



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Caracterización de Toxide Diftérico mediante pruebas Fisicoquímicas e Inmunoquímicas”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LIC. BIOQUÍMICO DIAGNÓSTICO

Presenta:

Juan Pablo Zurita Ramírez

Asesor Interno:

M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez

Coasesores:

M. en C. Francisco Reta Mares

Y

M. en C. Rosa Patricia Méndez Ortega

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 2017



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Caracterización de Toxoide Diftérico mediante pruebas Físicoquímicas e Inmunoquímicas.

Que presenta el pasante: Juan Pablo Zurita Ramírez

Con número de cuenta: 306316948 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Agosto de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Elia Granados Enriquez	
VOCAL	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
SECRETARIO	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Alberto Natahliel Soto Guevara	
2do. SUPLENTE	M. en C. María Lucero Paniagua García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

CARACTERIZACIÓN DE TOXOIDE DIFTÉRICO MEDIANTE PRUEBAS FÍSICOQUÍMICAS E INMUNOQUÍMICAS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo del Instituto Nacional de Higiene, Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México, S. A. de C. V.

Bajo la dirección de:

M. en C. Francisco Reta Mares

Y

M. en C. Rosa Patricia Méndez Ortega.

Mis más profundos agradecimientos a los compañeros del laboratorio de investigación, así como a mis compañeros de carrera con los que compartí historias inolvidables que siempre recordare y sobre todo a mi familia que siempre creyeron en mí.

Pd. No pongo nombres porque sería una lista interminable, pero les doy las gracias a todos darme la oportunidad de dejarme entrar a su vida.

Un día sin una sonrisa es un día malgastado. -Charlie Chaplin

Contenido

Índice general	4
Índice de figuras	5
Índice de tablas	6
Índice de Abreviaturas	7
Resumen	8
1. Introducción	10
1.1 Características del microorganismo	13
1.2 Toxina de <i>C. diphtheriae</i>	15
1.3 Difteria respiratoria	18
1.4 Difteria cutánea	19
1.5 Otras afectaciones y diagnóstico	19
1.6 Epidemiología	21
1.7 Vacuna	23
2. Justificación	27
3. Hipótesis	27
4. Objetivos general y particulares	28
5. Material y métodos	29
6. Resultados y discusión	34
7. Conclusiones	56
IX. Bibliografía	57
Apéndice 1: Curva tipo de proteínas por el método del ácido bicinconínico	61
Apéndice 2: Preparación de reactivos	62
Apéndice 3: Procedimiento para realizar Inmunodetección	65

Índice de figuras

No.	Título de la figura	Página
1	Estructura terciaria de la exotoxina de la difteria.	12
2	<i>C. diphtheriae</i> . 1a) pseudomembrana, 5a) bacilos Gram (+), 5b) colonias oscuras crecidas en telurito de potasio, 5c) Toxina puesta de manifiesto con anticuerpos en placa de Elek.	14
3	Mecanismo de acción de la toxina diftérica en la célula blanco.	17
4	Niño con difteria.	18
5	Faringitis exudativa.	19
6	Úlcera en la piel provocada por la infección con <i>C. diphtheriae</i> .	20
7	Número de casos registrados anualmente a partir de 1980 de difteria al 2015.	22
8	Diagrama de flujo del proceso realizado para pruebas Físicoquímicas e Inmunoquímica.	30
9	Caracterización y determinación del peso molecular de las muestras de referencia por SDS-PAGE	36
10-24	Caracterización de los diferentes lotes de muestras de TD por HPLC	39-46
25	Inmunodetección del TD. Primer Anticuerpo: anti-toxina diftérica (1:1000), (a y b) segundo anticuerpo: Anti-IgG de caballo unido a peroxidasa (1:4000)	48

Índice de tablas

No.	Título de la tabla	Página
1	Lotes de Toxoide Diftérico (15)	29
2	Concentración de proteína en las diferentes muestras de toxoide diftérico	34
3	Peso molecular de cada banda observada en el SDS	36
4	Área de cada banda obtenida de las muestras de Toxoide Diftérico	47
5	Lote, Lf, proteína, pureza (HPLC) y peso molecular de las muestras de toxoide diftérico	49

Indicie de Abreviaturas

Abreviatura	Definición
Abs	Absorbancia
BCA	Ácido Bicinconánico
ADP	Adenosin Difosfato
ADPr	Adenosindifosfato ribosa
BIRMEX	Biologicos y Reactivos de México
FEUM	Farmacopea Estados Unidos de México
HPLC	Cromatografía Liquida de Alta Eficacia
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico
FE-2	Factor de alargamiento 2
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
HB	Hepatitis B
kDa	Kilodaltones
LcT	Linfocito T
NAD	Nicotinamida dinucleótido
TD	Toxoide diftérico
Lf	Unidades de Floculación

Resumen

El presente trabajo muestra la caracterización del 15 lotes de Toxoide Diftérico producido en Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México BIRMEX, mediante pruebas fisicoquímicas e inmunoquímicas como Cromatografía Líquida de Alta Eficacia HPLC, del inglés “High-Performance Liquid Chromatography”, Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico SDS-PAGE, del inglés “*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*” e Inmunotransferencia del inglés “Western blot”. Algunos autores (Belasco F. et. al, 2014, Coombes L. et al, 2009 & Mezt B. et. al, 2007) proponen que estas pruebas puedan ayudar a predecir la calidad en la fase de control de calidad del proceso de producción.

El toxoide diftérico al ser un producto biológico y para uso en intervenciones de salud pública a gran escala, debe de cumplir los requisitos de calidad actuales de la OMS; ser inocuas y producir un efecto protector contra la propia enfermedad en todos los grupos de población (Brooks, 2014).

Por otra parte, la difteria es una enfermedad provocada por la especie *Corynebacterium diphtheriae* a través de su toxina se caracteriza por ser un bacilo Gram positivo con forma de bastón delgado. La toxina diftérica es responsable de la morbilidad y mortalidad, que ocasiona por la generación de pseudomembranas obstructivas en vías respiratorias altas y/o provocar daños en el miocardio y en otros tejidos. La vacuna contra la difteria (toxoides diftérico) se elabora en numerosos países, las etapas convencionales de fabricación de la vacuna son las siguientes: cultivo en medio líquido de cepas de *C. diphtheriae* productoras

de la toxina, separación del sobrenadante que contiene la exotoxina, conversión de la toxina en toxoide inducida por formalina, adsorción sobre sal de aluminio (Brooks, 2014).

Introducción

El género *Corynebacterium* es un grupo grande y heterogéneo de más de 100 especies y subespecies que poseen una pared celular que contiene arabinosa, galactosa, ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP) (en la mayoría de las especies) y ácidos micólicos de cadenas cortas (de 22 a 36 átomos de carbono) (Murray, 2013). Los bacilos de la difteria continúan produciendo toxina en forma activa. Esta se absorbe y el resultado es una lesión tóxica a distancia, principalmente degeneración parenquimatosa, infiltración grasa y necrosis en el músculo cardíaco (miocarditis), hígado, riñones (necrosis tubular) y glándulas suprarrenales, acompañada en ocasiones de hemorragia microscópica. La toxina además provoca lesión de los nervios (desmielización), cuyo resultado es a menudo parálisis del paladar blando, músculos oculares o extremidades (Jawetz, 2014).

Desde el punto de vista nutricional, la mayoría de las especies fermentan los hidratos de carbono y generan moléculas de ácido láctico. Aunque muchas especies crecen bien en los medios de laboratorio comunes, hay algunas especies que necesitan complementos lipídicos para desarrollarse adecuadamente. Aunque todas las especies de *Corynebacterium* se pueden comportar como patógenos oportunistas, unas pocas se asocian con una mayor frecuencia a enfermedades. La especie tipo, es *C. diphtheriae*, que es estrictamente aeróbica; presenta tres tipos o variedades morfológica y bioquímicamente distintas. Debido a que en un principio se les asoció con diversas formas de gravedad de los cuadros clínicos se les denominó: *gravis*, *mitis* e *intermedius*. Sin embargo, hoy se sabe que no hay relación entre la morfología colonial y la gravedad del cuadro clínico provocado, ya que todas ellas pueden ser toxigénicas en similar medida. *C. diphtheriae* se diferencia de otras

corinebacterias ya que es capaz de crecer en medios selectivos que utilizan para su aislamiento y por una variedad de reacciones bioquímicas (Kenneth, 2010).

El microorganismo no necesita penetrar en la sangre para producir los síntomas sistémicos a distancia que se observan en la enfermedad. El gen para la producción de la toxina diftérica está contenido en el genoma de un bacteriófago, que es lisogénico dentro del cromosoma de *C. diphtheriae*. Para las cepas que contienen este gen, la producción de toxina diftérica está controlada por una proteína represora, que responde a las concentraciones de hierro y también otras funciones relacionadas con toxinas (Kenneth, 2010).

La exotoxina (ver figura 1) producida por *Corynebacterium diphtheriae* la cual produce una toxina, la cual es el agente causante de la difteria, sintetizada en una forma precursora de 61 kDa. La proteína secretada tiene una masa molecular de 58k Da y es compuesta por dos distintos fragmentos: Fragmento A de 21 kDa y el Fragmento B de 37 kDa, unidos por enlaces disulfuro (Kenneth, 2010).

El Instituto Nacional de Higiene (INH), perteneciente a BIRMEX, en 1926 preparó el primer lote de toxoide diftérico en condiciones estáticas a nivel de garrafón utilizando la cepa de *C. diphtheriae* PW8 (cepa Park Williams No.8) y se mantuvo la producción así hasta el año de 1991 en donde, después de un proceso experimental, se lograron establecer las condiciones para la producción de la Toxina Diftérica.

En BIRMEX, se produce el Toxoide Diftérico a Granel y al paso del tiempo se ha modificado el proceso de producción para desarrollar un producto de mejor calidad para la elaboración

de las vacunas Toxoide Difterico “Td” y una mezcla de tres vacunas que inmunizan contra la difteria, *Bordetella pertussis* (la tos ferina/tosferina) y el tétanos “DTP”.

Bajo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud “OMS” y la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos “FEUM” se realizan pruebas biológicas (identidad/potencia, esterilidad y toxicidad) y fisicoquímicas (conservante y adyuvante) (OMS, 2014 & FEUM, 2008).

Hay tres etapas principales del mecanismo de acción de la toxina de la diftérica: la unión a receptor, la translocación del dominio catalítico al citosol y la inhibición del dominio catalítico al citosol y la inhibición de la síntesis de proteína que involucra a EF2 (factor de elongación 2) (Belasco, 2014).

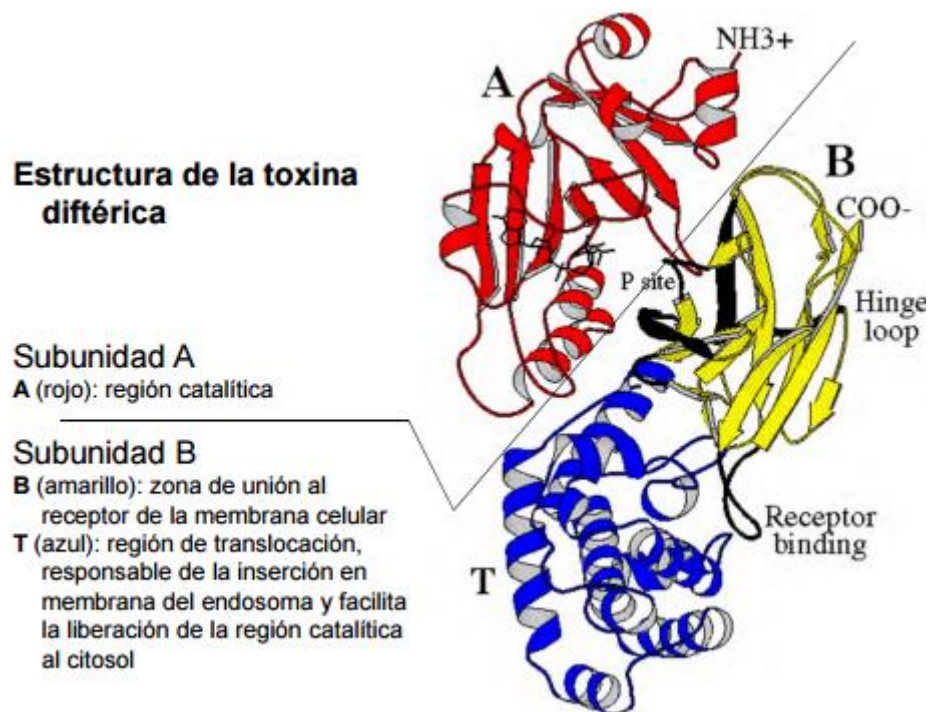


Figura No. 1 Estructura terciaria de la exotoxina de la difteria, extraído de la guía Biología disponible en línea Pag. <http://biologia.laguia2000.com/microbiologia/la-toxina-de-la-difteria>.

En 1924, Ramón describió que las toxinas, tales como la difteria, podrían ser inactivadas mediante tratamiento con formaldehído que resulta en formas no tóxicas (toxoides o aflatoxinas). Este hallazgo permite el comienzo de la producción de las primeras vacunas por tratamiento químico (Belasco, 2014).

1.1 Características del microorganismo

El género *Corynebacterium* está incluido dentro de la familia *Corynebacteriaceae*, lo conforman 46 especies, de las cuales 31 están asociadas a enfermedad en el humano y solo una (*C. diphtheriae*) recibe su nombre del griego: *coryne* = cubos, y *diphtheriae* = piel o membrana, resaltándose tanto su apariencia microscópica como el signo patognomónico de la infección causada por el microorganismo. *C. diphtheriae* es un bacilo curvado, Gram positivo de 4µm de longitud por 1µm de ancho, es aerobio, inmóvil, no encapsulado y no esporulado, presenta dilataciones irregulares características en uno de sus polos, lo que contribuye a darle un aspecto de “masa”, en medios subóptimos presenta gran pleomorfismo y se observa en forma de empalizadas o en formas angulares con apariencia “de alfabeto chino” (Figura 2) (Arteaga, 2008).

