

4
240
302 827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

"MODIFICACION EN EL PROCESO DE PRODUCCION
DE VACUNA BCG"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A I

MARCELA ALIDA FLORES CARRANZA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1993



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.

I N D I C E

Página

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2 OBJETIVOS	2
1.3 HIPOTESIS	2

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES	3
2.2 LA TUBERCULOSIS EN MEXICO	4
2.3 CARACTERISTICAS DEL BACILO DE LA TUBERCULOSIS	6
2.3.1 Clasificación, Morfología y Tinción	6
2.3.2 Fisiología	8
2.3.2.1 Medios de cultivo para el aislamiento de micobacterias	8
2.3.2.2 Medios de cultivo para la producción de vacuna BCG	12
2.3.3 Diagnóstico bacteriológico	14
2.3.4 Estructura antigénica de las micobacterias y mecanismo de inmunidad	16
2.3.5 Tratamiento de la tuberculosis	17
2.4 PREVENCIÓN DE LA TUBERCULOSIS	17
2.4.1 La vacuna BCG	17
2.4.2 Producción de la vacuna BCG	22

2.4.2.1 Normas Generales de Fabricación para la vacuna BCG	22
2.4.2.2 Preparación de la Vacuna BCG	23
2.4.2.3 Control de Calidad de la Vacuna BCG	24

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA DE FLUJO	28
3.1.1 Diagrama de Flujo del Método Establecido	28
3.1.2 Diagrama de Flujo del Método Modificado	29
3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO	30
3.2.1 Material Biológico	30
3.2.2 Material de Laboratorio	30
3.2.3 Aparatos	31
3.2.4 Reactivos	32
3.2.4.1 Preparación de Reactivos	33
3.3 METODOLOGIA	
3.3.1 Método Establecido	35
3.3.1.1 Desarrollo Bacteriano	35
3.3.1.2 Cosecha	36
3.3.2 Método Modificado	37

3.3.2.1 Desarrollo Bacteriano	37
3.3.2.2 Cosecha	37
3.3.3 Pruebas de Control	39

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS	43
4.2 DISCUSIONES	50

CAPITULO V

CONCLUSIONES	52
--------------------	----

BIBLIOGRAFIA	53
--------------------	----

CAPITULO I
I N T R O D U C C I O N

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis constituye uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo, siendo la causa de muerte más frecuente atribuible a un agente infeccioso aislado; debido a lo cual, es preocupación de los diversos organismos e instituciones dedicadas a la salud, prestar especial interés en medios de prevención y control de la misma. (7)

La prevención se realiza principalmente a través de la administración de la vacuna BCG (Bacilo de Calmette y Guérin). (4)

En México, la política de inmunización incluye actualmente, la vacunación general con BCG de todos los niños al nacer y la reactivación a los seis años de edad, lo cual explica la elevada demanda de ésta vacuna (5). La vacuna BCG es producida en México desde 1945. (12)

Tomando como base lo expuesto anteriormente, se da la necesidad de investigar la posibilidad de hacer modificaciones en el proceso de producción de la vacuna BCG que lo hagan más económico y optimicen la formulación misma.

En éste trabajo se propone un cambio en la forma de concentración de la biomasa-bacilar (la cual tradicionalmente se realiza a través de filtros Birkhaug), por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos a 8°C. (1,18,19). La razón de ésta modificación se debe al elevado costo de dichos filtros, los cuales tienen que ser sustituidos continuamente por deterioro, además de investigar si éste cambio puede mejorar y facilitar el proceso para obtener la vacuna.

1.2 OBJETIVOS

1. Evaluar la sustitución de los filtros Birkhaug, por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos a una temperatura de 8°C, en el proceso de concentración de los cultivos para la producción de vacuna BCG.
2. Determinar si la centrifugación afecta la sobrevivencia de los bacilos.
3. Establecer la posible equivalencia entre el proceso establecido y el propuesto; y determinar si existe diferencia significativa entre éstos. Los parámetros a evaluar son: humedad de la masa bacilar semiseca, consumo de oxígeno, opacidad-concentración y dispersión bacilar de la vacuna BCG en suspensión.

1.3 HIPOTESIS

1. Ho. Mediante el procedimiento de concentración de los cultivos de vacuna BCG por centrifugación a 3000 rpm a 8°C se obtienen graneles de las mismas características de calidad que los obtenidos por el procedimiento de concentración con filtro Birkhaug.
2. Ha. Por medio del procedimiento de concentración de los cultivos de vacuna BCG por centrifugación a 3000 rpm a 8°C, se obtienen graneles con características diferentes (superiores o inferiores) a aquellos que se logran a través del procedimiento establecido.

CAPITULO II
A N T E C E D E N T E S

2.1 GENERALIDADES

La tuberculosis es una enfermedad humana conocida desde la antigüedad y aún es una de las más extendidas. A comienzos del siglo XVI Frascastorius sospechó la naturaleza infecciosa de ésta enfermedad y, en 1865 Villemin demostró que la enfermedad podía transmitirse mediante la inoculación de material tuberculoso. En 1882 Koch observó el bacilo de la tuberculosis mediante métodos especiales de tinción, lo aisló, lo cultivó y demostró que era el agente causal de la tuberculosis. (11)

Se estima que aproximadamente 3 millones de personas mueren y 8 millones de nuevos casos de tuberculosis son registrados anualmente (7), siendo los más afectados los niños y los adultos jóvenes, representando éstos últimos el segmento económicamente más productivo de la sociedad. (2,6,7)

Las causas que contribuyen a que la tuberculosis no se haya aún controlado son muchas y de muy diversa índole, entre las principales se puede contar; los factores socio-económicos, como la desnutrición, la rudeza de trabajo, el poco tiempo dedicado al descanso, la mala calidad de la vivienda (hacinamiento y mala ventilación) y del lugar del trabajo (41) y los factores biológicos debidos principalmente al aumento de la resistencia del bacilo de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) a los medicamentos antituberculosos (7); así como al incremento de los casos de tuberculosis debida a la propagación de la infección por Virus de la Inmuno Deficiencia Humana (VIH) ya que la infección simultánea con el bacilo de la tuberculosis y el VIH hacen a la persona mucho más susceptible

de desarrollar tuberculosis activa y a su vez acelera la conversión de la infección por VIH en Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA). (2,37)

2.2 LA TUBERCULOSIS EN MEXICO

En México la tuberculosis ha constituido un problema de gran magnitud desde que se asentaron los primeros registros de morbilidad y mortalidad. (10)

En el primer tercio del siglo XX éste padecimiento ocupó uno de los primeros lugares en la lista de las diez principales causas de morbilidad y mortalidad; a fines de los años veinte morían por tuberculosis cerca de 11,000 mexicanos (10). En 1930 hay una disminución lenta de casos notificados y para 1935 se presentó un decremento muy marcado. En años posteriores se observó un estancamiento que duró aproximadamente una década (26), entre 1945 y 1955 se registró un descenso de casos notificados más marcado que el de 1935, lo cual se relacionó directamente al advenimiento de quimioterapéuticos eficaces (10,31). A partir de 1955 el declive continúa aunque en forma paulatina. Desde 1968 a 1985 la reducción de mortalidad por tuberculosis en todas sus formas fué del 8.2 %; por lo que respecta a la mortalidad por tuberculosis meníngea y del sistema nervioso en éste período de tiempo se observó un descenso de casos en personas menores de quince años muy marcado, 88 %; mientras que en personas mayores de quince años éste porcentaje fué del 56 %. (10,26)

El número de casos de tuberculosis detectados desde 1986 a 1991 puede resumirse en la tabla No. 1. (5)

TABLA # 1
CASOS NOTIFICADOS DE TUBERCULOSIS
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
1986-1991

AÑO	TUBERCULOSIS PULMONAR	TUBERCULOSIS MENINGEA
1986	18.412	30
1987	17.603	90
1988	16.573	170
1989	16.547	190
1990	15.926	271
1991	14.787	200

Los datos correspondientes a 1992 hasta la semana epidemiológica No. 37 (6-12 Septiembre de 1992) son de 5,668 casos de tuberculosis pulmonar y 93 casos de tuberculosis meníngea. (4)

México es un país con marcados contrastes regionales en todos los sentidos, destacando sus notables diferencias, en cuanto a características geográficas, climáticas, composición demográfica, proporción urbano/rural, condiciones socio-económicas de la población, desarrollo de los servicios de

salud, etc (29), por tales motivos, la incidencia de la tuberculosis varía enormemente no sólo de una zona a otra, sino también dentro de cada entidad federativa (10). Por lógica, existen focos tradicionalmente activos que suman un considerable número de casos a la contabilidad nacional, tales como los de algunas zonas húmedas subtropicales en los estados de Veracruz y Chiapas, en las costas del Océano Pacífico, en las Huastecas y en las regiones Tarahumara y Tzetzaltotzil (10,13,34); sin embargo, también son importantes algunas áreas urbanas como Tijuana, Tampico, La Paz y la Ciudad de México, en donde se encuentran poblaciones de muy diversa procedencia (incluyendo a las del medio rural) cuya ignorancia y falta de información los asocia a otros factores de riesgo que favorecen la adquisición de tuberculosis. (10,34)

2.3 CARACTERISTICAS DEL BACILO DE LA TUBERCULOSIS

2.3.1 CLASIFICACION, MORFOLOGIA Y TINCION

El bacilo de la tuberculosis está clasificado taxonómicamente en la familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*. (1)

Los bacilos de la tuberculosis se observan al microscopio como bastones delgados, a veces ligeramente curvos, de 0.2 a 0.6 μ de diámetro y de 1 a 4 μ de longitud. Aparecen como células aisladas, pero con frecuencia, se encuentran en grupos pequeños y, a veces, en masas compactas en las que no se puede distinguir cada bacilo (3,11), los bacilos de la variedad humana tienden a ser un poco más delgados que los de tipo

bovino, pero la morfología de ambos es variable y, no se pueden identificar en base a ésta característica. (1,11)

Cada célula tiene una estructura granular marcada. Con frecuencia, aparecen abundantes gránulos citoplasmáticos, que incluso, pueden proporcionar a la célula teñida la apariencia de una cadena de cocos. Entre éstos gránulos se encuentran los gránulos metacromáticos, constituidos por polifosfatos y gránulos lipídicos. (11)

El bacilo de la tuberculosis presenta tinción ácido-alcohol resistente, ya que los colorantes, como la carbofucsina, se combinan con la gran cantidad de lípidos de la pared celular micobacteriana, en particular a una fracción lipoide denominada ácido micólico, resistiendo la decoloración con alcohol-ácido.

