico que describió con evidente sagacidad clínica la evolución de la tuberculosis al señalar sus síntomas, hasta llegar a la caquexia (la tisis o consumación) provocada por una "úlceras del pulmón".

El padre de la medicina aplicó el nombre de tisis a la enfermedad con el significado de "consumación" y consideraba que era incurable.

Fracastorius llegó a algunas conclusiones de notable precisión en lo que se refiere a la naturaleza infecciosa de la tuberculosis y su mecanismo de transmisión; pero no fue sino hasta 1863 cuando Villemin transmitió la enfermedad del hombre a los conejos.

Tal vez Baumgarten viera el bacilo en los tejidos infectados en 1878, pero el descubrimiento de la causa de la tuberculosis se debe a Roberto Koch, quien aisló el bacilo tuberculoso en 1882. Koch encontró el bacilo asociado constan-

temente con la enfermedad, lo aisló en cultivo puro, reprodujo la enfermedad en conejos y cobayos con el cultivo (1).

Después de numerosos intentos, Roberto Koch pudo al fin descubrir el germen de la tuberculosis, aislarlo y reproducir la enfermedad en conejos, el 24 de marzo de 1882. En la sociedad de Fisiología de Berlín dió a conocer su sensacional descubrimiento, que motivó especulaciones en todo el mundo. Los postulados de Koch quedaron como base de la investigación bacteriológica (2).

Koch describió en 1861 el fenómeno que lleva su nombre demostró que el principio activo de la tuberculina es una proteína y todas las investigaciones posteriores sobre su naturaleza química han confirmado esta opinión.

Fenómeno de Koch: Si un cabayo normal es inoculado subcutáneamente con cierta cantidad de bacilos tuberculosos, ningún cambio de importancia se produce en el lugar de la inyección hasta que han transcurrido de 10 a 15 días, en este momento aparece bajo la piel un nódulo que crece lentamente y se ulcera a través de la epidermis. Los ganglios linfáticos correspondientes se hipertrofian, la enfermedad se extiende por todo el organismo y la úlcera no ha curado cuando el animal muere.

Si la misma cantidad de bacilos tuberculosos es inoculada de modo semejante a un animal tuberculoso, aparece en el lugar de la inoculación y dentro de 24 horas una inflamación intensa, con induración y hemorragia, que rápidamente se necrosa eliminándose la escara y curando por completo la lesión.

Los ganglios linfáticos correspondientes no llegan a ser afectados (1,4).

TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa debida a Mycobacterium tuberculosis. La enfermedad, como lo indica su nombre, está caracterizada por la formación de nódulos tuberculosos en los tejidos infectados.

La tuberculosis en el hombre es producida por los tipos humano y bovino del bacilo tuberculoso; el hombre no es receptivo al bacilo tuberculoso de las aves ni a los gérmenes que producen la tuberculosis en los animales de sangre fría.

Los bacilos tuberculosos humanos están caracterizados por su capacidad para infectar prácticamente cualquier órgano o tejido del organismo, por lo que la tuberculosis es una enfermedad que se encuentra en todas las especialidades de

la medicina.

Indiscutiblemente el mecanismo más importante de la transmisión de la tuberculosis humana es por inhalación de los bacilos en el polvo, o por contacto con individuos tuberculosos a través de la infección por gotitas en los actos de toser y estornudar. Otra fuente importante de infección es por ingestión, especialmente de leche o productos lácteos, la leche de vacas tuberculosas puede contener bacilos del tipo bovino, en particular cuando existe lesión en las ubres. El peligro de esta forma de infección es mayor cuando se emplea leche cruda procedente de vacas no inspeccionadas.

La existencia de portadores crónicos en tuberculosis puede ser admitida como una fuente de infección tratándose de individuos que no se sienten enfermos, pero que tienen una lesión activa y expectoran gérmenes.

MYCOBACTERIUM

El género Mycobacterium comprende un gran número de bacilos inmóviles, no esporulados, ácido-alcohol-resistentes que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Su habitat también es muy variado.

A continuación se presentan algunas especies patógenas

de Mycobacterium.

MICROORGANISMO	PADECIMIENTO
<u>M. leprae</u>	Lepra humana
<u>M. lepraemurium</u>	Lepra murina
<u>M. tuberculosis</u>	Tuberculosis humana.
<u>M. bovis</u>	Tuberculosis en bovinos y humanos.
<u>M. avium</u>	Tuberculosis en aves y cerdos.

2. DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS.

Para hacer el diagnóstico de tuberculosis se puede hacer uso de los métodos siguientes:

- a.- Frote
- b.- Cultivo
- c.- Tuberculino-reacción (PPD).

EL FROTE

El frote o baciloscopia directa para demostrar por tinción la presencia de los bacilos ácido-resistentes, es

el método más sencillo, rápido y económico; su resultado puede obtenerse en media hora. Requiere la selección del producto por examinar y la observación cuidadosa al microscopio. La tinción que se sigue habitualmente es la Ziehl Neelsen.

Se han usado distintas escalas para valorar el número de bacilos encontrados, por ejemplo, la escala de Gaffky, que señala en promedio el número de bacilos por campo. Otros más sencillos sólo valoran en cruces la apreciación global de escasez o abundancia de bacilos en la preparación.

La comisión de la American Tuberculosis Society recomienda la siguiente escala: Negativo, no se encuentran bacilos o cuando mucho una forma en toda la preparación, raros (X) de tres a nueve bacilos en toda la preparación, muchos (XX) de diez o más bacilos en toda la preparación, incontables (XXX) diez o más bacilos en cada campo.

En realidad lo que importa es que el resultado de la investigación del bacilo sea positivo o negativo.

Nunca podrá decirse categóricamente después del examen de un simple frote, que el bacilo ácido resistente que vemos es el bacilo tuberculoso, puesto que morfológicamente son idénticos a muchos saprófitos presentes en los productos por examinar. Debemos aunar el resultado al cuadro clínico y

al estudio radiológico.

CULTIVO

Para ayudar a la identificación de los bacilos observados y conocer su viabilidad, procedemos en segundo término a efectuar el cultivo.

En la práctica es necesario tratar los productos con métodos especiales de homogeneización y asilamiento, puesto que habitualmente son productos mucosos, purulentos o con gran cantidad de detritos y por ende contaminados por extensa flora agregada. Usando al método del hidróxido de sodio o del ácido sulfúrico para homogeneizar los productos. Actualmente se están usando algunas sustancias tales como:

N-acetil-L-cistín-NaOH, Zefirán-Fosfato trisódico, ácido oxálico, Cloruro de cetil piridinio (14,24).

RESULTADOS

Positivo, si aparece desarrollo del germen sobre la superficie; se anota como positivo y se describen las características de las colonias; pigmentadas (R) o sin pigmentación (S).

NEGATIVO

Se considera como negativo si no se aprecia desarrollo del germen en un plazo máximo de ocho semanas.

TUBERCULINO REACCION (PPD)

El producto que se emplea para efectuar la prueba tuberculínica es el derivado proteínico purificado de la tuberculina, conocido como PPD. El método de aplicación de la tuberculina es el intracutáneo (prueba de Mantoux) se recomienda como sitio de elección la cara anterior y externa del tercio superior del antebrazo. Se efectúa la inyección (0.1 ml) obteniéndose una pápula redondeada, de 8 a 10 milímetros de diámetro.

Una reacción positiva es aquella que, transcurridos cuarenta y ocho horas, presenta edema y un endurecimiento de 10 mm de diámetro; si la reacción es negativa no existe edema (1).

3. TUBERCULINA ANTIGUA (OT) y PPD.

Las primeras tuberculinas que se prepararon precedían del producto de la autólisis de los bacilos tuberculosos; la tuberculina es el líquido claro que queda en un cultivo

en que el bacilo de Koch ha crecido, después de que se ha filtrado y concentrado el líquido (4).