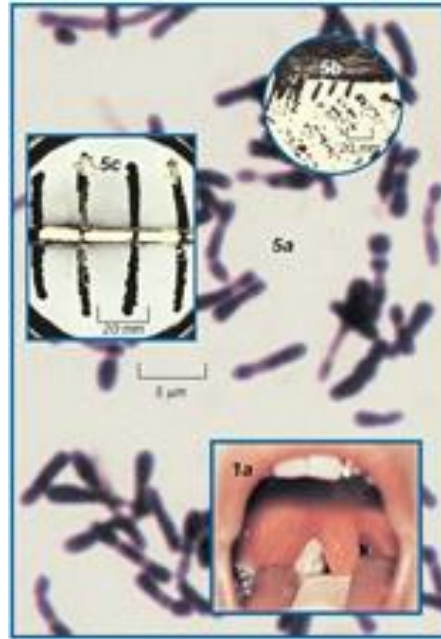


Figura 2. *C. diphtheriae*. 1a) pseudomembrana, 5a) bacilos Gram (+), 5b) colonias oscuras crecidas en telurito de potasio, 5c) Toxina puesta de manifiesto con anticuerpos en placa de Elek (Gefor, en línea) <http://www.gefor.4t.com/>.

C. diphtheriae posee un gran número de tipos serológicos y muestra, asimismo una gran heterogeneidad antigénica, posee dos tipos de antígenos de superficie, un antígeno termoestable, cuya naturaleza es polisacáridica con arabinogalactanos, y un antígeno compuesto de proteínas termolábiles localizadas en las capas superficiales de la pared y que participan de la inmunidad antibacteriana y en los eventos de hipersensibilidad (Molina, 2010).

El principal microorganismo patógeno en el ser humano del genero *Corynebacterium* es *C. diphtheriae*, el microorganismo que produce la difteria respiratoria o cutánea. En la naturaleza, *C. diphtheriae* se observa en el sistema respiratorio, en heridas o en la piel de personas infectadas o portadores normales. Se diseminan por las gotitas de secreciones respiratorias o por el contacto con individuos susceptibles; los bacilos luego se desarrollan

en las mucosas o en abrasiones en la piel, y comienzan a producir la toxina. Todos los microorganismos de la especie *C. diphtheriae* toxígena son capaces de elaborar la misma exotoxina productora de la enfermedad (Jawetz, 2014).

1.2 Toxina de *C. diphtheriae*

La toxina de la difteria inhibe la fisiología celular y bloquea la síntesis de proteínas en la célula hospedadora. Tras unirse a un receptor (derivado del factor de crecimiento del hospedador) en la membrana celular, la toxina de diftérica se escinde en un sitio sensible a proteasa entre los dominios A y B, que permanecen asociados covalentemente por un puente de disulfuro. El complejo toxina de difteria-receptor penetra entonces a la célula por endocitosis mediada por receptor, del mismo modo que muchas hormonas y virus con cubierta. Una vez dentro de la vesícula endosómica, la reducción del puente de disulfuro separa a la toxina en sus dominios A y B. las condiciones ácidas en el interior de la vesícula promueven la inserción de una porción del dominio B dentro de la membrana endosómica, la cual forma un poro para facilitar el paso del dominio A al citosol.

De este modo, el dominio B contribuye a tres funciones para aportar el dominio A al citosol: unión al receptor, transporte al interior del endosoma y una función de translocación, el enlace de disulfuro disminuye, y los dominios A y B se separan, lo que permite al dominio A, entrar al citosol. Durante la translocación, el enlace de disulfuro disminuye, y los dominios A y B se separan, lo que permite al dominio A entrar en el citosol. El dominio A efectúa la elongación del factor 2 (EF-2) por ribosilación de adenosin difosfato “ADP” por una síntesis de proteína eucariota que cataliza la hidrólisis de guanosina 5´-trifosfato (GTP)

necesaria para el desplazamiento de los ribosomas sobre el ARN mensajero. El dominio A permanece activo mucho tiempo dentro de las células, lo cual explica en parte su potencia, porque la internalización de un solo dominio A es insuficiente para matar a una célula (Coombes, 2009).

El EF-2 es el único sustrato conocido para la toxina de la difteria. El motivo de esta especificidad es que EF-2 contiene una extraña modificación en uno de sus residuos de histidina, y este es el sitio sobre el cual la toxina de la difteria efectúa la ADP ribosilación de EF-2. Las células mamíferas mutantes que carecen de esta histidina modificada son resistentes a la toxina de difteria. La adición de ADP ribosa inactiva a EF-2, bloquea irreversiblemente la síntesis proteínica y mata a las células. (Coombes, 2009) (*Género Corynebacterium Capítulo XXXII. En Microbiología, Bacteriología y Virología, J. 2010 y Belasco, F. et al. 2014*).

La producción de toxina es óptima a 0.14 mg de hierro por mililitro de medio de cultivo, pero prácticamente se suprime a una concentración de 0.5 mg/ml. Otros factores que influyen en la producción de toxina *in vitro*, son presión osmótica, concentración de aminoácidos, pH y disponibilidad de fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno (Jawetz, 2014).

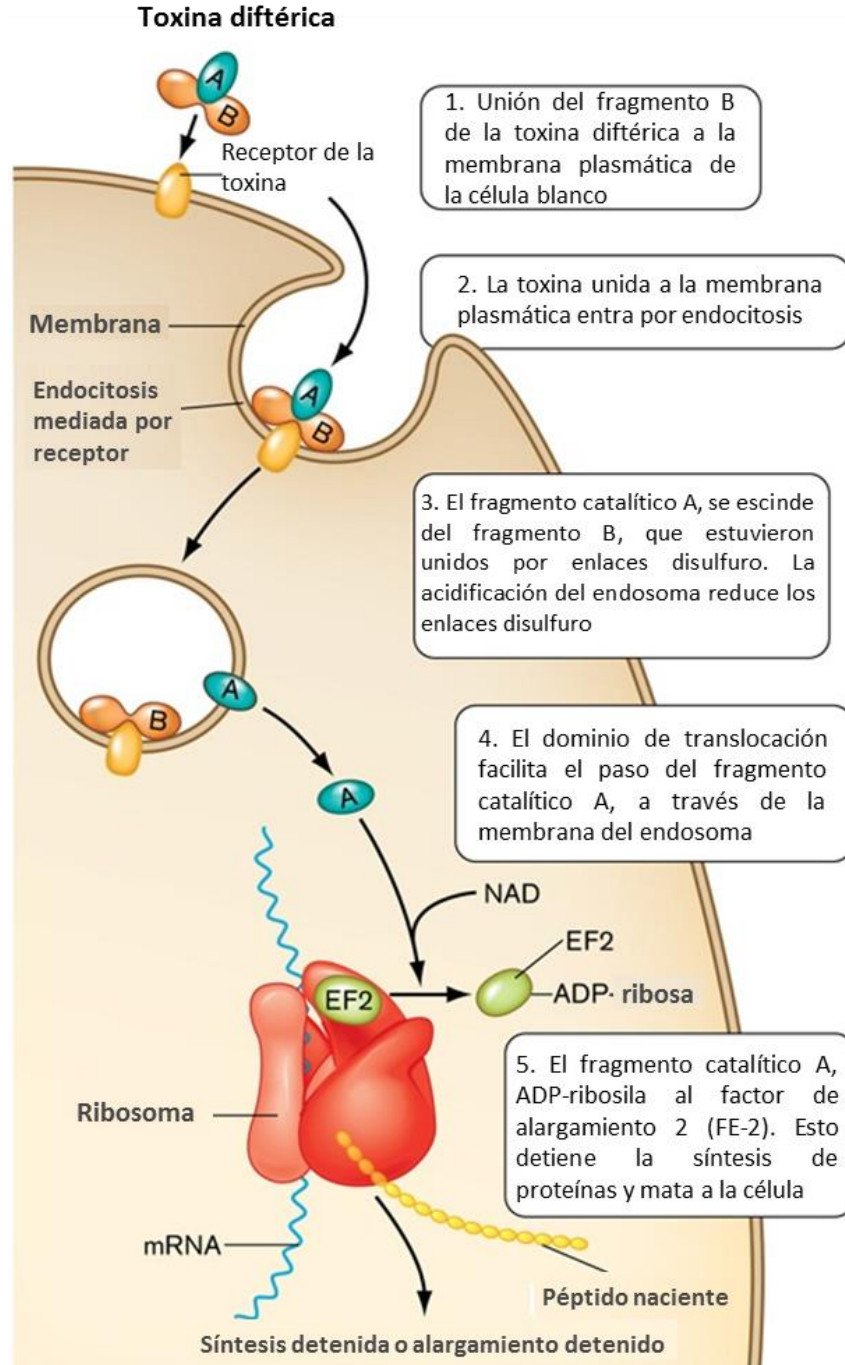


Figura 3. Mecanismo de acción de la toxina diftérica en la célula blanco. Tomado y Modificado de W. W. Norton & Company, Inc. Capítulo 25, en línea <http://www.pathologyoutlines.com/topic/oralcavitydiphtheria.html>

1.3 Difteria respiratoria

La difteria es una enfermedad que puede manifestar grados de intensidad según el estado inmunoalérgico de las personas y es así que puede haber simple estado de portador o producirse un cuadro respiratorio moderado o fulminante e incluso fatal (Brooks, 2014).



Figura 4. Niño con difteria. (se presentó con un cuello hinchado característico, a veces referido como "cuello de toro", tomado de *Find Pathology Information Fast*, disponible en línea <http://www.pathologyoutlines.com/topic/oralcavitydiphtheria.html>)

Los síntomas consisten en dolor laríngeo y fiebre, la característica más importante está dada por las membranas adherentes que recubren las amígdalas, la faringe y el velo del paladar (Figura 5), pueden extenderse hacia arriba, lo que hace que en algunas circunstancias se encuentre afectada la mucosa nasal. Estas membranas son bastante adherentes y al tratarse de retirarlas dejan un fondo sangrante. El microorganismo se multiplica masivamente pero además segrega la exotoxina que se disemina y ejerce su acción a distancia. Es común que haya obstrucción respiratoria y miocarditis. En las zonas tropicales y subtropicales también se observa compromiso nasal, ótico, conjuntival y genital (en la vagina) (Prats, 2013).

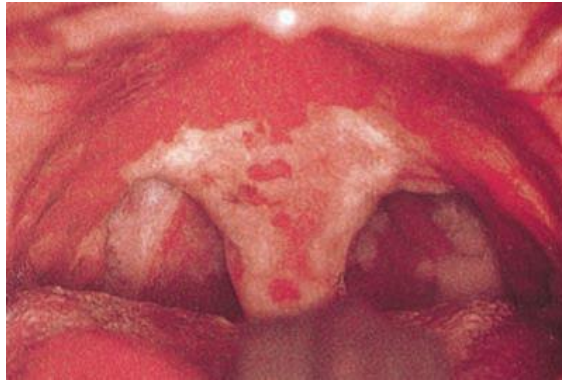


Figura 5. Faringitis exudativa, tomado de *Find Pathology Information Fast*, disponible en línea.
<http://www.pathologyoutlines.com/topic/oralcavitydiphtheria.html>

1.4 Difteria cutánea

En ocasiones la enfermedad afecta un lugar de la piel en el que previamente había habido una picadura de insecto. En estos casos aparece una zona ulcerada cubierta por una membrana. Este cuadro generalmente se ve en personas indigentes o en alcohólicos. (Figura 6) (Koneman, E. 2008 y Arteaga, R., Giono, S. Género *Corynebacterium* Capítulo XXXII. En *Microbiología, Bacteriología y Virología*. 2010).

1.5 Otras afectaciones y diagnóstico

Las cepas no toxigénicas pueden dar origen a otras patologías, como faringitis y endocarditis. La prueba de toxicidad, que es la más concluyente para llegar al diagnóstico definitivo o de certeza, se realiza por métodos serológicos (Brooks, 2014).

Existen distintos tipos de reacciones serológicas; una de ellas es la conocida como test de Elek, es una prueba de inmunodifusión, con toxina diftérica y el suero del paciente que permite obtener el resultado en 48 horas. Hay otras técnicas serológicas; también se han utilizado con buenos resultados, la inoculación de cobayos y el cultivo de tejidos (Brooks, 2014).



Figura 6. Úlcera en la piel, provocada por la infección con *C. diphtheriae*. Tomado de *Find Pathology Information Fast*, disponible en línea.

La inmunidad frente a las formas graves de difteria localizada o sistemática se basa principalmente en la presencia de anticuerpo IgG contra la toxina, mientras que la protección específica frente al estado de portador y las formas leves de difteria localizada es inducida por anticuerpos dirigidos contra antígenos variables de la capsula bacteriana. También puede intervenir la inmunidad mediada por célula. No obstante, en ocasiones la infección no confiere inmunidad protectora (WHO, 2014).

Las concentraciones de antitoxina circulantes inferiores a 0.01 UI/mL se considera plenamente protectoras. Las concentraciones de anticuerpos iguales o superiores que 1.0 UI/mL se asocian con una inmunidad protectora duradera. Las antitoxinas transferidas al feto a través de la placenta confieren inmunidad pasiva al recién nacido durante los primeros meses de vida (WHO, 2014).

1.6 Epidemiología

En épocas anteriores cuando era una enfermedad infantil frecuente, afectaba fundamentalmente a niños menores de 5 años, sin embargo, en la actualidad se observa

una tendencia a afectar a niños de mayor edad, adolescentes y adultos jóvenes. Todavía es una enfermedad endémica en regiones en desarrollo de África, Asia, Caribe y Sudamérica. En el último informe de la OMS se documentan 4680 casos de difteria en el mundo en el año 2013. Los países con más casos comunicados en 2014 fueron India, Pakistán, Indonesia, Irán y Nepal. En países desarrollados se han comunicado casos de niños procedentes de estos países, como un caso en Suecia en un niño procedente de Somalia y un caso en Estados Unidos en un niño procedente de Tailandia. Por tanto, es una enfermedad que debe ser tomada en cuenta por los pediatras que trabajen en cooperación internacional, como con niños inmigrantes. En los países occidentales produjo epidemias importantes en las décadas de los 20 y de los 30 del siglo XX, pero a partir de la segunda guerra mundial y al extenderse la vacunación, desarrollada en 1923, ha ido disminuyendo su incidencia hasta ser prácticamente inapreciable. En el inicio de 1990 en los países de la antigua Unión Soviética, se declaró una epidemia que afectó sobre todo a los adultos con una mortalidad del 20 % y que supuso la decisión de aplicar refuerzos de la vacuna a las personas de esta edad (*Dirección General de Epidemiología, Boletín epidemiológico, anuarios de morbilidad, en línea*).