(19)

Comunmente se realizan dos tipos de tinción ácido-alcohol resistente, la primera de ellas es la tinción de Ziehl-Neelsen en la cual el frotis se tiñe con carbofucsina en caliente, se decolora con alcohol-ácido y se aplica un colorante de contraste como el azul de metileno (19). A la tinción Ziehl-Neelsen se le puede aplicar la modificación Kinyoun, la cual se realiza siguiendo el mismo procedimiento pero sustituyendo el calentamiento por la adición de un agente surfactante que aumente la penetración del colorante primario (Carbofucsina) en los lípidos de la pared celular; en ambos casos los bacilos de la tuberculosis se tiñen de color rojo y el fondo de color azul claro (11). El segundo tipo de tinción ácido alcohol resistente, es la llamada tinción fluorocrómica, en la cual el

frotis se tiñe con un colorante fluoróculo llamado auramina-fenólica y se decolora con alcohol-ácido quedando los bacilos teñidos de color naranja amarillento contra un fondo oscuro. (19)

2.3.2 FISILOGIA

Los bacilos de la tuberculosis son aerobios estrictos, no son móviles, no forman esporas. Crecen mejor a 37°C y no presentan crecimiento a temperaturas inferiores de 30°C o superiores de 42°C. El tiempo de crecimiento de los cultivos es relativamente lento y, generalmente se requiere de 4 a 6 semanas para obtener un crecimiento abundante. (11)

Se ha observado que *M. tuberculosis* crece más abundantemente que *M. bovis*, por lo que el tipo de crecimiento del primero se denomina eugónico y del segundo disgónico. (1,11)

Una de las características más importantes del bacilo de la tuberculosis es que en medios de cultivo líquidos crece en forma de filamentos o cordones, debido a una sustancia llamada factor de crecimiento en cordón cuya naturaleza es lipídica.

(11)

Los bacilos de la tuberculosis no producen pigmentos a diferencia de otras especies de micobacterias. (3,19)

2.3.2.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE

MICOBACTERIAS

En los medios de cultivo para el aislamiento de micobacterias se encuentran los medios a base de huevo, en los

cuales la yema constituye una fuente de lípidos, por los que las micobacterias tienen especial preferencia (1,3,19); éstos medios están constituidos, generalmente, por soluciones reguladoras a base de fosfatos, ciertos cationes en muy bajas concentraciones, una fuente de carbono (glicerol), una fuente de nitrógeno (aminoácidos) o una fuente de ambos elementos (piruvato); además de agregar verde de malaquita como protector contra contaminaciones. (3,8,21)

Existen también otros tipos de medios llamados semisintéticos en los cuales se provee a las micobacterias de sales inorgánicas, glicerol, glucosa, aminoácidos, ácidos grasos de cadena larga y verde de malaquita para evitar contaminaciones. (4,13) (Ver tabla No. 2 (19)).

Los medios de cultivo para el aislamiento de micobacterias también pueden ser adicionados con algún antibiótico para reducir al máximo las posibilidades de contaminación. Este tipo de medios se denominan selectivos. (12,19)

En la tabla No. 3 se pueden observar algunos ejemplos de éste tipo de medios. (19)

TABLA # 2
 MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS

MEDIO	COMPONENTES	AGENTE INHIBIDOR
Löwenstein-Jensen (Medio a base de huevo)	Huevos enteros coagulados, sales definidas, glicerol, harina de papa.	Verde de malaquita
Petragnani (Medio a base de huevo)	Huevos enteros coagulados, yema de huevo, leche entera, papas, harina de papa, glicerol.	Verde de malaquita
7H10 de Middlebrook (Semisintético)	Sales definidas, vitaminas, cofactores, ácido oléico, albúmina, catalasa, glicerol, glucosa.	Verde de malaquita
7H11 de Middlebrook (Semisintético)	Sales definidas, vitaminas, ácido oléico, albúmina, catalasa, glicerol, hidrolizado de caseína.	Verde de malaquita
ATS (American Thoracic Society) (Medio a base de huevo)	Yemas de huevo fresco coaguladas, harina de papa, glicerol.	Verde de malaquita

TABLA # 3
MEDIOS SELECTIVOS PARA EL AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS

MEDIO	COMPONENTES	AGENTE INHIBIDOR
Löweinstein-Jensen Modificado por Gruft	Huevos enteros coagulados, sales definidas, glicerol, RNA 5mg/100ml	Verde de malaquita, penicilina, ácido nalidixico
Mycobactosel Löweinstein-Jensen	Huevos enteros coagulados, sales definidas, glicerol, harina de papa	Verde de malaquita, cicloheximida, lincomicina, ácido nalidixico
7H10 de Hoddlebrook	Sales definidas, vitaminas, ácido oléico, albúmina, catalasa, glicerol, glucosa	Verde de malaquita, lincomicina, cicloheximida, ácido nalidixico
7H11 Selectivo (Medio Mitchison)	Sales definidas, vitaminas, cofactores, ácido oléico, albúmina, catalasa, glicerol, glucosa, hidrolizado de caseína	Carbencilina, anfotericina, polimixina, lactato de trimetroptina

2.3.2.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE VACUNA BCG

Desde que Calmette y Guérin obtuvieron la cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* llamada BCG se trató de encontrar un medio de cultivo que conservara sus características y además que favoreciera la propagación del bacilo (14,36). El medio líquido de Sauton es particularmente favorable para el desarrollo de cultivos eugénicos de bacilos tuberculosos, por lo que se probó para observar cómo se desarrollaba el BCG; después de un tiempo de incubación se observó que se obtenían cultivos de características adecuadas, por lo que se empezó a utilizar para la preparación de vacuna BCG. (39,40).

Este medio contiene los siguientes elementos; asparagina, ácido cítrico anhidro, sulfato de magnesio heptahidratado, fosfato de potasio monobásico, citrato férrico amónico y sulfato de zinc; la asparagina es fuente de nitrógeno, el glicerol es fuente de carbono; además de que por ser una sustancia higroscópica es capaz de conservar la humedad dentro del cultivo, el sulfato de magnesio heptahidratado y sulfato de zinc son fuentes de minerales indispensables para el crecimiento y reproducción del bacilo, el fosfato de potasio monobásico actúa como amortiguador del pH del medio, además de proveer iones importantes para el crecimiento del bacilo; por su parte el citrato férrico amónico es una fuente de fierro que a pesar de no ser indispensable para el crecimiento del bacilo lo favorece considerablemente. (8,39)

El bacilo crece en la superficie del medio líquido a manera de una delgada capa o película que comunmente se llama "velo".(36)

Otro de los medios utilizados en la producción de vacuna BCG es el medio de Sauton-Papa; éste medio está constituido por un fragmento de papa cortado en forma de medio cilindro y medio líquido de Sauton, envasados en tubos de 20 X 15 mm. (22)

El crecimiento del BCG en el medio de Sauton-Papa representa la parte medular de la producción de vacuna BCG ya que si los cultivos no se desarrollan de manera adecuada en la fase líquida del medio, la producción no puede llevarse a cabo.