Tuberculina antigua (OT), es la tuberculina original de Koch y es considerada por muchos como la variedad más útil para el diagnóstico y tratamiento (11). Fué preparada originalmente cultivando durante 6 a 8 semanas bacilos tuberculosos en caldo glicerinado al 5%, y sometido éste a corriente de vapor en baño maría para estandarizarlo y concentrarlo hasta un décimo del volumen original. Los bacilos muertos son separados por filtración. Este filtrado o tuberculina bruta se calcula a groso modo que contiene un miligramo de tuberculina por centímetro cúbico a partir de ella y sobre esta base, se calculan las diluciones que se usan con fines diagnósticos o de tratamiento. Cada nuevo lote de tuberculina bruta es titulado y estandarizado.

Los preparados más antiguos de tuberculina, tales como la tuberculina antigua de Koch, tienen algunas desventajas; son muy difíciles de estandarizar, tienden a perder su potencia cuando se diluyen y a menudo contienen productos bacterianos inespecíficos que son irritantes.

Después de varias modificaciones introducidas clínicamente, Seibert logró finalmente éxito preparando una tuberculina estable conocida con el nombre de "derivado proteínico

purificado (PPD)", a partir de cultivos de 3 cepas de tipo humano crecidas en medio sintético exento de proteínas (4).

Actualmente se ha obtenido un derivado proteínico purificado que se conoce con el nombre de PPD, que es posible titular, por comparación con un patrón en Unidades de Tuberculina (UT), para lo cual se usa un patrón internacional de tuberculina purificada denominada RT23 preparado por el Statens Seruminstitut de Copenhague Dinamarca, que facilita gratuitamente muestras a cuantos laboratorios nacionales de control u otros laboratorios competentes las soliciten (13).

4. METODO DE PRODUCCION DEL PPD.

El derivado proteínico purificado de tuberculina se prepara con las fracciones hidrosolubles obtenidas por extracción ulterior de los cultivos del bacilo tuberculoso en un medio sintético líquido. La fracción activa del filtrado, que es sobretodo proteínica, se aísla por precipitación, se lava y se redisuelve. La preparación se puede distribuir en forma desecada o líquida. Las determinaciones de actividad se harán por comparación con el patrón internacional correspondiente (4).

OBJETIVO

Hacer un estudio preliminar para conocer el efecto de algunos factores Químicos (variación de componentes en la formulación de PPD) y Físico (temperatura y tipo de envase) sobre la potencia del PPD, mediante la realización de pruebas de potencia en cada uno de los casos señalados para este producto, para poder así establecer las condiciones óptimas para la formulación y asegurar que la potencia esté dentro de lo establecido por las normas de la Organización Mundial de la Salud y que su estabilidad sea satisfactoria.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

- Cobayos de 250 a 350 gramos de peso inicial al momento de ser sensibilizados con vacuna BCG.
- Frascos viales de 10 ml (estériles).
- Gradillas de alambre para 75 tubos de 16x150 mm.
- Jeringas para insulina y de 3 ml con agujas de 22x32.
- Pipetas de 0.1 1,2 y 10 ml (estériles).
- Tubos de 16x150 mm (estériles).
- Vernier.

METODOS

Cada lote de producción de PPD se comparó con el correspondiente PPD de referencia (PPD lote RT23 proporcionado por el Centro Panamericano de Zoonosis) en cobayos que previamente han sido sensibilizados; para determinar su actividad relativa, en cada ensayo se emplearon no menos de seis cobayos con peso entre 400 y 600 g., peso que han desarrollado desde la sensibilización con vacuna BCG hasta el momento de la prueba (12).

PRUEBA DE POTENCIA DEL PPD (TUBERCULINA)

La prueba se lleva a cabo en dos etapas.

Primera etapa: sensibilización de cobayos, por inoculación intramuscular con la vacuna BCG (Cultivo desecado de bacilos vivos de Calmette-Guerin cepa danesa 1331).

Segunda etapa: probar actividad del PPD (reacción dérmica) en cobayos con no menos de 3 semanas de haber sido sensibilizados.

Sensibilización: Se inocula intramuscularmente a los cobayos destinados a esta prueba con 0.5 ml. de vacuna BCG a una concentración de 2 mg. por 0.5 ml.

Prueba de potencia: Esta segunda etapa se llevó a cabo en cuatro fases:

- 1.- Preparación del animal de prueba.
- 2.- Preparación de las diluciones del PPD de prueba y referencia.
- 3.- Probar la actividad del PPD en cobayos sensibilizados (reacción dérica).
- 4.- Lectura de la reacción (medición de los diámetros del eritema formado) y cálculo de potencia del PPD en base a los diámetros de reacción obtenidos para cada caso.

PRUEBA DE POTENCIA DEL PPD.

- 1.- Preparación del animal de prueba.

Los cobayos destinados a esta prueba deben tener 3 semanas como mínimo de haber sido sensibilizados.

Los cobayos fueron depilados con ayuda de una rasadora eléctrica, en ambos flancos y en la parte superior del animal. Con un plumón se trazó un cuadrículado, de tal manera que en cada costado del cobayo se tienen cuatro cuadros.

Esto se hace momentos antes de la prueba.

2.- Preparación de las diluciones del PPD de prueba y estándar:

El PPD usado como referencia es proporcionado por el Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO) derivado del estándar Internacional de Copenhague y es el PPD lote RT23 concentrado (50,000 UT/ml) éste debe ser diluido (amortiguador de fosfatos) hasta una concentración de 2 UT/0.1 ml.

El PPD de prueba (envasado en el Instituto Nacional de Higiene) se presenta a una concentración mínima de 2 UT/0.1 ml, para este caso ya no es necesario diluir como se hizo con el PPD de referencia.

En el momento en que se va a realizar la prueba se preparan diluciones 1:2, 1:4 y 1:8 del PPD de prueba y referencia, que contenga 2 UT para el concentrado y 1, 0.5 y 0.25 UT/0.1 ml para cada una de las diluciones correspondientes, teniendo cuidado de que las diluciones del PPD no queden expuestas a la luz (para ello se forran los tubos con papel aluminio), de esta forma se tienen listos el PPD de referencia y el de prueba para la valoración de potencia de este producto.

3.- Probar la actividad del PPD en cobayos sensibili-

zados (reacción dérmica).

El cobayo que previamente ha sido depilado y cuadrículado, se inocula con jeringa para insulina con 0.2 ml del PPD por vía intradérmica en el siguiente orden:

Primeramente se inocula la dilución mayor (1:8) del PPD a valorar que tiene una concentración de 0.25 UT/0.1 ml, empezando por el flanco derecho y por la cola, en el siguiente cuadro, en dirección cola cabeza, se inocula el PPD de referencia (0.2 ml por vía intradérmica) dilución 1:8 de concentración 0.25 UT/0.1 ml. De la misma manera se continúa con las demás diluciones 1:4 1:2 y el concentrado, cuyas concentraciones son 0.5, 1 y 2 UT/0.1 ml respectivamente. Inoculando primeramente el PPD a valorar y en seguida el PPD de referencia, de esta manera el costado derecho se termina de inocular con la dilución 1:4 del PPD de referencia. El costado izquierdo se empieza a inocular en dirección cabeza-cola con la dilución 1:2 del PPD a valorar, finalizando en la cola con el PPD concentrado usado como referencia que tiene una concentración de 2 UT/0.1 ml.

Para cada control se emplearon 6 cobayos entre las 3 y 6 semanas de haber sido sensibilizados.

4.- Lectura de la reacción:

La lectura de la reacción se efectúa a las 24 horas, mediante la medición de los diámetros del eritema formado, esta medición se realiza con ayuda de un vernier, la lectura se registra en milímetros.

CAPITULO III

CALCULO DE POTENCIA DEL P.P.D.

CALCULO DE POTENCIA DEL P.P.D.