La difteria fue registrada por primera vez en México en 1863 y en el período de 1896 a 1934 el total de las defunciones registradas por difteria en la ciudad de México, ascendió a 2 025 y la tasa de mortalidad fluctuó alrededor de 7.4 a 15.3 por cada 100 000 habitantes. En el periodo de 1941 a 1979, se modificó la frecuencia de casos (17 754) y la tasa de incidencia anual disminuyó de 13.6 en 1941 a 0.01 por 100 000 habitantes en el último año citado. La tasa de mortalidad era de casi 5.9 en 1943, pero en el decenio siguiente la tendencia fue

decreciente, de tal modo que en 1979 se registraron sólo nueve casos y 57 defunciones. En 1985, ocurrieron cuatro casos en la ciudad de Ticul, Yucatán, con una defunción. Sin lugar a dudas, ha existido siempre un subregistro de las notificaciones, aun cuando la enfermedad ha sido muy grave, en especial entre los lactantes con difteria laríngea y miocarditis. De 1985 a 1991, se notificaron un total de 72 casos, con mayor carga de la enfermedad en el grupo etario de 5 a 14 años. El último caso de difteria en México fue reportado en Lázaro Cárdenas, Michoacán en 1991 (*Dirección General de Epidemiología, Boletín epidemiológico, anuarios de morbilidad, en línea*).

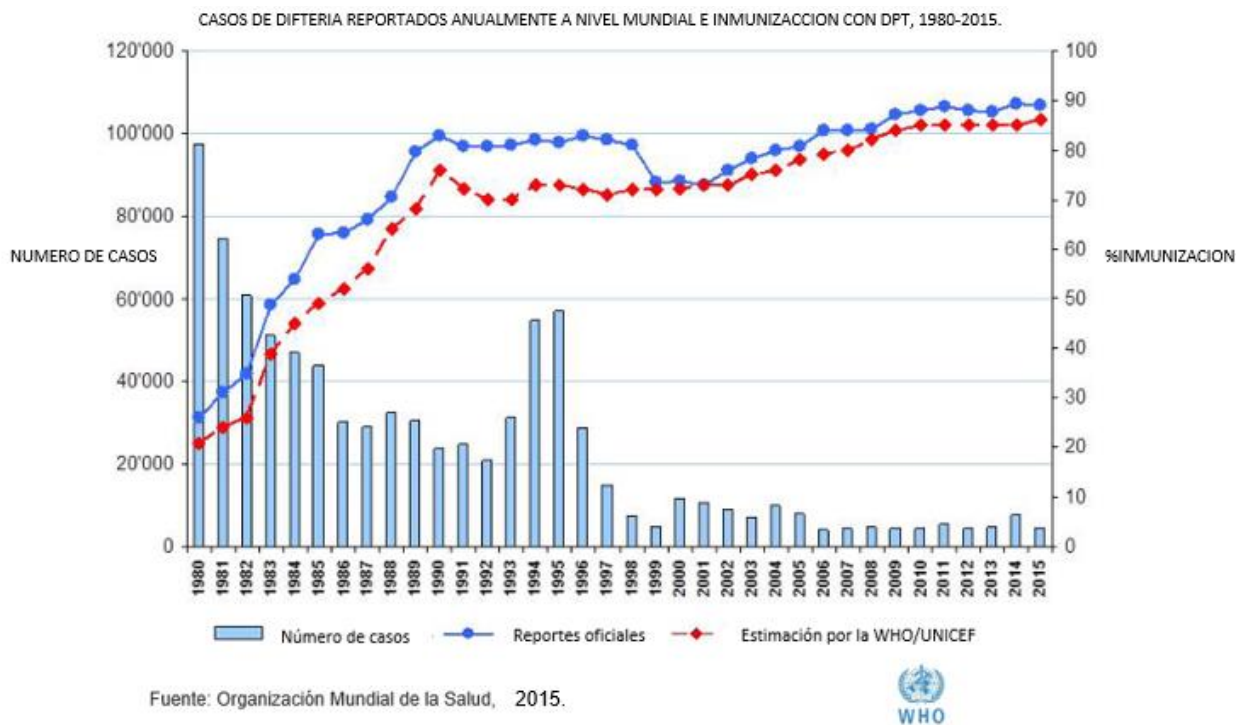


Figura 7. Número de casos de difteria, registrados anualmente a partir de 1980 al 2015 (*Tomado y modificado de: World Health Organization. Immunization surveillance, assessment and monitoring DPT 3 immunization coverage among 1-year old, 1980-2013*)

La difteria se presenta en los meses más fríos y afecta principalmente a niños menores de 15 años de edad y adultos no vacunados. En México, la difteria se presenta esporádicamente en preescolar y escolares, con picos en otoño e invierno y con la presentación de difteria cutánea en zonas tropicales; en nuestro país la vacunación contra la difteria es obligatoria en niños pequeños y esto ha venido a disminuir su incidencia en las poblaciones tradicionalmente más susceptibles (*Kenneth, 2010*).

Cuando algunos microorganismos de la difteria no toxígenos, son infectados con bacteriófago de determinados bacilos de la difteria. Cuando los bacilos de difteria son subcultivados en serie, en antisuero específico contra el bacteriófago que portan, tienden a volverse no toxígenos. Por consiguiente, la adquisición del bacteriófago conduce a la toxigenicidad (conversión lisógena). La producción eficaz de la toxina ocurre tal vez sólo cuando el probacteriófago de *C. diphtheriae* se observa lisógeno se activa y produce citólisis. Si bien la toxigenicidad está controlada por el gen del bacteriófago, la invasividad está sujeta al control de genes bacterianos (*Kenneth, 2010*).

La transmisión se produce en forma directa, por medio de aerosoles que permanecen en el ambiente o también por contacto cutáneo, la enfermedad comienza una semana después de producido el contacto. La vacuna específica preparada con toxoide estimula la producción de anticuerpos contra la fracción B, que es la única que puede neutralizar a la misma (*Negróni, 2009*).

1.7 Vacuna

El mayor logro médico en la historia de la humanidad se le debe a la inmunología, por el desarrollo de las vacunas que han salvado millones de vidas y están logrando la erradicación

de enfermedades. El empleo de las vacunas se basa en el hecho de que la enfermedad infecciosa induce la producción de inmunidad de tipo humoral y/o celular, que sirve para evitar la aparición de la enfermedad y que reaccionan rápida y activamente ante un nuevo ataque por el mismo microorganismo. La aplicación del microorganismo muerto o atenuado, programa al sistema inmune para la producción de estas células de memoria, sin necesidad de que se presente la enfermedad, o que si esto ocurre sea en forma muy leve. Una definición común de vacuna, es un producto biológico constituido por microorganismos vivos atenuados, o muertos, o por productos derivados de ellos, que inoculados en un hospedador, estimulan en aquél un estado de inmunidad específica, que le permite resistir a las infecciones que este microorganismo causa en forma natural (Rojas, 2015). Una de las formas más frecuentes de convertir una toxina en toxoide, es tratándola con formaldehído, como su inmunogenicidad. que bloquea algunos de los grupos amino libre de la toxina. Los toxoides generalmente no son antígenos tan eficientes como la exotoxina original, pero tienen la ventaja de que pueden administrarse con seguridad, aun en dosis altas (Fratelli F., et. Al 2011).

La fabricación de vacunas contra toxina diftérica tuvo lugar a principios del siglo XIX. Las investigaciones de Paul Ehrlich y de Adolf Von Behring, culminaron con la obtención de un preparado toxina-antitoxina, que se utilizó por primera vez como agente inmunizante en 1914 y en 1924 Gastón León Ramón, consiguió la destoxificación efectiva de la toxina. Se descubrió que bajas concentraciones de formaldehído, pueden inactivar la toxina y al mismo tiempo mejorar su capacidad para inducir formación de anticuerpos específicos en el hombre. Este hecho abrió el camino para desarrollar una vacuna de inmunización masiva

y la eliminación virtual de una enfermedad, que no mucho antes había sido la principal causa de muerte en la población infantil (*Prats, 2013*).

Si bien, con las vacunas que se aplican en forma reiterada, es posible alcanzar un efecto más duradero, algunas vacunas que se administran en una sola dosis, generan inmunidad permanente. La duración de la inmunidad debería ser de por vida, pero es irregular y depende de diversas condiciones, como por ejemplo del tipo de inmunógeno y también de la persona que recibió la vacuna. La respuesta depende del estado fisicoquímico del inmunógeno, de la forma de administrarlo (es más efectivo si reproduce la vía de entrada de la enfermedad), del destino metabólico del antígeno, de las características genéticas del receptor y de factores individuales del hospedador, como por ejemplo la edad y de su estado de salud. La respuesta primaria puede ser evidente después de un periodo de latencia de una a dos semanas. Momento en el cual pueden detectarse anticuerpos en el suero, aunque esto no siempre se cumple. Algunas vacunas pueden despertar una respuesta de tipo celular. Para la difteria podría comprobarse la producción de anticuerpos con la prueba de Sckick y para los que han recibido la vacuna BCG por la conversión de la prueba PPD. Otro alcance de la inmunización es que disminuye el número de personas susceptibles de enfermarse, lo que conduce a la interrupción de la cadena de propagación. Es un tipo de inmunización masiva (*Rojas, 2015*).

Si bien las vacunas en general están exentas de riesgo, en ocasiones pueden presentarse complicaciones menores, tanto de índole local como general. Las primeras se refieren a la inflamación que suele aparecer en el lugar de la punción; además, y sobre todo en el caso de la vacuna BCG, puede producirse una linfadenitis; las segundas se vinculan con la

hipertemia, que en algunas personas aparece al día siguiente. Hay casos muy aislados de hipersensibilidad (Negróni ,2009).

Las vacunas pueden ser administradas por vía oral, por aerosoles, por vía nasal, por vía sublingual, por vía conjuntival, por vía intradérmica, por vía subcutánea y por vía intramuscular (Murray, 2013).

Desde el punto de vista sanitario, puede decirse que hay vacunas de aplicación obligatoria y vacunas recomendadas o para circunstancias especiales. Las vacunas obligatorias para los seres humanos responden a un esquema, que en su mayor parte sigue reglas uniformes para todo el mundo. No obstante, existen pequeñas variaciones entre los países industrializados y los que están agrupados en el tercer mundo. Las vacunas recomendadas, no son obligatorias y son las que se indican en casos especiales, entre estos casos se encuentran las personas que trabajan en distintas áreas de riesgo, como por ejemplo los trabajadores de la salud (Murray, 2013).

2. Justificación

Las vacunas son medicamentos biológicos, los cuales no siempre pueden definirse químicamente, debido a que son moléculas complejas y siempre están sujetas a la variabilidad inherente de los sistemas biológicos, es por eso que cada lote de producción de un producto biológico puede considerarse único (en una consistencia en la producción, ya que los lotes presentan propiedades de identidad) sin embargo, también se busca que sean lo más cercano a la homogeneidad para asegurar una buena respuesta inmune en una población.

Mediante pruebas Físicoquímicas e Inmunoquímicas se pretende la caracterización de 15 lotes para dar a conocer los principales componentes mediante pruebas electroforéticas (PAGE-SDS), cromatografía (HPLC) y antigénicas (WESTERN BLOT), para poder predecir ciertas características con las pruebas ya mencionadas.

3. HIPÓTESIS

Al realizar pruebas electroforéticas (PAGE), cromatográfica (HPLC) y antigénicas (WESTER BLOT) se podrá evaluar la calidad de un lote o número de lotes los cuales tienen un mismo proceso en la obtención del toxoide diftérico, por lo que deberán presentar características similares y así aumentará la certeza de la calidad en la producción de vacuna diftérica.

4. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar el toxoide Diftérico vacunal producido en BIRMEX, mediante pruebas Físicoquímicas e Inmunoquímicas, para establecer parámetros en sus perfiles electroforéticos y cromatográficos que se observa la consistencia en la producción de este biológico.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el patrón electroforético en 15 lotes de producción de toxoide diftérico por PAGE-SDS.
- Determinar el patrón cromatográfico de 15 lotes de toxoide diftérico por HPLC.
- Determinar la antigenicidad de 15 lotes de toxoide diftérico por INMUNOTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN de los diferentes componentes del toxoide diftérico.
- Predecir las características electroforéticas, cromatográfica y antigénica, que presentan los lotes de Toxoide Diftérico.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Material biológico

Los 15 lotes de TOXOIDE DIFTÉRICO (TD), utilizados en este estudio fueron proporcionados por el departamento de producción de los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S. A. de C. V. (BIRMEX).

Las muestras de TD fueron filtradas en esterilidad por 0.2 μm y se hicieron alícuotas de 1.0 mL, las alícuotas se conservaron entre 4 y 8°C durante todo el trabajo.

Tabla 1. Lotes de Toxoide Diftérico (15)

MTA	LOTE	Toxoide diftérico Lf/mL
1	TDC1305	1655
2	TDC1306	1623
3	TDC1307	1754
4	TDC1301	1879
5	TDC1302	2072
6	TDC1303	1993
7	TDC1304	1422
8	TDC1201	2105
9	FTDCBE080	1655
10	FTDCBE087	1634
11	FTDCBE091	2272
12	FTDCBE092	1736
13	FTDCBE095	2308
14	FTDCBE097	2056
15	FTDCBE099	1655

7. DIAGRAMA DE FLUJO

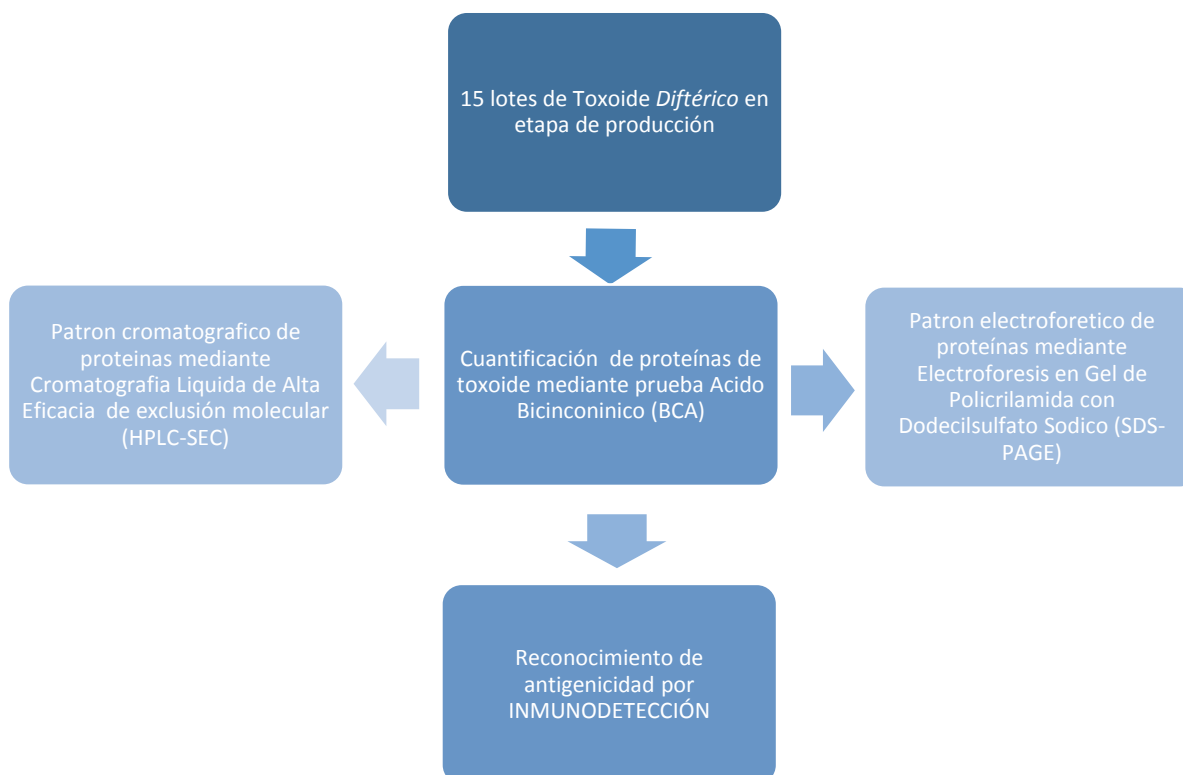


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso realizado para las pruebas Fisicoquímicas e Inmunoquímicas.