El tipo y la calidad de la papa, los métodos de conservación de la misma y la preparación del medio de cultivo, son de gran importancia para obtener un desarrollo bacteriano adecuado para la producción. (14)

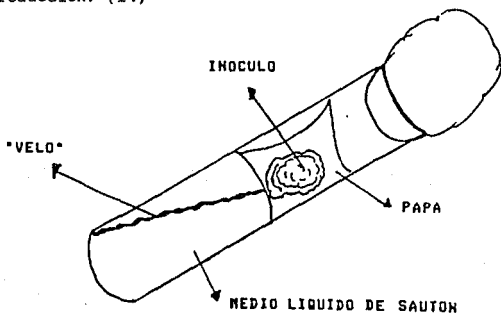


FIGURA No. 1 MEDIO DE SAUTON PAPA

2.3.3 DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

Existen diferentes métodos bacteriológicos para el diagnóstico de la tuberculosis; los cuales se pueden dividir del siguiente modo:

a) Baciloscopía; la cual se realiza a través del examen microscópico del frotis teñido por la técnica de Ziehl-Neelsen (tinción en caliente) o bien utilizando la modificación de Kinyoun (tinción fría) (1,3,9), el frotis puede prepararse a partir de muestras de saliva (esputo), orina, líquido cefalorraquídeo (3).

b) Cultivo; éste es un medio de diagnóstico de mayor sensibilidad que la baciloscopía, ya que se ha determinado que para alcanzar un 50 % de probabilidades de un resultado positivo en la baciloscopía, la muestra debe contener entre 5,000 y 10,000 bacilos ácido-alcohol resistentes, mientras que son suficientes 10 bacilos para obtener por lo menos una colonia en un medio de cultivo como el de Löwenstein-Jensen o el Stonebrink (3,21). Las características que deben observarse en los medios de cultivo son; tiempo que transcurre hasta la aparición de colonias visibles, temperatura óptima de crecimiento, las características de las colonias y la formación de pigmentos en ausencia y presencia de luz. (3)

El diagnóstico de la tuberculosis por cultivo no es rápido ya que el crecimiento de las micobacterias es muy lento. (21)

c) Pruebas bioquímicas de diferenciación; entre las cuales las más importantes son: acumulación de niacina (subproducto metabólico hidrosoluble), reducción de nitratos por la enzima

nitrito reductasa, actividad catalasa, hidrólisis de Tween 80, determinación de actividad de aril sulfatasa. (3,19)

Las pruebas bioquímicas para la diferenciación de micobacterias son útiles para conocer la frecuencia de las infecciones por micobacterias no tuberculosas y los casos de tuberculosis bovina en el hombre (21). (Ver tabla No. 4 (19))

TABLA # 4
CARACTERISTICAS UTILES PARA LA DIFERENCIACION DE MICOBACTERIAS

PRUEBA	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. vaccae</i>	<i>M. xenodi</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. goodii</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. flavescens</i>
Crecimiento	L	L	L	L	L	R	R	R	R	R	L	L	L	L	L	L
Niacina	+	-	-	-	+	-	V	-	-	-	-	-	V	-	-	-
Nitrato reductación	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Catalasa	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Hidrólisis de Tween 80	P	-	+	+	-	P	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Ariulfatasa	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	P	-	-	-	P	-

Abreviaciones : P:parcial
L:lento , R :Rápido
V :variable.

2.3.4 ESTRUCTURA ANTIGENICA DE LAS MICOBACTERIAS Y

MECANISMO DE INMUNIDAD

A partir de los estudios inmunoquímicos se ha demostrado que las micobacterias comparten constituyentes antigénicos entre sí. (11)

Entre las micobacterias son frecuentes las reacciones inmunológicas cruzadas, por ejemplo, cuando se realizan estudios para determinar el número de personas afectadas de tuberculosis utilizando la prueba de hipersensibilidad a la tuberculina, se ha observado una gran interferencia causada por la sensibilidad inducida por la vacuna BCG o por las micobacterias no tuberculosas. (11,13)

Se han desarrollado una serie de estudios para determinar los antígenos de las micobacterias y mediante éstos estudios se descubrió una proteína antigénica llamada Kilodalton 65, considerada como una de las más antigénicas de las micobacterias (33). Este antígeno contiene epítomos que son comunes a varias especies de micobacterias así como epítomos que son únicos para una especie dada de micobacteria. (33)

En la tuberculosis el tipo de inmunidad importante es celular, ya que aún cuando pueden formarse anticuerpos, éstos no son protectores (9,11). La presencia de la bacteria estimula la inmunidad celular con la proliferación de linfocitos y la activación de macrófagos mediante linfocinas (9,11,37). Esta es la razón por la cual la vacuna BCG está constituida por una suspensión de bacterias atenuadas pero vivas, ya que las bacterias muertas no provocan la respuesta inmune. (9,20)

2.3.5 TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

Actualmente hay 10 agentes antituberculosos que se clasifican como primarios, secundarios y terciarios, de acuerdo a su eficacia y toxicidad. Los primarios son isoniazida, rifampicina y pirazinamida; los secundarios: sulfato de estreptomycinina y clorhidrato de etambutol; los terciarios: aminosalicilato de sodio y sulfato de Kanamicina. (31)

Los fármacos antituberculosos pueden ocasionar reacciones adversas y toxicidad en hígado, riñón y nervio óptico. (30,31)

2.4 PREVENCIÓN DE LA TUBERCULOSIS

2.4.1 LA VACUNA BCG

Desde el descubrimiento del bacilo de la tuberculosis por Roberto Koch en 1882 se hicieron varios intentos por obtener una vacuna eficaz contra la tuberculosis (26). Se atribuye a Cavagnis (1886) la primera tentativa de inmunización mediante bacilos vivos atenuados (20). Roberto Koch realizó en 1890 ensayos inoculando los concentrados del medio de cultivo en donde se había desarrollado el bacilo de la tuberculosis sin tener éxito (23). Después de 12 años de investigación y de 231 resiembras sucesivas; en 1921 Calmette y Guérin obtienen una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* en el Instituto Pasteur de Lille Francia. Esta cepa conocida como bacilo biliado de Calmette y Guérin y después como BCG, fue probada inicialmente en animales de laboratorio y posteriormente en 1922 en niños lactantes por vía oral, mostrando una alta antigenicidad y seguridad. (15)

En 1930 se aplica por vía intradérmica con buenos resultados y sin ninguna contradicción en países Escandinavos. (15,16,27)

En la actualidad los laboratorios productores de vacuna BCG en el mundo, utilizan diversas cepas todas ellas derivadas del bacilo de Calmette y Guérin. En los países de América Latina y el Caribe se utilizan tres subcepas de BCG liofilizadas distintas: la cepa Copenhague 1331 en México, la cepa Moreau en Cuba y Brasil, la cepa Pasteur 1173 en el resto de los países productores.

La viabilidad mínima por ml de vacuna reconstituida generalmente aceptada oscila entre 2 y 3 millones de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). (6)

La finalidad de la vacuna BCG es; sustituir la infección natural patogénica, por la infección controlada de una micobacteria atenuada, desprovista de patogenicidad, que confiera inmunidad eficiente para controlar adecuadamente reinfecciones posteriores con *M. tuberculosis* virulentos.

En los casos en que no se puede evitar la reinfección o la primoinfección, impedir las localizaciones más peligrosas, por ejemplo, meninges, diseminación miliar, huesos, etc. (20)

Actualmente la prevención de la tuberculosis en México se lleva a cabo principalmente por la vacunación con BCG de todos los niños al nacer y la reactivación se aplica a los seis años de edad (5). La vacuna BCG es bien aceptada por la población infantil y se puede aplicar sola o al mismo tiempo que la vacuna antipoliomielítica, DPT (Difteria, Pertusis, Tétanos) y antisarampionosa. (28)

En 1977 se interrumpieron las campañas de vacunación masivas y la inmunización con BCG se integró a los servicios de las unidades de salud de primero y segundo niveles de atención. (27)

En el quinquenio de 1983 a 1988 la cobertura de vacunación fué de 7,183,490 niños, alcanzándose el 69 % de la meta operativa de inmunización. (10,28)

La cobertura de vacunación con BCG en 1989 de niños menores de 5 años varía de una zona a otra del país, la zona norte obtuvo una cobertura del 72 %, la zona central registró un 67.9 % y en la zona sur se observaron los niveles de vacunación más bajos alcanzando una cobertura de solamente 58.4 %. (3)

La cobertura de vacunación con BCG en menores de 5 años por entidad federativa en 1989 en México, puede observarse en la tabla No.5. (32)

TABLA # 5
 COBERTURA DE VACUNACION CON BCG EN MENORES DE CINCO AÑOS
 SEGUN ENTIDAD FEDERATIVA (1989)

ENTIDAD	COBERTURA %
Aguascalientes	77.7
Baja California	71.9
Baja California Sur	69.9
Campeche	68.9
Coahuila	80.0
Colima	74.1
Chiapas	33.1
Chihuahua	64.9
D.F.	80.8
Durango	65.9
Guanajuato	61.5
Guerrero	44.7
Hidalgo	58.5
Jalisco	74.0
Edo. de México	62.3
Michoacán	47.9
Morelos	77.1
Nayarit	70.5
Nuevo León	77.8
Oaxaca	56.3
Puebla	51.9
Querétaro	67.7
Quintana Roo	70.3
San Luis Potosí	68.4
Sinaloa	74.1
Sonora	66.0
Tabasco	58.4
Tamaulipas	71.3
Tlaxcala	77.1
Veracruz	55.3
Yucatán	67.9
Zacatecas	59.6

En 1990 en el programa Nacional de Salud correspondiente a 1990-1994, se estableció el programa de Vacunación Universal con el cual se pretendió asegurar que toda la población menor de 5 años residente en el país, contará para Octubre de 1992 con el esquema de vacunación básico dentro del cual se incluye la vacuna BCG (16). Para lograr la meta propuesta se recurrió a varias estrategias como son, la vacunación permanente en todas las Unidades de Salud, las actividades intensivas como los días Nacionales de Vacunación, la vacunación de la población en riesgo de enfermar por estar en contacto con enfermos (control de casos y brotes), la ampliación de la cobertura vacunal mediante la visita casa por casa, especialmente en las zonas periurbanas marginales y rurales de difícil acceso. (4)

Dentro de los primeros resultados de ésta campaña se pueden mencionar los logros obtenidos en la Semana Nacional de Vacunación, del 24 al 30 de Agosto de 1992, en la cual se aplicaron 553,256 dosis de vacuna BCG, que sumados a los resultados obtenidos en la segunda evaluación del programa Vacunación Universal dan una cobertura del 95.2 % para BCG.