Cálculo de la valoración biológica en cobayos de la actividad relativa de un PPD.

1. NOTACION.

r = preparación de referencia

p = preparación en prueba

N = número de lecturas

x = log. dosis.

y = respuesta en mm a las inoculaciones

Σx = suma de las x

Σy = suma de las y

$$\bar{X} = \frac{x}{N} = \text{promedio de la } x$$

$$\bar{Y} = \frac{y}{N} = \text{promedio de la } y$$

2. CALCULO DE LAS RECTAS AJUSTADAS POR EL METODO DE CUADRADOS MINIMOS.

Con los datos obtenidos (lectura de las reacciones tuberculínicas en los cobayos expresada en mm) y usando el método de cuadrados mínimos se pueden calcular dos rectas

ajustadas a los puntos observados, estas rectas reúnen ciertas condiciones deseables desde el punto de vista estadístico: la principal es que la suma de las distancias verticales de cada punto a la recta elevadas al cuadrado, es la mínima posible.

La recta tiene una ecuación general de la siguiente forma:

$$y = a + bx$$

El coeficiente "a" indica la altura de la recta cuando x es 0, es decir en el origen de los ejes de coordenadas. El coeficiente "b" indica el cambio de "y" por cada unidad de "x".

Para este caso particular se usará una ecuación equivalente:

$$y = \bar{y} + b(x - \bar{x})$$

La ecuación de regresión lineal para el PPD de referencia en el intervalo de dosis es:

$$Y_r = Y_r + b_r (x - x_r)$$

La ecuación de regresión lineal para el PPD problema es:

$$Y_p = Y_p + b_p (x - x_p)$$

Cuando las rectas de regresión de los PPD de referencia y en prueba tienen el mismo coeficiente de regresión, se dice que son paralelas.

Con pruebas estadísticas adecuadas se pueden evaluar cada una de las características siguientes, consideradas indispensables para que la valoración biológica sea válida (12).

3. VALIDACION E INTERPRETACION DE LA PRUEBA DE POTENCIA DEL PPD.

a.- Preparaciones: diferencia entre las medidas del PPD_r y PPp'

Criterio: el resultado debe ser menor que el valor crítico de $F = 4.17$.

Interpretación: las reacciones tuberculínicas promedio correspondientes a las dos preparaciones son similares.

Conclusiones: satisface la condición "preparaciones"

si

no

b.- Regresión o pediente: comparación con la horizontal.

Criterio: el resultado debe ser altamente significativo, mayor que el valor crítico de $F=7.56$

Interpretación: la pendiente de la línea de regresión discrimina fácilmente el efecto dosis respuesta.

Conclusiones: satisface la condición "regresión"

si

no

c.- Paralelismo: "similaridad" condición necesaria para poder calcular la actividad relativa.

Criterio: el resultado debe ser menor que el valor crítico de $F= 4.17$.

Interpretación: la línea recta de la muestra problema es paralela a la línea correspondiente al patrón de referencia.

Conclusiones: satisface la condición de paralelismo

si

no

d.- Linealidad: desviación de los puntos observados con respecto a la recta.

Criterio: el resultado debe ser menor que el valor crítico de $F = 3.32$.

Interpretación: Para cada preparación la relación existente entre el logaritmo de la dosis y la respuesta tuberculínica en el cobayo puede ser representada por una línea recta.

Conclusiones: satisface la condición linealidad

si

no

CALCULO DE LA POTENCIA DEL PPD

La potencia del PPD se calcula mediante el método de análisis de líneas paralelas.

El calculo se puede realizar por dos métodos:

a.- Método del programa diseñado para la calculadora Texas Instrument (T1-59), tomando como base los puntos 1 a 3 ya explicados.

b.- Método gráfico.

El método "a" fue el utilizado para el cálculo de la potencia del PPD en este trabajo.

METODO DEL PROGRAMA DISEÑADO PARA LA CALCULADORA TEXAS INSTRUMENT (T1-59).

En este método se hace uso de las mediciones registradas (diámetros de reacción).

FORMA DE USAR LA CALCULADORA.

Seguir los pasos indicados en la hoja para prueba de potencia del PPD:

Conectar, introducir la tarjeta marcada como T-1 a la calculadora, en la pantalla aparecerá el número 1.

Oprimir la tecla marcada como "CLR", enseguida se introduce la tarjeta marcada como T-2, en la pantalla aparecerá el número 2. Ahora todo se encuentra listo para introducir

los datos a la calculadora (diámetros de reacción). Entran primero los datos correspondientes al PPD de referencia comenzando con los valores del PPD concentrado y terminado con el PPD diluido. Enseguida los datos que corresponden al PPD que se va a valorar, los valores del PPD concentrado usado como referencia entran a la calculadora con la clave "1A", los datos entran a la calculadora conforme a su valor (diámetros de reacción) oprimiendo la tecla correspondiente al número que se desea registrar, para ello se oprime la tecla macada como "RS" antes y después de cada registro. Una vez que se ha registrado los datos del PPD concentrado se continua con el PPD diluido siguiendo la metodología ya explicada. Los datos (diámetros de reacción correspondientes a cada dilución) entran a la calculadora con la clave "2A" y "3A" respectivamente.

Una vez terminado con el PPD de referencia se continúa con los datos correspondientes al PPD a valorar, siguiendo la misma metodología que para el PPD de referencia, los datos entran con las claves "4A", "5A" y "6A" para el PPD concentrado y diluido 1:2 y 1:4 respectivamente.

Verificar si los valores registrados son los correctos esto se hace con ayuda de la tecla marcada como R/S, se oprime

PRUEBA DE POTENCIA DE PPD

Análisis de líneas paralelas, calculadora programable TI-59.

- 1) Conctar 2) Introducir la tarjeta marcada como T-1 3) Oprimir la tecla marcada como "CLR" 4) Introducir la tarjeta marcada como T-2 5) Introducir los datos a la calculadora.

REFERENCIA

1	A	11	R/S	10	R/S	9	R/S	11	R/S	10	R/S	10
2	A	9	R/S	9	R/S	8	R/S	9	R/S	9	R/S	9
3	A	8	R/S	8	R/S	7	R/S	8	R/S	8	R/S	8

LOTE: PPD Normal Etapa Inicial

4	A	11	R/S	11	R/S	9	R/S	11	R/S	11	R/S	11
5	A	9	R/S	9	R/S	8	R/S	10	R/S	9	R/S	9
6	A	8	R/S	8	R/S	7	R/S	9	R/S	8	R/S	8

- 6) Verificar con la tecla marcada como R/S los valores registrados.
 7) Oprimir la tecla marcada con la letra "B" aparece el cero en la pantalla 8) Introducir la tarjeta marcada como T-3 9) Oprimir la tecla marcada como "CLR" 10) Introducir la tarjeta marcada como T-4.

11) RESULTADOS		R/S (regresión)	=	95.07
C (Y_s)	= 8.94	R/S (paralelismo)	=	0.42
R/S (b_s pendiente)	= 1.16	R/S (linealidad)	=	0.70
R/S (Y_t)	= 9.22	E (potencia relativa)	=	1.1665
R/S (b_t = pendiente)	= 1.66	R/S (límite superior)	=	1.15
		R/s (límite inferior)	=	0.92
Análisis de varianza		RESULTADO:	<u>2.33 UT/O.1 ml.</u>	

D (preparaciones) = 1.76

la tecla en la pantalla aparecen los valores que hemos registrado en caso de que algún valor no corresponda al deseado se empezará nuevamente con el registro de valores como se explicó al principio. Una vez que se han verificado los valores, oprimir la tecla marcada con la letra "B", se espera aviso de pantalla (aparece el cero en la pantalla).

Introducir la tarjeta "3" a la calculadora (aparecerá el número 1 en la pantalla) oprimir la tecla marcada como "CLR" introducir la tarjeta marcada como "T4" (aparecerá al número 2 en la pantalla). Todo se encuentra listo para obtener el valor de la potencia del PPD a valorar y sus demás parámetros oprimiendo la tecla correspondiente.

El ejemplo tomado corresponde al PPD normal en la etapa inicial.

METODO GRAFICO

En este método se obtienen los diámetros de reacción promedio de cada una de las diluciones y el concentrado, tanto para el PPD estándar como para el PPD de prueba.

Trazar un sistema de coordenadas, indicando en el eje vertical los diámetros promedio, y en el eje horizontal

el logaritmo de la dosis empleada, graficar los puntos (dosis contra respuesta) al unir los puntos se obtienen las rectas del PPD de referencia y de prueba, se establece el punto correspondiente al diámetro medio obtenido con el PPD de prueba con el valor del punto medio se interpola en la gráfica la dosis que corresponde al PPD referencia y de prueba.

En la figura 1 se muestra el método gráfico se tomó como ejemplo el PPD normal en la etapa inicial, al igual que en el método "a" descrito anteriormente.

DATOS PARA GRAFICAR.

PPD de referencia	Diámetros medios (milímetros)	Logaritmo decimal	(UT)
PPD concentrado -----	11.83 -----	0.60	
PPD diluido 1:2 -----	10.33 -----	0.30	
PPD diluido 1:4 -----	8.33 -----	0.00	

PPD a valorar	Diámetros medios (milímetros)	Logaritmo decimal	(UT)
PPD concentrado -----	12.16 -----	0.60	
PPD diluido 1:2 -----	10.60 -----	0.30	
PPD diluido 1:4 -----	9.33 -----	0.00	

Diámetro medio del PPD de prueba ----- 10.71 mm

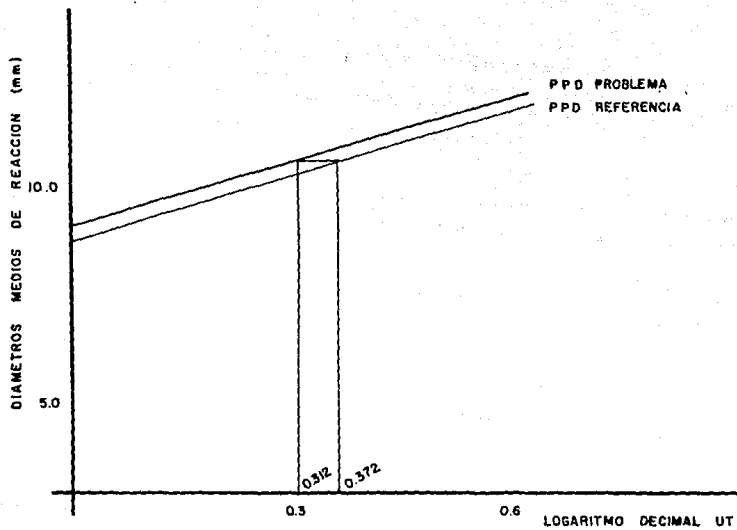


FIGURA I. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD RELATIVA DEL PPD PROBLEMA POR EL METODO GRAFICO

Con el valor del diámetro medio (10.71 mm) del PPD a valorar, se interpola en la gráfica la dosis que corresponde al PPD de referencia y de prueba.

Valores de PPD de referencia y PPD de prueba obtenidos de la gráfica.

PPD referencia ----- 0.372

PPD problema ----- 0.312

La potencia relativa del PPD a valorar se calcula con la siguiente relación:

$$\text{Pot. relativa} = \frac{\text{Dosis PPD referencia}}{\text{Dosis PPD problema}} \times 100$$

$$\text{Potencia relativa} = \frac{0.372}{0.312} \times 100$$

$$\underline{\text{Potencia relativa} = 2.38 \text{ UT}/0.1 \text{ ml}}$$

CAPITULO IV

RESULTADOS

Y

DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

EFECTO DE LA VALORACION DE COMPONENTES DE LA FORMULACION SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PPD.

En la formulación del PPD normal, con Tween al 0.005% y fenol al 0.4% de concentración final (tabla 1 muestra "A") se observó que la potencia en la determinación inicial fue 2.32 UT/0.1 ml, encontrándose este valor dentro de los límites de potencia, que marca el comite de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en patrones biológicos para este producto (4) que es de 2.4 a 1.6 UT/0.1 ml. Durante las siguientes determinaciones se observó un descenso de la actividad con respecto al valor inicial pero dentro de los límites establecidos, hasta el segundo bimestre. Para el sexto mes la potencia resultó ser de 1.21 UT/0.1 ml. este valor de potencia se encuentra ya fuera de los límites citados.

al eliminar el tween de la formulación del PPD normal (muestra "B") la potencia inicial fue de 1.61 UT/0.1 ml, en el primer bimestre la potencia bajo a 0.92 UT/0.1 ml que está por debajo del límite inferior. El resultado se muestra en la figura 2.

El PPD formulado con tween sin fenol (muestra C)

TABLA 1

EFECTO DE LA VARIACION DE COMPONENTES DE LA
FORMULACION SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PPD.

DETERMINACION DE LA POTENCIA DE PPD (UT/0.1 ml)

CLAVE DE LA MUESTRA	MUESTRA	INICIAL	PRIMER BIMESTRE	SEGUNDO BIMESTRE	TERCERO BIMESTRE	ACTIVIDAD %
*A	PPD Normal con Tween 0.005% y Fenol al 0.4%	2.32	1.72	1.66	1.21	52.15
B	PPD sin Tween 0.005% con Fenol 0.4%	1.61	0.92	1.34	1.04	64.59
C	PPD con Tween 0.005% sin Fenol	2.86	1.54	2.33	2.30	80.41
D	PPD con Tween 0.01% con Fenol.	2.40	1.64	1.83	1.05	43.75
E	PPD con Tween 0.0075% con Fenol 0.4%	2.78	1.77	2.43	1.13	40.64
F	PPD con agua desionizada Tween 0.005% y Fenol 0.4%	2.51	1.69	2.00	1.33	52.98
G	PPD sin Fenol y sin Tween	2.09	1.51	1.39	1.41	69.46

* VER ANEXOS

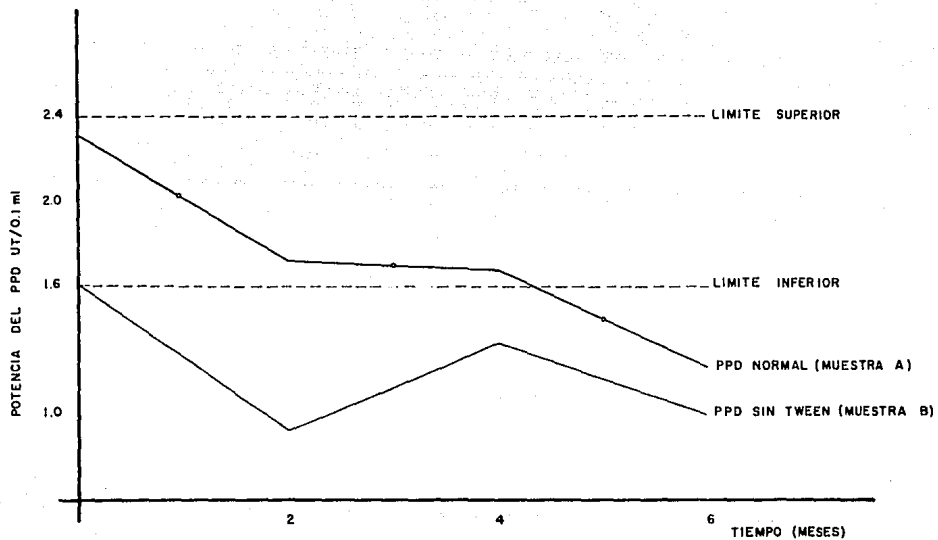


FIGURA 2. EFECTO DE LA AUSENCIA DEL TWEEN (MUESTRA B) SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PPD

mostró una potencia inicial de 2.86 UT/0.1 ml siendo ligeramente mayor que el límite superior que es de 2.4 UT/0.1 ml. Pese a que en el segundo mes presentó una reducción en la potencia con un valor de 1.54 UT/0.1 ml. En el cuarto y sexto mes permaneció constante con un valor de 2.30 UT/0.1 ml. como se muestra en la figura 3.