Cuantificación de proteínas por el método del Ácido Bicinconínico (BCA).

Se determinó la concentración de proteína de las muestras de toxoide diftérico por el micro método del ácido bicinconínico (Sigma-Aldrich™, No. Catalogo B9643, St. Louis USA) (Smith, P. et al., 1985). Se realizó una curva tipo, utilizando albúmina sérica bovina desde de 0 a 50 μg . El ensayo se realizó por triplicado. Apéndice 1.

A todas las muestras se les adicionaron 200 μL del reactivo de BCA (del inglés Bicinchoninic Acid), que contiene el reactivo A: solución comercial de ácido bicinconinico y reactivo B: solución de sulfato de cobre (II) pentahidratado. La microplaca que contenía las muestras

problema y la curva tipo se incubó a 37°C durante 30 minutos; se midió la absorbancia (A) a 562 nm. El ensayo se realizó por triplicado y se trabajó con el promedio.

Caracterización electroforética SDS-PAGE.

La electroforesis se realizó según lo descrito por *Laemmli, 1970*. Las soluciones y reguladores utilizados se describen en el apéndice 2. Se prepararon dos concentraciones diferentes del gel separador (12.5% y 15% de poliacrilamida) utilizando en los dos casos un gel concentrador al 5% de poliacrilamida, los geles se prepararon en una cámara electroforética (SE260 Hoefer™ Mighty Small™ II Mini Vertical). El procedimiento se realizó en condiciones no reductoras. Se cargaron 20 µg de proteína de cada muestra, se mezclaron volumen a volumen (1:1) con solución reguladora de muestra.

Se utilizaron marcadores de peso molecular de 14-97 kDa (GE™ Healthcare™,); los geles se corrieron en el regulador de corrimiento a 16 mili amperes (mA) para el gel concentrador durante 20 minutos y después se incrementó la corriente a 36 mA durante 40 minutos para el gel separador, el gel se tiñó con Azul brillante de Coomassie R-250™ 0.125% (Bio-Rad™) durante 1 hora, después se decoloraron los geles con solución decolorante (metanol: ácido acético: agua) durante 1 hora.

El perfil electroforético del TD se caracterizó empleando el sistema de adquisición de imágenes Kodak™, Gel logic 100 Imaging System™ y analizadas con el software Molecular Imaging, Kodak™. El equipo calcula el peso molecular para cada banda a partir de una regresión lineal automatizada (utilizando el patrón electroforético de los marcadores de peso molecular).

Caracterización Cromatográfica (HPLC)

Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de los diferentes lotes de toxoide diftérico, se empleó un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de arreglo de diodos (Series 1100™, Agilent Technologies™) con una señal de 214 nm. Columna empleada: Agilent Zorbax Bio Series GF-450™ con un límite de exclusión de 25,000 a 900,000 Daltons con un flujo de 1 ml/min. Se utilizó como fase móvil, una solución reguladora de fosfatos pH 7.0 (PBS 150 mM-NaCl 0.85%). Se inyectaron 2 µg de proteína de cada muestra.

Inmunotransferencia e Inmunodetección

La electroforesis se realizó según lo descrito por *Laemmli, 1970*. Se prepararon diferentes concentraciones del gel separador (15% de poliacrilamida) utilizando un gel concentrador al 5% de poliacrilamida, los geles se prepararon en una cámara electroforética (SE 260 Hoefer™ Mighty Small™ II Mini Vertical); se utilizaron 5 mL de poliacrilamida para el gel separador y 1.5 mL para el gel concentrador. Este procedimiento se realizó en condiciones no reductoras. Se cargaron 20 µg de proteína para cada una de las muestras por pozo. Se mezclaron volumen a volumen (1:1) con solución reguladora de muestra (Bio-Rad™).

Las muestras separaron por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), empleando un equipo de transferencia semi-seco (iBlot™, Invitrogen™). La electrotransferencia de las proteínas se realizó mediante la metodología descrita por *Towbin et. Al., 1979*. La detección se realizó utilizando el sistema de detección de proteínas SNAP i.d.™, Millipore™.

La membrana se bloqueó con solución de bloqueo durante 12 hrs a 4°C, posteriormente se incubo con el primer anticuerpo anti-toxina diftérica (1:1000), para después incubar con un

segundo anticuerpo Anti-IgG de caballo acoplado a peroxidasa (1:4000) y por último se revelo con un estuche comercial de substrato conjugado de HRP. Se incluyó como testigo negativo toxoide tetánico.

VI. Resultados y Discusión

Cuantificación de proteína

En la tabla 2 se muestran los resultados de la cuantificación de proteínas mediante la prueba BCA.

Tabla 2. Concentración de proteína en las diferentes muestras de toxoide diftérico (promedio n=3).

MTA	LOTE	mg/mL	STD ±
1	TDC1305	9.0	±1.05
2	TDC1306	7.8	±0.60
3	TDC1307	10.2	±1.02
4	TDC1301	10.0	±0.89
5	TDC1302	10.4	±0.83
6	TDC1303	8.7	±1.06
7	TDC1304	12.9	±0.35
8	TDC1201	11.1	±1.21
9	FTDCBE080	9.8	±1.22
10	FTDCBE087	9.3	±0.38
11	FTDCBE091	11.2	±0.60
12	FTDCBE092	8.6	±0.95
13	FTDCBE095	8.1	±0.73
14	FTDCBE097	8.9	±0.76
15	FTDCBE099	8.4	±0.34

Caracterización electroforética (SDS-PAGE) de las muestras de toxoide diftérico.

Se probaron dos concentraciones para gel de corrimiento: 12.5 y 15% de poliacrilamida. En el gel con una concentración de 12.5% de poliacrilamida, las bandas del toxoide diftérico se observaron difusas sin resolución (datos no mostrados). En la concentración de 15% de poliacrilamida se observó una mejor resolución de las bandas por lo que esta concentración se empleó para el análisis de todos los lotes.

Se obtuvieron los perfiles electroforéticos del toxoide diftérico empleando la técnica de SDS-PAGE, corridos como se describió en el apartado de materiales y métodos.

En la tabla 3 se muestra el promedio del peso molecular de las diferentes bandas encontradas en las diferentes muestras proporcionadas por el Laboratorio de Producción del Toxoide Diftérico.

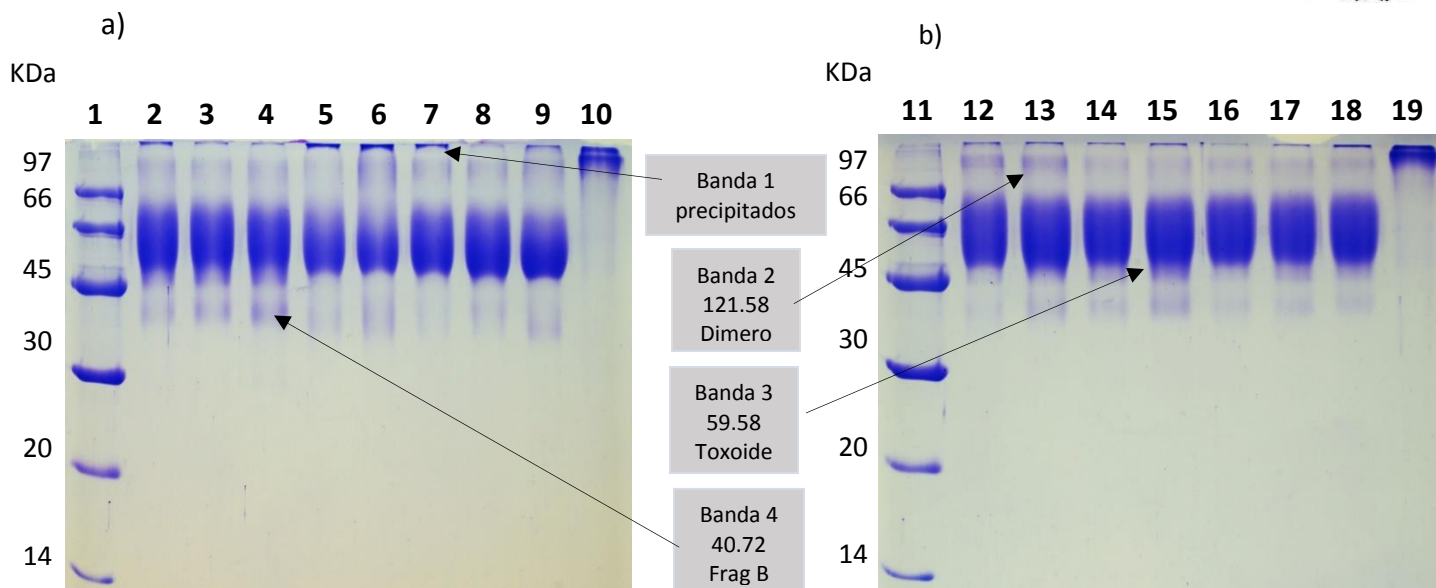


Figura 9 a y b. Caracterización y determinación del peso molecular de las muestras de referencia proporcionadas por el Laboratorio de Producción de toxoide diftérico por SDS-PAGE. Carriles: Marcadores de peso molecular bajos GE Healthcare (1 y 11), TDC01(2), TDC02(3), TDC03(4), TDC04(5), TDC05(6), TDC06(7), TDC07(8), TDC08(9), TDC09(12), TDC10(13), TDC11(14), TDC12(15), TDC13(16), TDC14(17), TDC15(18), testigo negativo (toxide tetánico 10 y 19).

Tabla 3. Peso molecular de cada banda observada en el PAGE-SDS.

No.	MUESTRA	PESO MOLECULAR (KDa)					
		BANDA 2	σ	BANDA 3	σ	BANDA 4	σ
1	TDC1305	121.6	± 0.20	59.4	± 1.27	40.5	± 0.39
2	TDC1306	121.4	± 0.42	59.9	± 1.37	40.3	± 0.25
3	TDC1307	121.4	± 0.85	59.9	± 1.09	40.7	± 0.56
4	FTDCBE080	120.9	± 1.34	58.8	± 0.64	40.3	± 0.59
5	FTDCBE087	120.5	± 0.38	58.8	± 1.16	40.2	± 0.49
6	FTDCBE091	121.7	± 0.90	59.8	± 2.19	40.1	± 0.81
7	FTDCBE092	122.1	± 2.10	59.1	± 1.65	40.1	± 0.55
8	FTDCBE095	123.2	± 0.92	59.1	± 1.36	40.2	± 0.67
9	FTDCBE097	121.9	± 0.65	59.6	± 0.57	40.8	± 0.26
10	FTDCBE099	121.0	± 0.64	59.6	± 0.50	41.1	± 0.08
11	TDC1301	120.9	± 0.76	59.2	± 1.16	41.2	± 0.51
12	TDC1302	122.1	± 1.03	59.8	± 0.77	41.1	± 0.35
13	TDC1303	121.9	± 1.21	59.9	± 0.12	41.1	± 0.47
14	TDC1304	121.3	± 1.65	59.8	± 0.67	41.2	± 0.59
15	TDC1201	121.2	± 0.65	60.3	± 0.51	41.1	± 0.02

Peso molecular de los 15 lotes de toxoide diftérico, se reportan en kilodaltones (kDa) n=3.

En la tabla No. 3 se observa las tres bandas del peso molecular (KDa) de las 15 diferentes muestras del toxoide diftérico, la primera banda con un peso promedio de 121.54 KDa

posiblemente se relacione con el dímero del toxoide diftérico la cual se puede observar en todas las muestras de manera tenue, la banda No.3 corresponde posiblemente con el monómero la cual tiene un peso promedio de 59.93 KDa y se puede observar en todas las muestras de manera marcada a excepción en las muestras 5-9 las cuales se observan de una forma tenue y por último tenemos la banda No. 4 que posiblemente se relacione con el fragmento B que tiene un peso promedio de 40.66 KDa y la cual se observa en todas las muestras de una manera muy pronunciada.

Como menciona Fratelli et al., 2011, la poca variabilidad del resultado puede deberse al proceso de destoxificación, ya que en este proceso se lleva a cabo una compleja reacción entre un número variable de productos del medio de cultivo donde se obtiene y destoxifica la toxina diftérica, además de contener sitios de entrecruzamiento intramolecular en el toxoide diftérico. Así mismo, el efecto provocado por la destoxificación también da como resultado, una dimerización del toxoide diftérico, tal vez porque la toxina diftérica cuenta con algunos sitios sensibles que reaccionan fácilmente con el formaldehído a una concentración establecida para lograr la destoxificación (Metz B., et al., 2004). La forma estructural de la toxina de la difteria antes de la desintoxicación por el formaldehído es un factor importante para el número de bandas de proteínas, mientras que en la forma mellada da tres bandas (toxoides y los fragmentos A y B) (Metz B., et al., 2007).

Caracterización Cromatográfica de las muestras de toxoide diftérico.

Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de las diferentes muestras de toxoide diftérico (TDC 1-15), empleando la técnica de HPLC-SEC, con una columna de filtración en gel Agilent

Zorbax Bio Series GF-450™ con un límite de exclusión molecular de 25,000-900,000 Da, a un flujo de 1 ml/min.