(17,24)

Durante mucho tiempo se cuestionó la eficacia de la vacuna BCG por lo que en América Latina y el Caribe se han realizado una serie de estudios recomendados por la OMS (Organización Mundial de la Salud), los resultados de los mismos indican que la vacuna es eficaz para prevenir las formas graves de tuberculosis primaria, especialmente de meningitis, cuando la vacuna se aplica poco tiempo después del nacimiento (6). Esta

afirmación confirma las observaciones previas de Ten Dam y Hetze que indican que ésta vacuna es eficaz para prevenir la diseminación hematógena de la infección primaria (6). Para que la eficacia de la vacuna sea óptima, es preciso elaborarla con productos de calidad, conservarla en forma adecuada y administrarla en dosis suficientes por vía intradérmica.(6,20)

2.4.2 PRODUCCION DE LA VACUNA BCG

En México se introdujo la vacuna BCG en forma líquida a partir de la cepa Pasteur 1173 en 1945. La producción de la vacuna líquida de efectuó regularmente hasta 1970; en éste año se inició la producción experimental de la vacuna liofilizada con la cepa Danesa 1331, recomendada por la OMS por su alta antigenicidad. (14,15)

La ventaja de la vacuna liofilizada frente a la líquida es su mayor estabilidad; es decir, su contenido en bacilos vivos se mantiene un periodo de tiempo más prolongado mientras que el de las vacunas líquidas refrigeradas se reduce generalmente a la mitad al cabo de un mes. Estas últimas vacunas sólo pueden usarse durante las dos o tres semanas después de su elaboración. (40)

2.4.2.1 NORMAS GENERALES DE FABRICACION PARA LA

VACUNA BCG

El buen funcionamiento de los laboratorios que fabrican productos biológicos requiere del establecimiento de normas

mediante las cuales se especifique las características de los locales y personal destinado a éste propósito.

Para la producción de la vacuna BCG se han fijado las siguientes normas:

A) La vacuna BCG debe fabricarse en locales y equipo propio y separados de los demás laboratorios del Instituto Nacional de Higiene.

B) No se autoriza la presencia de animales en los locales de fabricación.

C) En el lugar de fabricación solamente se tendrá la cepa usada para producir la vacuna.

D) El personal encargado de la producción deberá ser exclusivo para ésta labor y no podrá manipular otros agentes infecciosos.

E) El personal deberá de gozar de buena salud y debe someterse a un examen médico periódico que como mínimo deberá comprender una exploración radiológica del tórax cada seis meses. (40)

2.4.2.2 PREPARACION DE LA VACUNA BCG

La OMS recomienda la preparación de la vacuna BCG mediante la técnica llamada "lote semilla", por la cual se limita a 8 el número de subcultivos sucesivos a partir de cada ampollita de la cepa patrón liofilizada recibida del centro colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para referencia internacional en BCG que es el Staten Serum Institute de Copenhage o del Instituto Pasteur en Francia (25,36). El empleo de éste sistema reduce las posibilidades de variación de la cepa por selección de mutantes. (20,25,35)

La suspensión de la vacuna es aún producida en la misma forma en la que fue desarrollada originalmente varias décadas atrás; el bacilo crece en la superficie del medio líquido de Sauton como un velo y actualmente se sabe que los cultivos jóvenes aseguran una adecuada sobrevivencia de los bacilos después de la liofilización. La masa bacilar semiseca obtenida después de filtrar los cultivos es homogenizada en matraces con balas de acero inoxidable, siendo éste factor crítico para la obtención de una suspensión con un elevado número de bacilos vivos y una adecuada dispersión bacilar. La suspensión de la vacuna debe ser envasada en ampolletas color ámbar y posteriormente liofilizadas y selladas al alto vacío. (14,22,35)

2.4.3 CONTROL DE CALIDAD DE LA VACUNA BCG

Los productos biológicos deben cumplir con los requisitos de calidad fundamentales, en la vacuna BCG el control de calidad consta de dos fases; en la primera se analiza el producto a granel y en la segunda el producto terminado. (6)

Las pruebas que se realizan en el producto a granel más importantes son:

1. Consumo de Oxígeno, ésta prueba tiene como objetivo seleccionar las suspensiones que posean un gran número de bacilos metabólicamente activos con una mayor probabilidad de sobrevivir al proceso de liofilización que implica cambios bruscos de temperatura. (8)

2. Prueba de Pureza, mediante la cual se comprueba la ausencia de microorganismos contaminantes. La importancia de ésta

determinación radica en evitar envasar suspensiones contaminadas, con lo que se provocaría una pérdida de tiempo y desperdicio de material de empaque primario. (22)

3. Opacidad y Concentración, que consiste en estimar el contenido bacteriano total de la suspensión bacilar (40). La interpretación de ésta prueba queda sujeta a los resultados obtenidos en la prueba de consumo de oxígeno, ya que la concentración expresa el número total de bacterias vivas y muertas, mientras que el consumo de oxígeno hace referencia únicamente a bacilos vivos que son los que producen inmunidad.

(22)

4. Dispersión bacilar, a través de la cual es posible determinar el número de grumos, las características de los mismos y el número de bacilos libres presentes en la suspensión de la vacuna. (22)

Por otra parte los controles que se realizan en la vacuna liofilizada como se indica en la FEUM 5a Ed. y en la serie de informes Técnicos de la OMS son:

A. Prueba de Viabilidad y estabilidad térmica; en la que se calcula la cantidad de unidades viables, llamadas también Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml de vacuna reconstituida y a la proporción de UFC/ml que se pierde cuando la vacuna no se conserva en refrigeración. Para realizar ésta última prueba, algunas ampollitas que contienen vacuna se mantienen durante un tiempo de 4 semanas a 37°C y, a continuación, se compara el número de UFC por ml que conservan

el número de UFC/ml que contienen otras apolletas refrigeradas pertenecientes al mismo lote de producción. (6,22)

La viabilidad y la estabilidad térmica varían en función de la subcepa de BCG empleada y de las condiciones de liofilización. Para calcular la viabilidad de una vacuna, se inoculan varias diluciones de la misma en el medio de cultivo Löwenstein-Jensen y se cuenta el número de colonias; con ésta cifra se calcula el número de UFC/ml de vacuna. (6)

B. Prueba de pureza; mediante la cual se asegura la ausencia de microorganismos contaminantes en el producto terminado que será administrado por vía intradérmica. (22)

C. Porcentaje de Humedad; para determinar el agua residual presente en la vacuna después de ser liofilizada, siendo éste factor crítico para la estabilidad de la vacuna. (22)

D. Prueba de seguridad y potencia; cuyo fin es comprobar la ausencia de micobacterias virulentas, medir el grado de virulencia de la cepa y su poder sensibilizante, ésta prueba se realiza en cobayos a los que se les inocula con el equivalente a 50 dosis humanas de vacuna BCG y posteriormente con PPD; después de un tiempo se examina la lesión vacunal así como la evidencia macroscópica de infección tuberculosa. (40)

E. Prueba de atoxicidad; en la cual se observa la reacción epidérmica en cobayos inoculados con vacuna sin diluir y diluida. (40)

F. Prueba de Opacidad; en ésta se evalúa la concentración final de la vacuna, la cual debe ser de aproximadamente 10 mg/ml. (22)

G. Prueba de vacío; cuyo objetivo es asegurar que las ampollitas se encuentren cerrada herméticamente. (22)

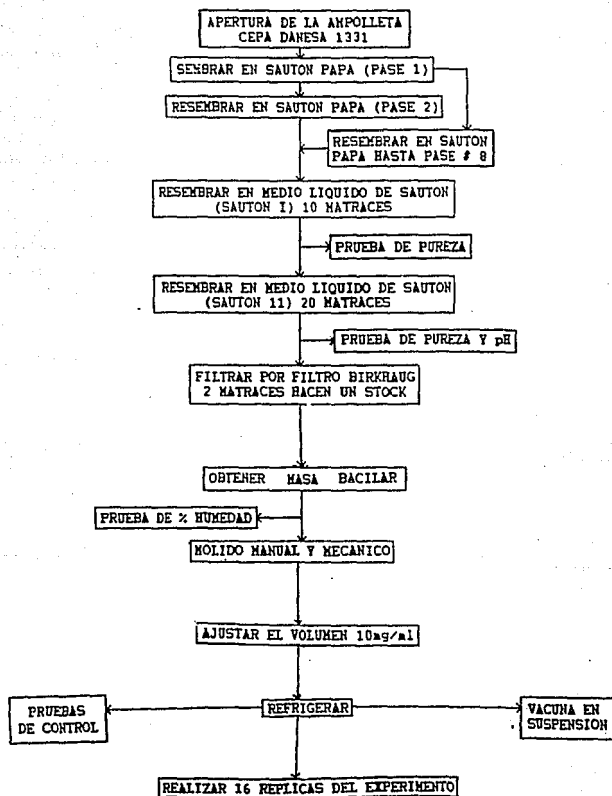
Los laboratorios productores son los encargados de realizar sus propios controles de calidad del producto (6). La OMS y la OPS (Organización Panamericana de Salud) recomiendan, para comprobar la calidad de la vacuna, someter muestras de algunos lotes a pruebas de control internacional anualmente (6,25). Estos controles se pueden realizar en el Staten Serum Institute en Dinamarca o en el INPPAZ (Instituto Panamericano de Protección a Alimentos y Zoonosis) en Argentina, que actúan como laboratorios regionales de referencia de la OMS y la OPS respectivamente.