El PPD con tween al 0.01% (muestra D) como única variante a la formulación, tuvo una potencia de 2.40 UT/0.1 ml encontrándose sobre el límite superior. Para el segundo mes se presentó una baja en la potencia con un valor de 1.64 UT/0.1 ml y continuó descendiendo hasta el sexto mes con una potencia de 1.05 UT/0.1 ml. El resultado gráfico se observa en la figura 4.

El PPD con tween 0.0075% de concentración final, con fenol (muestra E), tuvo una potencia inicial de 2.78 UT/0.1 ml hasta el cuarto mes la potencia se mantuvo dentro de los límites permitidos, para después en el sexto mes descender hasta una potencia de 1.13 UT/0.1 ml ya fuera de los límites permitidos figura 5.

En las muestras analizadas hasta el momento se usó agua destilada como disolvente, al substituir ésta por agua desionizada (muestra F) la potencia inicial fue de 2.51 UT/0.1 ml, para el segundo mes se presentó una baja en la potencia

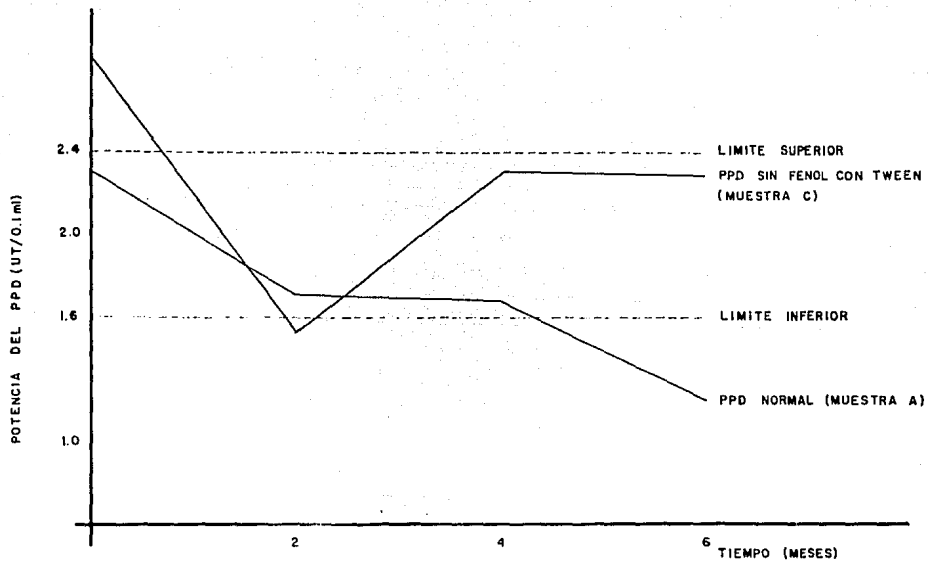


FIGURA 3. EFECTO DE LA AUSENCIA DE FENOL (MUESTRA C) SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PPD

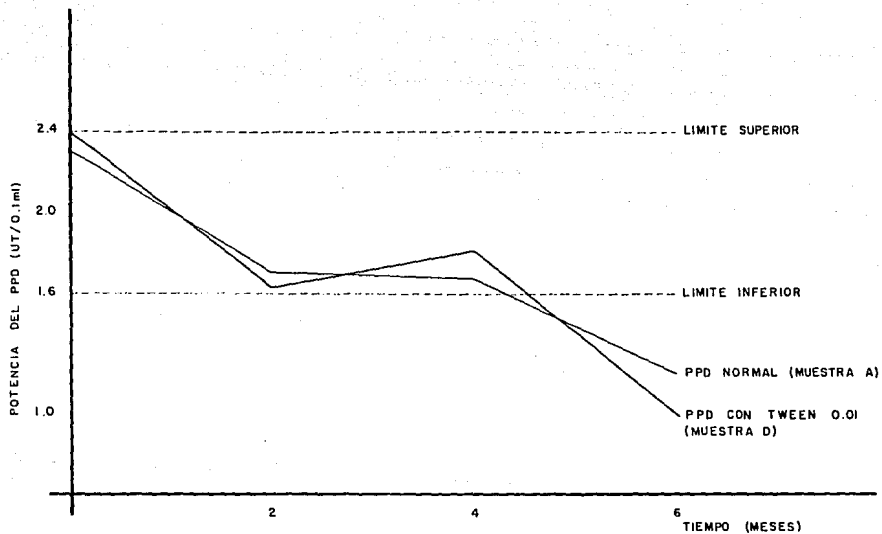


FIGURA 4. EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DEL TWEEN (MUESTRA D) SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PPD.

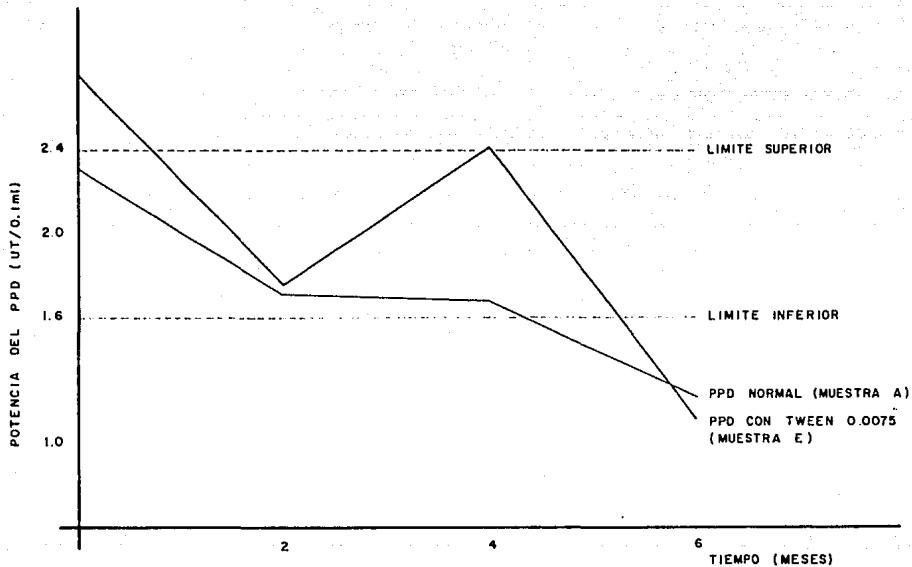


FIGURA 5. EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DEL TWEEN (MUESTRA E) SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PPD

con un valor de 1.69 UT/0.1 ml, aún dentro de los límites permitidos; en el cuarto mes hubo un aumento de 2.00 UT/0.1 ml, pero en el sexto mes la actividad bajó a 1.33 UT/0.1 ml, ésta última ya por debajo del límite inferior (figura 6).

Cuando se eliminó el fenol y el Tween de la formulación del PPD (muestra "C") se observó que la potencia inicial fue de 2.09 UT/0.1 ml pero a partir del segundo mes la potencia cae a 1.51 UT/0.1 ml y continúa en descenso hasta el sexto mes con una potencia de 1.41 UT/0.1 ml (figura 7). El efecto de las diferentes concentraciones del Tween sobre la actividad del PPD. se muestran en la figura 8, en donde se observa que la actividad no se influencia seriamente al modificarse la concentración de Tween, mostrando una tendencia de actividad similar al PPD normal durante los seis meses de prueba.

ESTABILIDAD DEL PPD A LA TEMPERATURA DE CONSERVACION (2-8°C).

Para observar el efecto de la temperatura de conservación sobre la actividad del PPD con formulación normal, el producto se almacenó a temperatura de refrigeración (2-8°C).

Se realizaron pruebas de potencia cada dos meses durante un lapso de seis meses que es el tiempo de caducidad de este producto.

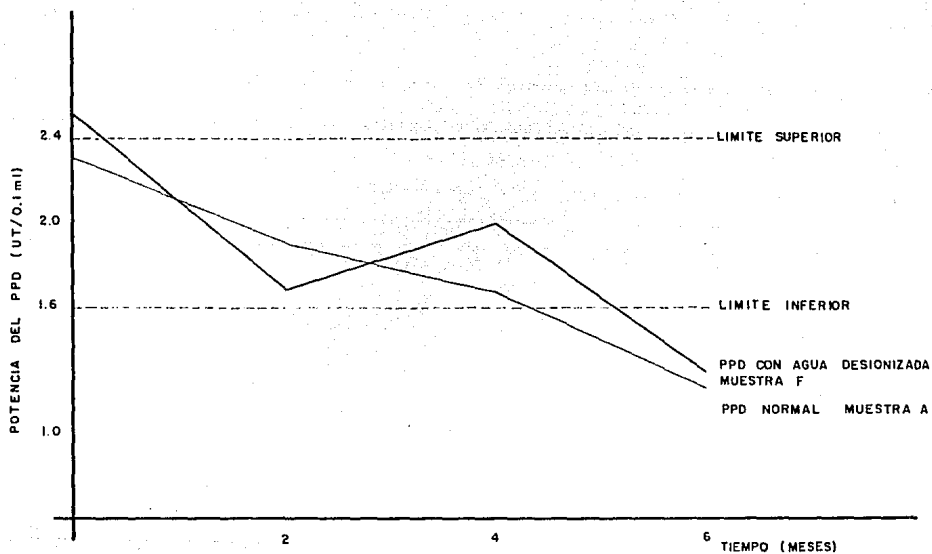


FIGURA 6. EFECTO DEL CAMBIO DE DISOLVENTE (MUESTRA F) SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PPD

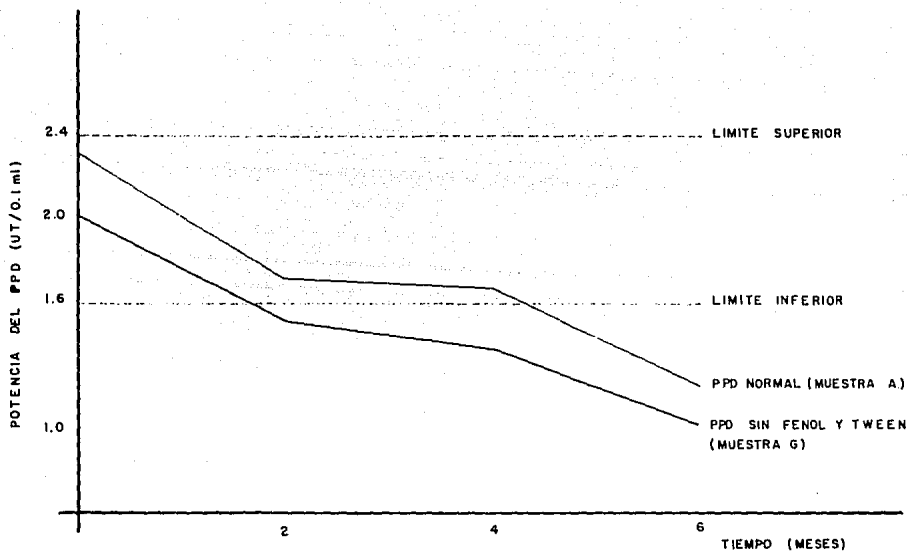


FIGURA 7. EFECTO DE LA AUSENCIA DEL FENOL Y TWEEN (MUESTRA G) SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PPD.

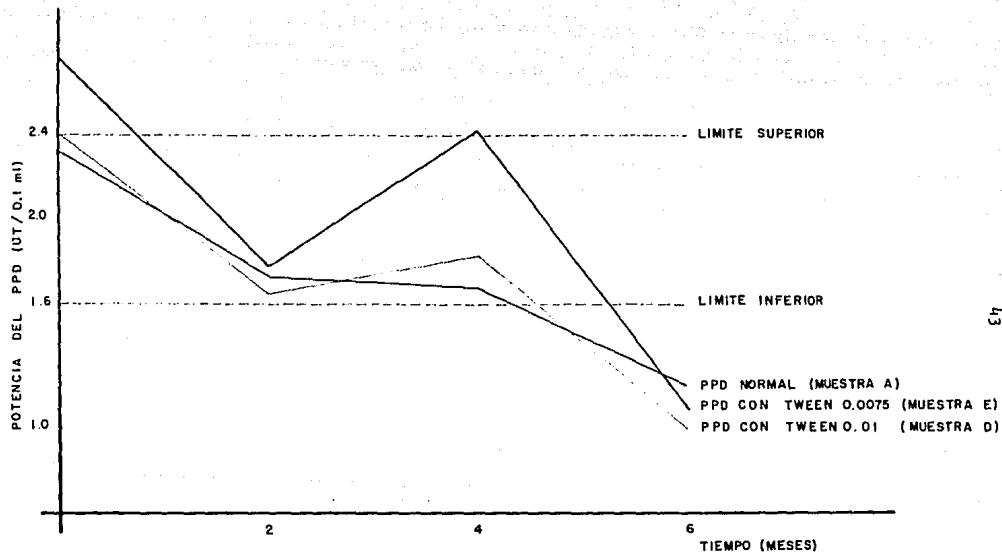


FIGURA B. EFECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DEL TWEEN (MUESTRAS D Y E) SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PPD.

Obteniendose los resultados que se muestran en la tabla 2. Donde se observa que la potencia inicial fue 1.82 UT/0.1 ml, estando éste valor dentro de los límites citados para la actividad de éste producto, permaneciendo casi sin variación, y se continúa hasta el sexto mes donde la potencia fue de 1.70 UT/0.1 ml.

El resultado gráfico se muestra en la figura 9.

TABLA 2

ESTABILIDAD DEL PPD A LA TEMPERATURA DE CONSERVACION (2-8°C)

Tiempo (meses)	Potencia (UT/0.1 ml)
0	1.82
2	1.79
4	1.80
6	1.70

EFEECTO DEL ENVASE SOBRE LA ACTIVIDAD
DEL PPD ALMACENADO DE 2 a 8°C

Para éste caso se envasó el PPD en frasco claro, corriéndose pruebas paralelas con el PPD envasado en frasco ámbar. En el frasco claro la determinación inicial fue de 2.11 UT/0.1 ml, (tabla 3), en las determinaciones siguientes se presentaron ligeras variaciones, hasta concluir en el sexto

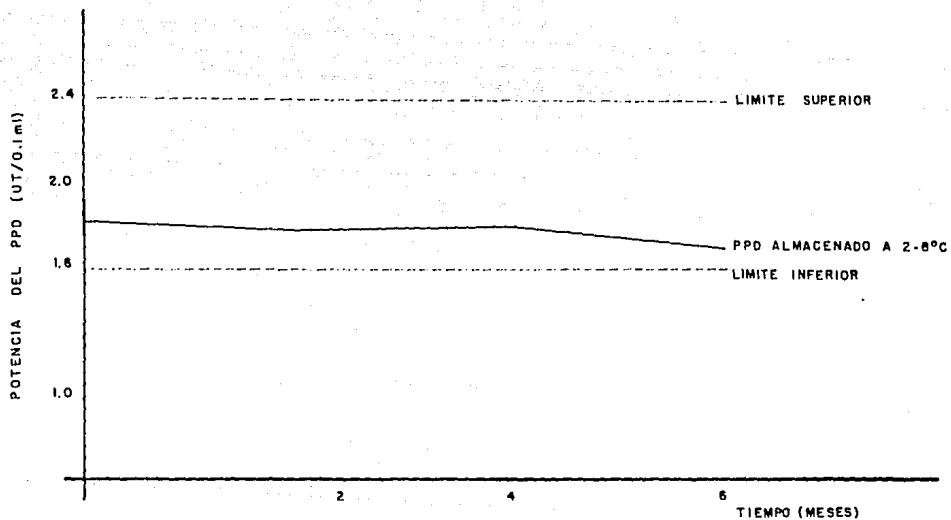


FIGURA 9. ESTABILIDAD DEL PPD A LA TEMPERATURA DE CONSERVACION (2 - 8°C)

mes con una potencia de 1.79 UT/0.1 ml encontrándose dentro de los límites permitidos. La gráfica se observa en la figura 10. Para el frasco ámbar la potencia inicial fue de 2.39 UT/0.1 ml, en éste caso tampoco se presentaron variaciones considerables durante las pruebas siguientes, ya que los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites permitidos.

TABLA 3
EFECTO DEL ENVASE SOBRE LA ACTIVIDAD
DEL PPD ALMACENADO DE 2 a 8°C

Tiempo (meses)	Potencia en UT/0.1 ml	
	Frasco claro	Frasco ámbar
0	2.11	2.39
2	2.55	2.10
4	2.00	1.94
6	1.79	1.83

EFECTO DEL ALMACENAMIENTO A 37°C SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PPD
ENVASADO EN FRASCO CLARO Y AMBAR

A diferencia con el PPD almacenado de 2 a 8°C la determinación de potencia en éste caso particular se llevó a cabo en un lapso de 16 días y no en 6 meses, ésto se debe a la variación de potencia de éste producto en tan poco tiempo

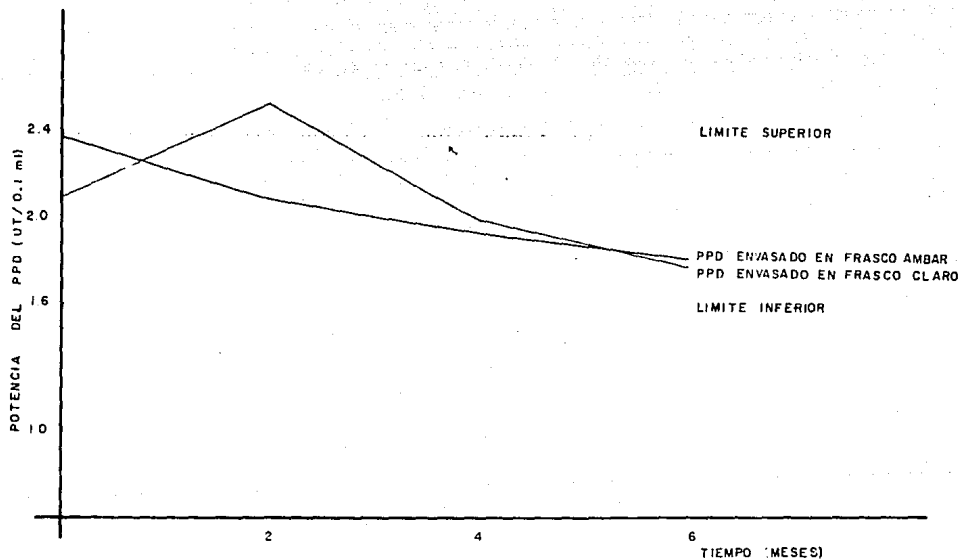


FIGURA 10. EFECTO DEL ENVASE SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PPD ALMACENADO DE 2 A 8 °C

cuando se encuentra en condiciones diferentes en su almacenamiento.

Para el PPD envasado en frasco claro almacenado a 37°C la potencia fue de 2.11 UT/0.1 ml (tabla 4) se continúa un descenso de la potencia hasta el cuarto día donde se obtuvo un valor de 1.67 UT/0.1 ml, dentro de los límites permitidos.

Para el PPD envasado en frasco ámbar sometido a éstas condiciones la potencia se mantuvo dentro de los límites permitidos hasta el segundo día, con un valor de 1.72 UT/0.1 ml a partir del cuarto día y hasta el dieciseisavo la potencia se encuentra fuera de los límites permitidos.

Para ambos casos se observa como la potencia permanece en valores aceptables hasta el segundo día, después de éste tiempo la potencia sigue su descenso, tal y como se esperaba, ya que éste producto se ve afectado por la acción del calor.

En la figura 11 se encuentran las gráficas correspondientes a éste caso.

TABLA 4

EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO A 37°C SOBRE LA ACTIVIDAD DEL
PPD ENVASADO EN FRASCO CLARO Y AMBAR

Tiempo (días)	Potencia en UT/0.1 ml	
	Frasco claro	Frasco ámbar
0	2.11	2.39
1	1.82	1.86
2	1.77	1.72
4	1.67	1.57
8	1.20	1.44
16	1.15	1.38

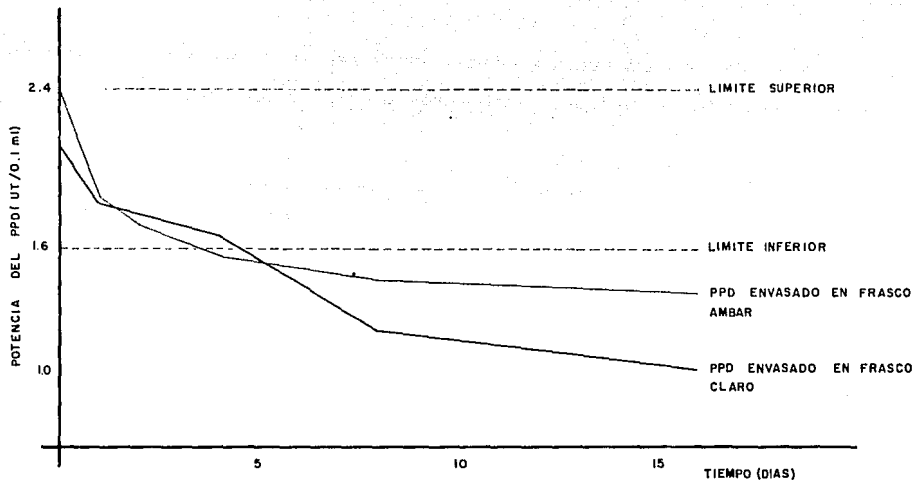


FIGURA 11. EFECTO DE ALMACENAMIENTO A 37°C SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PPD ENVASADO EN FRASCO CLARO Y AMBAR.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De los factores físicos estudiados temperatura y tipo de envase, se concluye que no presentan ninguna influencia sobre la potencia del PPD. Al analizar los resultados de los factores químicos estudiados (variación de componentes en la formulación del PPD) se concluye que de las variaciones estudiadas la ausencia de fenol (muestra C) en la formulación original, se mantiene constante la potencia del PPD, durante la etapa de prueba, presentando una actividad mayor (80.40%) con respecto a los demás casos estudiados. Sin embargo como la presentación del producto es en multidosis, no puede formularse sin conservador optándose por bajar la concentración del fenol a 0.25%, por estudios realizados simultáneamente en el departamento de vacuna B.C.G. del mismo instituto. (Esta concentración es aceptada por la Organización Mundial de la Salud).

Con los demás estudios realizados se corrobora la recomendación de envasar este producto en frasco ámbar y mantenerlo en refrigeración.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alcalá Valdés L. La Tuberculosis Pulmonar, Editorial Interamericana, Primera Edición, 1970.
- 2.- Bach Jean-Francois. Inmunología, Editorial Limusa, Primera Edición, 1984.
- 3.- Benacerraf Baruj Unanue Emil R. Inmunología, Editorial Panamericana, Segunda Edición, 1986.
- 4.- Comité de Expertos de la OMS en patrones biológicos, Normas para lasTuberculinas segundo informe, Organización Mundial de la Salud. 1968.
- 5.- Delaat Adrian N.C Microbiology. ed. Lea & Febiger, second edition, 1979.
- 6.- Dowden, Hutchinson & Ross, Inc. Microbial Growth. Edited By P.S.S. Dawson, National Research Council of Canada, 1974.
- 7.- D.J. Finney, M.A. Se. De. Statistical Method in Biological Assay. Editor Charles Griffin & Company Ltd. 1952.
- 8.- Eisen Heran N. Immunology Harper & Row Publisher. Second Edition, 1974.
- 9.- Emejuaiwe S.O Ogumbi O. Sanni S.O Global Impacts of Applied Microbiology, Sixht International Conference Academic Press. 1981.

- 10.- Howard Barbara J. Klass II, J O Robin Sally weissfeld Alice. Clinical and Pathogenic Microbiology, Printed in the United States of America, the C.V. Mosby Company Washington D.C. 1987.
- 11.- Johannes Guld & Erik Roelsgard. The Effect of Tween 80 on intradermal Tuberculin Reactions. Bull, Wld. Hlth Org. 33; 345-346; 1965.
- 12.- Jorgen Nyboe. The Efficacy of the Tuberculin test. An Analysis Based on Results From 33 Countries. Bull. Wld. Hlth Org. 22; 5-37 1960.
- 13.- Kantor de Isabel N, Nota Técnica No. 17 Rev. 1, Centro Panamericano de Zoonosis. 1980.
- 14.- Kubica G.P Dye. We, Cohn M1 and Middlebrook G. Sputum Digestion and Decontamination With N-Acetil-L-Cysteine-Sodium Hidroside for culture of Mycobacteria. Am. Rev. Resp. 87;725-779. 1963.
- 15.- Lennette Edwin H, Balows Albert, William S. Hausler J.R. Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology Washington, D.C. Fourth Edition 1985.
- 16.- Lotzova Eva ph. D, Herberman Ronald B. Immunobiology of Natural Killer Cells Volumen II, CCR Press INC, Printed in the United States. 1986.
- 17.- Moffet Hugh L. Clinical Microbiology. editorial J.B Lipincott Company, 1975.
- 18.- Roitt Ivan M. Essential Immunology. Blackwell Scientific Publications Fifth Edition, 1984.

- 19.- Rose Noel R, Friedman Herman. Manual of Clinical Laboratory Immunology. American Society For Microbiology Washington D.C. Third Edition 1986.
- 20.- Roth James A. Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens Copyright American Society for Microbiology Washington. D.C. 1988.
- 21.- S. Landi & H.R Held prevention of chinosol absorption by rubber stoppers used to seal glass vials containing Tuberculin PPD Mantoux Solutions. Bull Wld. Org. 33:395-404, 1965.
- 22.- S. Landi, H.R. & H. Pivnick Studies on Phenol and chinosol used as preservatives in Tuberculin PPD solutions. Bull. Wld. Hlth. Org. 39: 809-820, 1968.
- 23.- S. Landi, H.R. Held, and M.C. Tseng. disparity of potency between stabilized and nonstabilized dilute tuberculin solutions. Am. Rev. Resp. Dis. 104; 385-393, 1971.
- 24.- Smithwich RW, Stratigus C.B. and David Hl. Use of cetyl pyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of mycobacterium tuberculosis. J. clin microbiol. 1; 411-413. 1975.
- 25.- Stites Daniel P. Inmunología Básica y Clínica. Editorial el manual Moderno, S.A. de C.V. Cuarta edición, 1983.
- 26.- WHO Tuberculosis Research Office & Biophysics Laboratory of the University of Copenhagen. Effect of exposure of Tuberculin to Light. Wld. Hlth. Org. 12, 179-188. 1955.

A N E X O S

PREPARACION DE REACTIVOS

PREPARACION DE REACTIVOS

AGUA SAUTON.

Agua Sauton (dilución 1:4 del medio de cultivo Sauton) utilizada para reconstituir la vacuna BCG que se requiere para sensibilizar a los cobayos destinados a la prueba de potencia del PFD.

El medio de cultivo Sauton se prepara según la fórmula siguiente:

Asparagina -----	1.13 g
Ac. cítrico -----	2,186 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O -----	0.5 g
KH ₂ PO ₄ -----	0.5 g
Citrato ferrico- Amónico-----	0.5 g
ZnSO ₄ -----	0.133 g
Glicerol -----	60 ml
NaOH 6N -----	6 ml.
Agua bidestilada c.b.p.-----	1000 ml.

La preparación se hace de la siguiente manera;

1.- Disolver a baño maría; asparagina, ac. cítrico MgSO₄, KH₂PO₄ y el citrato férrico-amónico en aproximadamente 100 ml de agua destilada.

2. Disolver a baño maría y por separado el $ZnSO_4$ en aproximadamente 5 ml de agua destilada.

3. En un matraz de 1000 ml colocar aproximadamente 500 ml de agua destilada y agregar el glicerol, adicionar filtrado en este matraz los ingredientes disueltos en el inciso 1, a continuación se añade 5 ml de NaOH 6N y el $ZnSO_4$ mezclar y ajustar el volumen a un litro.

4. Ajustar el pH a 7.1-7.2.

5. Esterilizar a $121^\circ C$ por 30 minutos.

DIVERSAS FORMULACIONES DEL PPD.

- Tuberculina PPD lote RT23 de 50,000 UT/ml proporcionada por el Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO), usada como referencia.

- Tuberculina PPD de 2 UT/0.1 ml envasada en el Instituto Nacional de Higiene (INH), para ser valorada. Usada para la prueba de Mantoux.

- Tuberculina PPD preparada con variaciones en su formulación.

El PPD normal es aquel que contiene en su formulación Tween al 0.005% y fenol al 0.4% de concentración final (usado como dispersante y conservador respectivamente).

Tomando como referencia esta muestra (PPD normal), se prepararon muestras con variaciones en la formulación normal. (Muestra A).

En la muestra "B" se eliminó el Tween de la formulación original. Para la muestra "C" se eliminó el fenol. En las muestras "D" y "E" se cambió la concentración de Tween, de 0.005% a 0.01% y 0.0075% respectivamente.

En la muestra "F" se substituyó el agua destilada (usada como disolvente) por agua desionizada. En la muestra "G" se eliminó tanto el fenol como el tween de la formulación original como se observa en el siguiente cuadro:

Muestra	Tween %	Fenol %	Disolvente
"A" PPD Normal	0.005	0.4	Agua destilada
"B" PPD sin Tween con fenol	-----	0.4	Agua destilada
"C" PPD sin fenol con Tween	0.005	---	Agua destilada
"D" PPD con variaciones en la concentración de Tween	0.01	0.4	Agua destilada
"E" PPD con variaciones en la concentración de Tween.	0.0075	0.4	Agua destilada
"F" PPD con variaciones en el disolvente.	0.005	0.4	Agua destilada
"G" PPD sin Fenol y sin Tween.	-----	---	Agua destilada

Solución Salina amortiguada de fosfatos de pH 7.3 con agregado de tween 80 al 5% y fenol al 0.4% su composición es la siguiente:

Fosfato monopotásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) -----	1.45 g
Fosfato disódico (PO_4HNa_2) -----	6.0 g
Cloruro de sodio (NaCl) -----	4.8 g
Agua destilada C.S.P. -----	1000 ml

Agregar 1 ml de tween 80 al 5%

Agregar 1 ml de fenol a 0.4%.

Empleada para diluir el PPD.

Vacuna BCG (preparada en el Instituto Nacional de Higiene) para sensibilizar los cobayos destinados a la prueba de potencia del PPD.