En el perfil cromatográfico se observa un ligero pico que sobresale con un tiempo de retención “*t_r*” entre 6.617 y 7.001 minutos, la cual posiblemente se relacione con la banda que corresponde al peso de 137.36 kDa (promedio) formando parte del Toxoide Diftérico, el siguiente pico que se observa como ligero hombro del lado izquierdo del pico principal con un *t_r* entre 9.939 y 10.098 la cual posiblemente se relacione con la banda de peso 121.58 kDa (promedio) el cual probablemente se relacione con el dímero diftérico, la siguiente señal reportada la cual tiene un *t_r* entre 10.678 a 10.799 que se observa en mayor proporción la cual posiblemente corresponde al monómero con un peso de 58 kDa (observado 59.58 kDa promedio) observada en todas las figuras 3-17. La siguiente señal la cual se observa como un ligero hombro del lado derecho del pico principal con un *t_r* entre 11.751 y 11.917 la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un peso de 39kDa (observado 40.72 kDa promedio) y por último se observa un pequeño pico con un *t_r* entre 14.256 y 14.317 el cual no se observa en el gel de poliacrilamida ni con la técnica de Wester Blot debido a la sensibilidad de las técnicas mencionadas, la cual posiblemente se relacione con el fragmento A del toxoide diftérico el cual tiene un peso de 21 kDa.

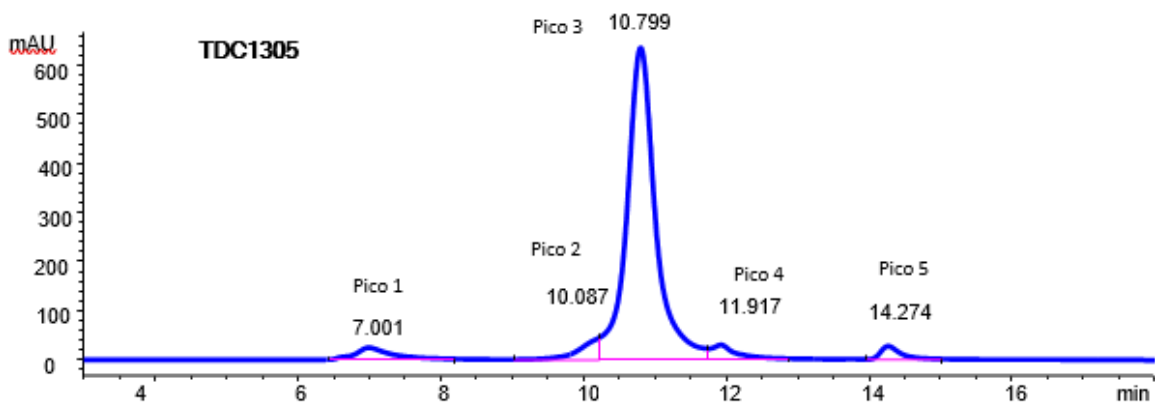


Figura 10. Perfil cromatográfico del lote TDC1305 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 7.001 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.87, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.799, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.917 y por último con un tr de 14.272 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A

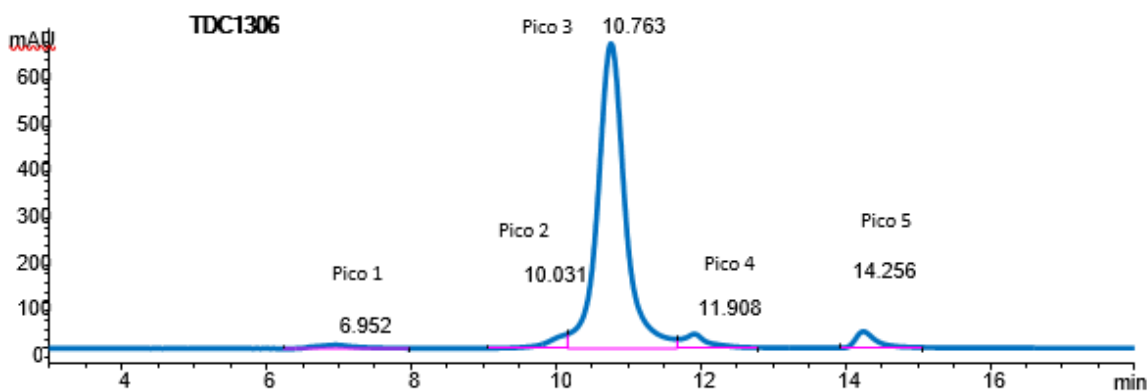


Figura 11. Perfil cromatográfico del lote TDC1306 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.952 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.031, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.763, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.908 y por último con un tr de 14.256 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A.

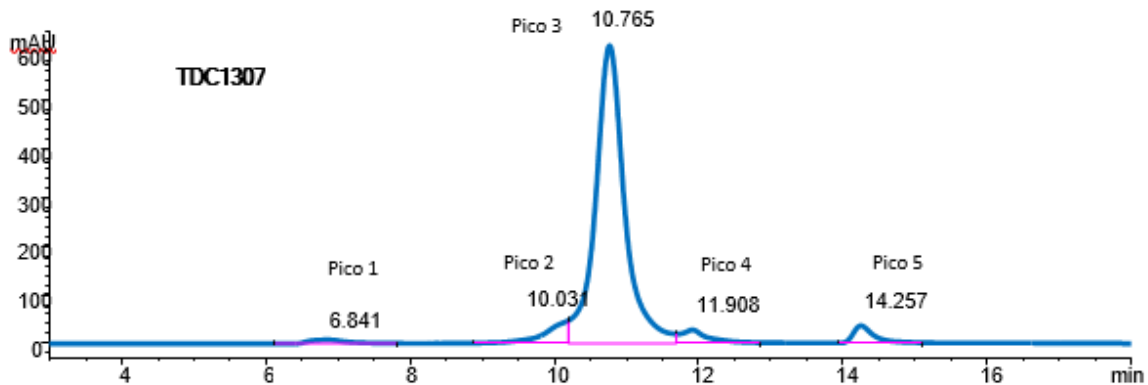


Figura 12. Perfil cromatográfico del lote TDC1307 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.841 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.031, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.765, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.908 y por último con un tr de 14.257 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A.

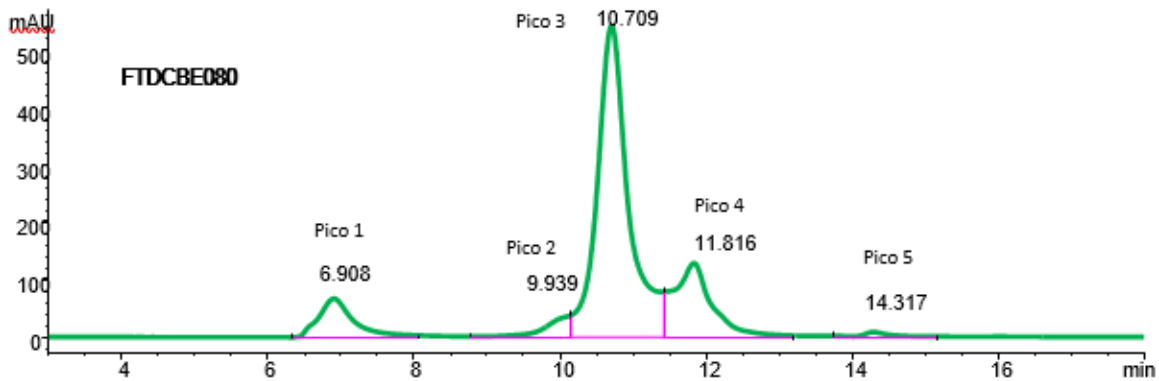


Figura 13. Perfil cromatográfico del lote FTDCBE080 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.908 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 9.939, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.709, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.816 y por último con un tr de 14.317 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A.

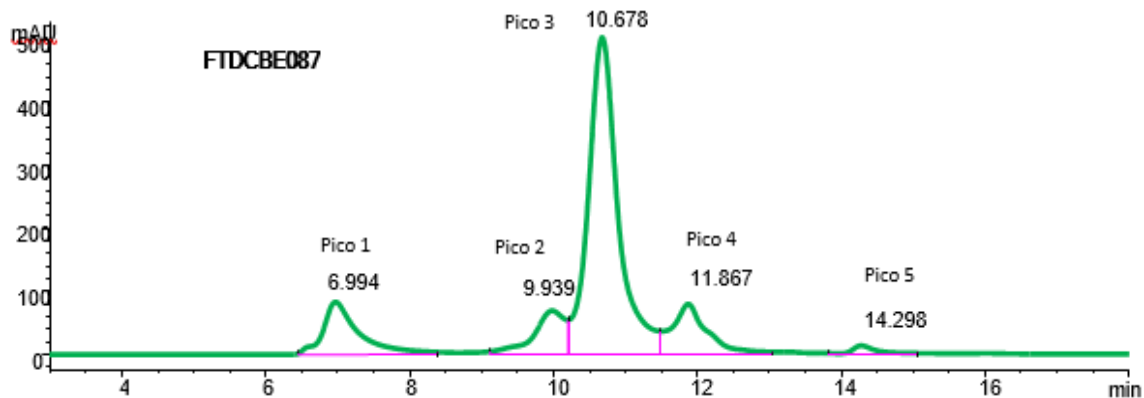


Figura 14. Perfil cromatográfico del lote FTDCBE087 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.994 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione es el dímero con un tr de 9.939, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.678, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.867 y por último con un tr de 14.298 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A.

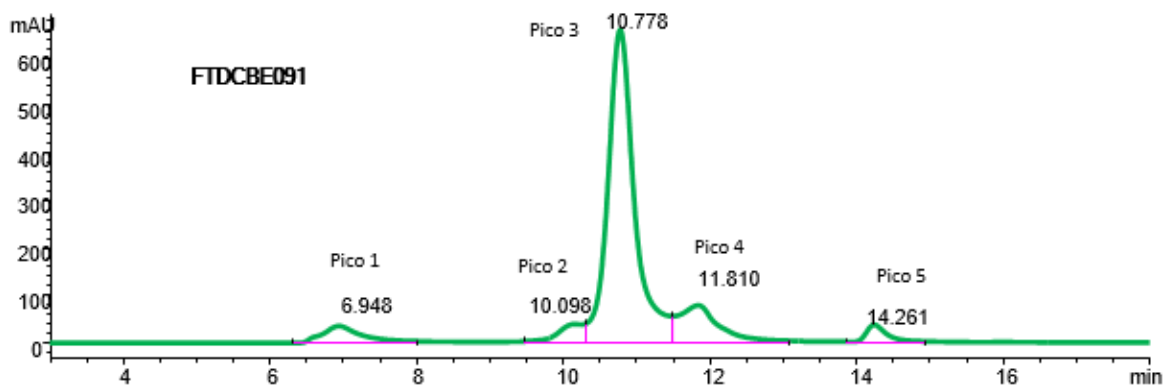


Figura 15. Perfil cromatográfico del lote FTDCBE091 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.948 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.098, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione el monómero con un tr de 10.778, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.810 y por último con un tr de 14.261 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A.

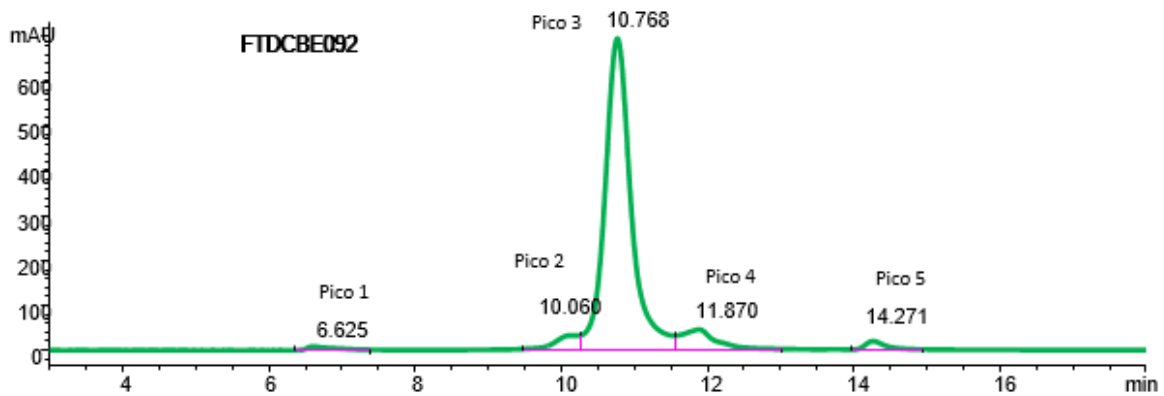


Figura 16. Perfil cromatográfico del lote FTDCBE092 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.625 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.060, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.768, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.870 y por último con un tr de 14.271 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A.

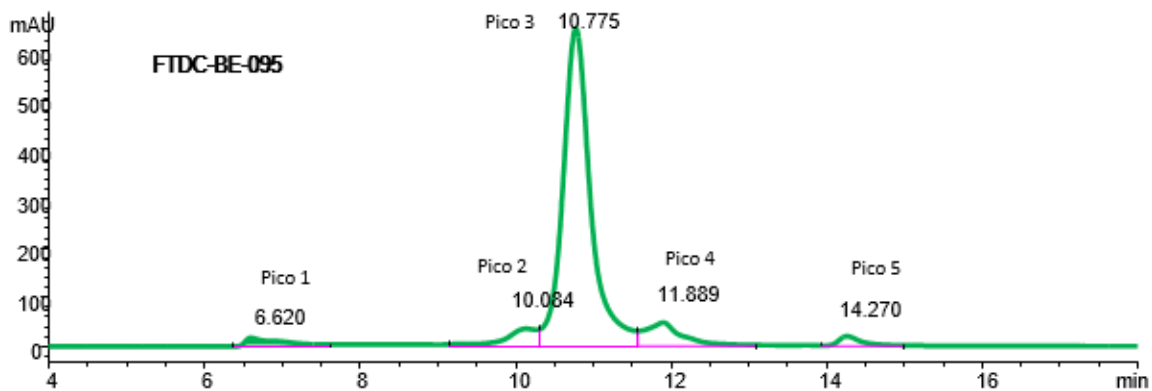


Figura 17. Perfil cromatográfico del lote FTDCBE095 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.625 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.057, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.769, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.871 y por último con un tr de 14.271 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A.