El objetivo de las pruebas de control regionales es verificar la calidad de la producción y de las pruebas de control nacionales y recomendar los ajustes necesarios en uno u otro aspecto. (6,25,40)

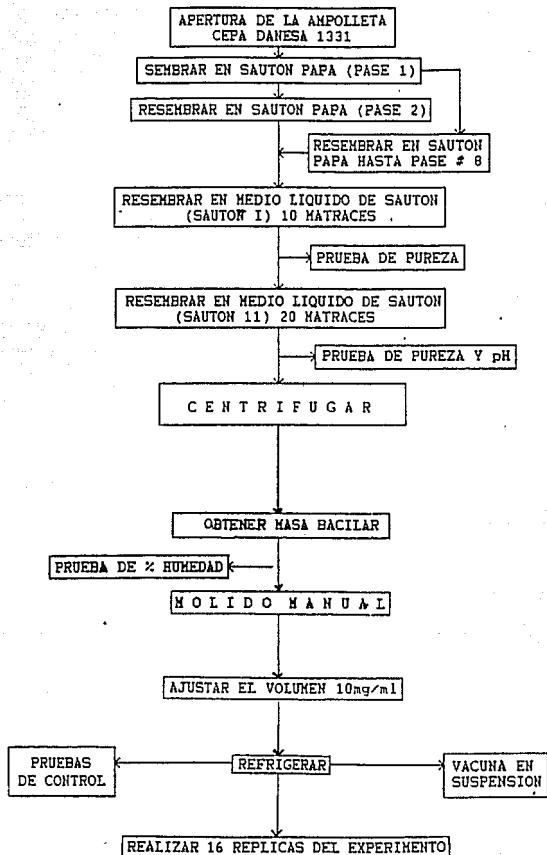
CAPITULO.III
PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA DE FLUJO

3.1.1 METODO ESTABLECIDO



3.1.2 METODO MODIFICADO



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO: Cepa danesa 1331 del Staten Serum Institute de Copenhague Dinamarca. Las ampollitas que contienen la cepa liofilizada procedente de Dinamarca, se conservan en refrigeración a una temperatura entre 2 y 8°C.

3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

- Matraces Erlenmeyer de 300 ml, 1 y 2 lts (Pyrex)
- Vasos de precipitados de 50 ml y 300 ml (Pyrex)
- Pipetas de 5 y 25 ml (Pyrex)
- Probetas de 500 ml y 1 lt (Pyrex)
- Matraces Bola fondo plano de 2 lt (Pyrex)
- Balas de acero inoxidable de 4 mm de diámetro
- Garrafones de 20 lt (Pyrex)
- Tubos muestra de 13 X 100 mm (Pyrex o PK)
- Espátulas y asas de siembra de 1.5 cm de diámetro
- Cestos
- Gasas
- Campos (lienzos de tela)
- Viales de Plástico para centrifuga de 250 ml (Beckman)
- Tela de molino de 15 X 20 cm
- Portaobjetos
- Papel Kraft
- Celda circular tipo B de 18 mm de diámetro (Beckman)
- Mecheros
- Goteros
- Puente de coloración

- Charola de coloración
- Guantes de cirujano
- Filtros de placa porosa (Waters)
- Papel filtro (Waters)
- Prefiltro (Waters)
- Tubos de ensaye de 20 X 150 mm (Pyrex)
- Tubos de ensaye de 20 X 150 mm con tapón de bakelita (Pyrex)
- Tapones de algodón

3.2.3 APARATOS

- Centrifuga (Beckman)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Balanza granataria (Sartorius)
- Campana de flujo laminar (Bioquest)
- Autoclave (Amsco)
- Potenciómetro (Beckman pH meter)
- Espectrofotómetro (Sequoia Turner)
- Aparato de Warburg (B. Braun Melsungen AG)
- Microscopio (Olympus C011)
- Filtros Birkhaug
- Termómetros
- Molino mecánico

3.2.4 REACTIVOS

- Hidróxido de potasio, grado analítico (Merck)
- Líquido Brodie (Baco Standardized)
- Caldo de soya tripticasa (Bioxon)
- Medio fluido de Tioglicolato (Bioxon)
- Asparagina, grado reactivo (JT Baker)
- Acido Cítrico Anhidro, grado analítico (Merck)
- Fosfato monobásico de Potasio, grado analítico (JT Baker)
- Sulfato de Magnesio 7 H₂O, grado analítico (JT Baker)
- Citrato Férrico Amónico, grado analítico (Merck)
- Sulfato de Zinc, grado analítico (Merck)
- Glicerol, grado analítico (JT Baker)
- Hidróxido de Sodio 6 N, grado analítico (Merck)
- Solución de Carbonato de Sodio al 5 %, grado analítico (Merck)
- Solución de Glutamato de Sodio al 1.5 %, grado analítico (JT Baker)
- Fucsina Básica (Merck)
- Fenol, grado analítico (Merck)
- Etanol al 95 % (JT Baker)
- Acido Clorhídrico, grado analítico (Merck)
- Azul de Metileno (Merck)
- Papas Seleccionadas y de cosecha controlada
- Agua destilada

3.2.4.1 PREPARACION DE REACTIVOS

1. Medio líquido de Sauton:

- a) Depositar en un matraz de 2 lts, 68.17 g de asparagina, 32.80 g de ácido cítrico anhidro, 7.5 g de fosfato de potasio monobásico, 7.5 g de sulfato de magnesio hepta hidratado, 0.75 g de citrato férrico amónico y agregar 1.5 lts de agua destilada. Disolver en baño María con agitación ocasional.
- b) Disolver 0.75 g de sulfato de zinc en un vaso de precipitados de 300 ml con agua destilada.
- c) Enjuagar un garrafón de 20 lts con agua bidestilada y filtrada; agregar 8 lts de agua destilada y filtrar a través de filtro y prefiltro. Añadir 900 ml de glicerol y posteriormente filtrar el contenido del matraz de 2 lts en el que se encuentran disueltos los demás ingredientes.
- d) Agregar 75 ml de hidróxido de sodio 6 N.
- e) Adicionar el sulfato de zinc sin filtrar.
- f) Ajustar el volumen a 15 lts y mezclar perfectamente.
- g) Medir el pH del medio y ajustarlo a 7.18-7.22 con hidróxido de sodio 6 N.
- h) Envasar en matraces de 300 ml enjuagados dos veces con agua filtrada y una vez con medio líquido de Sauton. El volumen de llenado es de 100 ml.
- i) Esterilizar 22 minutos a 15 lbs de presión y 121°C.

2. Medio de Sauton Agua:

Efectuar una dilución del medio líquido de Sauton. Proporción 1:4 (agua:medio líquido de Sauton).

3. Medio de Sauton-Papa:

- a) Mantener en refrigeración las papas que serán utilizadas hasta ocho días antes de la preparación del medio.
- b) Lavar y cortar las papas en medio cilindro.
- c) Lavar las papas cortadas, con agua corriente hasta eliminar el almidón presente en la papa.
- d) Mantener sumergidas las papas en una solución de carbonato de sodio al 5 % durante 24 hrs.
- e) Después de transcurrido el tiempo indicado, tirar la solución de carbonato de sodio y lavar con agua destilada.
- f) Sumergir las papas en medio líquido de Sauton durante tres hrs a una temperatura de 80°C.
- g) Lavar las papas con medio líquido de Sauton limpio.
- h) Envasar en tubos de 20 X 150 mm, agregar 15 ml de medio líquido de Sauton y esterilizar a 121°C y 15 lbs de presión durante 15 minutos. (12,14)

4. Reactivos para la tinción de Ziehl-Neelsen (Modificación Kinyoun):

- a) Colorante primario: mezclar 8 g de fenol y 20 ml de etanol en 60 ml de agua y luego agregar fucsina básica (4 g), mezclar y dejar reposar a temperatura ambiente durante un día. Al día siguiente adicionar 40 ml de agua y filtrar.
- b) Solución alcohol-ácido al 3 %: adicionar lentamente 3 ml de ácido clorhídrico a 97 ml de etanol y agitar.
- c) Colorante secundario: disolver 5 g de azul de metileno en 100 ml de agua destilada. (19)

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 METODO ESTABLECIDO:

3.3.1.1 DESARROLLO BACTERIANO:

1. Abrir una ampollita liofilizada que contenga la cepa Danesa 1331. Reconstituir con 0.25 ml de medio de cultivo de Sauton (dilución 1:4) y agitar para homogeneizar, a partir de ésta suspensión, sembrar la superficie de la papa del medio de cultivo de Sauton-Papa (pase 1). Incubar de 20 a 30 días a 37°C hasta que se presente un desarrollo homogéneo. (14, 23)
2. Realizar una segunda resiembra en el medio de Sauton-Papa (pase 2); proseguir las resiembras en tubos de medio de cultivo Sauton-papa. Para iniciar otra línea de cultivo, abrir otra ampollita liofilizada e iniciar el proceso nuevamente; nunca pasar del pase número 8. (14)
3. Dentro del área aséptica, tomar una asada con una asa calibrada de 1.5 cm de diámetro, del cultivo del segundo pase de Sauton-Papa, sembrar 10 matraces Erlenmeyer de 300 ml conteniendo cada uno de ellos 100 ml de medio de cultivo líquido de Sauton e incubar a 37°C durante 8 ó 9 días (Sauton I). Muestrear dos o tres matraces, tomándolos al azar; reunir una alícuota de aproximadamente 25 ml y hacer prueba de pureza de la siguiente manera: sembrar por separado dos tubos de caldo de soya tripticasa y dos tubos de medio líquido de tioglicolato. Incubar durante 14 días a 37°C. (22,23)
4. Tomar una asada, con una asa calibrada de 1.5 cm de diámetro, del cultivo Sauton I y sembrar 20 matraces Erlenmeyer de 300 ml de capacidad, conteniendo cada uno de ellos 100 ml de

medio líquido de Sauton e incubar a 37°C durante 6 ó 7 días (Sauton II). Efectuar prueba de pureza como se indica en el inciso tres. (22)

3.3.1.2 COSECHA:

1. Seleccionar los mejores cultivos de la segunda resiembra en medio de cultivo Sauton II, en base a su crecimiento. (14)

2. Tomar una muestra de dos o tres cultivos y determinar pureza y pH. Para la prueba de pureza sembrar un ml de la muestra en medio de soya tripticasa y medio líquido de tioglicolato e incubar a 37°C durante 6 días. (14)

3. Filtrar dos matraces de Sauton II a través de un filtro Birkhaug, lavar con 500 ml de solución de glutamato de sodio al 1.5 %, comprimir la masa bacilar para eliminar la mayor humedad posible, depositar la masa bacilar en un vaso de precipitados estéril, el cual debe ser previamente pesado, y pesar nuevamente el vaso conteniendo la masa bacilar, para determinar el rendimiento de masa bacilar por matraz de medio de cultivo. (22)

4. Depositar la mayor cantidad posible de masa bacilar en un matraz bola de fondo plano de 2 lts de capacidad (matraz de molido) con 1.450 Kg de balas de acero inoxidable de 4 mm de diámetro. (14)

5. Pesar el vaso de precipitados con la masa bacilar residual para determinar exactamente qué cantidad de masa bacilar se depositó en el molino. (14)

6. Moler la masa bacilar que se encuentra en el molino del siguiente modo:

- a) Homogeneizar manualmente la masa bacilar con las balas, con movimientos rotatorios suaves.
- b) Moler mecánicamente a 18 rpm durante dos minutos.
- c) Homogeneizar manualmente.
- d) Moler mecánicamente a 18 rpm por 3 minutos.
- e) Agregar 20 ml de glutamato de sodio al 1.5% y homogeneizar.
- f) Moler mecánicamente a 18 rpm por 30 ó 60 segundos. (22)
- g) Homogeneizar manualmente.

7. Ajustar el volumen con solución de glutamato al 1.5 % a una concentración de 10 mg/ml. Homogeneizar y decantar la suspensión en un matraz Erlenmeyer estéril y almacenar en refrigeración a una temperatura de entre 2 y 8 °C. (14,22)

8. Colocar el vaso de precipitados que contiene la masa bacilar residual en una estufa a una temperatura de entre 60 y 70°C durante tres horas. Transcurrido éste tiempo, pesar nuevamente el vaso de precipitados y determinar la humedad de la masa bacilar. Límites: de 60 a 85 % de humedad. (14)

3.3.2 METODO MODIFICADO

3.3.2.1 DESARROLLO BACTERIANO: Seguir los mismos pasos que para el método establecido.

3.3.2.2 COSECHA:

1. Dentro del área aséptica en una campana de flujo laminar y utilizando guantes de cirujano estériles, filtrar dos matraces de cultivo de Sauton II a través de una tela de molino de 15 X

- 20 cm. Recibir el sobrenadante en un vaso de precipitados de 300 ml y determinar el pH del sobrenadante.
2. Colocar la masa bacilar retenida en la tela de molino en viales de plástico de 250 ml para centrifuga.
 3. Centrifugar a 3000 rpm durante 40 minutos a una temperatura de 8°C.
 4. Sacar la masa bacilar compactada del vial de plástico, depositar en un vaso de precipitados de 300 ml estéril previamente pesado; pesar nuevamente el vaso con la masa bacilar y determinar el rendimiento de masa bacilar por matraz de medio de cultivo.
 5. Depositar la mayor cantidad posible de masa bacilar en un matraz bola fondo plano de 2 lts (matraz de molido) con 1.450 Kg de balas de acero inoxidable de 4 mm de diámetro. (14)
 6. Pesar el vaso de precipitados con masa residual para determinar exactamente qué cantidad de masa bacilar se depositó en el molino. (14)
 7. Moler la masa bacilar en el matraz de molido manualmente con movimientos rotatorios y suaves de 1 a 2 minutos, hasta lograr la apariencia adecuada (las paredes del matraz deben tener la apariencia de "mica").
 8. Agregar 20 ml de solución de glutámato de sodio al 1.5 % y homogeneizar manualmente.
 9. Ajustar el volumen con solución de glutamato de sodio al 1.5 % a una concentración de 10 mg/ml. Homogeneizar, decantar en un matraz Erlenmeyer estéril de 2 lts y almacenar en refrigeración a una temperatura de entre 2 y 8°C. (14,22)

10. Colocar el vaso con la masa bacilar residual en la estufa a una temperatura de entre 60 y 70 °C durante tres horas, transcurrido éste tiempo, pesar nuevamente el vaso de precipitados y determinar la humedad de la masa bacilar. Límites: de 60 a 80 % de humedad. (14)

3.3.3 PRUEBAS DE CONTROL

Tomar una muestra de 30 ml de suspensión de la vacuna por stock y realizar las siguientes pruebas de control:

A) Pureza:

1. Tomar una alícuota de 3 ml con una pipeta de 5 ml y sembrar un mililitro de la misma en tres tubos de ensaye que contengan caldo de soya tripticasa; del último tubo inoculado, tomar una alícuota de tres mililitros y sembrar un mililitro en otros tres tubos de ensaye que contengan caldo de soya tripticasa por separado.
2. Proceder del mismo modo descrito en el punto anterior, pero utilizando medio fluido de tioglicolato.
3. Incubar los tubos a 37 °C durante 14 días en ambos casos.
4. La ausencia de cualquier crecimiento después de terminado el tiempo de incubación dan como satisfactoria la prueba. (22)

B) Consumo de Oxígeno: Aparato Warburg

1. Ajustar la temperatura del baño a 37 °C.
2. Homogeneizar la muestra.
3. Colocar 0.2 ml de KOH al 20 % en el compartimiento central del matraz de reacción e introducir un pequeño papel filtro en

éste recipiente para aumentar la superficie de absorción del bióxido de carbono que se forma durante la prueba.

4. Colocar 3 ml de la suspensión de la vacuna en cada uno de los matraces de reacción. La prueba se realiza por duplicado para cada Stock.

5. Colocar en 2 matraces de reacción 0.2 ml de KOH al 20 % en la parte central y 3 ml de glutamato de sodio al 1.5 % en la parte exterior. Estos matraces sirven como testigo para detectar las pequeñas variaciones de presión durante el desarrollo de la prueba.

6. Ensamblar los matraces de reacción con su correspondiente termobarómetro e introducir los matraces con las muestras y testigos al baño del aparato a 37°C.

7. Estabilizar la temperatura del baño y de las muestras, mediante el sistema de agitación del aparato durante 15 minutos, con las llaves abiertas.

8. Cerrar las llaves y tomar las lecturas de los termobarómetros en el tiempo cero.

9. Efectuar la lectura del consumo de oxígeno en cada uno de los termobarómetros de prueba, y de las variaciones de presión en el termobarómetro testigo a intervalos de 30 minutos durante dos horas.

10. Efectuar las correcciones de volúmenes problema con respecto a las variaciones en el termobarómetro testigo.

11. Calcular el consumo de oxígeno en microlitros por miligramo y por hora de la suspensión de la vacuna.

12. Límites: de 0.7 a 2.4 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr}$. (22)

C) Opacidad:

1. Colocar en el espectrofotómetro el filtro correspondiente a 350-500 nm. Seleccionar una longitud de onda de 400 nm.
2. Calentar el aparato durante 10 minutos.
3. Ajustar el aparato a 100 % de transmitancia y 0 de absorbancia.
4. Hacer una dilución 1:10 (suspensión de la vacuna:agua fría).
5. Leer, utilizando como blanco glutamato de sodio al 1.5 %.
6. Calcular la concentración real de la vacuna, utilizando la absorbancia obtenida.
7. La interpretación de ésta prueba se debe hacer en función del resultado obtenido en el consumo de oxígeno, por lo que no se cuenta con límites preestablecidos.

D) Dispersión bacilar:

1. Homogeneizar la muestra.
2. Poner en un portaobjetos limpio y seco una gota de la vacuna en suspensión. Extender en el portaobjetos la muestra, dejar secar y fijar con calor.
3. Cubrir el frotis con fucsina fenicada durante cinco minutos.
4. Lavar el exceso de colorante con un chorro suave de agua.
5. Agregar alcohol-ácido hasta que no arrastre colorante.
6. Lavar el exceso de colorante con un chorro suave de agua.
7. Agregar azul de metileno y dejarlo durante dos minutos.
8. Lavar abundantemente con agua.
9. Observar a inmersión (100x)
10. Contar el número de bacilos libres por campo, así como el número de grumos y las características de los mismos.