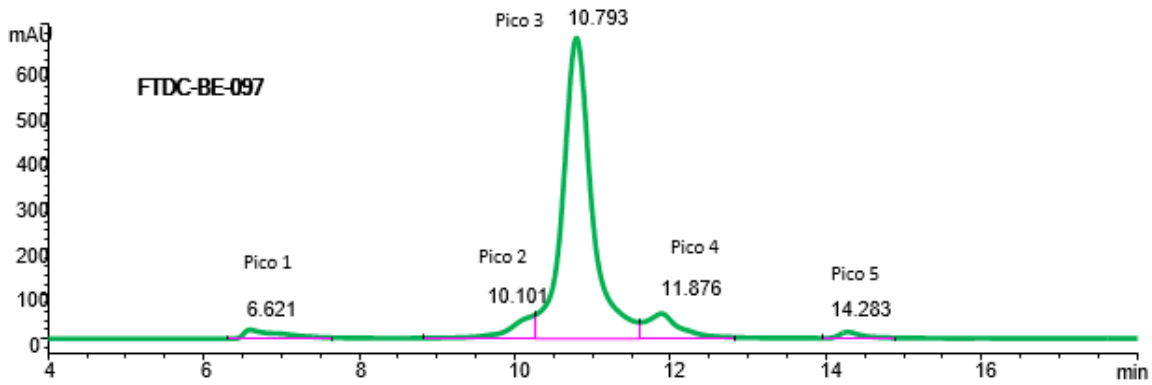


Figura 18. Perfil cromatográfico del lote FTDCBE097 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.622 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.085, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.776, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.891 y por último con un tr de 14.28 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A.

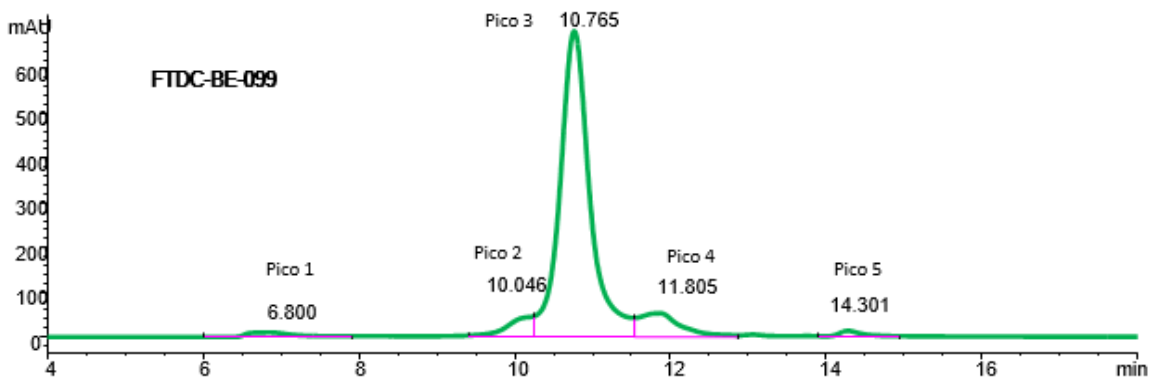


Figura 19. Perfil cromatográfico del lote FTDCBE099 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.617 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.086, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.793, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.878 y por último con un tr de 14.282 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A.

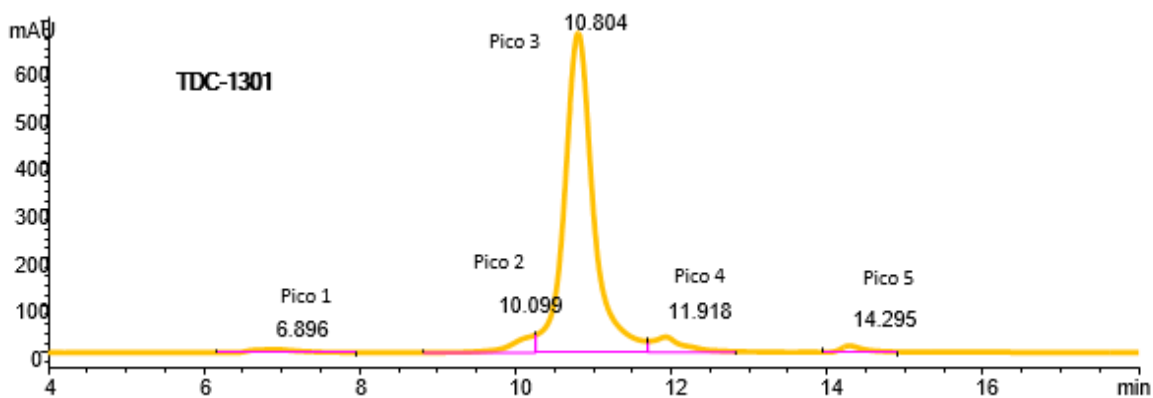


Figura 20. Perfil cromatográfico del lote TDC1301 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.806 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.050, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.769, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.812 y por último con un tr de 14.306 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A.

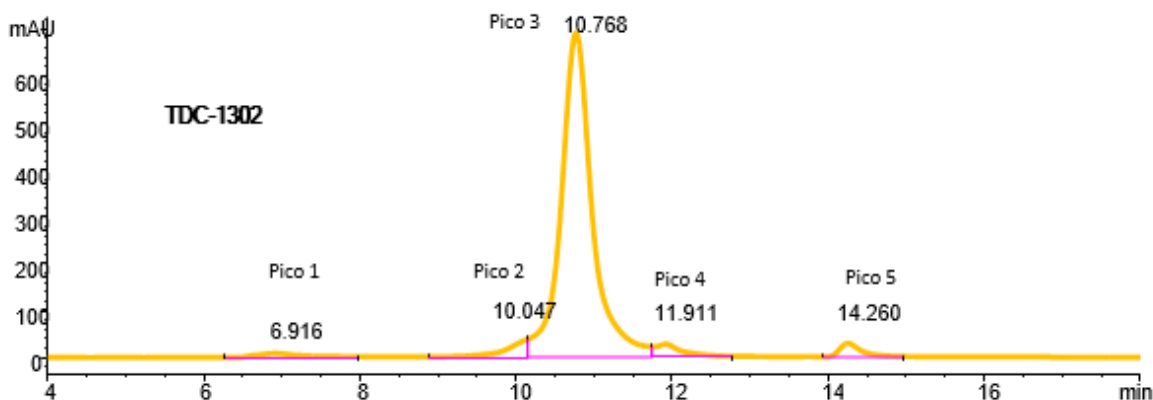


Figura 21. Perfil cromatográfico del lote TDC1302 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.876 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.047, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.790, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.911 y por último con un tr de 14.293 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A.

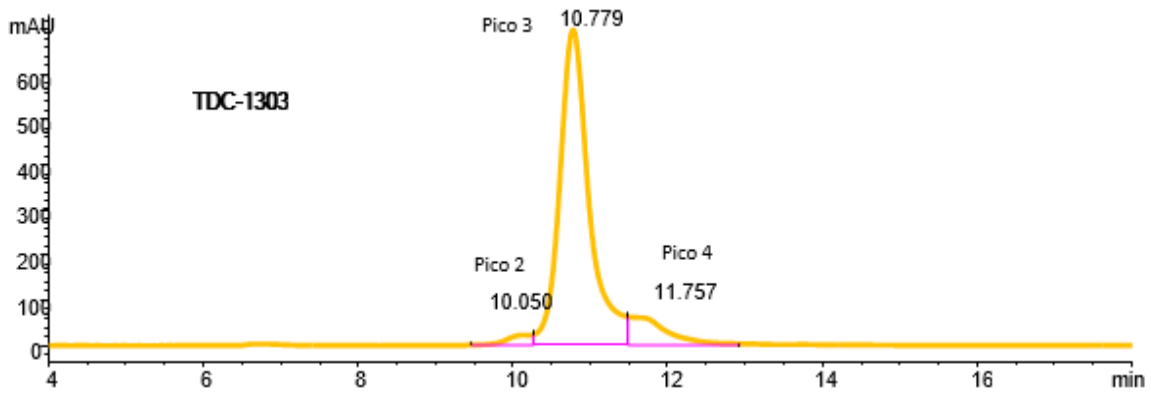


Figura 22. Perfil cromatográfico del lote TDC1303 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.920 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.050, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.771, la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.913 y por último con un tr de 14.274 la cual posiblemente se relacione con el fragmento A.

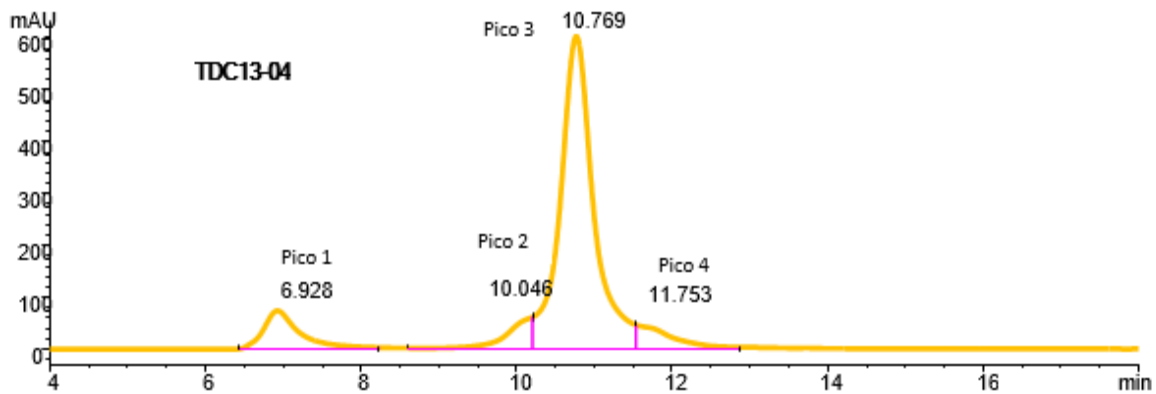


Figura 23. Perfil cromatográfico del lote TDC1304 por HPLC-SEC se observa 3 picos con diferentes tr la primera señal la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.045, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.783 y la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.751.

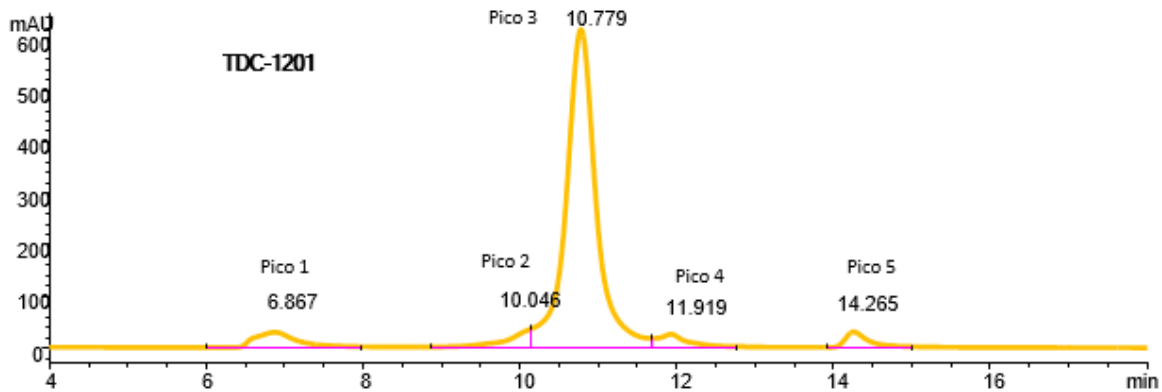


Figura 24. Perfil cromatográfico del lote TDC1201 por HPLC-SEC se observa 5 picos con diferentes tr la primera señal con un tr de 6.942 se asocia a componentes no identificados propios del toxoide diftérico, la segunda señala la cual posiblemente se relacione con el dímero con un tr de 10.045, el tercer pico que se observa la cual posiblemente se relacione con el monómero con un tr de 10.774 y la cuarta señal la cual posiblemente se relacione con el fragmento B con un tr de 11.805.

Se muestran las figuras 10-24 de las diferentes muestras de TD, se observan en casi todos los perfiles 5 picos los cuales probablemente podemos relacionar con los fragmentos que constituyen el Toxoide Diftérico, el primer pico se asocia a componentes no identificados propios del TD, el segundo pico el cual posiblemente se relacione con el dímero del TD, el tercer pico posiblemente lo relacionamos con el monómero del biológico y el cuarto pico posiblemente se relaciona con el fragmento B.

Se observa el área del pico 1 en todas los gráficos menos en la muestra TDC1303 (figura 22) posiblemente a menos impurezas, este pico probablemente se asocia a componentes no identificados del TD, se toma la media de 4.57 y así lo relacionamos con la inexistencia de dichos componentes, el área del pico 2 se observa en todas las muestras como un ligero hombro con una media de 4.62 mientras, el área del pico 3 con un promedio de 81.08 observando en el gráfico que tiene la mayor área posiblemente se relacione con el monómero, el área pico 4 con un promedio de 7.92 el cual se observa en todas las muestras

como un ligero hombro que posiblemente relacionándolo con el fragmento B, el porcentaje de las áreas obtenidas de los geles de poliacrilamida corresponden a lo observado en cada banda que constituye el Toxoide Diftérico.

Tabla No 4. Área de cada banda obtenida del HPLC de las muestras de toxoide diftérico. n=3

No.	LOTE	Área 1 (Pico 1)	STD	Área 2 (Pico 2)	STD	Área 3 (Pico 3)	STD	Área 4 (Pico 4)	STD	Área 5 (Pico 5)	STD
1	TDC1305	4.3	0.05	4.0	0.18	85.0	0.20	3.8	0.02	2.8	0.06
2	TDC1306	1.4	0.02	2.8	0.29	87.8	0.71	4.2	0.27	3.7	0.14
3	TDC1307	1.4	0.01	5.3	0.10	85.8	0.27	3.8	0.08	3.6	0.08
4	FTDCBE080	9.5	0.06	3.7	0.02	66.1	0.05	19.8	0.08	0.9	0.02
5	FTDCBE087	12.7	0.01	9.4	0.01	64.3	0.02	12.1	0.01	1.5	0.00
6	FTDCBE091	6.0	0.01	4.5	0.06	72.7	0.05	13.3	0.01	3.5	0.00
7	FTDCBE092	1.1	0.00	3.9	0.05	85.1	0.02	7.9	0.01	2.0	0.01
8	FTDCBE095	3.0	0.01	5.4	0.02	81.1	0.04	8.3	0.02	2.2	0.00
9	FTDCBE097	3.2	0.00	5.4	0.02	81.8	0.03	8.1	0.03	1.5	0.02
10	FTDCBE099	2.0	0.02	4.9	0.01	82.5	0.03	9.1	0.01	1.4	0.01
11	TDC1301	1.5	0.01	3.9	0.10	88.0	0.12	4.9	0.01	1.5	0.01
12	TDC1302	1.7	0.01	3.5	0.02	88.5	0.02	3.4	0.01	2.8	0.01
13	TDC1303			2.5	0.01	87.2	0.11	10.3	0.09		
14	TDC1304	10.5	0.01	6.2	0.46	77.1	0.45	6.2	0.02		
15	TDC1201	5.7	0.02	4.0	0.05	83.2	0.25	3.7	0.04	3.3	0.07

Utilizando el software Agilent ChemStation se calculó el porcentaje de pureza del toxoide diftérico (monómero) y de los otros componentes e impurezas.

En la tabla No.4 podemos observar el área calculada de cada uno de los componentes de los 15 lotes de Toxoide Diftérico, la primera banda, la cual se observa de una forma muy marcada, tiene un área de 4.28% con un valor entre 1.4 y 12.7 y probablemente podemos correlacionarla a los precipitados; la segunda banda se observa de manera tenue pero en todas las muestras la cual tiene un área de 4.64% con un valor 2.5 y 9.4 probablemente corresponda al dímero, observando la figura 9, la tercer banda puede verse en el gel en mayor proporción además de ser muy intensa ya que tiene el mayor porcentaje de área con 89% probablemente corresponde al toxoide con un valor entre 66.1 y 88.5, por último

tenemos una banda en el gel muy tenue observando un área de 2.05% entre valores de 0.9 y 3.7 que posiblemente se relacione con el fragmento B, cabe destacar que no pudo registrarse el área del fragmento A.

Inmunodetección de las diferentes muestras de TD.

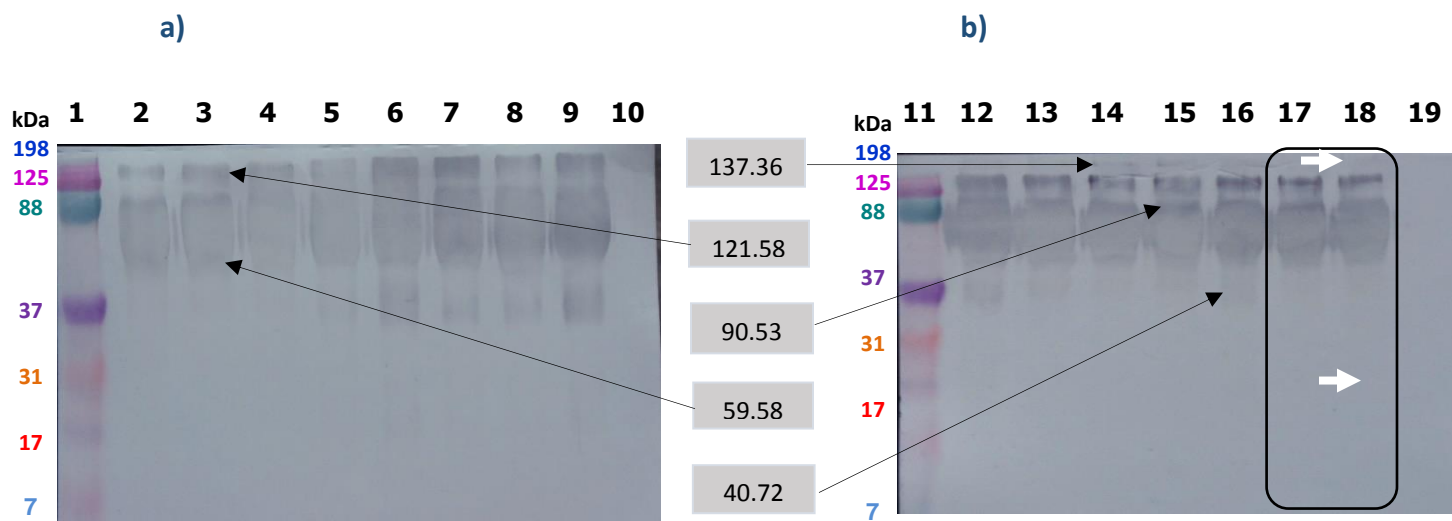


Figura 25 a) y b). Inmunodetección del TD. Primer Anticuerpo: anti-toxina diftérica (1:1000), segundo anticuerpo: Anti-IgG de caballo unido a peroxidasa (1:4000). Carriles: Marcadores de peso molecular bajos GE Healthcare (1 y 11), TDC1305(2), TDC1306(3), TDC1307(4), FTDCBE080(5), FTDC087(6), FTDC091(7), FTDC092(8), FTDC095(9), FTDC097(12), TDC1301(14), TDC1302(15), TDC1303(16), TDC1304(17), TDC1201(18), testigo negativo (toxoiide tetánico 10 y 19).

Las muestras de TD fueron separadas por SDS-PAGE, transferidas a una membrana de PVDF e incubada con anti-toxina diftérica. El resultado se muestra en la figura 25 a y b, en donde se observa un patrón de reconocimiento antigénico muy evidente por la anti-toxina diftérica hacia todas las muestras TD-1-15 (carriles 2-9 y 11-18).

Se reconocen de manera muy evidente a la banda de 121.58kDa (promedio) la cual posiblemente se relacione con la banda al dímero, además de haber sido reconocida también la banda de 59.58 kDa (promedio) la cual posiblemente se relacione con el monómero, se observa un reconocimiento de una banda con un peso molecular de 40.72 kDa (promedio) la cual posiblemente se relacione y correspondiendo al fragmento B, se

reconoció el fragmento de 21.1 kDa, no es visible en la imagen al ser muy débil el reconocimiento, probablemente a que el fragmento A no es muy inmunogénico como el fragmento B. Adicionalmente se observaron otras impurezas que no fueron detectadas por HPLC y SDS-PAGE en las muestras TD 1-15 (carriles 2-9 y 11-18), señaladas con una flecha color blanco. Debido a que la técnica de Inmunodetección tiene una menor sensibilidad que la técnica de SDS-PAGE y HPLC. (Fratelli et. Al. 2011)

Tabla No 5. Se observan las 15 muestras como Lote, Lf, proteína, pureza (HPLC) y peso molecular de las muestras de toxoide diftérico obtenidas por el departamento de producción, en la cual podemos observar sus Lf/mL, concentración de la proteína en mg/mL, la pureza del toxoide diftérico (HPLC) y por último el peso molecular promedio del toxoide diftérico. n=3.

MTA	LOTE	Lf/mg de N2 proteico	Proteína mg/mL	Pureza de toxoide diftérico (HPLC)
1	TDC1305	1655	9.0	85.0
2	TDC1306	1623	7.8	87.8
3	TDC1307	1754	10.2	85.8
4	TDC1301	1879	10.0	88.0
5	TDC1302	2072	10.4	88.5
6	TDC1303	1993	8.7	87.2
7	TDC1304	1422	12.9	77.1
8	TDC1201	2105	11.1	83.2
9	FTDCBE080	1655	9.8	66.1
10	FTDCBE087	1634	9.3	64.3
11	FTDCBE091	2272	11.2	72.7
12	FTDCBE092	1736	8.6	85.1
13	FTDCBE095	2308	8.1	81.1
14	FTDCBE097	2056	8.9	81.8
15	FTDCBE099	1655	8.4	82.5

Hablando de la patogenia de la enfermedad el factor de virulencia más importante de *C. diphtheriae* es la exotoxina, un polipéptido mediado por bacteriófagos codificado por el cromosoma bacteriano y muy conservado. Fuera de la célula hospedadora, la exotoxina es

relativamente inactiva, pero tras unirse a la célula e introducir en ella su fragmento B (37 kDa), no tóxico, se desprende el fragmento A (21 kDa) de gran toxicidad que inhibe la síntesis celular de proteínas (Zolfaharian H., 2004).

Todos los microorganismos de la especie *C. diphtheriae* tóxigena son capaces de elaborar la misma exotoxina productora de la enfermedad. Los factores que influyen en la producción de toxina *in vitro* son presión osmótica, concentración de aminoácidos, pH y disponibilidad de fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno. Los factores que controlan la producción de toxina *in vitro* no se comprenden bien. La antitoxina de la difteria se produce en diversos animales (caballos, corderos, cabras y conejos) mediante la inyección repetida de toxoide purificado y concentrado (Jawetz, 2014).

El toxoide diftérico es una de las vacunas más antiguas utilizadas hoy en día. Su uso está bien asentado en todo el mundo y su proceso de fabricación es relativamente sencillo, de modo que el costo de la vacuna es bajo. No obstante, al haberse aumentado ahora el número de dosis recomendadas, es probable que aumente una reacción adversa. Aunque el problema posiblemente pueda mejorarse mediante una purificación adicional del toxoide para eliminar las proteínas extrañas que lo acompañan, las vacunas antidiftéricas óptimas desarrolladas en el futuro deberán proporcionar una protección más duradera con menos aplicaciones (WHO, 2014).

Es importante precisar el objetivo de este trabajo el cual es la caracterización de 15 lotes de TD, las técnicas como HPLC, SDS-PAGE e INUNOTRANSFERENCIA son una alternativa para la caracterización del TD, sin embargo proponemos el uso de estas como herramientas para un mejor control de calidad en su producción, al ser un producto biológico es difícil la

predicción del comportamiento de sus moléculas sensibles (difícil caracterización) de igual manera se pretende el uso de estas técnicas como una herramienta rápida e informativa en el laboratorio para evaluar las características del antígeno proteico, ya que las técnicas de SDS-PAGE y HPLC permiten el análisis de mezclas complejas de proteínas ofreciendo la ventaja de que utilizan volúmenes pequeños de muestra. Adicionalmente estas técnicas pueden resultar muy útiles para determinar la consistencia en la producción del TD lote a lote y se han propuesto que estas características pudieran predecir la calidad de los lotes de producción bajo los lineamientos de la OMS y FEUM (OMS, 2014 & FEUM, 2008).

La caracterización electroforética de los 15 lotes (figura 9 a y b) en las cuales se observa una homogeneidad en todos los lotes, con respecto a la primera banda que se puede deber a las reacciones que conducen a una unión transversal. Estas reacciones pueden ocurrir entre los aminoácidos de la misma molécula de la toxina, dando como resultado compuestos de mayor peso molecular a la vinculación cruzada interna de la proteína, entre dos moléculas de toxina resultantes en la dimerización y/o entre un pequeño péptido presente en el medio y una molécula de la toxina. Los complejos que se forman debido a estas reacciones pueden permanecer con el toxoide hasta el final del proceso de purificación y es muy difícil separarlos. Una manera fácil de evitar la mayoría de estas impurezas es purificar la toxina de difteria antes de desintoxicación. Por lo tanto, la posibilidad de la creación de precipitados mencionados de reacciones intra e inter moleculares reducidos a una cantidad mínima, y la vacuna producida no puede causar efectos secundarios alérgicos (Zolfaharian H., 2004).

La caracterización realizada con la técnica HPLC refleja una homogeneidad en los cromatogramas obtenidos de los 15 lotes, se observa un primer pico con un tiempo de retención (tr) de 6.617 - 7.001 minutos el cual posiblemente se relacione con la banda de un peso de 137.36 kDa (promedio) la cual tiene un área promedio que corresponde a un 4.28% Fratelli et al., (2011) menciona que se asocian con el tratamiento de la toxina a toxoide por formalina ya que el proceso de destoxificación puede interferir con la calidad del Toxoide Diftérico producido. La exotoxina contiene sitios que reaccionan fácilmente con formaldehído, pero como el sobrenadante de cultivo utilizado para obtener el toxoide contiene muchos otros los componentes (tales como aminoácidos, péptidos y proteínas específicas). El segundo pico observado con un tr de 9.939 – 10.098 posiblemente corresponda a la banda de 121.58 kDa (promedio) con un área de 4.64% siendo este probablemente el dímero. El pico principal se encuentra con un tr de 10.678-10.799 el cual posiblemente se relacione con la banda de 59.58 kDa (promedio) la cual cuenta con la mayor área de 89% y muy probablemente corresponda al toxoide diftérico. El cuarto pico se observa como un pequeño hombro del lado derecho en todos los cromatogramas y que muy probablemente corresponda al fragmento B el cual tiene un tr de 11.751-11.917 y un área de 2.05% y por último se observa un pequeño pico que probablemente corresponda al fragmento A del cual no se logró registrar el área.

Respecto a la técnica Western Blot (Figura No.11 a y b) hay un reconocimiento de manera similar de todos los lotes, se observa que hay un reconocimiento de la primera banda con un peso promedio de 137.36 kDa con lo cual podemos mencionar que forma parte del toxoide diftérico. Se observa una banda con un peso de 121.58 kDa la cual probablemente

se relacione con el dímero, las siguientes dos bandas se observan de una manera muy evidente (90.53 y 59.58 kDa) comprenden el toxoide, una banda de un peso molecular de 40.72 kDa (probablemente el fragmento B) se observa pero el componente de 30 kDa (posiblemente el fragmento A) no fue reconocido con la anti-toxina, ya que el fragmento A no es muy inmunogénico como el fragmento B (*Perera V., et al., 1990*).

Las pruebas utilizadas en este trabajo Inmunoquímicas y Fisicoquímicas (SDS-PAGE, HPLC e INMUNODETECCION) han demostrado ser adecuados para el control de la consistencia y la estabilidad para la producción de toxoides de difteria (*Coombes L., et al., 2009*).

Las vacunas para uso en intervenciones de salud pública a gran escala deberán cumplir los requisitos de calidad actuales de la OMS, ser inocuas y producir un efecto significativo contra la propia enfermedad en todos los grupos de población objetivo (OMS, 2014).

SDS-PAGE se ha utilizado rutinariamente durante varias décadas para el análisis de los componentes de la vacuna a base de proteína. Con lo cual se propone el uso de isoelectroenfoque (IEF) electroforesis bidimensional (una combinación de IEF y SDS-PAGE) y electroforesis capilar se utilizan con menos frecuencia para el control de calidad de las vacunas. Técnicas electroforéticas pueden revelar las mismas propiedades físicas de antígenos de proteínas como la cromatografía líquida. IEF detectará los cambios en grupos cargados debido a tratamiento con formaldehído. La alta resolución de electroforesis en gel bidimensional se utiliza muy poco para fines de control de calidad, pero la técnica puede ser útil como control en proceso durante el cultivo de las bacterias, que puede adaptarse expresión de la proteína como una función de las condiciones metabólicas (*Metz B., et al., 2002*).

Como una expectativa menciona *Pecetta S., et al., 2015* y *Aleksandrovna T., et al., 2015*, el desarrollo de una vacuna sintética de toxina de la difteria. De hecho, es mucho mejor para un refuerzo con un pequeño péptido que contra la proteína de longitud completa. Una vacuna sintética tiene que centrarse en el sistema inmune epítomos de células B que son importantes para la neutralización de la producción de anticuerpos. Por otra parte, los péptidos pequeños son más seguros que los toxoides, a pesar de que los toxoides son reclamados para ser completamente atenuada por formalina. El riesgo de reacción autoinmune se reduce en gran medida cuando se utiliza un péptido corto con un pequeño número de objetivos potenciales para el desarrollo de anticuerpos. La síntesis de péptidos puede ser más barato que la producción de toxoide, especialmente si la longitud es de menos de 25 residuos de aminoácidos. Las características antigénicas de toxoide de la difteria no son los mismos que los de la toxina diftérica.

VIII. Conclusiones

- ✚ El patrón electroforético de los 15 lotes estudiados realizado mediante la técnica SDS-PAGE presentan 4 bandas de diferente peso molecular relacionándose con el biológico de interés en las cuales 2 son muy pronunciadas y 2 se observan tenues, así observando una homogeneidad en la prueba en todos los lotes.
- ✚ El patrón cromatográfico de los 15 lotes estudiados realizado mediante la técnica HPLC se logró determinar los componentes reflejando así 5 picos en todas las muestras estudiadas, observando con una mayor área el pico 3 siendo el producto de interés.
- ✚ El patrón antigénico se determinó mediante la técnica de Inmunotransferencia en la cual se observa el reconocimiento de 5 bandas, observándose 2 muy fuertemente y 3 muy tenues, todas las fracciones pertenecientes al biológico.
- ✚ Con este tipo de técnicas se podrá predecir las características electroforéticas, cromatográfica y antigénica, que presentan los lotes de Toxoide Diftérico.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Aleksandrovna T., Victorovich V., Vcitorovich E., Leonidovna K., Archipovich A., (2015), Structural and antigenic features of the synthetic SF23 peptide corresponding to the receptor binding fragment of diphtheria toxin, 63, 235-244.
2. Arteaga, R., Giono, S. Género *Corynebacterium* Capítulo XXXII. En, Microbiología, Bacteriología y Virología. 2010 y Koneman, E. 2008. Pag. 113-140.
3. Brock T. (1987) *Microbiología*. 4ª edición editorial Hispanoamericana. Pág. 605.
4. Brooks G., Carroll K., Butel J., Morse S., Mietzner T., (2014) *Microbiología Médica*. 26ª edición editorial Mc Graw Hill education. Pág. 65-69.
5. Belasco F., Goes A., Muller S., Gondo H., Hamuri M., (2014). Characterization of production processes for tetanus and diphtheria anatoxins, 42, 91-100.
6. Coombes L., Stickings P., Tierney R., Rigsby P., Sesardic D., (2009). Development and use of a novel in vitro assay for testing of diphtheria toxoid in combination vaccines, 350, 142-149.
7. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). Décima edición. 2011.
8. Fratelli F., Abrañao J., Tojeira A., Marques B., Guidolin R., Pereira C., (2011). An alternative method for purifying and detoxifying diphtheria toxin, 57, 1093-1100
9. Jawetz, Melnick y Adelberg (2014) *Microbiología médica*. BROOKS 26ª edición editorial Mc Graw Hill. Pag. 183-185.
10. Kenneth J., George C., (2010) *Microbiología Médica* 5ª edición, editorial McGrawHill Pag. 215-217.

11. Koneman, E., (2008) *Diagnóstico microbiológico*. 6ª edición. Buenos Aires. Médica Panamericana.
12. Laemmli UK. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227, 680-685
13. López, E. (1999) *Infectología pediátrica*. 2ª edición. Librería técnica. Argentina
14. Murray P., Rosenthal K., Pfaller M., (2013) *Microbiología Medica*. 7ª edición, editorial ELSEVIER SAUNDERS. Pag. 222-227
15. Molina J., Manjarrez E., M., Tay, J. (2010). *Microbiología, Bacteriología y Virología*. 1ª edición, Editorial: Méndez Editores.
16. Madigan M., Martinko J., Bender K., Buckley D., Stahl D. (2015) Brock. *Microbiología de los organismos*. 14ª edición, editorial PEARSON.
17. Metz B., Kersten, G., Hoogerhout, P., Brugghe, H., Timmermans, H., De Jong, A., Jantzen, H., Hennik, W., Crommelin, D., Jiskoot, W. (2004). Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reaction with model peptides. *Vaccines*, 279, 6235-6243.
18. Metz B., Hendriksen C., Jiskoot W., Kersten G., (2002). Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems, 20, 2411-2430.
19. Metz B., Jiskoot W., Mekkes D., Kingma R., Hennink W., Crommenlin D., Kersten G., (2007). Quality control of routine, experimental and real-time aged diphtheria toxoids by in vitro analytical techniques, 25, 6863-6871.

20. Metz B., Jiskoot, W., Hennink W., Crommelin, D., Kersten, G. (2003). Physicochemical and immunochemical techniques predict the quality of diphtheria toxoid vaccines. *Vaccines*, 156-167.
21. Negróni M. (2009) *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*. 2ª edición editorial Médica Panamericana. Pag. (279-281)
22. OMS, 2014 & FEUM, 2008
23. Ramon, G. (1956). *Some historical points of immunology: the phenomenon of flocculation reaction in toxin and antitoxin mixtures; applications*. *Rev Immunol Ther Antimicrob*, 20, 289-316.
24. Perera, V., Corbel, M. J. (1990). *Human antibody response to fragment A and B of diphtheria toxin and a synthetic peptide of amino acid residues 141-157 of fragment A*. *Epidemiol. Infect.* 105, 407-468.
25. Prats G. (2013) *Microbiología y Parasitología Médicas*. 1ª edición, editorial Médica Panamericana Pag. 453-455.
26. Pecetta S., Lo Surdo P., Tontini M., Proietti D., Zambonelli C., Bottomley M., Biagini M....., Romano M. (2015) Carrier priming with CRM197 or diphtheria toxoid has a different impact on the immunogenicity of the respective glycoconjugates: Biophysical and immunochemical interpretation, 33, 314-320.
27. Richard A. Harvey (2008). *Microbiología* 2ª edición, editorial wolters Kluwer 11-13, 33, 91-93.
28. Smith, P. Krohn, R., Hermanson, G. (1985). *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 150, 76-85.

29. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon J. (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A. 76(9):4350.
30. Willian Rojas M. (2015) *Inmunobiología*. 17ª edición editorial corporación para investigaciones biológicas Medellín, Colombia Pág. 449-452.
31. Zolfaharian H., Mohammadpour N., (2004). Study on Diphtheria Toxin Purification: A new Approach to Prepare Toxoid, 57, 65-74.
32. World Health Organization (WHO) (2014). Vacuna contra la difteria

Referencias electrónicas (URLS)

33. Dirección General de Epidemiología, Boletín epidemiológico, anuarios de morbilidad, en línea.
34. Manual de vacunas en línea de la asociación española de pediatría, AEP. (fecha de consulta: 14 de enero del 2016), disponible en:
<http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-21>
35. Grupo de estudio para la formación y docencia en enfermedades infecciosas y microbiología, Gefor. Fecha de consulta: 7 noviembre 2012, disponible en:
<http://www.gefor.4t.com/>
36. W.W. Norton & Company, Inc. Independent Publishers since 1923. Microbiology. Chapter 25, Microbial Pathogenesis. Fecha de consulta: 23 Diciembre 2016, disponible en:
<http://wnnorton.com/college/biology/microbiology2/ch/25/etopics.aspx>

37. Find Pathology Information Fast. Fecha de consulta: 25 enero 2016, disponible en:

<http://www.pathologyoutlines.com/topic/oralcavitydiphtheria.html>

38. La guía: Biología. Fecha de consulta 27 de enero de 2016 disponible en:

<http://biologia.laguia2000.com/microbiologia/la-toxina-de-la-difteria>

39. Vacuna contra la difteria fecha de consulta 1 diciembre 2015, disponible en:

http://www.who.int/immunization/wer8103Diphtheria_Jan06_position_paper_SP.pdf.

Apéndice No.1

Preparación de la curva tipo para determinación de proteína.

1. PROCEDIMIENTO

1.1. **Reactivo A:** Solución comercial de ácido bicinconinico: Solución de ácido bicinconinico. Contiene: carbonato de sodio, tartrato de sodio y bicarbonato de sodio en hidróxido de sodio 0.1 N. Almacenar a temperatura ambiente. Caducidad: 1 año. Almacenar a temperatura ambiente.

1.2. **Reactivo B:** Solución de sulfato de cobre (II) pentahidratado. Concentración 4% (peso/volumen) Caducidad: 1 año. Almacenar a temperatura ambiente

1.3. **Reactivo C:** Mezclar 1mL del reactivo B con 50 mL del reactivo A (las cantidades de cada solución es para 10 pozos). Preparar fresco, justo antes de usar. Mezclar el reactivo A y el reactivo B

1.4. Preparación del estándar de proteína a 0.25 mg/mL.

Tomar un vial de proteína (cantidad de 1.95 mg albúmina sérica bovina) y diluirlo con 7.776 mL de agua de osmosis inversa.

Distribuir en alícuotas de 1.1 mL en tubos Eppendorff, etiquetar con numero consecutivo, lote, fecha de preparación y nombre de la persona que lo preparó. Almacenarlo a -20°C . Fecha de caducidad: 5 años.

Preparación para la curva estándar de tubos:

Pozo	Sistemas de curva estándar						
	1	2	3	4	5	6	7
μl de STD-BCA	0	0	3	6	9	12	15
μl de Agua	225	25	22	19	16	13	10
mL de Reactivo C	0	200	200	200	200	200	200
μg de Proteína	0	0	6.25	12.5	25.0	37.5	50

Tapar y agitar suavemente, incubar en una estufa a 37°C durante 30 minutos. Después dejar enfriar a temperatura ambiente y leer a 562 nm

Preparación para las muestras problema.

Diluir las muestras para que contengan aproximadamente 25 μg y completar a 200 μL con agua

Reactivos	Muestras problema														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
μL de muestra	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
μL de agua	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
μL de reactivo C	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200

*colocar la cantidad de muestra requerida para que esta contenga 15μg de proteína.

** completar a 200 μL con agua AFI.

Apéndice No. 2 Preparación de reactivos

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Dodecil Sulfato de Sodio (SDS 10% PV). Pesar 10 gramos de SDS y aforar con agua a 100 mL.*No refrigerar porque se cristaliza

Regulador del gel separador (Tris HCl 1.5 M pH 8.8)

Disolver 18.15 g de Trizma Base en 90 mL de agua destilada

Ajustar el pH 8.8 con unas gotas de HCl concentrado y aforar con agua hasta 100 ml

Regulador del gel concentrador (Tris HCl 0.5 M pH 6.8)

Disolver 3.0 g de Trizma Base en 40 mL de agua destilada

Ajustar el pH hasta 6.8 con unas gotas de HCl concentrado y aforar con agua hasta 50 mL.

Filtrar la Solución con papel filtro N.1

Regulador de corrimiento

Pesar 3.0 gramos de Trizma Base, 14.4 gramos de Glicina, adicionar 10 mL de SDS al 10% y aforar con agua a 1000 mL. Mantener en refrigeración

Persulfato de amonio (APS) 10 % (P/V):

Disolver 0.312 g de Persulfato de amonio en 3.0 mL de Agua, aforar a 3.125 mL

Hacer Alícuotas de 50 μ L y guardar en congelación.

Azul de Coomassie 0.125 % (P/V):

Pesar 0.125 g de Azul brillante de Coomassie R-250 y disolver en 50 ml de la solución decolorante 1, posteriormente aforar hasta 100 mL con la misma solución.

*Filtrar periódicamente

La sensibilidad es del orden de 0.5 μ g de proteína

Solución decolorante 1 (Mezcla de Metanol- Acético-Agua). Preparar la solución en una relación 5:1:4 en un litro.

HPLC-SEC**Fase móvil: NaCl 0.85 % en PBS 150 mM pH 7.4**

Preparación de soluciones

NaCl 0.85% en PBS 150 mM. (PBS-NaCl) Cloruro de sodio al 0.85% en Regulador de fosfatos 10 mM pH 7.4. Para Preparar 1 L pesar 8.5 g de NaCl y disolver con 375 mL de PBS 400 mM pH 7.4, colocar en un matraz aforado de 1 L y aforar con Agua para Fabricación de Inyectables. Filtrar por 0.22 μ m.

PBS 400 mM pH 7.4. Mezclar 0.81 partes de fosfato dibásico de sodio 400 mM (Na_2HPO_4) con 0.19 partes de fosfato monobásico de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 400 mM. Para preparar 1 L mezclar 810 ml de Na_2HPO_4 400 mM con 190 ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 400 mM.

Na_2HPO_4 400 mM. Fosfato dibásico de sodio 400 mM. Para preparar 1 L pesar 57.185 g, disolver y aforar en un matraz aforado a 1 L con agua para fabricación de inyectables (AFI) (pureza 99.3%).

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 400 mM. Fosfato monobásico de sodio monohidratado 400 mM. Para preparar 250 mL pesar 13.94 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, disolver y aforar a 1L con AFI en un matraz aforado (pureza 99%).

REACTIVOS PARA INMUNO ELECTRO TRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

Regulador para transferencia:

Tris base	3.025g
Glicina	14.4g
Metanol	200mL
Agua	800mL

PBS 10X (1Litro)

Colocar en un recipiente especial 87.7g de cloruro de sodio, 4.0g de fosfato de sodio monobásico y 27.7g de fosfato de sodio di-básico.

PBS 1X Tween

Tomar 100mL de PBS 10X y llevarlo a 1 Litro con agua destilada y se agrega 0.5mL de Tween 20.

Solución Bloqueadora PBS leche DESCREMADA 5% (Al momento)

Agregar 5.0g de leche en 100mL PBS 1X.

Reactivo para revelado

HRP Kit Substrato de conjugado

HRP reactivo de color A (contiene 4-cloro-1-naftol en di-etilenglicol), 200mL.

HRP reactivo de color B (contiene peróxido de hidrogeno), 10mL.

HRP color desarrollo de buffer, 100ml, 10X concentrado.

Apéndice No. 3 Procedimiento para realizar la Inmunodetección (WESTERN BLOT)

- 1) Bloquear la membrana, durante toda la noche a 4°C en solución de bloqueo (0.5% de leche en PBS 10mM NaCl 0.85%, Tween 0.1%)
- 2) Incubar con el primer anticuerpo (antitoxina diftérica) 1:1000 durante 2 horas en agitación.
- 3) Lavar tres veces con PBS-tween 1.0%
- 4) Lavar tres veces con PBS
- 5) Incubar con el segundo anticuerpo (Anti-IgG de caballo acoplado a peroxidasa 1:4000): durante una hora a temperatura ambiente en agitación.
- 6) Lavar tres veces con PBS-Tween 0.1%
- 7) Lavar tres veces con solución reguladora de fosfatos.
- 8) Revelar. Para revelar las bandas se utilizó un estuche de substrato conjugado de HRP, Bio-Rad. Contiene: Reactivo A; 4-cloro-1-naftol en dietilen glicol. Reactivo B: Peróxido de hidrógeno y solución reguladora de desarrollo de color.