11. Límites; ésta prueba no cuenta con límites preestablecidos por lo que su evaluación se deja al criterio del químico responsable. (22)

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS

Para evaluar la sustitución de los filtros Birkhaug por centrifugación, se establecieron inicialmente las condiciones de centrifugación a las que se sometieron las muestras del método propuesto, las cuales fueron 3000 rpm por un tiempo de a 8°C. Se realizaron 16 réplicas del método propuesto y 16 réplicas del método establecido.

Los graneles obtenidos por cada uno de los métodos respectivamente, fueron analizados para determinar la calidad de los mismos y los parámetros a evaluar fueron; porcentaje de humedad en la vacuna semiseca, consumo de oxígeno, pureza, opacidad-concentración y dispersión bacilar. En los cuadros 1 y 2 se puede observar que los valores referentes a los parámetros estudiados en general, se encuentran dentro de los límites establecidos y son homogéneos entre sí.

Los resultados obtenidos en las pruebas mencionadas se analizaron estadísticamente para establecer si existía diferencia significativa entre los dos métodos. Para los resultados de porcentaje de humedad en la vacuna semiseca, consumo de oxígeno, concentración y dispersión bacilar se utilizaron dos pruebas de hipótesis; la primera de ellas llamada Prueba de la razón de variancias para determinar si las variancias de las dos poblaciones eran iguales (ver cuadro 3) y a partir de éste resultado aplicar la segunda prueba de hipótesis para establecer si existía una diferencia significativa entre las medias de las dos poblaciones evaluadas, usando la distribución t como estadística de prueba.

A través de éste último resultado se estimó la equivalencia entre los dos métodos (ver cuadro 4).

Para analizar los resultados de la pureza de los graneles se empleó otra prueba de hipótesis basada en la confrontación de la proporción de resultados satisfactorios obtenidos por uno y otro tratamiento (ver cuadro 5).

CUADRO 1
 RESULTADOS DE LOS GRANELES PRODUCIDOS POR EL METODO ESTABLECIDO

MUESTRA	PUREZA	CONSUMO OXIGENO μ l/mg/hr	OPACIDAD (Abs)	CONCENTRACION (mg/ml)	% HUMEDAD	DISPERSION BACILAR		
						GRADO DE DISP.	# BACILO LIBRE	DESCRIP. CUMULO
1	S	0.89	0.63	1.03	81.77	15-16	90-100	M
2	S	1.90	0.88	1.48	84.55	11-12	90-100	G, M
3	S	0.89	0.41	0.67	77.05	11-12	70-80	CH
4	S	1.09	0.41	0.67	73.71	9-10	70-80	CH
5	S	1.07	0.50	0.83	79.70	11-12	80-90	M
6	S	1.09	0.83	1.50	73.71	9-10	70-80	CH
7	S	1.57	0.61	1.01	78.47	9-10	90-100	G, M
8	S	1.20	0.44	0.70	81.54	9-10	70-80	M
9	S	1.31	0.46	0.76	78.93	10-11	80-90	M
10	S	1.32	0.45	0.74	69.34	11-12	60-70	G
11	S	1.27	0.43	0.70	64.30	10-11	80-90	M
12	S	1.21	0.43	0.79	64.25	8-9	90-100	M
13	S	0.77	0.46	0.76	84.15	11-12	50-60	CH
14	S	1.30	0.58	0.93	78.71	15-16	90-100	G, M
15	S	1.09	0.40	0.65	77.20	15-16	90-100	G, M
16	S	2.35	0.73	1.19	84.04	17-18	90-100	G, M

ABREVIATURAS : S = Satisfactoria
 Abs = Absorbancia
 CH = Chico
 M = Mediano
 G = Grande

CUADRO 2
RESULTADOS DE LOS GRANELES PRODUCIDOS POR EL METODO PROPUESTO

MUESTRA	PUREZA	CONSUMO OXIGENO μ l/mg/hr	OPACIDAD (Abs)	CONCENTRACION (mg/ml)	% HUKEDAD	DISPERSION BACILAR		
						GRADO DE DISP.	# BACILIO LIBRE	DESCRIP. CUKULO
1	S	1.78	0.66	1.10	65.30	11-12	90-100	G . M
2	S	2.13	0.66	1.10	67.40	3-4	90-100	G . CH
3	S	1.00	0.39	0.64	64.43	4-5	50-60	M
4	S	1.50	0.52	0.86	65.14	6-7	50-60	M
5	S	1.57	0.59	0.98	81.39	13-14	90-100	G . M
6	S	2.35	0.70	1.17	64.49	10-11	80-90	G . M
7	S	1.70	0.59	0.98	71.82	10-11	90-100	G . M
8	S	1.49	0.57	0.95	66.30	11-12	90-100	M
9	C	1.18	0.53	0.88	65.46	6-7	80-90	M . CH
10	S	1.18	0.64	1.07	63.87	10-11	70-80	M
11	S	1.58	0.47	0.77	68.19	12-13	50-60	G
12	C	1.30	0.62	1.03	73.51	8-9	80-90	G . M
13	S	1.63	0.78	1.31	64.90	12-13	90-100	G . M
14	S	0.94	0.62	1.03	65.93	8-9	90-100	G
15	S	1.31	0.72	1.20	66.71	8-9	60-70	G
16	S	1.22	0.71	1.19	67.40	12-13	50-60	M

ABREVIATURAS : C = Contaminada
 S = Satisfactoria
 CH = Chico
 M = Mediano
 G = Grande
 Abs = Absorbancia

CUADRO 3
ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR
EL METODO PROPUESTO Y EL ESTABLECIDO

P R U E B A	M E T O D O				PRUEBA DE HIPOTESIS # 1 (PRUEBA DE RAZON DE VARIANCIAS)			RESULTADO
	ESTABLECIDO		PROPUESTO		F ($\alpha = 0.05$)		G. I.	
	\bar{X}	S	\bar{Y}	S	CALC.	TABLA		
CONSUMO OXIGENO $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr}$	1.27	0.16	1.49	0.14	1.07	2.33	(15.15)	H_{01} ACEPTADA
CONCENTRACION (mg/ml)	0.90	0.80	1.02	0.30	2.62	2.33	(15.15)	H_{01} RECHAZADA
% HUNEDAD	76.96	41.42	67.40	20.36	2.03	2.33	(15.15)	H_{01} ACEPTADA
GRADO DISPERSION	11.81	7.29	9.50	9.06	1.24	2.33	(15.15)	H_{01} ACEPTADA
BACILO LIBRE	83.75	158.33	80.00	293.33	1.85	2.33	(15.15)	H_{01} ACEPTADA

H_{01} : Las variancias de las dos poblaciones son iguales.

ABREVIATURAS: a) CALC. = Calculada
 b) G. I. = Grados de libertad
 c) S = Variancia
 d) H_0 = Hipótesis nula
 e) \bar{X} = Media

CUADRO 4
ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR
EL METODO PROPUESTO Y EL ESTABLECIDO

P R U E B A	M E T O D O				PRUEBA DE HIPOTESIS # 2 (DISTRIBUCION t)			
	ESTABLECIDO		PROPUESTO		F ($\alpha = 0.05$)		G. I	RESULTADO
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	CALC.	TABLA		
CONSUMO OXIGENO $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr}$	1.27	0.16	1.49	0.14	-1.62	± 2.04	30	H_0 ACEPTADA
CONCENTRACION (mg/ml)	0.90	0.80	1.02	0.30	-1.42	± 2.05	27	H_0 ACEPTADA
% HUNEDAD	76.96	41.42	67.40	20.36	4.87	± 2.04	30	H_0 RECHAZADA
GRADO DISPERSION	11.81	7.29	9.50	9.06	2.29	± 2.04	30	H_0 RECHAZADA
BACILO LIBRE	83.75	158.33	80.00	293.33	0.71	± 2.04	30	H_0 ACEPTADA

H_0 : Las medias de las dos poblaciones evaluadas son iguales

- ABREVIATURAS:
- a) CALC. = Calculada
 - b) G.L. = Grados de libertad
 - c) S = Variancia
 - d) H_0 = Hipótesis nula
 - e) \bar{X} = Media

CUADRO 5
ANALISIS ESTADISTICO DE LA PRUEBA DE PUREZA

M. ESTABLECIDO		M. PROPUESTO		VCZ $\alpha = 0.05$	Z	RESULTADO
N.M	N.M.S	N.M	N.M.S	1.645	1.46	H ₀ ACEPTADA 3
16	16	16	14			

H₀ : No hay diferencia significativa en la proporción
3 de resultados satisfactorios obtenidos en cada uno de los métodos.

ABREVIATURAS : NM = Número de muestras
NMS = Número de muestras Satisfactorias
VCZ = Valor Crítico de Z
H₀ = Hipótesis nula
M = Método

4.2 DISCUSIONES

En el presente trabajo, se evaluó la sustitución de los filtros Birkhaug por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos a 8°C en el proceso de concentración de los cultivos en la producción de la vacuna BCG, para determinar si la centrifugación afecta la sobrevivencia de los bacilos y establecer si existe equivalencia entre ambos métodos. Inicialmente se analizaron los resultados correspondientes al consumo de oxígeno, observándose que en los graneles obtenidos por el método propuesto eran elevados; por lo cual se considera que la centrifugación no afecta en forma adversa la viabilidad de los bacilos.

Mediante la comparación estadística de los resultados de las pruebas de control efectuadas a los graneles obtenidos, se determinó la equivalencia entre los dos métodos con respecto al consumo de oxígeno, pureza, concentración y número de bacilo libre; así como la diferencia significativa en relación al porcentaje de humedad de la masa bacilar semiseca en donde se observó que los graneles producidos por el método propuesto presentaban en general valores más bajos y homogéneos que los elaborados por el método establecido, lo cual se debe a que la filtración de la masa bacilar por filtro Birkhaug está sujeta a un mayor número de variables como son la eficiencia de la bomba de vacío a la cual se conecta el filtro, la destreza y fuerza que aplica el operador; mientras que al utilizar la centrifugación las condiciones siempre se mantienen constantes.

Los métodos no resultaron tampoco equivalentes en cuanto al grado de dispersión ya que con el método propuesto se obtuvieron graneles con un número inferior de grumos, lo cual resulta favorable para la calidad de la vacuna.

CAPITULO V
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La centrifugación de los cultivos para la producción de vacuna BCG a 3000 rpm durante 30 minutos a 8°C no afecta a la viabilidad de los bacilos de Calmette y Guérin.

2. El método propuesto es equivalente al establecido con respecto a la pureza, concentración, consumo de oxígeno, número de bacilos libres y más eficaz en relación al porcentaje de humedad de la vacuna semiseca y grado de dispersión en la vacuna en la fase de granel.

3. El método por centrifugación propuesto puede sustituir al método por filtración con filtro Birkhaug establecido.

4. La sustitución de los filtros Birkhaug por centrifugación implica una inversión fuerte pero evitará el cambio continuo de dichos filtros cuyo costo es muy elevado.

BIBLIOGRAFIA

1. Allen B.W., Baker F.D. MICOBACTERIAS, AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD. 1a Ed. El Manual Moderno. México, D.F (1976).
2. Bol. of Sanit. Panam. 110 (1), 57, Enero (1991).
3. Centro Panamericano de Zoonosis. Microbiología del Bacilo de la Tuberculosis. Serie de Monografías Científicas. Argentina (1979).
4. Comisión Nacional de Vacunación, Estrategias del Programa de Vacunación. Gazeta Acción Vacuna Acción No 1, 9-10, Jul-Ago (1991).
5. Comisión Nacional de Vacunación, Vacuna BCG. Gazeta Acción Vacuna Acción No.8, 14-15, Sep-Oct (1992).
6. De Kantor N. Isabel. Eficacia y Control de Calidad de la Vacuna BCG en América. Bol. of Sanit. Panam. 107 (3), 253-258, Sep. (1989).
7. Del Villar Yáñez Alvaro. La tuberculosis en la Década de 1990. Bol. of Sanit. Panam. 111 (5), 461-469, Nov. (1991).

8. Drea F. William, Andrejeu Anatole, Long R. et. al. THE METABOLISM OF THE TUBERCLE BACILLUS 1th Ed., Charles C. Thomas Publisher, Springfiel. Illinois USA (1953).

9. Estrada Parra Sergio, García P. Emilio. Inmunología de la tuberculosis. Revista Salud Pública de México. Vol XXIV, No.3, 269-275, May-Jun (1982).

10. Fernández de Castro P. Tuberculosis Perspectivas en México. Rev. Inst. Nac. Enf. Resp. 3, (1), 55-61, (1990).

11. Freeman A. Bob. MICROBIOLOGIA DE BURROWS. 22a Ed Interamericana, Mc-Graw-Hill. (1989).

12. Fuentes Méndez F. PLANEACION DE REQUERIMIENTOS DE MATERIALES EN LA PRODUCCION DE VACUNA BCG. Memoria para obtener el Título de QBP Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. (1985).

13. Gloyd Stephen, López José L., Mercado Javier F. et al. Riesgo de Infección por Tuberculosis en el Estado de Jalisco México. Bol. of Sanit. Panam. 111 (5), 393-400, Nov. (1991).

14. Gómez Herrera Jorge, Montesinos I. N., Vázquez V. ALGUNOS FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCION DE VACUNA BCG. INH Laboratorio de Producción de Vacuna BCG. (1976).

15. Gómez Herrera Jorge, Villalva P.H., LA VACUNA BCG EN MEXICO Memorias de la XXXVII Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Salud Pública. Gto, México. (1983).
16. Herrera Téllez José Oscar. Programa de Vacunación Universal, Organización y Desarrollo. Gaseta Acción Vacuna Acción No.7, 1-2, Ago. (1992).
17. Jara Valencia Jorge. La Vacuna Universal Meta lograda con la Participación de Todos. Gaseta Acción Vacuna Acción No.7, 10-11 Ago (1992).
18. Krasil'nikov N.A., Koronell T.V. Nature of Polar Lipids from a paraffin Oxidin Culture of Mycobacterium rubrum. Mikrobiologiya. Vol 40, No 2, 196-200, Mzo-Abr. (1971).
19. Koneman W. Elmer, Allen D.S., Dowel V.R. et. al. DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO, 1a Ed. Médica Panamericana. México D.F (1989).
20. Kumate Jesús, INMUNIDAD-INMUNIZACION-VACUNAS. 3a Ed. Editor Francisco Méndez Cervantes. México D.F. (1983).
21. Latini Omar, Amadio Gladis, Di Lonardo Martha et. al. Métodos Bacteriológicos de la Tuberculosis en Argentina. Evaluación de la Calidad. Bol. of Sanit. Panam. 104 (4), 355-363, Abr. (1988).

22. Manual de Producción y Control de Vacuna BCG. Gerencia General de Biológicos y Reactivos. Instituto Nacional de Higiene, Depto. de Vacuna BCG. México (1988).

23. Martínez Morales Roberto. Vacuna del BCG Costos de Producción. Ensayo Bibliográfico para obtener el Título de Q.B.P. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México D.F. (1985).

24. Nakamura López Miguel Angel. Resultados de la Semana Nacional de Vacunación. Gaseta Acción Vacuna Acción No.8, 10-12 Sep-Oct (1992).

25. OMS, Control de Calidad de la Vacuna BCG. Reseña. Bol. of Sanit. Panam. 99 (4), 415-416, Oct. (1985).

26. Pacheco P.C., Magaña F. A Cien Años del Descubrimiento del Bacilo de la Tuberculosis. Folleto Conmemorativo de la Dirección General de Control de la Tuberculosis y de las Enfermedades Respiratorias. Sría de Salud. Intersistemas S.A de C.V. México D.F. (1982).

27. Pacheco P.C., Olvera R. Importancia de la Vacunación con BCG en el Programa de Control de la Tuberculosis. Comunicación Interna DGCTEAR. Revista Sal. Pub. México (1982).

28. Pacheco P.C., Olvera R. Control de la Tuberculosis en México. Bol. of Sanit. Panam. 105 (1), 34-39, (1988).
29. Peñafiel A. Principales Enfermedades Regionales de la República Mexicana. Rev. de Salud Pública, 33 (1), 95-97, (1991).
30. Piña J.M. Intolerancia I Toxicitat Desis Farmacs Antituberculosos. Ann. Med. (Barcelona) 74 (1) (1988).
31. Ramos Espinosa Jesús, Mendez F. Tratamiento Actual de la Tuberculosis. Rev. Salud Pública de México. Vol XXIV No.3 Mayo-Junio (1982).
32. Secretaría de Salud, Dirección General de Estadística. Mortalidad (1989).
33. Shinnick Thomas. The 65 Kilodalton Antigen of Mycobacterium tuberculosis. J. of Bacteriology. Vol 169 No.3, 1080-1088, (1987).
34. Solórzano Moguel J., Cuevas M. E. Atención del Enfermo de Tuberculosis a Nivel Comunitario en el Estado de Chiapas, México. Bol. of Sanit. Panam., 111 (5), 432-438, (1991).

35. Toman K. Estado Actual de los Conocimientos Técnicos sobre la Inmunización contra la Tuberculosis. Bol. of Sanit. Panam. 75:93, 380-400, (1973).

36. Van Diense F. Senechal D. BCG on Sauton's Medium. Bull World Health Org. 2, 373-380, (1950).

37. Wallis S. Robert, Vecha Michael, et. al.. Influence of Tuberculosis Human Immunodeficiency Virus. (HIV-1) Enhanced Cytokine Expression and Elevated Microglobulin in HIV-1, Associated Tuberculosis. J. Infectious Diseases 163, 43-47 (1993).

38. Wayne W. Daniel. BIOESTADISTICA, 3a Ed. Limusa, México (1989).

39. Williston H. Elizabeth. Rosenthal Roy. Further Studies in Trace Elements and BCG Cultures. Bull Wld Hlth Org. 26, 47-50, (1962).

40. WHO Requeriments for dried BCG Vaccine (WHO Expert Committee on Biological Standardization) 18th Report, Geneva (1966).

41. Zuluaga Luz, Betancur Ceneida, Abaunza Myriam. et. al. Prevalencia de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias en Personas Mayores de 15 años de la Comunidad Nororiental de

Medellín, Colombia. Bol. of. Sanit. Panam. 111 (5) 414-419,
(1991).

ESTE NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA