

89
2ef



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

**IMPLEMENTACION DEL MANUAL PARA LA PRODUCCION
DE LA VACUNA CONTRA FIEBRE TIFOIDEA A BASE
DE PORINAS DE *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d PARA
APLICACION EN HUMANOS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N :
ARACELI OLGUIN JIMENEZ
OLIVIA PORTILLO TOGNO



MEXICO, D. F.

1998.

267012

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

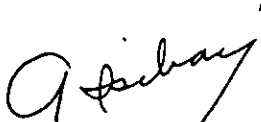
Jurado Asignado:

Presidente	Prof. Peniche Quintana Elda
Vocal	Prof. León Chapa Saturnino de
Secretario	Prof. Isibasi Araujo Armando
1er. Suplente:	Prof. García Tamayo Fernando
2º. Suplente:	Prof. Lemus Díaz Hortencia Eugenia

Sitio donde se realizó el tema:

Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Asesor:


Dr. Armando Isibasi Araujo

Supervisor técnico:


Q.B.P. María del Carmen Maldonado Bernal

Sustentantes:


Araceli Oguín Jiménez


Olivia Portillo Togno

A nuestros padres

A nuestro asesor, el Dr. Armando Isibasi Araujo

Un reconocimiento especial a todas las personas que nos apoyaron con su asesoría, participación y paciencia:

Prof. Socorro Alpizar Ramos

Ing. Joaquín Pérez Ruelas

(del laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Fac. de Química de la UNAM)

Dr. Jorge Paniagua Solís

Dr. Vianney Ortíz Navarrete

Mtro. Mario Vega

(de la UIM en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades de CMN, Siglo XXI del IMSS)

Dr. Jorge González Canudas

(del Dpto. de Medicina Interna del Hospital de Especialidades de CMN, Siglo XXI del IMSS)

Prof. Eida Peniche Quintana

(del Dpto. de Microbiología de la Fac. de Química de la UNAM)

Prof. Luciano Hernández Gómez

(del Cepario de la Fac. de Química de la UNAM)

Dra. Celia González Bonilla

(del INDRE)

A la Unidad de Control Técnico de Insumos del IMSS

A todos nuestros compañeros de la UIM en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI del IMSS

CONTENIDO

Capítulo	Página
I. Resumen	1
II. Antecedentes	
1. Introducción	2
2. Fiebre Tifoidea	
2.1. Generalidades	3
2.2. Patogenia	3
2.3. Etiología	4
2.4 Epidemiología	6
3. Vacunas Contra la Fiebre Tifoidea	
3.1. Generalidades	6
3.2. Vacunas Parenterales de Bacterias Muertas	7
3.3. Vacunas Orales de Bacterias Completas Inactivadas	8
3.4 Vacunas Orales de Bacterias Atenuadas	8
3.5. Vacunas Parenterales Conjugadas Polisacárido-Proteína Acarreadora	9
3.6. Vacunas Parenterales de Subunidades Bacteriaas	9
4. Antecedentes en la Investigación de Porinas de <i>Salmonella typhi</i> y <i>Salmonella typhimurium</i>	12
5. Características Generales de una Vacuna Inyectable	18
6. Buenas Prácticas de Manufactura de productos Biológicos	20
6.1. Instalaciones y Areas de Trabajo	22
6.2. Personal	23
6.3. Producción	24
6.4. Registro	24
6.5. Control de Calidad	25

III. Objetivos	26
1. Objetivo General	
2. Objetivos Particulares	
IV. Material y Métodos	27
V. Resultados	
1. Acondicionamiento de las Areas de Producción y Purificación/Dosificación	77
2. Programa de Sanitización de las Areas de Producción Purificación/Dosificación	78
3. Resultados del Proceso Producción	
3.1. Control en Proceso	82
3.2. Control de Producto a Granel	97
3.3. Control de Producto Terminado	107
VI. Discusión	120
VII. Conclusiones	127
VIII. Bibliografía	128

I. RESUMEN

En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, desde hace mas de diez años se estudia el papel de las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d en la inducción de inmunidad protectora contra la fiebre tifoidea.

Con el objeto de producir porinas en las condiciones necesarias para su aplicación en humanos, se implementó un manual de producción cuya finalidad es la de asegurar resultados confiables y reproducibles con un sistema de documentación eficiente.

En primer lugar se realizó el acondicionamiento de las áreas de producción y purificación/dosificación con el objetivo de lograr instalaciones adecuadas para la obtención de un producto inyectable en humanos. Posteriormente se diseñó un programa de sanitización donde se disminuyó, lo más posible, la carga de contaminación microbiana en el área.

La obtención de Porinas de *Salmonella typhi* se llevó a cabo siguiendo el proceso general utilizado en la Unidad de Investigación en Inmunoquímica, adaptándolo a las nuevas instalaciones y necesidades. A la par, se elaboraron e implementaron los Procedimientos Estándares de Operación (PEO) involucrados tanto en la producción como en el control y aseguramiento de calidad de la vacuna.

Además de muchos ensayos realizados para optimizar los diferentes procesos, se produjo un lote final de Porinas de *Salmonella typhi* siguiendo los Procedimientos Estándares de Operación del manual. Los resultados obtenidos muestran que es posible obtener Porinas de la calidad y en las cantidades necesarias para la producción de la vacuna, sin embargo, es necesario seguir mejorando los procedimientos críticos donde se pueda generar contaminación externa (ambiental o humana).

II. ANTECEDENTES

1. INTRODUCCION

Actualmente la fiebre tifoidea sigue siendo un problema de salud pública, sobre todo en países subdesarrollados, donde las condiciones de higiene y la prevalencia de portadores asintomáticos crean una fuente de difusión considerable (6). Como consecuencia de esto se genera contaminación del medio ambiente, agua y alimentos; dejando expuestos a riesgo de fiebre tifoidea a cuatro grupos que son: los niños que viven en áreas endémicas, las personas que viajan a áreas endémicas o a países subdesarrollados, trabajadores de la salud y personas de edad avanzada (46).

El tratamiento oportuno con antibióticos específicos ha mejorado el pronóstico y reducido la mortalidad; sin embargo, la tardanza en el inicio del tratamiento, la aparición de cepas resistentes y la diseminación por parte de portadores asintomáticos, explican la incidencia de esta enfermedad, con la presencia de algunos casos mortales. Por lo tanto, es necesario tomar medidas para la prevención y eliminación de la enfermedad (6).

En el mercado existen varias vacunas contra fiebre tifoidea, las cuales no alcanzan a cubrir los parámetros necesarios para su aplicación en programas masivos, ya sea por sus efectos colaterales, corta duración, costo, etc. Actualmente, los procesos biotecnológicos nos permiten el desarrollo de nuevas vacunas fabricadas por diferentes metodologías, entre las que se encuentran extracción y purificación de subunidades estructurales de bacterias, ingeniería genética o biología molecular. En publicaciones anteriores se ha propuesto a las porinas de *Salmonella typhi* 9,12, Vi:d como candidatos a una vacuna contra la fiebre tifoidea, la cual ha demostrado tener ventajas sobre otras opciones (35,36,42).

El desarrollo y fabricación de vacunas implica procedimientos por medio de los cuales se garantiza que la vacuna obtenida cumpla las especificaciones para ser administrada en humanos, como son: inocuidad, potencia, especificidad, pureza, seguridad, estabilidad y efectividad. En este trabajo se describe la propuesta de un manual de fabricación para la obtención de una vacuna contra fiebre tifoidea a partir de Porinas de *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d siguiendo las buenas prácticas de manufactura para productos biológicos (10).

2. FIEBRE TIFOIDEA

2.1. GENERALIDADES

La fiebre tifoidea es una enfermedad infecciosa aguda y febril causada por *Salmonella typhi*. La infección se adquiere por medio de la ingestión de alimentos o agua contaminados con la bacteria. Debido a que este microorganismo afecta solo al ser humano y no hay reservorios animales, el elemento más importante en la cadena de transmisión, son los individuos que no presentan sintomatología clínica pero son portadores y excretores activos del agente (portadores asintomáticos) (8).

La fiebre tifoidea se caracteriza por síntomas sistémicos como fiebre, malestar general, cefalea y dolor abdominal. Frecuentemente se presenta con exantema transitorio, esplenomegalia y leucopenia. Las complicaciones más importantes incluyen perforación y hemorragia intestinal e incluso choque en una tasa del 1 al 5 % (40).

2.2. PATOGENIA

La vía de entrada de *Salmonella typhi* es casi siempre el tracto gastrointestinal, se multiplica rápidamente en el intestino delgado y penetra la membrana basal sin causar daño importante en los tejidos, es fagocitada por los macrófagos y transportada a los ganglios linfáticos,

donde se multiplica activamente, los sujetos infectados presentan una fase de bacteremia por medio de la cual los bacilos se distribuyen en el sistema fagocítico mononuclear, donde se reproducen y son liberados nuevamente al sistema circulatorio, donde causa una bacteremia secundaria la cual se acompaña del cuadro de fiebre clásico (20,32). La dosis que es capaz de infectar a los humanos y producir la enfermedad, según estudios realizados en humanos sanos, es de aproximadamente 10^9 unidades viables ingeridas por vía oral (32).

La presencia del antígeno Vi, el cual se encuentra en la superficie del bacilo, tiene una actividad importante en la virulencia. Observaciones epidemiológicas de voluntarios demuestran que las cepas de *S. typhi* que contienen el antígeno Vi son más virulentas que las que no lo tienen (20,34), aunque la fisiopatología del padecimiento no está totalmente esclarecida se sabe que gran parte de las manifestaciones clínicas son provocadas por la liberación de la endotoxina, virtualmente todas las cepas aisladas de pacientes contienen el lipopolisacárido (LPS); entre otros efectos se ha demostrado que produce fiebre, hipotensión arterial, leucopenia y estimulación policlonal de linfocitos B (34).

La fiebre se produce por un mecanismo que involucra a una sustancia conocida como "pirógeno-endógeno" y que se sabe corresponde a la Interleucina 1 (IL-1) (77). Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra diversas partes antigénicas de *Salmonella typhi* las cuales parecen no correlacionar con el desarrollo de protección contra recaídas o reinfecciones, a excepción de algunos estudios que sugieren que los anticuerpos contra el antígeno H son un indicador de la resistencia a la fiebre tifoidea (75).

2.3. ETIOLOGIA

El género *Salmonella* comprende alrededor de 2, 200 variedades que generalmente se incluyen en tres especies: *Salmonella cholerae-suis*, altamente adaptada a los cerdos pero que puede causar también enfermedad en el humano; *Salmonella enteritidis*, en la que se incluye el

resto de los serotipos y que son causa común de diarrea y *Salmonella typhi*, que afecta sólo al ser humano (8,19).

El microorganismo causante de la fiebre tifoidea es la bacteria Gram negativa *Salmonella typhi*, considerada taxonómicamente como una de las tres especies del género *Salmonella* de la familia *Enterobacteriaceae*. *Salmonella typhi* es un bacilo citofílico, Gram negativo, facultativo, no capsulado, no esporulado, móvil y tiene un tamaño promedio de 2-3 μm x 0.6 μm , fermenta la glucosa con producción de ácido, es lactosa y sacarosa negativo. Serológicamente cae en el grupo D y comparte con los antígenos de ese grupo los antígenos somáticos 9 y 12; el bacilo presenta un antígeno "d" flagelar y en la superficie posee el antígeno Vi, el cual consiste en un homopolímero de ácido N-acetil galacturónico. Muestras frescas aglutinan típicamente con el antígeno Vi pero no con el grupo D. Sin embargo, si se remueve el antígeno Vi se puede apreciar la reacción con el suero del grupo D (9).

Uno de los componentes integrales de gran importancia en la membrana externa de las bacterias Gram negativas es el lipopolisacárido (LPS). El LPS es un glicolípido complejo, el cual está constituido principalmente por dos regiones estructural y químicamente diferentes: Polisacáridos hidrofílicos que forman las estructuras del núcleo (core) y del antígeno O, éstos, a su vez, están unidos por medio de un trisacárido de ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico (KDO) con un dominio hidrofóbico conocido como lípido A. El LPS posee un amplio espectro de actividades biológicas (fiebre, hipoglicemia y necrosis tumoral) y funciones sobre el sistema inmune. Clásicamente se conoce como un antígeno independiente de células T, siendo mitógeno para linfocitos B y considerado como el inductor de la respuesta del hospedero, para provocar un choque séptico con consecuencias fatales (11,56,77).

Por otra parte, el lípido A puede actuar como adyuvante debido a la capacidad de inducir mitogénesis en células B; también confiere una respuesta inmune, incluso se considera que a partir de la presencia de esta región se induce la respuesta anti-LPS (9).

La cadena O específica está constituida por oligosacáridos de más de cinco azúcares residuales (este número dependerá de la bacteria Gram negativa que lo contenga), por lo tanto, la mayor respuesta inmune anti LPS es específica al antígeno O (32). Por el contrario, la estructura del núcleo (core) es más conservada (77).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

Aunque se considera a *Salmonella typhi* como una sola clona con divergencia mínima intraespecie en su distribución mundial, en el Continente Americano la bacteria causa generalmente una enfermedad menos grave que en Africa o en Indonesia. La enfermedad tiene características endémico-epidémicas relacionadas con deficiencias en el saneamiento ambiental y el aprovisionamiento de agua potable (6). En áreas endémicas la incidencia se presenta principalmente entre los 5 y 19 años, por lo cual se está sugiriendo la implementación de programas de vacunación en niños en edad escolar. Tan sólo en los Estados Unidos fueron reportados 41,000 casos en 1993 (75). En México, la incidencia actual de la enfermedad sigue siendo importante, el reporte de casos acumulados a nivel nacional durante el año de 1997 fue de 9,481 y la notificación de casos hasta la semana 30 de este año fue de 5 638 (67).

3. VACUNAS CONTRA LA FIEBRE TIFOIDEA

3.1. GENERALIDADES

Existen comercialmente diferentes tipos de vacunas contra la fiebre tifoidea las cuales tienen como objetivo principal la prevención de la infección y, por lo tanto, sólo se aplican en casos particulares. Las vacunas que se han utilizado desde principios del siglo se pueden clasificar en cinco grupos:

1. Parenterales de bacterias completas inactivadas.
2. Parenterales de subunidades bacterianas.
3. Parenterales conjugadas polisacárido-proteína acarreadora.
4. Orales de bacterias completas inactivadas.
5. Bacteria oral atenuada.

Sin embargo, actualmente no se cuenta con una vacuna totalmente efectiva contra la fiebre tifoidea, pues las vacunas inactivadas causan reacciones colaterales debido a la endotoxina que contienen (46) y tanto la vacuna oral como la elaborada a partir de antígeno Vi, inducen buena inmunidad pero de corta duración (1,44).

3.2. VACUNAS PARENTERALES DE BACTERIAS MUERTAS

A pesar de que la primera inmunización experimental contra la infección por *Salmonella typhi* se realizó en 1886, fue a partir de los años 50 que se realizaron estudios de campo controlados para evaluar la eficacia de este tipo de vacunas. Cuatro variedades de este tipo de vacunas se han incluido en estos ensayos; la inactivada por calor y fenol, la inactivada por alcohol, la inactivada por acetona y la inactivada por formalina y preservada en fenol (46).

La utilización masiva de estas vacunas fue exitosa, pues la morbilidad por fiebre tifoidea disminuyó al aplicarla en la India, Egipto, Italia y Sudáfrica. Además, en los sujetos que adquirían la enfermedad a pesar de estar vacunados, el cuadro clínico era considerablemente menos severo (39). La vacuna que se utiliza más ampliamente en la actualidad es la inactivada por calor y fenol ya que es relativamente fácil de producir. Sin embargo, tiene efectos colaterales debido a la cantidad de lipopolisacárido (LPS) que siempre la contamina. Además, confiere protección parcial y de corta duración, por lo tanto su empleo se ha limitado a grupos considerados como de alto riesgo y no está indicada en niños, lo cual la excluye del Programa Ampliado de Inmunización (PAI). Por lo tanto, es conveniente contar con una vacuna más segura y eficaz que confiera

inmunidad de larga duración y se pueda aplicar en niños pequeños. En México, el Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salud elabora una vacuna antitifoídica inactivada, la cual presenta las siguientes contraindicaciones: con cierta frecuencia produce severas reacciones adversas tanto locales como sistémicas, que incluyen fiebre, dolor de cabeza y eritema, por lo que en ocasiones su uso es causa de ausentismo en el trabajo o en la escuela (40).

3.3. VACUNAS ORALES DE BACTERIAS COMPLETAS INACTIVADAS

Estas vacunas se comenzaron a utilizar desde mediados de los años 20 hasta la década de los 70. Incluyen principalmente una vacuna inactivada por acetona y otra inactivada por formalina. Sin embargo, en amplios ensayos de campo mostraron ser ineficientes por lo que en la actualidad ya no se elaboran ni se recomienda su uso (73).

3.4. VACUNAS ORALES CON BACTERIAS ATENUADAS

Se ha logrado la obtención de mutantes atenuadas de *Salmonella typhi* por métodos químicos o por ingeniería genética. La primera de ellas fue una cepa dependiente de estreptomycinina que en ensayos clínicos demostró ser protectora y segura cuando se administró fresca. Sin embargo, al liofilizarse perdió su inmunogenicidad por lo que no se continuó su desarrollo (45).

Una de las opciones más viables de este tipo de vacunas fue la desarrollada por Germanier en 1975, a partir de la cepa *Salmonella typhi* Ty21a, induciendo mutagénesis con nitrosoguanidina. Entre las mutaciones que contiene, es deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa, codificada en el gene *galE*, y no produce antígeno Vi (22). Se pensaba que la mutación en el gene *galE* era el origen de la atenuación, sin embargo, la obtención por ingeniería genética de mutantes *galE*⁻, Vi⁻ han demostrado que la delección de estos genes no es suficiente para inducir atenuación; por tanto, la cepa *Salmonella typhi* Ty21a debe contener otros genes alterados relacionados con virulencia y patogenicidad. Esta vacuna protege eficientemente, siempre y cuando antes de administrarla se neutralice el jugo gástrico. Actualmente está

disponible en el mercado (Vovotif®) y su utilización general en programas de salud pública tiene utilidad limitada debido a que son necesarias varias vacunaciones para alcanzar niveles aceptables de inmunidad y el costo es elevado (21,46).

Por otra parte, su administración presenta la siguiente contraindicación: no debe administrarse a personas con alguna inmunodeficiencia, incluyendo infección por HIV. En este grupo se recomienda la vacuna parenteral de células muertas (46).

3.5. VACUNAS PARENTERALES CONJUGADAS POLISACARIDO-PROTEINA ACARREADORA

Para incrementar la inmunogenicidad del antígeno Vi y hacerlo un antígeno timo-dependiente, se ha tratado de conjugarlo químicamente a varias proteínas acarreadoras como son el toxoide tetánico, el toxoide diftérico y la subunidad β de la toxina del cólera. En modelos animales se ha demostrado que estos conjugados inducen títulos más altos de anticuerpos que el antígeno Vi solo, sin embargo, aún no se tiene información sobre los resultados en ensayos clínicos en humanos (26).

Otra opción para una posible vacuna es la conjugación de las proteínas de membrana externa de *Salmonella typhi* a otros antígenos. Los resultados preliminares muestran que un conjugado porina-toxoide tetánico protege a ratones y genera anticuerpos neutralizantes de la toxina. Por otro lado, el conjugado Vi-porinas seguramente inducirá memoria inmunológica más eficientemente que el antígeno Vi solo (26).

3.6. VACUNAS PARENTERALES DE SUBUNIDADES BACTERIANAS

Se han diseñado diversas estrategias para obtener vacunas de subunidades. Entre las que se han evaluado clínicamente se encuentran: los extractos obtenidos por congelación/descongelación, los tripsinizados, el LPS purificado (41) y el antígeno Vi purificado. De todos ellos, el último ha mostrado los mejores resultados. El antígeno Vi es un polisacárido

constituido por un polímero de ácido 2-deoxi-2-N-acetil galacturónico que se puede purificar en condiciones no desnaturalizantes utilizando hexadeciltrimetilamonio (Cetavlon®). Los ensayos de campo en Nepal y en Sudáfrica dieron resultados alentadores y actualmente esta vacuna se encuentra en el comercio (TYPHIM Vi*) (17). Sin embargo, su naturaleza polisacáridica hace poco probable que induzca inmunidad de larga duración (62,72).

Se han estudiado diversos antígenos de la superficie de *Salmonella typhi* como probables candidatos a vacunas contra la fiebre tifoidea. Entre ellos está el antígeno somático O, el cual induce títulos altos de anticuerpos tanto en animales de experimentación como en personas con fiebre tifoidea; sin embargo, éstos no correlacionan con un estado de inmunidad (32). De igual forma, el antígeno flagelar H no es capaz de inducir inmunidad protectora (78).

Otra alternativa, es desarrollar una vacuna a partir de proteínas de membrana externa (PME) de *Salmonella typhi* (56). En el modelo murino, tanto las PME de *Salmonella typhi*, como las porinas purificadas (48,69), e incluso la OmpC recombinante (35), inducen protección relacionada con la actividad de anticuerpos, ya que el suero hiperinmune de conejo anti-PME protege pasivamente a ratones (36) y anticuerpos monoclonales anti-porinas confieren protección, mientras que anticuerpos monoclonales anti-LPS no tienen ningún efecto (57), además, los pacientes convalecientes de fiebre tifoidea producen IgG contra las porinas de *Salmonella typhi*. Por otro lado, las porinas también inducen inmunidad mediada por células ya que activan específicamente linfocitos T en humanos y ratones y promueven activación de macrófagos (4,26).

Debido a la localización de las PME en la superficie de las bacterias Gram-negativas, se han considerado como antígenos importantes en la inducción de una respuesta inmune-protectora específica (56). Así, se ha demostrado que la inmunización con PME de *Neisseria meningitidis* y *N. gonorrhoeae* confiere protección contra la infección por la bacteria relevante (4,26).

Estudios subsecuentes han demostrado que la inmunización con PME derivadas de otras bacterias Gram-negativas, como *Haemophilus influenzae* (29), *Shigella flexneri* (2) y *Pseudomonas aeruginosa* (23,80) también confieren protección contra la infección en animales experimentales. Recientemente se ha elaborado una vacuna a base de PME de *N. gonorrhoeae*, la cual se encuentra disponible para uso en humanos. Por otro lado, las PME obtenidas de una cepa rugosa de *Salmonella typhimurium* confieren protección contra la infección por dicha bacteria en ratones (48). También, el suero hiperinmune obtenido en conejos contra las PME confiere protección pasiva contra *Salmonella typhimurium* en ratones no inmunizados (24).

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de nuevas tecnologías en el área biomédica ha permitido el desarrollo de nuevas vacunas. Uno de los ensayos más importantes para la producción de una vacuna contra la fiebre tifoidea es la aplicación de técnicas de ingeniería genética para lograr obtener diversas cepas de *Salmonella typhi* atenuadas. Haciendo deleciones específicas en los loci *aroC*, *aroD*, *aroA* o *purA*, se logran cepas auxotróficas, es decir, que necesitan metabolitos específicos para sobrevivir. Una de las más prometedoras es *Salmonella typhi* CVD908, la cual es dependiente de aminoácidos aromáticos, pues contiene mutaciones definidas en los loci *aroC* y *aroD*, lo cual causa dependencia nutricional por metabolitos que no se encuentran en tejidos de mamíferos y, consecuentemente, no es capaz de sobrevivir en ellos. En ensayos clínicos, esta cepa ha demostrado ser inmunogénica y segura (74), así como inducir una fuerte respuesta inmune humoral y celular (70,71). Esta cepa además, se ha utilizado como acarreador de antígenos heterólogos como gp120 de HIV-1 (18), los factores de colonización CFA/I y CS3 de *Escherichia coli* enterotoxigénica (24) y la proteína circunsporozoítica (CSP) de *Plasmodium falciparum* o en *Salmonella typhi* actualmente todos los cuales se encuentran en proceso de evaluación (75).

4. ANTECEDENTES EN LA INVESTIGACIÓN DE PORINAS DE *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium*.

Las porinas son proteínas monoméricas de peso molecular de 31 a 48 Kda, se encuentran asociadas estrechamente a la péptido glicana y al LPS de forma no covalente (50). Reciben el nombre de porinas porque se ordenan en forma regular en la membrana externa formando trímeros, los cuales forman poros o canales que permiten la entrada pasiva inespecífica de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas (30,31,51).

Basados en los antecedentes de protección con las PME de otras bacterias Gram-negativas (56) y los estudios ya efectuados con las PME de *Salmonella typhi*, Isibasi et. al. (37), diseñaron un proyecto para llevar a cabo la producción de una vacuna contra la fiebre tifoidea a partir de porinas de *Salmonella typhi* para inmunización en humanos. Por otro lado, se ha valorado la respuesta inmune humoral hacia las PME de *Salmonella typhi* en pacientes con fiebre tifoidea en fase aguda y de convalecencia. Los resultados demuestran que las porinas son inmunogénicas en el humano, ya que se encontraron anticuerpos de las clases IgM e IgG específicos; los de clase IgG dirigidos principalmente contra ellas (36).

Para explicar la protección activa y pasiva a través de anticuerpos, se sugiere que la activación del complemento por los anticuerpos anti-porinas, probablemente sea uno de los mecanismos efectores del sistema inmune en la fiebre tifoidea, ya que la reacción antígeno-anticuerpo se lleva a cabo sobre la superficie bacteriana, permitiendo al complejo C5-C9 (MAC) insertarse en la membrana y ejercer su efecto lítico; esto no ocurre con los anticuerpos dirigidos contra el antígeno somático O ya que la reacción antígeno-anticuerpo ocurre en las unidades de repetición oligosacáridicas O, lejos de la membrana bacteriana. Lo anterior podría explicar la falta de correlación entre títulos altos de anticuerpos anti-O y un estado de inmunidad protectora (69).

La protección activa con las porinas de *Salmonella typhi* probablemente se debe a la inducción de una respuesta inmune celular específica. Un modelo para explicar este mecanismo sería el siguiente: La liberación de INT- γ e IL-2 por linfocitos Th1 antígeno-específicos, activaría macrófagos capaces de destruir bacterias, así como clonas antígeno específicas de linfocitos Lyt2+ que ejercerían actividad citotóxica sobre macrófagos infectados con *Salmonella typhi*, de manera semejante a lo que sucede en el modelo murino infectado por *Listeria monocytogenes* (38).

Algunas de las observaciones más relevantes sobre el papel de las proteínas de membrana externa en la inducción de inmunidad protectora ante la infección por *Salmonella typhi* son las siguientes:

1. Las PME de *Salmonella typhi* obtenidas mediante la solubilización con un detergente no iónico, presentan pesos moleculares de 14 a 70 kDa con pl de 4.0 a 6.0, y un 4% de contaminación con LPS (55).
2. Los pacientes con fiebre tifoidea producen anticuerpos de clase IgM dirigidos contra una PME de 28 kDa durante la fase aguda de su padecimiento. En la convalecencia, la respuesta es de IgG y dirigida contra las porinas de 38 a 41 kDa (55).
3. La vacunación de ratones NIH con 10 μ g a 30 μ g de porinas de *Salmonella typhi* induce protección del 100% al reto con 500 DL₅₀ de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d y *Salmonella typhi* Ty2; y del 30% al reto con la misma dosis de *Salmonella typhimurium* (36,37).
4. La administración pasiva de suero de conejo anti-PME de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, confiere protección del 100% al reto con 100 DL₅₀ de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d y *Salmonella typhi* Ty2; y del 80% al reto con *Salmonella typhimurium* (42).
5. Las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d purificadas por cromatografía de exclusión molecular, electroelución e inmunoabsorbente tienen un pl de 4.0 a 5.0 y pesos moleculares de 114 a 128 kDa en estado nativo (cuando se encuentran asociados en forma de homotrimeros y de 36 a 41 kDa en su forma monomérica, con una

- contaminación por LPS del 0.04%) (58).
6. Anticuerpos monoclonales (IgM) anti-porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d confieren una protección del 60% al reto con 20 DL₅₀ de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, mientras que anticuerpos monoclonales anti-LPS no producen ningún efecto, esto viene a corroborar, que las porinas son los inmunógenos protectores en el modelo murino (57).
 7. La inmunización de ratones BALB/c con porinas de *Salmonella typhimurium* generan una red de anticuerpos anti-idiotípicos (36).
 8. La administración de anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos de las porinas a ratones BALB/c normales genera una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer a las porinas por inmunoelectrotransferencia (36).
 9. La vacunación de ratones NIH con 30 µg de PME de *Salmonella typhi*, induce respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos, en presencia de porinas de *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* o *E. coli* (25).
 10. La administración de vacuna antitifoídica oral induce, en las personas estudiadas, la producción de anticuerpos anti-porinas cuantificados por el método de ELISA (3,12).

Por otro lado, en América Latina hay varios grupos de Investigación que están trabajando con PME y específicamente con porinas de *Salmonella typhi* con el fin de emplearlas como inmunógenos protectores o para diagnóstico de fiebre tifoidea. Hay dos grupos de investigación interesados en este campo; uno de ellos considera que las PME de pesos moleculares por arriba del de las porinas, son las importantes tanto para el diagnóstico específico como para inmunógenos protectores (21). El otro grupo de investigación ha obtenido por ingeniería genética el gene de la porina OmpC de *Salmonella typhi* Ty21a . En la Fig. 1 se muestra la imagen cristalográfica de la porina OmpF (7,63).

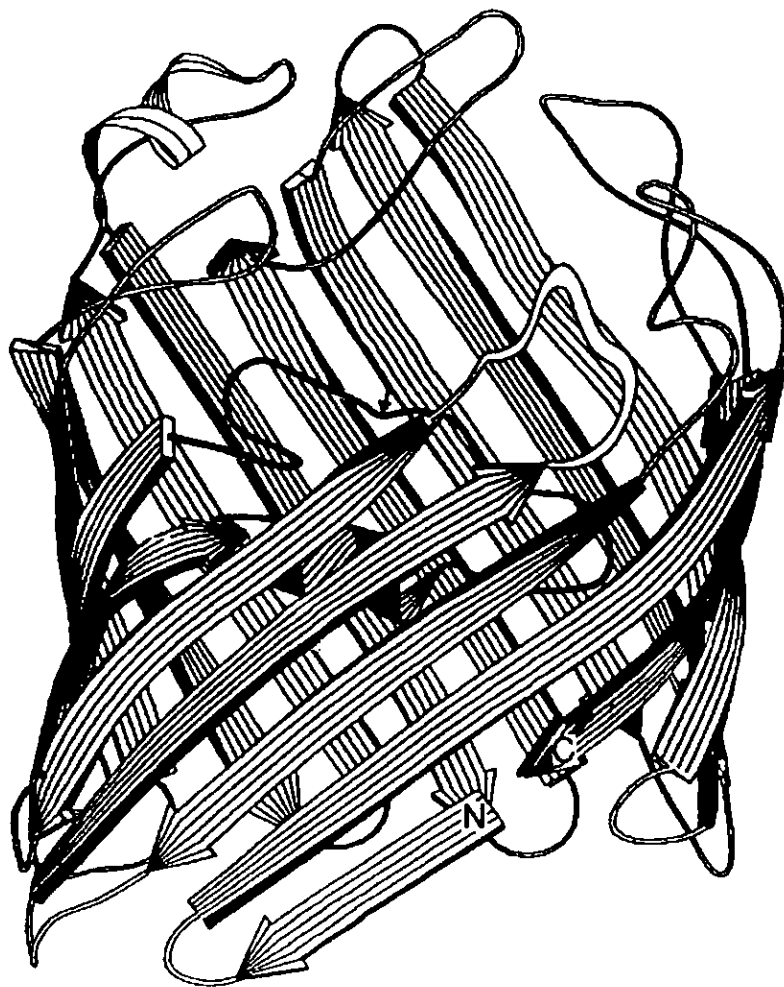


Fig. 1
Porina Omp F

El problema principal para el estudio de la fiebre tifoidea es que *Salmonella typhi* es patógena solo en humanos y chimpancés (19). Debido a esto, se tiene al ratón como el mejor modelo experimental ya que *Salmonella typhimurium* le causa una infección natural muy similar a la fiebre tifoidea humana (54). Es por ello que es de gran utilidad determinar la respuesta inmune celular y humoral a porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d en diferentes cepas de ratones singénicos a nivel del haplotipo H-2, para poder emplear el mejor modelo murino en la inducción de protección al reto de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d (33,68).

La salmonelosis murina, igual que en el hombre, se transmite por la ingestión de alimentos o agua contaminada con heces de animales infectados o portadores; después de que la infección tiene lugar por vía oral, la bacteria coloniza el intestino delgado sin causar síntomas apreciables, posteriormente, estas bacterias entran a los tejidos submucosos atravesando el epitelio vellosos ó a través de las células M de las placas de Peyer para su posterior diseminación, vía linfáticos, a todo el torrente circulatorio y sistema fagocítico mononuclear, donde las bacterias son fagocitadas por macrófagos de bazo e hígado (células de Kupffer). Estas células son el principal sitio de multiplicación de *Salmonella* en los siguientes días de la infección. Su multiplicación tiene lugar intracelularmente, protegiéndose de los anticuerpos y antibióticos (27).

La salmonelosis murina puede dividirse en dos fases: fase temprana (menos de 10 días de infección) y fase tardía (mayor a 10 días de infección). El periodo de incubación de *Salmonella typhimurium* es de 3 a 6 días. La salmonelosis murina puede variar desde una infección leve con signos clínicos a una enfermedad aguda y fatal. Los ratones se muestran menos activos, adoptan una postura encorvada con distensión abdominal, pelaje áspero, pérdida de peso, ocasionalmente diarrea, esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatía (27).

No todos los ratones llegan a sufrir salmonelosis al reto con la bacteria. Estudios anteriores han demostrado que la resistencia natural, a un número de diferentes agentes infecciosos (bacterias, hongos, virus y protozoarios), está controlado en parte por la constitución genética de cada cepa en particular, un ejemplo de tal control genético son los diferentes grados de susceptibilidad a *Salmonella typhimurium* (27,68).

El hallazgo de que por lo menos tres genes gobiernan la respuesta a *Salmonella typhimurium* en ratones singénicos, sugiere que el resultado final de la infección lo determina una serie de eventos inmunológicos y que un defecto en cualquiera de estos pasos puede resultar en la muerte del animal, por lo tanto, la identificación de los productos de estos genes de resistencia a *Salmonella typhimurium* es importante en la definición de las interacciones hospedero-parásito (25,27).

Una vez recopiladas todas estas evidencias, se pueden considerar a las porinas de *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d como fuertes candidatos para inducir una respuesta inmune eficaz, duradera y con efectos adversos mínimos (ya que al ser purificadas, se elimina casi completamente la presencia del LPS). Para su obtención se implementó un manual de producción aplicando el concepto de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Biológicos, respaldado por la implantación de un sistema de Aseguramiento de Calidad y del Manual de Control de Calidad aplicado al proceso. Todo esto con la finalidad de obtener un producto seguro y confiable para la administración en humanos.

5.0 CARACTERISTICAS GENERALES DE UNA VACUNA INYECTABLE

La vacuna ideal está considerada como una forma modificada no patógena de un agente infeccioso, sin la capacidad de replicarse ni diseminarse como lo haría el agente en su forma natural, pero con la capacidad de estimular al sistema inmune. Esta debe seguir con la ruta de infección del agente patógeno y así estimular al sistema inmune de manera similar a la presentada en una infección natural. Desafortunadamente, no siempre es posible desarrollar este tipo de vacunas para todos los agentes infecciosos. Otra de las alternativas es el uso, como vacunas, de microorganismos muertos o atenuados, sin embargo, presentan la desventaja de inducir una respuesta inmune de corta duración. Una de las opciones para inducir inmunidad contra muchos agentes microbianos y para todos los parásitos eucariotes, es el uso de vacunas basadas en subunidades del microorganismo; tales subunidades tienen la característica de contener elementos que son necesarios para producir una infección independiente, multiplicación o crecimiento en el hospedero (5).

Se consideran vacunas vivas atenuadas, aquellas donde el agente infeccioso conserva la capacidad de replicarse y multiplicarse pero no su virulencia; mientras que el término de vacunas muertas se utiliza para las preparaciones en las cuales el microorganismo no tiene la capacidad de multiplicarse, este grupo incluye subunidades celulares y/o material sintético (5).

Actualmente, gran parte de estas subunidades se han identificado y caracterizado, así se tienen: proteínas individuales, accesorios, carbohidratos y otras estructuras de la superficie de las células, en algunos casos se ha determinado su participación en la patogenicidad de los microorganismos. La caracterización de las estructuras antigénicas bacterianas específicas ha incrementado los esfuerzos para el desarrollo de nuevas vacunas bacterianas más definidas, éstas están basadas en componentes celulares purificados. Este campo permite un mejor Control de Calidad de las vacunas, así como un aumento en la eficacia y una disminución de la reactogenicidad (5).

Se están desarrollando muchas vacunas experimentales basadas en antígenos purificados o en cepas atenuadas, y se ha encontrado que los antígenos purificados generan una inmunogenicidad débil en comparación con la bacteria completa. Las bacterias completas contienen una gran variedad de macromoléculas, algunas de las cuales tienen la capacidad de estimular el sistema inmune inespecíficamente. Una aplicación importante, por ejemplo, se tiene en que algunas estructuras como los peptidoglicanos de la pared celular y los lipopolisacáridos, pueden actuar como adyuvantes para mejorar la respuesta inmune de otros antígenos con baja inmunogenicidad (5).

Las vacunas basadas en subunidades celulares, generalmente utilizan antígenos de superficie o componentes bacterianos extracelulares, sin embargo, se ha despertado interés en el desarrollo con antígenos intracelulares tales como las proteínas de choque térmico o proteínas ribosomales. Comúnmente se esperaría que la respuesta inmune se dirigiera hacia la superficie de patógenos bacterianos extracelulares o bien a toxinas de microorganismos viables. Sin embargo, bacterias que se desarrollan intracelularmente en el hospedero evadiendo la respuesta inmune, sufren el mecanismo de presentación de antígenos intracelulares de los microorganismos lisados, en la superficie de las células presentadoras del antígeno asociado con moléculas del MHC (5).

Es necesario considerar ciertos puntos con relación a las perspectivas para el desarrollo de nuevas vacunas, entre los que se incluyen:

- Definir los mecanismos inmunológicos por medio de los cuales se genera la protección después de la adquisición natural de la enfermedad.
- Identificar las partes antigénicas del microorganismo que inducen la protección.
- Identificar los genes que codifican para la expresión de los antígenos importantes para la generación de la inmunidad.
- Utilizar nuevas técnicas de biotecnología para producir dichos antígenos.
- Evaluar la compatibilidad de los reactivos y medios durante la obtención del inmunógeno, para garantizar la inocuidad y eficacia de la vacuna.

- Diseñar modelos adecuados para la evaluación de la capacidad protectora de la vacuna.

La elaboración de un producto con estas características implica el diseño de un protocolo de producción donde el objetivo principal sea obtener un producto seguro y confiable que posea las características antes mencionadas (10).

6. BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS.

Las Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Biológicos son un conjunto de especificaciones que sirven como guía para alcanzar la obtención de un producto con las características mencionadas, las cuales establecen claramente las especificaciones para la obtención o producción de una gran diversidad de productos biológicos adaptándose a las características de cada uno de ellos (60).

Los procesos necesarios para la manufactura y control de Productos Biológicos están determinados por el origen de los productos, así como por los métodos de obtención. Dentro de los procesos de Manufactura considerados en este campo se encuentran:

- Crecimiento de cepas de microorganismos y células eucarióticas.
- Extracción de sustancias a partir de tejidos biológicos, incluyendo humanos, animales y plantas.
- Técnicas recombinantes de DNA (rDNA).
- Técnicas relacionadas con hibridomas.
- Propagación de microorganismos en embriones o animales.

Los productos obtenidos por medio de estos métodos están clasificados como Productos Biológicos dentro de los que se encuentran: alérgenos, antígenos, vacunas (53), hormonas, citocinas, enzimas, sangre total humana, plasma y sus derivados, suero inmune, inmunoglobulinas (incluyendo anticuerpos monoclonales), productos de fermentación (incluyendo productos derivados de DNA) y agentes de diagnóstico para uso *in vitro* (60).

La fabricación de productos biológicos debe considerarse de acuerdo con el principio básico de las Buenas Prácticas de Manufactura, además de los requerimientos generales de las Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos (61), y las complementarias específicamente a Producción y Control de Productos Biológicos, con gran aplicación en lo que a bioseguridad se refiere (60).

La manera en que los productos biológicos sean producidos, controlados y administrados, involucrará directamente tomar algunas precauciones especiales. A diferencia de los productos farmacéuticos convencionales, los cuales son producidos y controlados por medio de métodos químicos y físicos reproducibles, los productos biológicos se fabrican por medio de métodos que involucran materiales y procesos biológicos, tales como cultivo de células o extracción de material a partir de microorganismos vivos; estos procesos presentan una gran variabilidad intrínseca debido a la gama y naturaleza de los bio-procesos. Por lo tanto, una de las principales especificaciones de las Buenas Prácticas de Manufactura indica que en cada paso del proceso de producción se deben especificar los ingredientes activos que se utilizan u obtendrán, así como todos los pasos de la producción (60,61).

El control de los productos biológicos involucra técnicas biológicas que implican más variabilidad que las determinaciones fisicoquímicas convencionales. El control en proceso es de gran importancia, ya que ciertas deficiencias durante el proceso de producción, muchas veces, no se detectan durante el análisis de producto terminado.

6.1. INSTALACIONES Y ÁREAS DE TRABAJO.

El establecimiento de fabricación y su personal deben ser dirigidos por una persona que domine las técnicas de fabricación de sustancias biológicas y que conozca los principios científicos en que se fundamentan estas técnicas (60).

Las instalaciones de producción deben cumplir con algunos parámetros específicos como son:

- Deben estar situadas, distribuidas, construidas, adaptadas y mantenidas para adecuarse a las operaciones que se realizarán en ellas.
- Las áreas destinadas a la fabricación deben reunir las mejores condiciones de higiene y protección contra polvo, insectos, roedores, etc. (15,43).
- Las superficies interiores (paredes, pisos, techos) deben ser lisas y no presentar grietas; no deben desprender partículas y deberán ser limpiadas con facilidad.
- Evitar dentro de las áreas la presencia de lavaderos o tarjas, en caso de existir éstas deben ser de un material adecuado (como acero inoxidable) sin rebosadero y no ser utilizadas durante el proceso de producción. Es preciso evitar la diseminación en el aire de microorganismos patógenos, para evitar la posibilidad de contaminación durante el proceso de producción (15,43).
- Los lotes de siembra y bancos de cepas bacterianas deben ser almacenados en lugares independientes; el acceso a éstas áreas estará restringido a personal autorizado (15,43).
- Todos los recipientes que contiene sustancias biológicas, cualquiera que sea la etapa de fabricación, deben estar identificados con etiquetas firmemente adheridas (15,43).
- Algunas recomendaciones para evitar la contaminación cruzada son (15,43):
 - Realizar la producción y el envasado en zonas independientes.
 - Evitar la fabricación de distintos productos al mismo tiempo, a menos que estén efectivamente separados;

- Impedir la transferencia de material en procesos como cambio de vestimenta, lavado y descontaminación (15,43).
- Evitar la formación de aerosoles (especialmente por centrifugación y mezclas).
- Usar recipientes esterilizados (15,43).
- Los materiales secos utilizados para preparar amortiguadores, medios de cultivo, deben ser pesados y disueltos en un área aislada, fuera de los locales asépticos y de purificación.

6.2. PERSONAL

En cuanto a las recomendaciones de mayor importancia en lo que se refiere al personal que será asignado a la producción de la vacuna, deberán seguir las siguientes normas (60):

- Asegurarse de que el personal que llevará cabo el proceso en las áreas, no sufre ninguna enfermedad o trastorno que pudiera comprometer la integridad microbiológica o de otro tipo del producto.
- Es necesario mantener las normas más estrictas en cuanto a higiene personal se refiere.
- Informar inmediatamente de cualquier trastorno (por ejemplo, diarrea, tos, resfriados, piel o cabello infectados , heridas, fiebre, etc.).
- El personal no debe pasar de las áreas donde se manipulan microorganismos o animales vivos a otras áreas donde va otro paso del proceso, o se están fabricando otros productos.
- Debe utilizar la vestimenta apropiada durante el proceso, con el fin de mantener íntegra la identidad del producto.

6.3. PRODUCCION

Durante el proceso de producción de la vacuna se deben considerar las siguientes especificaciones (60):

- Deben existir Procedimientos Estandarizados de Operación actualizados para cada paso del procedimiento así como para las pruebas de control de calidad en proceso y en producto terminado, los cuales deberán mantenerse actualizados.
- Deben extremarse precauciones en el vaciado de inóculos en procesos de fermentación para evitar que haya contaminación (15,43).
- El medio de cultivo y todos sus suplementos deben estar debidamente esterilizados para garantizar la pureza del cultivo.
- Cuando se utilice equipo de cromatografía para purificación, debe considerarse la apropiada limpieza y sanitización de este equipo para evitar contaminación cruzada. Por lo que antes de cada purificación debe realizarse un monitoreo microbiológico y determinar la presencia de endotoxina en la solución de lavado (15,43).
- Con respecto a la rotulación de productos envasados, se recomienda el uso de una etiqueta que permita identificarlo claramente, deben estar perfectamente adheridas a los envases en cualesquiera que sean las condiciones de almacenamiento.

6.4. REGISTRO

Un punto importante es el que se refiere a Registros de la producción del lote, los cuales deberán proporcionar los datos completos de la fabricación del mismo, de la preparación biológica y mostrar que ha sido fabricado, probado y envasado de acuerdo con los procedimientos autorizados. Un registro también debe incluir el rendimiento obtenido en cada etapa de fabricación, así como debe estar debidamente firmado en cada paso e indicar las precauciones que se tomaron y las observaciones especiales efectuadas durante toda la fabricación del lote. Estos puntos aplican para los registros de las pruebas de control y muestras aprobadas de etiquetas.

6.5. CONTROL DE CALIDAD

Con lo que a Control de Calidad de desarrollo y fabricación de la vacuna se refiere, las principales actividades que están involucradas son:

- Preparar instrucciones detalladas para cada prueba y análisis.
- Asegurar la identificación y el aislamiento adecuado de las muestras para evitar confusiones y la contaminación cruzada (15,43).
- Efectuar la evaluación microbiológica del ambiente y adecuación para las condiciones de fabricación (15,43).
- Autorizar o rechazar materias primas, materiales de etiquetado y envasado, productos intermedios y producto terminado cuando sea necesario.
- Evaluar la adecuación de las condiciones de almacenamiento.
- Evaluar la calidad y estabilidad del producto final y, cuando sea necesario, las materias primas y el producto intermedio.

Es necesario tomar en cuenta los requisitos descritos para obtener un producto que cumpla con las características para las cuales fue diseñado, para obtener un producto de óptima calidad (60).

III. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Implementar el Manual de Producción de la vacuna contra fiebre tifoidea a base de Porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d para aplicación en humanos

2. OBJETIVOS PARTICULARES

2.1. Acondicionar las áreas de producción y purificación/dosificación

2.2. Implementar un programa de sanitización para las áreas de producción y purificación/dosificación

2.3. Elaborar los Procedimientos Estándares de Operación correspondientes a la producción

2.4. Producir un lote siguiendo el Manual de Producción de la vacuna contra fiebre tifoidea a base de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d

IV. MATERIAL Y METODOS

Como se mencionó en la introducción, las Buenas Prácticas de Manufactura de productos biológicos establecen que para cualquier proceso debe existir un Procedimiento Estándar de Operación (PEO) el cual se define como: "Procedimiento escrito autorizado que contiene instrucciones para realizar operaciones que no necesariamente son específicas para un producto o material determinado, sino de naturaleza más general. Algunos procedimientos de esta naturaleza pueden utilizarse como complemento de la documentación específica para un producto, sea esta una documentación maestra o referente a la producción de lotes" (64).

El manual de producción de la vacuna contra fiebre tifoidea a base de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d incluye Procedimientos Estándares de Operación relacionados con el aseguramiento de calidad (65), con la producción, con el control de calidad en proceso y de producto terminado (66), y con la operación, limpieza y mantenimiento de los equipos involucrados (65). Para la elaboración del lote de vacuna se aplicaron todos los Procedimientos Estándares de Operación incluidos en dicho manual, sin embargo, en el capítulo de Materiales y Métodos del presente trabajo se incluyen solamente los Procedimientos Estándares de Operación elaborados por las sustentantes. El primer Procedimiento corresponde al índice de todos los Procedimientos Estándares de Operación de dicho manual.

**DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO GENERAL DE PRODUCCION Y CONTROL
PRODUCCION CONTROL DE CALIDAD**

Sanitizar el área de producción (UIM-PG-05)	<ul style="list-style-type: none"> • Monitoreo ambiental (UIM-PG-03)
Preparar el medio mínimo "A" suplementado (UIM-PP-10)	
Diluir cepa semilla, verter en matraces para inóculo e incubar (UIM-PP-02)	<ul style="list-style-type: none"> • Caracterización Macroscópica, microscópica y bioquímica (UIM-CA-01 y 02) • pH (UIM-CA-11)
Inocular matraces para cultivo e incubar (UIM-PP-02)	<ul style="list-style-type: none"> • Curva de crecimiento (UIM-CA-04) • Caracterización Macroscópica, microscópica y bioquímica (UIM-CA-01 y 02) • pH (UIM-CA-11)
Cosechar la biomasa por centrifugación (UIM-PP-03)	<ul style="list-style-type: none"> • Biomasa húmeda (UIM-PP-03)
Romper las bacterias en el molino de células y agregar DNAasa y RNAasa (UIM-PP-04)	<ul style="list-style-type: none"> • Tinción de Gram (UIM-CA-01)
Extraer las porinas por el método de Nikaido (UIM-PP-05)	<ul style="list-style-type: none"> • Control de extracción de porinas (UIM-CA-05)
Purificar las porinas en columna de FPLC (UIM-PP-06)	<ul style="list-style-type: none"> • Monitoreo ambiental (UIM-PG-03) • Control de purificación de porinas (UIM-CA-05) • Control de eliminación de LPS (UIM-CA-05) • Concentración de proteínas (UIM-CA-07) • Peso molecular (UIM-CA-05) • Concentración de ácidos nucleicos (UIM-CA-06) • Endotoxinas bacterianas (UIM-CA-09) • Antigenicidad (UIM-CA-10)
Dosificar las porinas en viales de 2 mL bajo campana de flujo laminar (UIM-PP-07)	<ul style="list-style-type: none"> • Monitoreo ambiental (UIM-PG-03) • Aspecto (UIM-CA-13) • Control de purificación de porinas (UIM-CA-05) • Control de eliminación de LPS (UIM-CA-05) • Concentración de proteínas (UIM-CA-07) • Peso molecular (UIM-CA-05) • Concentración de ácidos nucleicos (UIM-CA-06) • Pirógenos (UIM-CA-16) • Antigenicidad (UIM-CA-10) • Esterilidad (UIM-CA-15) • Potencia (UIM-CA-14) • Seguridad (UIM-CA-17)
Acondicionar los viales dosificados (UIM-PP-08)	
Almacenar los viales (UIM-PP-09)	

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA					
INDICE DE PROCEDIMIENTOS			PEO: JEFATURA			
Escrito por: OLIVIA PORTILLO			Revisado por: QB ARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI	UIM-JG-06 En vigor: Nov. 97	Pág.: 1 de 3 Sustituye a: NUEVO
Próxima revisión: Noviembre 1998						
OBJETIVO						
Clasificar, ordenar y enumerar los procedimientos estándares de operación relacionados con la obtención de porinas de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d para inmunización en humanos.						
ALCANCE						
Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción.						
POLITICAS						
Es responsabilidad de las personas involucradas en la producción el consultar el presente índice al producir porinas de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d para inmunización en humanos.						
I) Aseguramiento de Calidad						
<ol style="list-style-type: none"> 1. Elaboración de Procedimientos (UIM-JG-01) 2. Sistema de Codificación (UIM-JG-02) 3. Misión (UIM-JG-03) 4. Políticas de Calidad (UIM-JG-04) 5. Objetivos (UIM-JG-05) 6. Indice de Procedimientos (UIM-JG-06) 7. Estructura Organizacional (UIM-JG-07) 8. Revisión y Aprobación de Procedimientos (UIM-JG-08) 9. Emisión, Control y Distribución de Procedimientos (UIM-JG-09) 						
II) Procesos Generales						
<ol style="list-style-type: none"> 1. Descontaminación y Lavado de Material (UIM-PG-01) 2. Preparación, Esterilización y Despirogenización de Material (UIM-PG-02) 3. Monitoreo Ambiental Microbiológico (UIM-PG-03) 4. Sanitización de Mesas de Trabajo (UIM-PG-04) 5. Sanitización de Area de Producción (UIM-PG-05) 6. Técnica de Vestido (UIM-PG-06) 7. Preparación de Medios de Cultivo (UIM-PG-07) 8. Preparación de Soluciones (UIM-PG-08) 9. Proceso General de Producción y Control de Calidad (UIM-PG-09) 						
III) Proceso de Producción						
<ol style="list-style-type: none"> 1. Producción de Cepa Semilla y Cepa de Trabajo (UIM-PP-01) 2. Preparación de Medio Mínimo "A" Suplementado (UIM-PP-10) 3. Preparación de Inóculo y Fermentación en Matraz (UIM-PP-02) 4. Cosecha y Biomasa Húmeda (UIM-PP-03) 5. Ruptura de Bacteria y Eliminación de DNA y RNA (UIM-PP-04) 						

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
INDICE DE PROCEDIMIENTOS			PEO: JEFATURA	
			UIM-GJ-06	Pág.: 2 de 3
Escrito por: OLIMA PORTILLO	Revisado por: QBC CARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
<ol style="list-style-type: none"> 6. Extracción de Porinas de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d por el Método de Nikaido (UIM-PP-05) 7. Purificación (FPLC) (UIM-PP-06) 8. Dosificación (UIM-PP-07) 9. Acondicionamiento (UIM-PP-08) 10. Almacenaje (UIM-PP-09) <p>IV) Control del Proceso de Producción</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Características Microscópicas y Macroscópicas (UIM-CA-01) 2. Caracterización Bioquímica (UIM-CA-02) 3. Caracterización Serológica (UIM-CA-03) 4. Curva de Crecimiento y pH (UIM-CA-04) 5. Control de Purificación de Porinas (PAGE-SDS) (UIM-CA-05) 6. Control de Ruptura de Bacteria (UIM-CA-01) 7. Control de Extracción de Porinas (PAGE-SDS, Tinción de Plata) (UIM-CA-05) 8. Control de Eliminación de LPS (PAGE-SDS, Tinción de Plata) (UIM-CA-05) 9. Cuenta Viable (UIM-CA-19) <p>V) Control de Producto a Granel</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Peso Molecular (PAGE-SDS) (UIM-CA-05) 2. Concentración de Acidos Nucleicos (absorbancia a 260 nm y 280 nm) (UIM-CA-06) 3. Concentración de Proteínas (Lowry) (UIM-CA-07) 4. Endotoxinas Bacterianas (Limulus) (UIM-CA-09) 5. Antigenicidad (ELISA) (UIM-CA-10) 6. pH (UIM-CA-11) 7. Concentración de SDS (UIM-CA-12) <p>VI) Control de Producto Terminado</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Aspecto (UIM-CA-13) 2. Peso Molecular (PAGE-SDS) (UIM-CA-05) 3. Concentración de Proteínas (Lowry) (UIM-CA-07) 4. Antigenicidad (ELISA) (UIM-CA-10) 5. Potencia (UIM-CA-14) 6. Esterilidad (UIM-CA-15) 7. Pirógenos (UIM-CA-16) 8. Seguridad (UIM-CA-17) 				

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
INDICE DE PROCEDIMIENTOS			PEO: JEFATURA	
			UIM-GJ-06	Pág.: 3 de 3
Escrito por: OLIVIA PORTILLO	Revisado por: QFC CARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
<p>VI) Operación de Equipos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Autoclave (UIM-PO-08) 2. Espectrofotómetro BECKMAN (UIM-PO-07) 3. Agitador INNOVA (UIM-PO-04) 4. Centrífuga (UIM-PO-02) 5. Ultracentrífuga (UIM-PO-05) 6. Dyno Mill (UIM-PO-03) 7. Columna FPLC WATERS (UIM-PO-09) 8. Potenciómetro (UIM-PO-10) 9. Campana de flujo laminar (UIM-PO-11) <p>VII) Mantenimiento y Limpieza de Equipos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Agitador limpieza (UIM-PL-03) 2. Incubadora NAPCO 5100 (UIM-CL-05) 3. Ultracentrífuga mantenimiento (UIM-PT-05) 4. Centrífuga mantenimiento (UIM-PT-03) 				



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



DESCONTAMINACION Y LAVADO DE MATERIAL

PEO: GENERAL

UIM-PG-01

Pág.: 1 de 2

Escrito por:

Olivia Portillo
OLIVIA PORTILLO

Revisado por:

Carmen Maldonado
CARMEN MALDONADO

Aprobado por:

Armando Isibasi
DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:

Nov. 97

Sustituye a:

NUEVO

Próxima revisión Noviembre 1998

OBJETIVO

Establecer el protocolo mediante el cual se realizará la descontaminación y el lavado de material en la obtención de porinas de *S. typhi* para inmunización en humanos.

ALCANCE

Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción.

POLITICAS

Es responsabilidad de las personas que realicen la descontaminación y el lavado de material el cumplir con lo indicado en este procedimiento.

MATERIAL

Escobillones

Papel aluminio

Papel kraft

Algodón

Gasa

Cinta testigo

Recipientes para esterilización de desechos comerciales o matraces bola de fondo plano de vidrio

Canastas de metal para esterilización

SOLUCIONES

Extran al 2%

Agua corriente

Agua destilada

EQUIPO

Autoclave

PROCEDIMIENTO

a) **DESCONTAMINACION DE LIQUIDOS**

1. Utilizar guantes y cubreboca.
2. Colocar el material líquido contaminado en los recipientes comerciales o en matraces bola de fondo plano de vidrio. El líquido no deberá sobrepasar la mitad del volumen del recipiente para evitar derrames.
3. Colocar las tapas a los recipientes comerciales o colocar tapones de gasa y algodón con capuchones de papel kraft a los matraces de vidrio.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 30 minutos (1).
5. Desechar los líquidos en la tarja.

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
DESCONTAMINACION Y LAVADO DE MATERIAL			PEO: GENERAL	
			UIM-PG-01	Pág.: 2 de 2
Escrito por: OLIVIA PORTILLO	Revisado por: QEB CARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
<p>b) DESCONTAMINACION DE SOLIDOS</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Utilizar guantes y cubreboca. 2. Colocar el material sólido contaminado en canastas de metal forradas con papel kraft. 3. Esterilizar en autoclave a 130°C durante 20 minutos (1). 4. Desechar los sólidos en la basura. <p>b) LAVADO DE MATERIAL DE VIDRIO</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Remojar el material de vidrio sucio en una solución de Extran al 0.5% y cloro 100 ppm durante un mínimo de 1 hora. 2. Lavar el material de vidrio con una solución de extran al 2% utilizando un escobillón. 3. Enjuagar el material 2 veces con agua potable. 4. Enjuagar el material con agua destilada. 5. Dejar escurrir el material boca abajo sobre papel kraft. 6. Una vez seco, tapar el material con papel aluminio. <p>REFERENCIAS</p> <p>(1) Autoclave (UIM-PO-08)</p> <p>BIBLIOGRAFIA</p> <p>Wayne P. Olsen, Micheal J. Graves, 1987, <i>Aseptic Pharmaceutical Manufacturing</i>, Ed. Interpharm Press, E.U.A., 151-175.</p>				



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



PREPARACION, ESTERILIZACION Y DESPIROGENIZACION DE MATERIAL

PEO: GENERAL

UIM-PG-02

Pág.: 1 de 2

Escrito por:
[Signature]
OLIVERA PORTILLO

Revisado por:
[Signature]
DR. CARMEN MALDONADO

Aprobado por:
[Signature]
DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:
Nov. 97

Sustituye a:
NUEVO

Próxima revisión Noviembre 1998

OBJETIVO

Establecer el protocolo mediante el cual se realizará la preparación, esterilización y despirogenización de material para la obtención de porinas de *S. typhi* para inmunización en humanos.

ALCANCE

Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción.

POLITICAS

Es responsabilidad de las personas que realicen la preparación cumplir con lo indicado en este procedimiento.

MATERIAL

Gasas
Algodón
Bolsas indicadoras para esterilización con vapor
Papel estraza
Cinta testigo
Tijeras
Papel aluminio



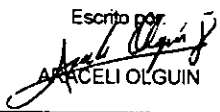

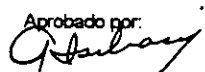
EQUIPO

Autoclave
Homo

SOLUCIONES

Hidróxido de potasio (1)
Agua inyectable

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
PREPARACION, ESTERILIZACION Y DESPIROGENIZACION DE MATERIAL			PEO: GENERAL	
			UIM-PG-02	Pág.: 2 de 2
Escrito por: OLIVIA PORTILLO	Revisado por: QBC CARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
PROCEDIMIENTO				
<p>I) Preparación de material para esterilización</p> <p>a) Material de vidrio</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Lavar el material (2). 2. Dejar secar. 3. El material que será utilizado en el proceso de producción de porinas no deberá taparse con gasa y algodón, sino con doble bolsa indicadora para esterilización a vapor y cinta testigo. 4. El material que será utilizado para las pruebas de control y para procesos fuera del área sanitizada deberá prepararse normalmente con tapones de gasa y algodón y con capuchones de papel estraza. <p>II) Esterilización</p> <p>a) Material de vidrio y sólidos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Introducir el material en el autoclave y esterilizar en ciclo de sólidos, 130°C durante 10 minutos (3). 2. Dejar enfriar. <p>b) Líquidos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Aflojar un poco los tapones. 2. Introducir en el autoclave y esterilizar en ciclo de líquidos, 121°C durante 15 minutos (3). 3. En cuanto se pueda abrir la puerta del autoclave, asegurar los tapones y dejar enfriar. <p>c) Material y Soluciones especiales</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cierta material y soluciones, como son los tubos para ultracentrífuga o la solución de glucosa, deberán esterilizarse a 10 libras de presión durante 10 minutos. <p>III) Despirogenización</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. lavar el material de vidrio (2). 2. Enjuagar el material con hidróxido de potasio y dejar secar (utilizar guantes). 3. Tapar y/o envolver el material con papel aluminio. 4. Introducir al horno durante 30 minutos a 250°C. 5. Sin que el material se enfríe del todo, y con la ayuda de guantes de asbesto, colocar el material pequeño en recipientes de vidrio estériles que puedan cerrarse herméticamente, y/o colocar una segunda envoltura de papel aluminio en los recipientes más grandes. 				
REFERENCIAS				
<ol style="list-style-type: none"> (1) Preparación de soluciones (UIM-PG-08) (2) Descontaminación y lavado de material (UIM-PG-01) (3) Autoclave (UIM-PO-08) 				
BIBLIOGRAFIA				
Wayne P. Olsen, Micheal J. Graves, 1987, <i>Aseptic Pharmaceutical Manufacturing</i> , Ed. Interpharm Press, E.U.A., 151-175.				

		CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
MONITOREO AMBIENTAL MICROBIOLÓGICO				PEO: GENERAL	
				UIM-PG-03	Pág.: 1 de 3
Escrito por:  ARACELI OLGUIN	Revisado por:  OFELIA CARMEN MALDONADO	Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO	
Próxima revisión Noviembre 1998					
OBJETIVO Describir el procedimiento mediante el cual se realizará el monitoreo ambiental microbiológico del área limpia donde se llevará a cabo la obtención de porinas de <i>Salmonella typhi</i> 9, 12, Vi:d. para inmunización en humanos.					
ALCANCE Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción.					
POLITICAS Es responsabilidad de todo el personal que interviene en este proceso seguir este procedimiento.					
MATERIAL 50 Cajas Petri estériles de 15 X100 mm 1 matraz de 2,000 mL 5 Pipetas de 10 mL estériles Espátula Mechero Bunsen Algodón Gasas Papel kraft Cinta testigo Propipeta Alcohol al 70% Marcador indeleble					
EQUIPO E INSTRUMENTOS Autoclave Agitador magnético con calentamiento Incubadora a 37 °C Baño de temperatura controlada a 45°C Balanza analítica Contador de colonias					
MEDIOS Y REACTIVOS Medio Agar Soya tripticaseína (TSA) estéril (1). Agua destilada					



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



MONITOREO AMBIENTAL MICROBIOLÓGICO

PEO: GENERAL

UIM-PG-03

Pág: 3 de 3

Escrito por:

ARACELI OLGUIN J.

Revisado por:

QB. CARMEN
MALDONADO

Aprobado por:

DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:

Nov. . 97

Sustituye a:

NUEVO

1. Sanitizar mesa de trabajo. (2)
2. En condiciones asépticas agregar 20 mL de medio estéril a 45°C a cada caja Petri estéril.
3. Homogeneizar el contenido de las cajas girándolas en ambos sentidos para cubrir completamente el fondo de la caja.
4. Dejar solidificar el medio durante 30 min a temperatura ambiente.
5. Seleccionar al azar 5 cajas e incubarlas a 37°C durante 24 horas.
6. Numerar progresivamente el resto de las cajas y conservarlas a 4°C hasta su utilización.
7. Colocar las placas en el área retirando totalmente la tapa, distribuyéndolas según el diagrama de la fig. 1. (Las placas deberán colocarse estrictamente siguiendo el orden indicado, para evitar cruzar por encima de alguna caja que haya sido abierta previamente).
8. Cerrar el área limpia y exponer las cajas al ambiente durante 30 min.
9. Tapar y recoger las placas en el orden inverso al que fueron colocadas.
10. Incubar las placas invertidas a 37 °C durante 48 horas.
11. Contar las colonias presentes y registrarlas en el formato correspondiente. Si el número de colonias por placa es mayor de 300 se consideran incontables.

REFERENCIAS

- (1) Preparación de medios de cultivo.-(UIM-PGO-07)
- (2) Sanitización de Area de Producción (UIM-PG-04)

BIBLIOGRAFIA

DeSain Carol ; 1993, "Drug, Device and Diagnostic Manufacturing-The Ultimate Resource Handbook-"; 2nd. e; Editorial Interpharm; Pag. 235-241.

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
SANITIZACION DE MESAS DE TRABAJO			PEO: GENERAL	
UIM-PG-04			Pág.: 1 de 1	
Escrito por: OLIMA PORTILLO	Revisado por: QFB CARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
Próxima revisión Noviembre 1998				
OBJETIVO				
Establecer el protocolo mediante el cual se realizará la sanitización de las mesas de trabajo del área de producción para la obtención de porinas de <i>S. typhi</i> para inmunización en humanos, en procesos donde no se requieran condiciones de esterilidad.				
ALCANCE				
Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción.				
POLITICAS				
Es responsabilidad de las personas que realicen la sanitización de mesas de trabajo el cumplir con lo indicado en este procedimiento.				
MATERIAL				
Gasas Esponja				
SOLUCIONES				
Piseta con hipoclorito de sodio 500 ppm o cloruro de benzalconio al 1% Extran al 2% Agua estéril				
PROCEDIMIENTO				
<ol style="list-style-type: none"> 1. Lavar con esponja y Extran la superficie de la mesa. 2. Enjuagar con gasas y agua usando un movimiento uniforme de atrás hacia adelante sin pasar dos veces por el mismo lugar. 3. Dejar pasar 5 minutos. 4. Aplicar el sanitizante de la misma manera que el agua en el punto 2. 5. Dejar actuar al sanitizante durante 10 minutos. 				
BIBLIOGRAFIA				
Graham C. Cole, 1993, <i>Pharmaceutical Production Facilities, Design and Applications</i> , Ed. Ellis Horwood Limited, Londres, pp. 180-205				

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
SANITIZACION DEL AREA DE PRODUCCION			PEO: GENERAL	
			UIM-PG-05	Pág.: 1 de 2
Escrito por: OLIVIA PORTILLO	Revisado por: CECILIA CARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
Próxima Revisión: Noviembre 1998				
OBJETIVO				
Establecer el protocolo mediante el cual se realizará la sanitización del área de producción para la obtención de poninas de <i>S. typhi</i> para inmunización en humanos.				
ALCANCE				
Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción.				
POLITICAS				
Es responsabilidad de las personas que realicen la sanitización del área de producción cumplir con lo indicado en este procedimiento.				
MATERIAL				
Traje estéril 10 paquetes cada uno con 5 gasas estériles 2 esponjas estériles Cojinete para trapeador estéril Mango de trapeador sanitizado Recipiente para desechos sanitizado 2 pisetas estériles				
SOLUCIONES				
4 L de cloruro de benzalconio al 1% en agua destilada estéril o el preparado comercial 4 L de hipoclorito de sodio 500 ppm en agua destilada estéril 4 L de agua destilada estéril 4 L de Extran al 2% en agua estéril				
PROCEDIMIENTO				
<ol style="list-style-type: none"> 1. Introducir todo el material necesario al área a sanitizar. 2. Vestir el traje estéril y entrar al área (1). 3. Lavar con Extran al 2%, utilizando una esponja estéril, empezando por el techo, siguiendo con paredes, ventanas, mesas, muebles, módulos, equipo y piso (2). 4. Enjuagar con agua estéril, aplicando con esponja estéril, sin permitir que el jabón se seque. Seguir el mismo orden de aplicación que en el punto anterior (2). 5. 5 minutos después de haber terminado con el enjuague, aplicar el cloruro de benzalconio o el hipoclorito de sodio con las gasas y el trapeador estériles, seguir el mismo orden de aplicación que en el punto número 3 (2). 				



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



SANITIZACIÓN DEL AREA DE PRODUCCION

PEO: GENERAL

UIM-PG-05

Pág.: 2 de 2

Escrito por:
[Signature]
OLIVIA PORTILLO

Revisado por:
[Signature]
QBP CARMEN
MALDONADO

Aprobado por:
[Signature]
DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:
Nov. 97

Sustituye a:
NUEVO

6. Después de terminar la sanitización, abrir una sola vez la puerta para salir extrayendo todos los desechos.
7. Cerrar perfectamente bien la salida y sanitizar la parte exterior de la puerta.
8. Dejar actuar al sanitizante de 48 a 72 horas.
9. Rotar los sanitizantes alternándolos cada 2 sanitizaciones.

REFERENCIAS

- (1) Técnica de Vestido (UIM-PG-06)
- (2) Lave o aplique las soluciones comenzando desde el fondo del área hacia la puerta. Utilice movimientos firmes y uniformes. Nunca pase dos veces sobre la misma superficie. Evite realizar movimientos bruscos para evitar la formación de corrientes de aire.

BIBLIOGRAFIA

1. Graham C. Cole, 1993, *Pharmaceutical Production Facilities, Design and Applications*, De. Ellis Horwood Limited, Londres, 180-205.
2. Wayne P. Olsen, Michael J. Graves, 1987, *Aseptic Pharmaceutical Manufacturing*, Ed. Interpharm Press, pp. 151-175.

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA						
TECNICA DE VESTIDO			PEO: GENERAL				
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td data-bbox="90 399 370 516">Escrito por: ARACELI OLGUIN J.</td> <td data-bbox="370 399 636 516">Revisado por: QBB DARMEN MALDONADO</td> <td data-bbox="636 399 1005 516">Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI</td> </tr> </table>			Escrito por: ARACELI OLGUIN J.	Revisado por: QBB DARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: NOV 97	Pág: 1 de 2 Sustituye a: NUEVO
Escrito por: ARACELI OLGUIN J.	Revisado por: QBB DARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI					
Próxima revisión Noviembre 1998							
OBJETIVO							
Establecer el procedimiento que indique los pasos a seguir durante la técnica de vestido para el acceso al área aséptica para la obtención de porinas de <i>Salmonella typhi</i> 9, 12, Vi:d.							
ALCANCE							
Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la obtención de porinas de <i>Salmonella typhi</i> 9, 12 para inmunización en humanos.							
POLITICAS							
Es responsabilidad de todo el personal que interviene en este proceso seguir este procedimiento.							
MATERIAL							
Uniforme estéril completo 2 Pares de guantes de cirujano estériles Cubrebocas 1 Escafandra Aspensor manual con sanitizante para manos(1) Tapete con pegamento. Esponja							
SOLUCIONES							
Hipoclorito de sodio 500 ppm (1)							
PROCEDIMIENTO DE DOBLADO DEL UNIFORME.							
<ol style="list-style-type: none"> 1. Extender completamente el uniforme dejando abierto el cierre. 2. Hacer un dobléz de protección hacia afuera de las mangas y en las piernas. 3. Hacer un dobléz a lo largo del traje desde los hombros hasta las piernas 4. Doblar las mangas plegándolas sobre el pecho del traje. 5. Plegar el traje tomándolo desde las piernas hacia el frente del traje de tal forma que la parte final quede hacia arriba. 6. Colocarlo dentro de la bolsa. 7. Doblar la escafandra con la parte interna hacia afuera; hacer un dobléz con los extremos de la escafandra y doblar a la mitad. 8. Introducirlo dentro de la bolsa. 9. Arremangar la parte externa de las botas y colocarlas dentro de otra bolsa. 10. Amarrar las cintas de las bolsas. 11. Preparar los guantes en las carteras especiales para tal proceso, colocándolos con un dobléz de protección hacia afuera de aproximadamente 4 cm. Marcar en la bolsa exterior el tamaño de los guantes. 12. Esterilizar todas las bolsas en autoclave seleccionando el modo CICLO CON SECADO (1). 							
PROCEDIMIENTO PREVIO AL INGRESAR AL AREA							
<ol style="list-style-type: none"> 1. Colocar el uniforme estéril, en la segunda trampa de la esclusa. 2. Aflojarse la ropa y zapatos. 3. Evitar el uso de maquillaje, joyas o cualquier accesorio. 4. Cubrir el cabello con una cofia. 5. Enjuagar y secar perfectamente manos y antebrazos. 							



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



TECNICA DE VESTIDO

PEO: GENERAL

UIM-PG-06

Pág: 2 de 2

Escrito por:

ARACELI OLGUIN J.

Revisado por:

QUECARMEN
MALDONADO

Aprobado por:

DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:

OCT 97

Sustituye a:

NUEVO

6. Abrir la cortina de plástico con el dedo meñique y la parte lateral de la mano derecha. Una vez adentro cerrar la cortina evitando, al máximo tocar cualquier otra superficie.
7. Despojarse de los zapatos sin tocarlos. Colocarlos sobre el tapete adhesivo que está en la primera trampa de la esclusa que se encuentra frente de la puerta.

NOTA: Recuerde que sus movimientos deben ser suaves y debe evitar tocar las paredes

1. Tomar el cubrebocas y colocarlo de tal manera que cubra nariz y boca.
2. Desdoblar completamente el paquete que contiene los guantes estériles y colocarlos empezando por el izquierdo tomándolo por la parte interna del dobléz e introducir lentamente la mano procurando no tocar la parte externa. Dejarlo hasta el dobléz de protección.
3. Colocar el otro guante ajustándolo con la mano que tiene el guante ya puesto, sin desdoblar el dobléz de protección.
4. Verificar que estén puestos correctamente antes de tomar el uniforme.
5. Colocar uno de los zapatos y al apoyarlo introducirlo dentro de la segunda trampa de la esclusa.
6. Colocar el otro zapato apoyando los dos pies dentro de la siguiente trampa de la esclusa.
7. Sacar la escafandra de la bolsa que contiene el uniforme estéril. Tomar la escafandra por la parte interna.
8. Desdoblar la escafandra sin tocar la parte externa.
9. Colocarse la escafandra tomándola por la parte interna
10. Verificar que esté bien colocada sujetarla con los listones hacia la parte trasera de cabeza.
11. Sacar el uniforme tomándolo de tal forma que las mangas y los pies no se desdoblen.
12. Colocar las manos entre los dobleces de la parte interna de las mangas y comenzar a desdoblarlo.
13. Cuidar que al desoblar las piernas no arrastre en el piso, sin soltar la parte de los hombros y sin desdoblar las mangas arremangar uno de los pies, dejando el hueco por donde se introducirá el pie.
14. Introducir la pierna sin soltar el resto de uniforme y en un solo movimiento. Repetir el mismo movimiento con el otro pie.
15. Colocar el uniforme hasta la cintura y desdoblar el resto del uniforme.
16. Introducir los dos brazos y con movimientos ligeros colocar correctamente el uniforme al cuerpo.
17. Verificar que no haya quedado afuera la escafandra y correr el uniforme mediante la cinta de contacto.
18. Tomar los zapatonos por la parte interna, desdoblarlos e introducir el pie en ellos.
19. Extender la parte superior del zapatón y asegurarlo con las cintas. Colocar el pie con el zapatón del otro lado de la banca.
20. Quitar guantes iniciales.
21. Colocar los segundos guantes tomándolos de la parte interna del dobléz e introducir lentamente las manos. Colocarlos hasta el dobléz de protección.
22. Desdoblar los guantes de manera que cubran las mangas del uniforme.
23. Verificar que la vestimenta esté correctamente colocada.
24. Antes de abrir la puerta del área colocarse sobre el tapete adhesivo limpiando completamente los zapatonos
25. Abrir la puerta del área con el dedo meñique y la parte lateral de la mano derecha. Una vez adentro, cerrar la puerta evitando al máximo tocar cualquier otra superficie y desplazarse con movimientos lentos sin crear turbulencias.

REFERENCIAS

(1) Preparación, esterilización y despirogenización de material (UIM-PG-03)

BIBLIOGRAFIA

Pérez Ruelas J., Alpizar Ramos S. 1994. "Manual de Prácticas de Laboratorio de Tecnología Farmacéutica II"; UNAM; Facultad de Química; Septiembre.



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

PEO: GENERAL

UIM:PG-08

Pág.: 1 de 5

Escrito por:

ARABELI OLGUIN J.

Revisado por:

QBP ARMEN
MALDONADO

Aprobado por:

DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:

Nov. 97

Sustituye a:

NUEVO

Próxima revisión Noviembre de 1998

OBJETIVO

Describir el procedimiento adecuado para la preparación de soluciones, involucradas en la obtención de porinas de *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d para inmunización en humanos.

ALCANCE

Este proceso involucra a todo el personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción

POLÍTICAS



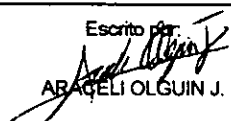
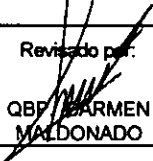
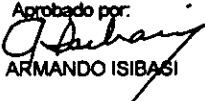
Es responsabilidad de todo el personal, encargado del proceso de fermentación para la obtención de porinas de *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d para inmunización en humanos, seguir este procedimiento.

MATERIAL

Matraces aforados de 1,000 mL.
Matraces bola de fondo plano de 1,000 mL
Pipetas estériles de 5 mL y 10 mL
Membrana de acetato de celulosa de 45 mm de diámetro y poro de 0.2 μ
Unidad de filtración de 500 mL
Barra magnética
Espátula
Algodón
Gasas
Cinta testigo
Papel aluminio
Frascos esterilizables de 1L c/tapón de rosca
Tijeras
Pinzas millipore
Agua inyectable



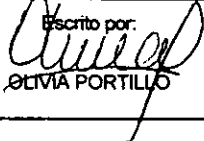

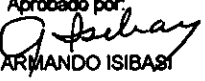
EQUIPO E INSTRUMENTOS

Autoclave
Parrilla de calentamiento con agitación
Balanza analítica
Balanza granataria
Potenciómetro
Bomba de vacío
Campana de Flujo Laminar

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES			PEO: GENERAL	
			UIM:PG-08	Pág.: 2 de 5
Escrito por:  ARACELI OLGUIN J.	Revisado por:  QBFBARMEN MALDONADO	Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
<p>SOLUCIONES</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Amortiguador Tris-HCl pH 7.7 2. Amortiguador Tris-HCl SDS 2% pH 7.7 3. Amortiguador de Nikaido pH 7.7. 4. Amortiguador de Nikaido para purificación pH 7.7 s/β mercaptoetanol 5. MgCl₂ 1M 6. NaCl 50 mM 7. NaCl 0.15 M 8. RNAasa 1000 U/mL 9. DNAasa 1000 U/mL 10. Hipoclorito de sodio 500 ppm <p>PROCEDIMIENTO</p> <p>NOTAS:</p> <p>Las indicaciones siguientes son para la preparación de 1L. Todos los procedimientos siguientes deben realizarse dentro de la campana de Flujo Laminar.(1).</p> <p>A) AMORTIGUADOR TRIS-HCl pH 7.7</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar en la balanza analítica exactamente, el siguiente reactivo: <ul style="list-style-type: none"> - TRIS Base 6.0 g 2. Disolver la sal en 500mL de agua inyectable en un matraz bola estéril de 1,000 mL 3. Tomar una muestra de aproximadamente 2 mL. Leer pH en el Potenciómetro.(2) 4. Ajustar el pH a 7.7 adicionando HCl 0.2N 5. Tomar una muestra de 2 mL. Leer el pH en el Potenciómetro . Si la lectura da el pH deseado, seguir con el procedimiento, en caso contrario, repetir los últimos dos pasos. (En caso de que el pH sea menor al deseado ajustar con NaOH 0.2N). 6. Aforar con agua inyectable en un matraz aforado de 1,000 mL 7. Filtrar el amortiguador a través de membrana de poro de 0.2μ en el equipo de filtración con ayuda de la bomba de vacío. 8. Recibir el filtrado en un frasco de 1L estéril 9. Etiquetar el frasco con la siguiente información: <ul style="list-style-type: none"> - Nombre de la solución - Fecha de preparación - pH - Nombre de la persona que la preparó. <p>B) AMORTIGUADOR TRIS-SDS 2% pH 7.7</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar en la balanza analítica exactamente, los siguientes reactivos: <ul style="list-style-type: none"> - TRIS Base 6.0 g - SDS 20.0 g 2. Disolver el TRIS base en 500 mL de agua inyectable en un matraz bola estéril de 1,000 mL 3. Tomar una muestra de aproximadamente 2 mL. Leer el pH en el Potenciómetro (2). 				

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA											
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES			PEO: GENERAL									
			UIM:PG-08	Pág.: 3 de 5								
Escrito por ARACELI OLGUIN J.	Revisado por QBP CARMEN MALDONADO	Aprobado por DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO								
<p>4. Ajustar el pH a 7.7 adicionando HCl 0.2N</p> <p>5. Tomar una muestra de 2 mL. Leer el pH en el Potenciómetro. Si la lectura da el pH deseado, seguir con el procedimiento, en caso contrario, repetir los últimos dos pasos. (En caso de que el pH se menor al deseado ajustar con NaOH 0.2N).</p> <p>6. Disolver el SDS en la solución ajustada. (si es necesario utilice la parrilla con agitación y calentamiento). Aforar con agua inyectable en un matraz aforado de 1,000 mL</p> <p>7. Filtrar el amortiguador a través de membrana de poro de 0.2μ en el equipo de filtración con ayuda de la bomba de vacío (evitar la formación de espuma).</p> <p>8. Recibir el filtrado en un frasco de 1L estéril</p> <p>9. Etiquetar el frasco con la siguiente información:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nombre de la solución - Fecha de preparación - pH - Nombre de la persona que la preparó. <p>C) AMORTIGUADOR DE NIKAIDO pH 7.7</p> <p>1. Pesar en la balanza analítica exactamente, los siguientes reactivos:</p> <table style="margin-left: 20px;"> <tr><td>- TRIS Base</td><td style="text-align: right;">6.0 g</td></tr> <tr><td>- SDS</td><td style="text-align: right;">10.0 g</td></tr> <tr><td>- NaCl</td><td style="text-align: right;">23.4 g</td></tr> <tr><td>- EDTA</td><td style="text-align: right;">1.9g</td></tr> </table> <p>2. Disolver las sales en 500 mL de agua inyectable en un matraz bola estéril de 1,000 mL (Si es necesario utilice la parrilla de agitación y calentamiento).</p> <p>3. Tomar una muestra de aproximadamente 2 mL. Leer el pH en el Potenciómetro (2).</p> <p>4. Ajustar el pH a 7.7 adicionando HCl 0.2N</p> <p>5. Tomar una muestra de 2 mL. Leer el pH en el Potenciómetro. Si la lectura da el pH deseado, seguir con el procedimiento, en caso contrario, repetir los últimos dos pasos.(En caso de que el pH sea menor al deseado ajustar con NaOH 0.2N).</p> <p>6. Disolver el SDS en la solución ajustada. (Si es necesario utilice la parrilla con agitación y calentamiento).</p> <p>7. Aforar con agua inyectable en un matraz aforado de 1,000 mL.</p> <p>8. Adicionar 0.5 mL de β-Mercaptoetanol.</p> <p>9. Filtrar el amortiguador a través de membrana de poro de 0.2μ en el equipo de filtración con ayuda de la bomba de vacío (evitar la formación de espuma).</p> <p>10. Recibir el filtrado en un frasco de 1L con tapón de rosca estéril.</p> <p>11. Etiquetar el frasco con la siguiente información:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nombre de la solución - Fecha de preparación - pH - Nombre de la persona que la preparó. 					- TRIS Base	6.0 g	- SDS	10.0 g	- NaCl	23.4 g	- EDTA	1.9g
- TRIS Base	6.0 g											
- SDS	10.0 g											
- NaCl	23.4 g											
- EDTA	1.9g											

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA		
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES			PEO: GENERAL
UIM:PG-08			Pág.: 5 de 5
Escrito por ARACELI OLGUIN J.	Revisado por QBE CARMEN MALDONADO	Aprobado por DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97
Sustituye a:			NUEVO
<p>G) NaCl 0.15 M</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar exactamente en la balanza analítica 0.877 g de NaCl. 2. Disolver en 100 mL de agua inyectable 3. Etiquetar el recipiente con marcador indeleble con la siguiente información: <ul style="list-style-type: none"> - Nombre de la solución - Fecha de preparación - Nombre de la persona que la preparó. <p>H) RNAasa (10 000 U/mL)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Preparar según lo descrito en el marbete del frasco 2. Disolver en NaCl 50 mM <p>I) DNAasa (10 000 U/mL)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Preparar según lo descrito en el marbete del frasco. 2. Disolver en NaCl 0.15 M <p>J) Hipoclorito de sodio 500 ppm</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Adicionar 8.5 mL de hipoclorito de sodio comercial (6%) por cada litro de agua destilada <p>K) HCl 0.2N</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pasar 1.7 mL de HCl conc a un matraz con 100 mL de agua destilada. 2. Etiquetar <p>L) NaOH 0.2 N</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar 0.8 g de NaOH en hojuelas. 3. Disolver en 100 mL de agua destilada 4. Etiquetar. <p>M) KOH al 20 % en alcohol</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar exactamente 40g de hidróxido de potasio (KOH) 2. Disolver en 200 mL de alcohol etílico. 3. Etiquetar (Es necesario señalar que este reactivo es fuertemente corrosivo). <p>REFERENCIAS</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) Campana de Flujo Laminar (UIM-PO-11) (2) Potenciómetro (UIM-PO-10) (3) Descontaminación y Lavado de Material (UIM-PG-01) (4) Preparación, Esterilización y Despirogenización de Material (UIM-PG-02) <p>BIBLIOGRAFIA</p> <p>FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. 1994, 6a. Edición; México; pag 19, 213, 253.</p>			

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA		
PROCESO GENERAL DE PRODUCCION Y CONTROL DE CALIDAD			PEO:GENERAL
			UIM-PG-09
Escrito por:  OLIVIA PORTILLO	Revisado por:  QBP CARMEN MACDONADO	Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97
			Pág.: 1 de 2 Sustituye a: NUEVO
Próxima Revisión: Noviembre 1998			
OBJETIVO			
Describir el procedimiento general de producción y de control para la obtención de porinas de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d para inmunización en humanos.			
ALCANCE			
Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI designado a la producción y al control de calidad.			
POLITICAS			
Es responsabilidad de las personas involucradas tanto en la producción como en el control de porinas de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d el consultar este procedimiento.			
PROCEDIMIENTO			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Si fuera necesario, realizar la producción de la cepa semilla (UIM-PP-01). 2. 48 horas antes de comenzar la producción, sanitizar el área de producción (UIM-PG-05). 3. Al cumplirse las 48 horas, una persona deberá entrar al área con el uniforme estéril (UIM-PG-06) y otra persona permanecerá afuera asistiéndola y realizando pruebas de control. La persona que entre al área no deberá salir de ella más de una vez a lo largo del día y deberá cambiarse el uniforme por otro estéril antes de volver a entrar al área de producción. 4. Todo el material que ingrese al área de producción durante el proceso deberá ser sanitizado previamente con la misma solución que se utilizó para la sanitización del área. 5. Realizar el monitoreo ambiental microbiológico del área de producción (UIM-PG-03). 6. Realizar la preparación del inóculo y la fermentación (UIM-PP-02), observar las características microscópicas y macroscópicas (UIM-CA-01) y características bioquímicas (UIM-CA-02) en los pasos indicados, efectuar la curva de crecimiento y leer el pH de la fermentación (UIM-CA-04). 7. Realizar la cosecha de la biomasa y pesar la biomasa húmeda (UIM-PP-03). 8. Realizar la ruptura de la bacteria y la eliminación de DNA y RNA (UIM-PP-04). Tomar una muestra de la ruptura para observarla al microscopio (características microscópicas (UIM-CA-01)). 9. Realizar la extracción de porinas por el método de Nikaido (UIM-PP-05), tomando muestras de 3 mL de los sobrenadantes para realizar el control de extracción de porinas (PAGE-SDS) (UIM-CA-05) y el control de eliminación de LPS (PAGE-SDS, Tinción de Plata) (UIM-CA-05). 10. Realizar la Purificación de Porinas por FPLC (UIM-PP-06), esté será el producto a granel, tomar una alícuota de 5 mL para realizar las pruebas de control posteriores. 11. Realizar la determinación de la concentración de porinas por el método de Lowry (UIM-CA-07), tomando alícuotas de las porinas antes y después de purificar. 12. Dependiendo de la concentración de porinas del producto a granel, realizar la dosificación (UIM-PP-07). 13. Realizar el acondicionamiento del producto terminado (UIM-PP-08). 14. Almacenar el producto terminado (UIM-PP-09). 15. Una vez terminado el proceso de producción, realizar las siguientes pruebas: 			



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



PROCESO GENERAL DE PRODUCCION Y CONTROL DE CALIDAD

PEO:GENERAL

UIM-PG-09

Pág.: 2 de 2

Escrito por:

OLIVIA PORTILLO

Revisado por:

QBP CARMEN MALDONADO

Aprobado por:

DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:

Nov. 97

Sustituye a:

NUEVO

A) Producto a Granel

1. Acidos nucleicos (UIM-CA-06)
2. LPS (Endotoxinas Bacterianas) (UIM-CA-09)
3. Antigenicidad (ELISA) (UIM-CA-10)
4. Peso Molecular (UIM-CA-05)
5. pH (UIM-CA-11)
6. Concentración de SDS (UIM-CA-12)

B) Producto Terminado

1. Aspecto (UIM-CA-13)
2. Peso Molecular (PAGE-SDS) (UIM-CA-05)
3. Concentración de Proteínas (UIM-CA-07)
4. Antigenicidad (ELISA) (UIM-CA-10)
5. Potencia (UIM-CA-14)
6. Esterilidad (UIM-CA-15)
7. Pirógenos (UIM-CA-16)
8. Seguridad Biológica (UIM-CA-17)

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
PRODUCCION DE CEPA SEMILLA Y DE CEPA DE TRABAJO			PEO: PRODUCCION	
			UIM-PP-01	Pág.: 1 de 3
Escrito por: OLIVIA PORTILLO	Revisado por: QBP CARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
Próxima revisión Noviembre 1998				
OBJETIVO				
Establecer el protocolo mediante el cual se realizará la producción y la conservación de la cepa semilla de <i>Salmonella typhi</i> 9,12,Vi:d, ATCC 9993.				
ALCANCE				
Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción.				
POLITICAS				
Es responsabilidad de las personas que realicen el proceso de producción y conservación de la cepa semilla el cumplir con lo indicado en el presente procedimiento.				
MATERIAL				
CEPA SEMILLA				
Algodón Gasa Mechero Lima metálica Pinzas estériles Pipetas Pasteur estériles Tubo de ensaye de 13 x 100 con tapón de rosca estéril Matraz Erlenmeyer de 100 mL Tubos para liofilización con tapones de gasa y algodón estériles Tijeras estériles Aplicadores de madera estériles Tiras de papel filtro de 0.5 cm x 1.5 cm estériles				
CEPA DE TRABAJO				
Matraz Erlenmeyer de 500 mL Matraz Erlenmeyer de 4,000 mL 2 botellas Nalgene para centrífuga Mechero Paquete con 5 pipetas de vidrio graduadas de 10 mL estériles Propipeta Criotubos de 1.9 mL				

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA						
PRODUCCION DE CEPA SEMILLA Y CEPA DE TRABAJO			PEO: PRODUCCION				
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td data-bbox="163 459 362 546" style="width: 33%; text-align: center;"> Escrito por: OLIVIA PORTILLO </td> <td data-bbox="451 459 650 566" style="width: 33%; text-align: center;"> Revisado por: CARMEN MALDONADO </td> <td data-bbox="727 459 984 546" style="width: 33%; text-align: center;"> Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI </td> </tr> </table>			Escrito por: OLIVIA PORTILLO	Revisado por: CARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI	UIM-PP-01	Pág.: 2 de 3
Escrito por: OLIVIA PORTILLO	Revisado por: CARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI					
EQUIPO E INSTRUMENTOS			En vigor:	Sustituye a:			
CEPA SEMILLA Incubadora Liofilizadora Conexión de vidrio múltiple para vacío Bomba de vacío Pistola de rayos UV Soplete			Nov. 97	NUEVO			
CEPA DE TRABAJO Agitador INNOVA Centrífuga Congeladora -70°C							
SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO							
Leche descremada en polvo al 12% (1) Medio BHI (2) Medio Luña-Bertani (2) Medio Luria-Bertani-glicerol 20% (3)							
PROCEDIMIENTO							
I) PRODUCCION DE LA CEPA SEMILLA A PARTIR DEL LIOFILIZADO DE LA CEPA ATCC 9993 <ol style="list-style-type: none"> 1. Sanitizar la mesa de trabajo y trabajar con guantes (4). 2. Limpiar el vial con un algodón humedecido con alcohol y dejar secar. 3. En condiciones asépticas, calentar la punta del vial exterior con el mechero (en el caso de la cepa conservada en el laboratorio, no habrá un vial interior). 4. Rociar unas gotas de agua estéril sobre la punta caliente del vial para estrellar el vidrio. 5. Golpear la punta del vial con una lima metálica o un lápiz hasta abrirlo. 6. Extraer el vial interior. 7. Con la ayuda de las pinzas estériles, extraer el tapón de algodón. 8. En condiciones de esterilidad y con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, agregar de 0.3 a 0.4 mL de medio de cultivo BHI, homogeneizar. 9. Transferir la mezcla a un tubo de ensaye que contenga 5 mL de medio BHI estéril. 10. Incubar durante 48 horas a 37°C y 120 rpm (5). 11. En condiciones de esterilidad, vaciar a un matraz Erlenmeyer de 100 mL que contenga 40 mL de leche descremada al 12% estéril, homogeneizar. 12. Alicuotar 300 µL por cada tubo para liofilización, preparados con tapones de gasa y algodón y estériles, simultáneamente realizar la cuenta viable de uno de los tubos (6). 13. Liofilizar los tubos con los tapones puestos. 							



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



PRODUCCION DE CEPAS SEMILLA Y CEPAS DE TRABAJO

PEO: PRODUCCION

UIM-PP-01

Pág.: 3 de 3

Escrito por:

OLIVIA PORTILLO

Revisado por:

DR. CARMEN MALDONADO

Aprobado por:

DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:

Nov. 97

Sustituye a:

NUEVO

14. Recortar los bordes de los tapones de gasa y algodón utilizando tijeras estériles y en condiciones asépticas.
15. Con la ayuda de un aplicador de madera estéril y cerca del mechero, empujar el tapón para que quede aproximadamente a 2 cm por arriba de la suspensión bacteriana.
16. Introducir al tubo, por encima del tapón, una tira de papel filtro estéril de 1.5 cm de largo con el nombre de la cepa y la fecha de preparación escritos a lápiz.
17. Colocar los tubos en la conexión de vidrio múltiple para vacío.
18. Encender el vacío y dejar aproximadamente 2 minutos.
19. Con un soplete, estirar, sellar y cortar los tubos por arriba de la etiqueta de papel filtro.
20. Checar el vacío de cada tubo utilizando una pistola de rayos UV.
21. Los tubos que no tengan vacío podrán utilizarse para repetir la cuenta viable.
22. El tiempo de caducidad de los tubos será de 10 años conservados a 4°C.

II) PRODUCCION DE LA CEPAS DE TRABAJO PARA LA PRODUCCION DE PORINAS

1. Seguir los pasos 1 a 8 de la preparación de la cepa semilla a partir del liofilizado.
2. En condiciones asépticas, inocular el reconstituido en 150 mL de medio Luria-Bertani estéril en un matraz Erlenmeyer de 500 mL.
3. Incubar a 37°C, 120 rpm durante 3 horas (5).
4. En condiciones asépticas, inocular en 1000 mL de medio Luria-Bertani en un matraz Erlenmeyer de 4,000 mL.
5. Incubar a 37°C, 120 rpm (5).
6. Realizar el proceso de curva de crecimiento tomando muestras de 0.5 mL. Detener la incubación cuando la absorbancia presente un aumento entre lectura y lectura de 0.1 o menos (7).
7. En condiciones asépticas, vaciar el cultivo en dos botellas Nalgene para centrifuga estériles.
8. Centrifugar a 7,000 rpm, 4°C durante 10 minutos (8).
9. Repetir el paso 8 hasta obtener dos botones con toda la biomasa.
10. Resuspender cada botón con 5 mL de medio Luria-Bertani-Glicerol 20%, homogeneizar.
11. Juntar las suspensiones en una botella, homogeneizar.

REFERENCIAS

- (1) Utilizar leche marca "Svelty" y seguir las instrucciones del marbete.
- (2) Preparación de medios de cultivo (UIM-PG-07).
- (3) A 80 mL de medio Luria-Bertani, agregar 20 mL de glicerol y esterilizar a 10 libras durante 10 minutos.
- (4) Sanitización de mesas de trabajo (UIM-PG-04).
- (5) Agitador INNOVA (UIM-PO-04).
- (6) Cuenta Viable (UIM-CA-19).
- (7) Curva de crecimiento (UIM-CA-04).
- (8) Centrifuga (UIM-PO-02).

BIBLIOGRAFIA

Folleto informativo de la ATCC para la cepa 9993, 1996



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



PREPARACION DE MEDIO MINIMO A SUPLEMENTADO			PEO: PRODUCCION	
			UIM.-PP-10	Pág.: 1 de 2
Escrito por: <i>[Signature]</i> ARAGELI OLCUIN	Revisado por: <i>[Signature]</i> QBF CARMEN MALDONADO	Aprobado por: <i>[Signature]</i> DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO

Próxima revisión Noviembre de 1998

OBJETIVO

Describir el procedimiento adecuado para la preparación del medio mínimo A suplementado que se utilizará como medio de cultivo durante el proceso de fermentación para la obtención de porinas de *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d.

ALCANCE

Este proceso involucra a todo el personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI designado a la producción.

POLITICAS

Es responsabilidad de todo el personal involucrado en el proceso de la preparación del medio mínimo A suplementado seguir este procedimiento.

MATERIAL




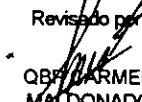

1 Agitador magnético
1 probeta de 1,000 mL estéril
1 matraz aforado de 100mL estéril
1 matraz bola de fondo plano de 12L estéril
10 pipetas graduadas de 10 mL estériles
6 Matraces erlenmeyer de 4 L estériles
6 Matraces erlenmeyer de 1L estériles
espátula
algodón
gasas
papel kraft
cinta testigo


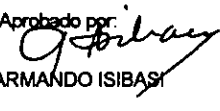
EQUIPO E INSTRUMENTOS



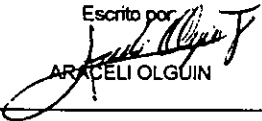
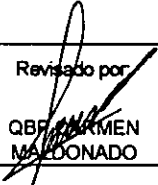
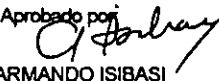
Balanza analítica
Parrilla de agitación
Autoclave

MEDIOS Y REACTIVOS

K_2HPO_4
 KH_2PO_4
 $(NH_4)_2SO_4$
Citrato de Sodio 2 H₂O
Extracto de levadura
Glucosa
 $MgSO_4$
H₂O destilada

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA																
PREPARACION DE MEDIO MINIMO A SUPLEMENTADO		PEO:PRODUCCION UIM.-PP-10 Pág.: 2 de 2															
Escrito por:  MARCELA OLGUIN	Revisado por:  QB MARMEN MALDONADO	Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI															
PREPARACION DE SOLUCIONES																	
<p>A) Sulfato de magnesio al 25 %</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Pesar 25 g de MgSO₄ y disolver en 100 mL de agua 2.- Esterilizar a 15 lb de presión durante 15 min (1). <p>B) Glucosa al 12.5%</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Pesar 75g de glucosa y disolver en 600 mL de agua destilada 2.- Esterilizar a 10 lb de presión durante 10 min (1). <p>C) Extracto de levadura al 5%</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar 15g de extracto de levadura y disolver en 300 mL de agua destilada. 2.- Esterilizar a 15 lb de presión durante 15 minutos (1). 																	
PROCEDIMIENTO																	
<ol style="list-style-type: none"> 1.- El material a utilizar deberá estar lavado siguiendo el procedimiento correspondiente (2). 2.- Pesar los reactivos necesarios para preparar la cantidad requerida de medio mínimo A (a continuación se indican las cantidades necesarias para la composición de un litro de medio mínimo A). <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;">K₂HPO₄</td> <td style="width: 20%; text-align: center;">7.0 g</td> <td style="width: 20%;"></td> </tr> <tr> <td>KH₂PO₄</td> <td style="text-align: center;">3.1 g</td> <td></td> </tr> <tr> <td>(NH₄)₂SO₄</td> <td style="text-align: center;">1.0 g</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Citrato de Sodio 2 H₂O</td> <td style="text-align: center;">0.5 g</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Agua destilada cbp</td> <td style="text-align: center;">1000 mL</td> <td></td> </tr> </table>			K ₂ HPO ₄	7.0 g		KH ₂ PO ₄	3.1 g		(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g		Citrato de Sodio 2 H ₂ O	0.5 g		Agua destilada cbp	1000 mL	
K ₂ HPO ₄	7.0 g																
KH ₂ PO ₄	3.1 g																
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g																
Citrato de Sodio 2 H ₂ O	0.5 g																
Agua destilada cbp	1000 mL																
Registrar en el formato de Preparación de Medio Mínimo A todos los valores que se obtuvieron de la balanza al pesar los reactivos.																	
<ol style="list-style-type: none"> 3. Disolver las sales con agitador magnético. 4. Suplementar las sales disueltas con solución de extracto de levadura al 5%, adicionando 2 mL por cada 100 mL de medio. 5. Esterilizar el medio a 15 lb de presión durante 15 min (1). 6. Adicionar 4 mL de una solución de MgSO₄ al 25 % estéril por cada litro de medio de cultivo. 7. Suplementar el medio adicionando 4mL de una solución de glucosa al 0.5% estéril , por cada 100 mL de medio. 																	
REFERENCIAS																	
<ol style="list-style-type: none"> (1) Autoclave (UIM-PO-08) (2) Descontaminación y Lavado de material (UIM-PG-01) 																	

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA		
PREPARACION DEL INOCULO Y FERMENTACION EN MATRAZ			PEO:PRODUCCION
Escrito por:  BRÁCELI OLGUIN			Pág.: 1 de 3
	Revisado por:  QBP ARMEN MALDONADO	Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97
			Sustituye a: NUEVO
Próxima revisión Noviembre de 1998			
OBJETIVO Describir el procedimiento para la preparación del inóculo y la fermentación para la obtención de porinas de <i>Salmonella typhi</i> 9, 12, Vi:d.			
ALCANCE. Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción.			
POLITICAS Es responsabilidad de todo el personal que interviene en este proceso seguir lo descrito en este procedimiento.			
MATERIAL 6 Matraces Erlenmeyer de 1,000mL 6 matraces Erlenmeyer de 4,000 mL Pipetas graduadas estériles de 2 mL Pipetas graduadas estériles de 5 mL Pipetas graduadas estériles de 10 mL Celda de cuarzo de 1cm de 3mL Mechero Tubos de ensaye estériles de 13x100 Piseta Gradilla Propipeta Recipiente para desechos contaminados (1) Gasas Papel absorbente suave			
REACTIVOS BIOLÓGICOS 9 mL de Cepa semilla de <i>Salmonella typhi</i> 9, 12, Vi:d.			
MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES 90 mL de Solución salina isotónica al 0.85% estéril 9,266.4 mL de Medio mínimo A 198 mL de extracto de levadura al 5% (2) 396 mL de Glucosa al 12.5%estéril (2) 39.6 de MgSO ₄ al 25% (2) Hipoclorito de sodio 500 ppm (3)			

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
PREPARACION DEL INOCULO Y FERMENTACION EN MATRAZ			PEO:PRODUCCION	
			UIM.-PP-O2	Pág.: 2 de 3
Escrito por  ARACELI OLGUIN	Revisado por  QB ARMEN MALDONADO	Aprobado por  DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov 97	Sustituye a: NUEVO
<p>EQUIPO Autoclave FEHLMEX, Modelo Azteca Plus 348 E Espectrofotómetro BECKMAN DV 600 Agitador de temperatura controlada INNOVA</p> <p>PREPARACION DE SUSPENSION BACTERIANA 1.- En condiciones de esterilidad agregar 9 mL de la cepa semilla (4). a 90 mL de solución salina estéril. 2.- Homogeneizar</p> <p>PROCEDIMIENTO</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Todos los matraces deberán estar limpios y secos siguiendo el procedimiento adecuado (1). 2. En 6 matraces Erlenmeyer de 1,000 mL agregar 140.4 mL de medio mínimo A, además de 3 mL de una solución de extracto de levadura al 5%. Esterilizar a 15 lb de presión, 121°C durante 15 min (5). 3. En condiciones de esterilidad suplementar cada matraz con 6 mL de una solución de glucosa al 12.5 % estéril y 0.6 mL de una solución de MgSO₄ al 25% estéril.] 4. Agregar a cada matraz Erlenmeyer de 4 litros, 1,404 mL de medio mínimo además de 30 mL de una solución de extracto de levadura. 5. Cerrar perfectamente los matraces cubriendo la boca del matraz con una bolsa de papel y esterilizar a 15 lb de presión, 121 °C, durante 15 min (5) 6. Suplementar en condiciones de esterilidad, cada matraz con 60 mL de una solución de glucosa al 12.5 % estéril y con 6 mL de una solución de MgSO₄ al 25 % estéril (2). 7. Colocar todos los matraces dentro del agitador de temperatura controlada, a 200 rpm y 37°, durante 24 horas (6). 8. Una vez transcurrido este tiempo verificar que no haya presencia de desarrollo, es decir los medios deberán permanecer transparentes. 9. Tomar una muestra del medio suplementado sin inocular que se utilizará como blanco en la curva de crecimiento. 10. Adicionar a cada matraz Erlenmeyer de 1,000 mL con el medio suplementado estéril 15 mL de la suspensión bacteriana (10% del volumen total de medio) 11. Leer la densidad óptica del medio a 540 nm, utilizando como blanco medio sin inocular. Registrar el dato en el formato de curva de crecimiento. A esta lectura se le considera el tiempo 0 (t₀.) 12. Colocar el medio inoculado con la suspensión bacteriana en el agitador de temperatura controlada (6) a 37°C, 200 rpm durante 4 horas. Al terminar este tiempo tomar una muestra del cultivo en condiciones de esterilidad y leer su densidad óptica; si la lectura es 1.0 ± 0.05 detener la incubación y continuar con el paso 13. En caso contrario continuar con la incubación durante otra hora y leer la densidad óptica final. 13. Se toma una alícuota de 1mL del cultivo en un tubo estéril para evaluar características macroscópicas y microscópicas además de llevar a cabo la caracterización bioquímica del cultivo. 14. Tomar una alícuota de los matraces de 4 L que contienen medio sin inocular, Leer la densidad óptica del medio a 540 nm, esta lectura será considerada como blanco en la elaboración de la curva de crecimiento. 				

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
PREPARACION DEL INOCULO Y FERMENTACION EN MATRAZ			PEO:PRODUCCION	
			UIM.-PP-O2	Pág.: 3 de 3
Escrito por: ARACELI OLGUIN	Revisado por: QUESADA ARMÉN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov 97	Sustituye a: NUEVO
<p>15. Adicionar en condiciones de esterilidad, a cada matraz de 4 litros con medio estéril suplementado, los inóculos fermentados obtenidos en el paso No 12. Tomar una muestra de aproximadamente 2 mL de uno de los matraces y leer su densidad óptica a 540 nm esta lectura será considerada como el tiempo 0 (t_0). Elaborar la curva de crecimiento (7).</p> <p>16. Tomar cada hora una alícuota de 2 mL del mismo matraz en que se tomó la lectura del t_0, leer su densidad óptica a 540 nm y graficar en la curva de crecimiento (7).</p> <p>17. Detener la fermentación a las 5 horas si la lectura de absorbancia es 1.0 ± 0.05. En caso contrario continuar con el proceso de fermentación hasta obtener dicha lectura, pero sin llegar a la fase estacionaria del crecimiento.</p> <p>18. Tomar en un tubo de ensaye estéril una alícuota de 1 mL del cultivo para llevar a cabo la caracterización microscópica, macroscópica y bioquímica (8)(9),</p> <p>19. Registrar todos los resultados en el formato de Curva de crecimiento y elaborar la gráfica.</p>				
REFERENCIAS				
<p>(1) Descontaminación y Lavado de material (UIM-PG-01)</p> <p>(2) Preparación de Medio mínimo "A" Suplementado (UIM-PP-10)</p> <p>(3) Preparación de Soluciones (UIM-PG-08)</p> <p>(4) Producción y conservación de la Cepa Semilla (UIM-PP-01)</p> <p>(5) Autoclave FELMEX (UIM-PO-08)</p> <p>(6) Agitador INNOVA.(UIM-PO-04)</p> <p>(7) Curva de crecimiento (UIM-CA-04)</p> <p>(8) Características microscópicas y macroscópicas(UIM-CA-01)</p> <p>(9) Caracterización bioquímica (UIM-CA-02)</p>				



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



COSECHA Y BIOMASA HUMEDA
(Salmonella typhi 9,12,Vi:d)

PEO: PRODUCCION

UIM-PP-03

Pág.: 1 de 2

Escrito por:

OLIVA PORTILLO

Revisado por:

QBPTARMEN
MALDONADO

Aprobado por:

DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:

Nov. 87

Sustituye a:

NUEVO

Próxima revisión Noviembre 1998

OBJETIVO

Establecer el protocolo mediante el cual se realizará la cosecha y la pesada de la biomasa de *S. typhi* 9,12,Vi:d, después de la fermentación.

ALCANCE

Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción.

POLITICAS

Es responsabilidad de las personas que realicen la técnica de cosecha y biomasa húmeda el cumplir con lo indicado en este procedimiento.

MATERIAL

6 botellas Nalgene de 250 mL para centrífuga, estériles
Paquete de 5 pipetas graduadas de 10 mL, estériles
Propipeta sanitizada
2 mecheros Bunsen, sanitizados
2 agitadores de vidrio, estériles
Recipiente para desechos líquidos grande, sanitizado

INSTRUMENTOS Y/O EQUIPO





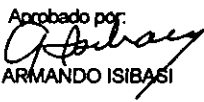
Centrífuga
Rotor GSA para botellas de 250 ml, ángulo fijo
Balanza granataria




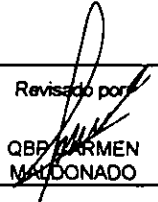

REACTIVOS



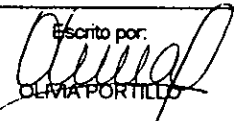
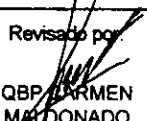
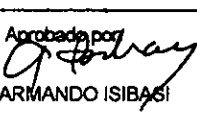
3 L de amortiguador Tris-HCl pH 7.7 (1)
1 L de hipoclorito de sodio 500 ppm (1)





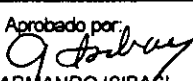
REACTIVOS BIOLÓGICOS

Cultivo de *S. typhi* 9,12,Vi:d en medio mínimo "A" suplementado (2)

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
COSECHA Y BIOMASA HUMEDA <i>(Salmonella typhi 9,12,Vi;d)</i>		PEO: PRODUCCION		
		UIM-PP-03	Pág.: 2 de 2	
Escrito por:  OLIVIA PORTILLO	Revisado por:  CARMEN MALDONADO	Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
<p>PROCEDIMIENTO</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Marcar y pesar una de las botellas para centrifuga estéril. 2. Vaciar aproximadamente 200 mL del cultivo en cada una de 6 botellas de 250 mL (3). 3. Balancear pares de botellas en balanza granataria utilizando el cultivo y una pipeta estéril (3). 4. Centrifugar a 7,000 r.p.m. durante 15 min. a 4°C (4). 5. Decantar y descontaminar los sobrenadantes (3,5). 6. Repetir los pasos 1 a 4, sin extraer los botones de las botellas, las veces que sean necesarias hasta terminar con todo el cultivo. 7. Resuspender los botones con 200 mL por botella de amortiguador Tris-HCl pH 7.7 y centrifugar a 7,000 r.p.m. durante 15 min a 4°C para eliminar el medio de cultivo remanente (3,4). 8. Resuspender todos los botones en la mínima cantidad necesaria de Tris-HCl pH 7.7 y reunirlos en la botella marcada y pesada (3). 9. Agregar 200 mL de Tris-HCl pH 7.7 y centrifugar a 7,000 rpm durante 15 min a 4°C (3,4). 10. Decantar y descontaminar el sobrenadante (3,5). 11. Resuspender el botón en Tris-HCl pH 7.7 a un volumen final de 100 mL (3). 12. Llenar el formato de resultados de biomasa húmeda. <p>REFERENCIAS</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) Preparación de Soluciones (UIM-PG-08) (2) Preparación de Inóculo y Fermentación (UIM-PP-02) (3) Trabajar cerca del mechero manteniendo condiciones de esterilidad (4) Centrifuga (UIM-PO-02) (5) Descontaminación y Lavado de Material (UIM-PG-01) 				

		CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
RUPTURA DE BACTERIA Y ELIMINACION DE DNA Y RNA				PEO: PRODUCCION	
				UIM-PP-04	Pág.: 1 de 2
Escrito por:  OLIVIA PORTILLO	Revisado por:  QBB CARMEN MALDONADO	Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO	
Próxima revisión Noviembre 1998					
OBJETIVO Establecer el protocolo mediante el cual se realizará la ruptura de la biomasa de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d y la eliminación de DNA y de RNA posteriores a la cosecha.					
ALCANCE Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción					
POLITICAS Es responsabilidad de las personas que realicen la técnica de ruptura y eliminación de DNA y RNA el cumplir con lo indicado en este procedimiento					
MATERIAL Piseta sanitizada, llena con agua destilada estéril Vaso de precipitados de 1L, sanitizado, para desechos 3 Embudos de vidrio, de tallo corto, estériles Probeta de 200 mL, estéril Probeta de 50 mL, estéril 2 Vasos de ppdo. de 500 mL, estériles Agitador de vidrio, estéril Matraz Erlenmeyer de 500 mL, estéril 60 cm ³ de perlas de vidrio, estériles Micropipeta de 20 - 200µL, sanitizada Puntas para micropipeta de 20 - 200µL, estériles					
INSTRUMENTOS Y/O EQUIPO Recirculador de agua Molino para bacterias Cámara para molino y aditamentos estériles					
MEDIOS Y/O REACTIVOS 1 L de Tris-HCl pH 7.7 estéril (1) 1 L de agua destilada estéril 1 L de hipoclorito de sodio 500 ppm estéril (1) 10 mL MgCl ₂ 1M estéril (1)					
REACTIVOS BIOLÓGICOS 100 mL de biomasa de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d concentrada y lavada (2) 100 µL RNAasa en NaCl 50mM (10,000 U/mL) (1) 100 µL DNAasa en NaCl 0.15M (10,000 U/mL) (1)					

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
RUPTURA DE BACTERIA Y ELIMINACION DE DNA Y RNA			PEO:PRODUCCION	
			UIM-PP-04	Pág. 2 de 2
Escrito por:  OLIVIA PORTILLO	Revisado por:  QBP CARMEN MALDONADO	Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
PROCEDIMIENTO				
<ol style="list-style-type: none"> 1. En todo momento, trabajar en el molino con un mechero cerca para crear un área estéril. 2. Prender el recirculador, dejarlo enfriar hasta 1°C y ajustar la temperatura (3). 3. Acomodar la cámara sobre el empaque del molino presionando con fuerza (3). 4. Asegurar la cámara y bajar la palanca (3). 5. Colocar el tapón de salida localizado en la parte inferior de la cámara asegurándolo con las pinzas (3). 6. Verter 100 mL de agua destilada estéril en la cámara con la ayuda de un embudo estéril, colocar y asegurar el tapón de entrada. 7. Prender el molino y dejarlo funcionar durante 2 min., si en este tiempo se presentaran fugas, vaciar la cámara y repetir los pasos 3-6. Si no existieran fugas, seguir con el paso 8. 8. Vaciar el agua de la cámara. Colocar las perlas de vidrio en la cámara con la ayuda de un embudo estéril. Conectar las mangueras del recirculador y abrir el recirculador. 9. Verter el concentrado de bacteria en la cámara con la ayuda de un embudo estéril. 10. Realizar mínimo 12 ciclos, con 2 min de ruptura y 3 min de descanso cada uno, anotando la temperatura del recirculador al terminar cada ciclo (3). 11. Recolectar la mezcla de bacterias rotas y perlas por la parte inferior de la cámara en un vaso de precipitados de 500 mL estéril. 12. Lavar la cámara con 50 mL de Tris-HCl pH 7.7 y reunir el lavado en el vaso de precipitados de 500 mL con las perlas y agitar con un agitador de vidrio estéril. 13. Decantar el lavado a una botella para centrifuga de 250 mL estéril tratando de no vaciar las perlas. 14. Repetir los pasos 11-12 dos veces, decantando la bacteria rota en la misma botella. 15. Centrifugar la bacteria rota a 7,000 rpm durante 20 min a 4°C (5). 16. Decantar y guardar el sobrenadante, tomar una muestra del botón para control, descontaminar (4) y desechar el botón. 17. Por cada 10 g de biomasa, agregar al sobrenadante: <ul style="list-style-type: none"> 2.77 mL de MgCl₂ 1M 25 µL de RNAasa 10,000 U/mL 25 µL de DNAasa 10,000 U/mL 18. Incubar a 37°C durante 30 min a 120 rpm (6). 19. Descontaminar (4), lavar y dejar secar las perlas de vidrio. 24. Descontaminar, esterilizar y lavar el material contaminado (4). 25. Llenar el formato de resultados de ruptura de bacteria. 				
REFERENCIAS				
<ol style="list-style-type: none"> (1) Preparación de Soluciones (UIM-PG-08) (2) Cosecha y Biomasa Húmeda (UIM-PP-03) (3) Dyno Mill (UIM-PO-03) (4) Descontaminación y Lavado de Material (UIM-PG-01) (5) Centrifuga (UIM-PO-02) (6) Agitador INNOVA (UIM-PO-04) 				

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
EXTRACCION DE PORINAS DE <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d POR EL METODO DE NIKAIDO		PEO: PRODUCCION		
		UIM-PP-05	Pág.: 1 de 2	
Escrito por:  OLIVIA PORTILLO	Revisado por:  QBPRARMEN MALDONADO	Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
Próxima Revisión Noviembre 1998				
OBJETIVO Establecer el protocolo mediante el cual se realizará la extracción de porinas de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d mediante el método de Nikaido				
ALCANCE Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción				
POLITICAS Es responsabilidad de las personas que realicen la extracción de las porinas el cumplir con lo indicado en este procedimiento				
MATERIAL Paquete estéril con 5 pipetas graduadas de 5 mL Propipeta sanitizada 2 matraces Erlenmeyer de 500 mL estériles Matraz Erlenmeyer de 250 mL estéril 8 tubos para ultracentrifuga estériles 2 agitadores de vidrio estériles Homogeneizador de vidrio de 50 ml estéril Gasas estériles				
EQUIPO Y/O INSTRUMENTOS Ultracentrifuga				
REACTIVOS 500 mL de Tris HCl - SDS 2% estéril (1) 500 mL de amortiguador de Nikaido-SDS 1% estéril (1)				
REACTIVOS BIOLÓGICOS Suspensión de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d rota en Tris-HCl pH 7.7 (2)				



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



EXTRACCION DE PORINAS DE *S. typhi* 9,12,Vi:d POR EL METODO DE NIKAIIDO

PEO: PRODUCCION

UIM-PP-05

Pág.: 2 de 2

Escrito por:
[Signature]
OLGA PORTILLO

Revisado por:
[Signature]
QBP ARMIN
MADONADO

Aprobado por:
[Signature]
DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:
Nov. 97

Sustituye a:
NUEVO

PROCEDIMIENTO

1. Vaciar la bacteria rota en los 8 tubos para ultracentrifuga, trasvasar el líquido de manera que no se formen burbujas al cerrar los tubos.
2. Ultracentrifugar los tubos a 45,000 rpm durante 45 min a 4°C (3).
3. Desechar los sobrenadantes (4).
4. Resuspender cada botón en 10 mL de Tris HCl - SDS 2% con la ayuda de un agitador de vidrio estéril.
5. Homogeneizar las suspensiones en el homogeneizador de vidrio en dos fracciones de 40 mL tratando de hacer la menor cantidad de espuma posible.
6. Reunir las dos fracciones en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, llevar a 100 mL con Tris HCl - SDS 2% e incubar a 32°C durante 30 min a 120 rpm (5).
7. Ultracentrifugar a 40,000 rpm durante 30 min a 20°C (3).
8. Resuspender cada botón en 5 mL de Tris HCl - SDS 2% con la ayuda del agitador de vidrio.
9. Homogeneizar las suspensiones en el homogeneizador de vidrio, en una sola fracción, tratando de hacer la menor cantidad de espuma posible.
10. Incubar a 32°C durante 30 min a 120 rpm (5).
11. Repetir el paso No. 7.
12. Resuspender el botón en 20 mL de amortiguador de Nikaido - SDS 1% con la ayuda de un agitador de vidrio estéril.
13. Repetir el paso No. 9.
14. Incubar a 37°C durante 2 h a 120 rpm (5).
15. Trasvasar el tubo con amortiguador de Nikaido - SDS 1% y ultracentrifugar a 40,000 rpm durante 45 min a 20°C (3).
16. Recuperar el sobrenadante (porinas) y desechar el botón.
17. Guardar una alícuota de 2 mL del sobrenadante y leer absorbancia a 260 nm y 280 nm.

REFERENCIAS

- (1) Preparación de Soluciones (UIM-PG-08)
- (2) Ruptura de Bacteria y Eliminación de DNA y RNA (UIM-PP-04)
- (3) Ultracentrifuga (UIM-PO-05), rotor TI-60
- (4) Descontaminación y lavado de Material (UIM-PG-01)
- (5) Agitador INNOVA (UIM-PO-04)

BIBLIOGRAFIA

Nikaido H., 1983, *Proteins Forming Large Channels from Bacterial and Mitochondrial Outer Membranes: Porins and Phage Lambda Receptor Protein*, Methods in Enzymology, Vol. 97, pp. 85-101

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA				
PURIFICACIÓN (FPLC) (PORINAS DE <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d)		PEO:PRODUCCION			
Escrito por:  ARACELI OLGUIN J.		Revisado por:  QBETAR MEN MALDONADO	Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Pág.: 1 de 3 Sustituye a: NUEVO
Próxima revisión Noviembre de 1998					
OBJETIVO					
Describir el procedimiento adecuado para la purificación del lote a granel de porinas de <i>Salmonella typhi</i> 9,12,Vi:d; por columna de separación de Sephacril S-200.					
ALCANCE					
Este proceso involucra a todo el personal de la UIM en Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción.					
POLÍTICAS					
Es responsabilidad de todo el personal que interviene en el proceso seguir este procedimiento.					
MATERIAL					
Jeringa de propileno estéril de 25mL Aguja de punta roma estéril calibre No. 20 Recipiente de vidrio de 250 mL con tapón, estéril Matraz bola de fondo plano de 6,000 mL Matraz Erlenmeyer de 2L estéril con tapón que no desprenda partículas Botella de 500 mL libre de pirógenos y estéril Tubo de 50 mL estéril y libre de pirógenos Micropipeta de 1,000 µL Puntas de 1,000 µL estériles y libres de pirógenos Gasas estériles Piseta con agua inyectable Piseta con solución desinfectante Papel absorbente					
EQUIPO E INSTRUMENTOS					
Campana de Flujo Laminar Regulador de corriente Columna FPLC WATTERS 650 E Detector Graficador LKB Colector					



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



PURIFICACIÓN (FPLC)
(PORINAS DE *S. typhi* 9,12,Vi:d)

PEO: PRODUCCIÓN

UIM-PP-06

Pág.: 2 de 3

Escrito por:

ABACELI OLGUIN J.

Revisado por:

QBM CARMEN MALDONADO

Aprobado por:

DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:

Nov. 97

Sustituye a:

NUEVO

REACTIVOS

Tris base
SDS
NaCl
EDTA
Agua desionizada

SOLUCIONES



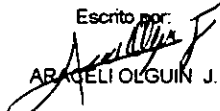
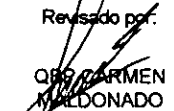
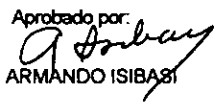
4L de Amortiguador de Nikaido s/β-Mercaptoetanol (3)
Hipoclorito de sodio 500 ppm.(3)

REACTIVOS BIOLÓGICOS

Lote de porinas de *Salmonella typhi* a granel

PROCEDIMIENTO

1. Encender el equipo y establecer los parámetros de uso (1). La fase móvil será amortiguador de Nikaido 0.5X s/β mercaptoetanol estéril y libre de pirógenos. Las mangueras de alimentación y el recipiente que lo contenga deberán estar dentro de la campana de flujo laminar previamente encendida durante 15 minutos (2).
 - 1.1. Velocidad de flujo: 10 mL/min.
 - 1.2. Sensibilidad del lector: 0.1 Esperar la calibración hasta que la lectura del detector indique 0.00, dejando presionado el botón ZERO
2. Encender el graficador ajustando con las perillas el punto de origen del cromatograma, y la guía de recorrido, ajustar la velocidad del papel a 2 mm/min.
3. Colocar la perilla de inyección de la columna en la posición LOAD, para inyectar la muestra.
4. Preparar la jeringa con 22 mL del lote a granel de porinas obtenido por extracción de Nikaido, colocarle la aguja de punta roma de calibre 20, sin dejar burbujas en el interior de la jeringa.
5. Inyectar la muestra en la columna eluyendo a un flujo de 10 mL /min. (Al inyectar la muestra habrá un desplazamiento de volumen, por lo que se deberá colocar un recipiente de aproximadamente 50 mL en la manguera de salida del inyector.
6. Cuando se termina de inyectar la muestra girar la perilla del inyector hacia la posición INJECT. Liberar el botón ZERO del detector. Iniciar el registro del graficador.
7. Registrar el tiempo de inicio. Colectar el volumen de salida en el matraz Erlenmeyer de 2 litros estéril, de tal manera que la manguera de salida permanezca dentro de la campana de flujo laminar.
8. En condiciones de esterilidad tomar una muestra al final del volumen vacío en un recipiente estéril y libre de pirógenos que se etiquetará como volumen de lavado.
9. En las mismas condiciones, recolectar en un recipiente de 50 mL estéril y libre de pirógenos sólo el primer pico que aparece en el cromatograma, el cual pertenece a las porinas. Registrar la absorbancia máxima del pico y el volumen aproximado en el formato de PURIFICACION DE PORINASPOR FPLC, ABSORBANCIA A 260/280 nm Y pH.
10. Cerrar perfectamente el recipiente donde fue recolectado el producto purificado y homogeneizar el producto con movimientos circulares lentos.

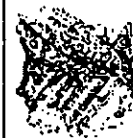
	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
PURIFICACIÓN (FPLC) (PORINAS DE <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d)			PEO: PRODUCCIÓN	
			UIM-PP-06	Pág.: 3 de 3
Escrito por:  ARACELI OLGUÍN J.	Revisado por:  QFB CARMEN MALDONADO	Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
<ol style="list-style-type: none"> 1. Tomar una muestra de aproximadamente 3 mL del producto purificado. en las mismas condiciones, con una micropipeta de 1,000 μL con punta estéril y libre de pirógenos. Realizar las pruebas de control del producto a granel 2. Cerrar perfectamente el recipiente antes de sacarlo de la campana de flujo laminar. 3. Terminar la elución de la muestra hasta completar el cromatograma registrando en el formato de PURIFICACION DE PORINAS POR FPLC, ABSORBANCIA A 260/280 nm Y pH los valores de absorbancia máximos y los volúmenes aproximados de cada pico. 4. Detener y apagar el graficador. 5. Lavar la columna después de la purificación manteniendo la velocidad de flujo durante una hora 6. Disminuir la velocidad de flujo gradualmente hasta llegar a cero, sin provocar cambios bruscos de presión. 7. Apagar el detector y el equipo (1). 8. Apagar la campana de flujo laminar. 				
REFERENCIAS				
(1) Columna FPLC Watters 650 E (UIM-PO-09)				
(2) Campana de Flujo Laminar (UIM-PO-11)				
(3) Preparación de soluciones (UIM-PG-08)				

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
DOSIFICACION			PEO: PRODUCCION	
			UIM-PP-07	Pág.: 1 de 2
Escrito por: OLIVIA PORTILLO	Revisado por: QBP CARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBAZI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
Próxima revisión Noviembre 1998				
OBJETIVO				
Establecer el protocolo mediante el cual se realizará la dosificación de porinas de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d, en condiciones de esterilidad, para inmunización en humanos.				
ALCANCE				
Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción.				
POLITICAS				
Es responsabilidad de las personas que realicen el proceso de dosificación el cumplir con lo indicado en este procedimiento.				
MATERIAL				
Botellas estériles, libres de pirógenos, de 250 mL Pipetas de vidrio graduadas de 10 y 5 mL, despirogenizadas Viales de vidrio tipo 1, de 2 mL despirogenizados Tapones de hule, estériles Casquillos de aluminio estériles Pinzas estériles Engargoladora sanitizada Micropipeta de 1,000 µL sanitizada Micropipeta de 200 µL sanitizada Puntas para micropipeta despirogenizadas Propipeta sanitizada Marcador indeleble 4 pares de guantes estériles				
EQUIPO				
Campana de flujo laminar sanitizada				
SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO				
Agua inyectable Porinas de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d purificadas (1)				

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA				
DOSIFICACION			PEO: PRODUCCION		
Escrito por: OLIVIA PORTILLO			Revisado por: QBP CARMEN MALDONADO	UIM-PP-07 En vigor: Nov. 97	Pág.: 2 de 2 Sustituye a: NUEVO
PROCEDIMIENTO					
<ol style="list-style-type: none"> 1. Encender y sanitizar la campana 15 min antes de comenzar. 2. Sanitizar e introducir a la campana la o las botellas, el recipiente con porinas, las pipetas de vidrio, la propipeta, un marcador indeleble y el agua inyectable. 3. Eliminar las envolturas y capuchones y acomodar el material para poder trabajar. 4. Hacer un cambio del segundo par de guantes, no sacar las manos de la campana durante el proceso. 5. Dependiendo de la concentración del producto a granel y de la cantidad de viales a dosificar, hacer las diluciones necesarias de porinas en las botellas, utilizando las pipetas de vidrio y el agua inyectable. 6. Retirar de la campana el recipiente con el producto a granel, la propipeta, las pipetas y el agua inyectable. 7. Sanitizar e introducir a la campana los paquetes que contengan los viales despirogenizados, los tapones de hule, los casquillos de aluminio, las puntas, las micropipetas, la engargoladora, las pinzas y las tijeras. 8. Eliminar la primer envoltura de los paquetes y recortar con las tijeras la segunda para que el material pueda tomarse con facilidad. 9. Hacer un cambio del segundo par de guantes, no sacar las manos de la campana durante el proceso. 10. Para cada uno de los viales, realizar los siguientes pasos (cada vial deberá contener 4 dosis de 0.5 mL más 0.125 mL de excedente): <ol style="list-style-type: none"> a) Sin tocar la orilla de la boca del vial, retirar la tapa de papel aluminio. b) Con las micropipetas y las puntas, llenar el vial con 2.125 mL de porinas diluidas sin tocar la orilla de la boca del vial y tratando de no hacer espuma. c) Con las pinzas estériles, colocar el tapón de hule sobre el vial. d) Con las pinzas estériles, colocar el casquillo de aluminio sobre el tapón de hule. e) Con la engargoladora, prensar el casquillo de aluminio sobre los bordes de la boca del vial. El casquillo no deberá abombarse, si esto sucediera, ajustar el tomillo de la engargoladora. 11. Llenar el formato de resultados de dosificación. 					
REFERENCIAS					
(1) Purificación (FPLC) (UIM-PP-06)					



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



ACONDICIONAMIENTO			PEO: PRODUCCION	
			UIM:PP-08	Pág.: 1 de 2
Escrito por: <i>Araceli Olguín</i> ARACELI OLGUÍN	Revisado por: <i>Carmen Maldonado</i> CARMEN MALDONADO	Aprobado por: <i>Dr. Armando Sibasi</i> DR. ARMANDO SIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO

Próxima revisión Noviembre de 1998

OBJETIVO

Describir el procedimiento adecuado para el acondicionamiento de los envases dosificados, con porinas de *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d.

ALCANCE

Este proceso involucra a todo el personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI asignado al proceso de producción.

POLÍTICAS

Es responsabilidad de todo el personal involucrado en el proceso seguir lo descrito en este procedimiento.

MATERIAL



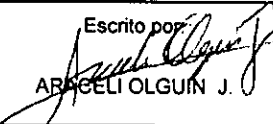
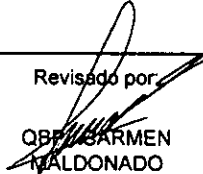
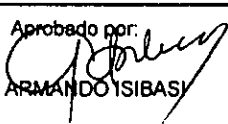






Etiquetas autoadheribles
Diurex
Tijeras
Regla
Cutter

MATERIAL BIOLÓGICO



Porinas de *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d para aplicación en humanos, dosificados en frascos ampula.

PROCEDIMIENTO

1. Imprimir la etiqueta con la siguiente información.
 - Logotipo del IMSS
 - Imagen cristalográfica de una porina
 - Descripción del Producto.
 - Dosis
 - Especificaciones del contenido del vial.
 - Número de lote.
 - Fecha de fabricación
 - Lugar de fabricación.
2. Colocar cuidadosamente sobre las etiquetas impresas una capa de Diurex.
3. Recortar las etiquetas dejando diurex extra en los bordes laterales y recortando al límite de la etiqueta en los bordes superior e inferior.
4. Adherir cuidadosamente la etiqueta al vial. Verificar que la información de la etiqueta corresponda al contenido del frasco..

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA				
ACONDICIONAMIENTO		PEO: PRODUCCION			
Escrito por:  MARCELI OLGUÍN J.		Revisado por:  QFB GARMEN MALDONADO			
Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI		UIM:PP-08 En vigor: Nov. 97	Pág.: 2 de 2 Sustituye a: NUEVO		
Próxima revisión Noviembre de 1998					
ETIQUETAS APROBADAS PARA CADA DOSIS					
	Porinas de <i>S. typhi</i> 9, 12, Vi:d 10 µg/dosis de 0.5 mL Frasco con 4 dosis Cada mL contiene: Porinas de <i>S. typhi</i> 20 µg Vehículo c.b.p. 1 mL Lote: L-S06/11/97 Fecha de fabricación: NOVIEMBRE DE 1997 Unidad de Investigación Médica en Inmunología			Porinas de <i>S. typhi</i> 9, 12, Vi:d 25µg/dosis de 0.5 mL Frasco con 4 dosis Cada mL contiene: Porinas de <i>S. typhi</i> 50 µg Vehículo c.b.p. 1 mL Lote: L-S06/11/97 Fecha de fabricación: NOVIEMBRE DE 1997 Unidad de Investigación Médica en Inmunología	
	Porinas de <i>S. typhi</i> 9, 12, Vi:d 50µg/dosis de 0.5 mL Frasco con 4 dosis Cada mL contiene: Porinas de <i>S. typhi</i> 100µg Vehículo c.b.p. 1 mL Lote: L-S06/11/97 Fecha de fabricación: NOVIEMBRE DE 1997 Unidad de Investigación Médica en Inmunología				
BIBLIOGRAFIA 1. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6a. Edición, México 1994; pag. 852.					

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
ALMACENAJE			PEO:PRODUCCION	
Escrito por: ARABELI OLGUIN J.			Revisado por: QEPHARMEN MALDONADO	Aprobado por: DR. ARMANDO ISIBASI
			UIM-PP-09	Pág: 1 de 1
			En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
Próxima revisión Noviembre de 1998				
OBJETIVO				
Describir el procedimiento adecuado para el almacenamiento del producto terminado.				
ALCANCE				
Este proceso involucra a todo el personal de la UIM en Inmunoquímica del CMN Siglo XXI asignado a la producción de un lote de porinas de <i>Salmonella typhi</i> 9, 12, Vi:d para inmunización de humanos.				
POLITICAS				
Es responsabilidad de todo el personal involucrado en este proceso seguir lo descrito en este procedimiento.				
MATERIAL				
Caja contenedora del producto terminado acondicionado.				
EQUIPO E INSTRUMENTOS				
Refrigerador a 4°C.				
REACTIVOS BIOLÓGICOS				
Porinas de <i>Salmonella typhi</i> 9, 12, Vi:d para inmunización en humanos acondicionado en su envase final.				
PROCEDIMIENTO				
<ol style="list-style-type: none"> 1. Colocar los frascos ampula dentro del contenedor, de tal manera que todos queden seguros y manteniendo separadas las diferentes dosis. 2. Introducir el contenedor al refrigerador verificando se encuentre a la temperatura de 4°C. 3. Mantener las muestras a esta temperatura hasta el momento de ser utilizadas. 				

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA		
CURVA DE CRECIMIENTO Y pH			PEO: CONTROL ANALITICO
			UIM: CA-04
			Pág: 1 de 2
Escrito por: <i>Araceli Olgún J.</i> ARACELI OLGÚN J.	Revisado por: <i>Q.B. Carmen Maldonado</i> Q.B. CARMEN MALDONADO	Aprobado por: <i>Dr. Armando Isibasi</i> DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97
			Sustituye a: NUEVO
Próxima revisión Noviembre de 1998			
<p>OBJETIVO Describir el procedimiento adecuado para elaboración de la curva de crecimiento durante el proceso de fermentación</p>			
<p>ALCANCE Este proceso involucra a todo el personal encargado del proceso de fermentación para la obtención de porinas de <i>Salmonella typhi</i> 9, 12, Vi:d.</p>			
<p>POLITICAS Es responsabilidad de todo el personal asignado a la producción seguir este procedimiento.</p>			
<p>MATERIAL Mechero 6 tubos de ensayo estériles Pipetas de 5 mL estériles Gradilla Piseta Celda de plástico Propipeta Espátula Algodón Papel suave Gasas Papel kraft Cinta testigo Recipiente para desechos Guantes Cubrebocas Papel para graficar.</p>			
<p>EQUIPO E INSTRUMENTOS Espectrofotómetro BECKMAN DU 640(2)</p>			
<p>MEDIO DE CULTIVO Medio mínimo "A" suplementado</p>			
<p>SOLUCIONES Hipoclorito de sodio 500 ppm.(4)</p>			
<p>PROCEDIMIENTO</p> <p>1. Todo el material deberá estar limpio y estéril según el procedimiento descrito (1). Antes de adicionar el inóculo a los matraces, tomar en condiciones asépticas una muestra de medio mínimo "A" de aproximadamente 4 mL, con la ayuda de una pipeta estéril, Esta muestra se utilizará como blanco para ajustar en el espectrofotómetro.</p>			



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



CURVA DE CRECIMIENTO y pH

PEO: CONTROL ANALITICO

UIM:CA-04

Pág: 2 de 2

Escrito por:

ARACELI OLGUIN J.

Revisado por:

QBP. ARMEN
MADONADO

Aprobado por:

DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:

Nov 97

Sustituye a:





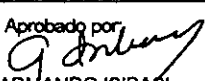
NUEVO

3. Medir el pH del medio sin inocular, introduciendo una tira reactiva en la alícuota tomada y comparando los cambios de coloración con el panel de lectura del empaque
4. Inmediatamente después de agregar el inóculo, tomar una muestra en las mismas condiciones que el punto 2. Leer la densidad óptica de la muestra en el espectrofotómetro a una densidad óptica de 540 nm. Efectuar la lectura de pH de la misma forma que el punto anterior y registrarla. Esta lectura se considera el tiempo "0" (t_0). Todos los desechos generados durante el lavado de la celda deberán colectarse en un recipiente que contenga hipoclorito de sodio 500 ppm.
5. Simultáneamente trazar una gráfica donde en el eje de las abscisas (x) se colocan los valores de tiempo (h), y en el eje de las ordenadas (y) los valores de absorbancia obtenidos.
6. Tomar cada hora en las mismas condiciones, muestras del mismo matraz de donde se tomaron las lecturas anteriores, registrarlas en la curva y en el formato de Curva de Crecimiento e introducirlas en la gráfica.
7. Efectuar la determinación de pH de cada lectura siguiendo las instrucciones del punto 3.
8. Registrar todos los datos obtenidos en este procedimiento en el formato de Curva de Crecimiento.

NOTA: Todo el material utilizado durante este procedimiento, deberá descontaminarse (3).

REFERENCIAS

- (1) Preparación, Esterilización y Despirogenización de Material (UIM-PG-02)
- (2) Espectrofotómetro BECKMAN (UIM-PO-07)
- (3) Descontaminación y lavado de material (UIM-PG-01)

	CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA			
CUENTA VIABLE			PEO: CONTROL	
			UIM-CA-19	Pág.: 1 de 2
Escrito por:  OLIVIA PORTILLO	Revisado por:  QBP CARMEN MALDONADO	Aprobado por:  DR. ARMANDO ISIBASI	En vigor: Nov. 97	Sustituye a: NUEVO
Próxima revisión Noviembre 1998				
<p>OBJETIVO Establecer el protocolo mediante el cual se realizará la cuenta viable de la cepa semilla de <i>S. typhi</i>.</p> <p>ALCANCE Este procedimiento involucra al personal de la UIM-Inmunoquímica del CMN Siglo XXI del IMSS designado a la producción.</p> <p>POLITICAS Es responsabilidad de las personas que realicen la cuenta viable el cumplir con lo indicado en este procedimiento.</p> <p>MATERIAL Pipetas graduadas de vidrio de 2 mL, estériles Pipetas graduadas de vidrio de 10 mL, estériles Propipeta eléctrica Mechero 12 tubos de ensaye de vidrio de 16 x 150 con tapón de rosca, estériles 1 gradilla para tubos de ensaye 8 cajas Petri desechables, de 15 x 100 mm, estériles</p> <p>MEDIO DE CULTIVO 200 mL de medio TSA estéril (1)</p> <p>SOLUCIONES 200 mL de solución salina isotónica, estéril</p> <p>EQUIPO Incubadora a 37°C</p> <p>PROCEDIMIENTO</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Trabajar en condiciones asépticas cerca del mechero. 2. Agregar 9.0 mL de solución salina a cada uno de 12 tubos de ensaye utilizando una pipeta de vidrio estéril de 10 mL. Numerar los tubos de 1×10^{-1} a 1×10^{-12}. 3. Tomar 1.0 mL de la cepa semilla con una pipeta de vidrio estéril de 2 mL y agregarlos al primer tubo de ensaye (1×10^{-1}), homogeneizar con la pipeta. 4. Tomar 1.0 mL de la dilución anterior y agregarlos al siguiente tubo (1×10^{-2}), homogeneizar con vortex o por inversión 8 veces. 5. Realizar las siguientes diluciones como se indica en el paso anterior hasta llegar a la dilución de 1×10^{-12}. 6. Tomar 1.0 mL de las diluciones de 1×10^{-8} a 1×10^{-12} y colocarlos en cajas Petri, hacer esto por duplicado. 7. Verter 20 mL de medio TSA a 45°C sobre el mL de dilución de <i>S. typhi</i> en cada una de las cajas Petri. Inmediatamente después de agregar el medio a cada caja, agitar sobre la superficie de la mesa de trabajo girando 10 veces en el sentido de las manecillas del reloj, 10 veces en contra de las manecillas del reloj y 10 veces hacia adelante y hacia atrás. 				



CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA



CUENTA VIABLE

PEO: CONTROL

UIM-CA-19

Pág.: 2 de 2

Escrito por:
Olivia Portillo
OLIVIA PORTILLO

Revisado por:
QBP Carmen Maldonado
QBP CARMEN
MALDONADO

Aprobado por:
Dr. Armando Isibasi
DR. ARMANDO ISIBASI

En vigor:
Nov. 97

Sustituye a:
NUEVO

8. Dejar solidificar durante 30 minutos cerca del mechero.
9. Verter 20 mL de medio TSA a 45°C en 4 cajas Petri vacías como controles.
10. Incubar todas las cajas a 37°C durante 48 horas.
11. Contar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en cada caja.
12. Calcular el promedio de las UFC de los duplicados en cada dilución.
13. Multiplicar el valor promedio por la dilución correspondiente a la menos uno, esto es:

$$\text{UFC}/1.0 \text{ mL} = \text{valor promedio} \times (1/1 \times 10^0)$$

donde x = dilución correspondiente

14. Llenar el formato de resultados de Cuenta Viable.

REFERENCIAS

- (1) Preparación de medios de cultivo (UIM-PG-07)

BIBLIOGRAFIA

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6ª Edición, México D.F., 1994, pp. 301-302.

V. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la elaboración de cualquier producto biológico deberán registrarse en formatos específicos para el proceso involucrado y firmarse tanto por el operador como por el supervisor.

1. Acondicionamiento de las Areas de Producción y Purificación/Dosificación

Las áreas de producción y purificación/dosificación se acondicionaron con recubrimiento epóxico en techos, paredes y pisos y con terminaciones sanitarias en las uniones techo-pared, pared-pared y pared-piso. Todas las ventanas se cancelaron y se sellaron con silicón. Todos los ductos de aire se cancelaron con plástico cristal y se sellaron con silicón. Se construyó un túnel de acceso, también con plástico cristal, que sirvió tanto de trampa de aire como de área de vestido.

Los muebles se lavaron y pintaron. Se retiró el equipo no utilizado dentro del proceso (a excepción de los fermentadores). El material y equipo involucrado en el proceso se distribuyó acorde al flujo de la producción.

2. Programa de Sanitización de las Areas de Producción y Purificación/Dosificación

Se realizó un monitoreo ambiental microbiológico (PEO clave UIM-PG-03) en las áreas de producción y purificación/dosificación previo al acondicionamiento y a la construcción del túnel de acceso y, por lo tanto, previo a la sanitización. Después del acondicionamiento y de la construcción del túnel de acceso, se realizaron dos sanitizaciones (PEO clave UIM-PG-05), la primera utilizando hipoclorito de sodio 500 ppm como sanitizante y la segunda utilizando cloruro de benzalconio al 1% (los formatos de dichos resultados se muestran en las siguientes páginas).

El monitoreo realizado previo al acondicionamiento muestra un mínimo de 0 colonias por caja y un máximo de 46 (pág. 79), presentándose una mayor incidencia de colonias en las cajas colocadas cerca de las entradas y debajo de los ductos de aire.

El primer monitoreo realizado después de la sanitización con hipoclorito de sodio 500 ppm muestra una clara disminución en la contaminación ambiental (pág. 80). De las 40 cajas colocadas para el monitoreo, 25 no presentaron crecimiento, 11 presentaron una colonia y 3 cajas presentaron 2 colonias.

En el monitoreo realizado después de la sanitización con cloruro de benzalconio al 1% (pág. 81), también se observó una marcada disminución de la contaminación ambiental. De las 40 cajas colocadas 26 no presentaron crecimiento, 12 presentaron una colonia y 2 cajas presentaron 2 colonias.

No fue de nuestro interés indagar sobre el tipo de microorganismos contaminantes en este paso del proceso. El propósito fue el de evaluar si los sanitizantes y el proceso de sanitización implementados eran los adecuados para disminuir la contaminación microbiana a niveles adecuados para la producción.

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

MONITOREO AMBIENTAL MICROBIOLOGICO

FECHA: 19/Jun/97

LOTE: L-S06/11/97

PROCESO: Monitoreo de las áreas de producción y purificación/dosificación previo al acondicionamiento y a la construcción del túnel de acceso.

No. de Caja	No. de Colonias	Observaciones	No. de Caja	No. de Colonias	Observaciones
1	46	43 (L, reg), 3 (L, irreg)	21	20	L, reg
2	5	4(L, reg), 1(L, irreg)	22	5	"
3	8	L, reg	23	8	"
4	7	"	24	10	9(L, reg), 1H
5	4	"	25	17	L, reg
6	17	"	27	0	
7	14	"	28	1	L, irreg
8	23	"	29	1	L, irreg
9	4	"	31	1	L, irreg
10	8	"	32	1	L, irreg
11	12	"	33	4	3(L, irreg), 1H
12	4	"	35	0	
13	3	"	36	1	L, irreg
14	1	"	37	6	L, irreg
15	6	"	38	16	15(L, irreg), 1(H)
16	14	12(L, reg), 2(L, irreg)	41*	0	
17	6	4(L, reg), 1(L, irreg), 1H	42*	0	
18	5	L, irreg	43*	0	
19	5	L, reg	44*	0	
20	4	"	45*	0	

REALIZO:

SUPERVISO:

Abreviaciones: bca (blanca), ama (amarilla), L (lisa), R (rugosa), cre (cremosa), peq (pequeña), gde (grande), med (mediana), irreg (bordes irregulares), reg (bordes regulares), H (hongo filamentoso)

* CONTROL (SIN EXPOSICION)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

MONITOREO AMBIENTAL MICROBIOLOGICO

FECHA: 21/Sep/97

LOTE: L-S06/11/97

PROCESO: Sanitización de las áreas de producción y purificación/dosificación con hipoclorito de sodio 500 ppm

No. de Caja	No. de Colonias	Observaciones	No. de Caja	No. de Colonias	Observaciones
1	0		24	0	
2	0		25	1	bca, L, reg, peq
3	1	ama, L, reg, peq	26	0	
4	1	bca, L, reg, peq	27	1	bca, L, reg, gde
5	1	bca, L, reg, gde	28	0	
6	0		29	0	
7	0		30	1	ama, L, reg, peq
8	0		31	0	
9	0		32	0	
10	2	bca, L, reg, peq	33	0	
11	0		34	0	
12	1	bca, L, reg, peq	35	0	
13	0		36	1	bca, L, reg, peq
14	1	bca, L, reg, gde	37	0	
15	0		38	2	bca, L, reg, peq
16	0		39	2	bca, L, reg, gde
17	1	bca, L, reg, gde	40	1	ama, R, irreg, peq
18	0		41*	0	
19	0		42*	0	
20	0		43*	0	
21	0		44*	0	
22	0		45*	0	
23	1	bca, L, reg, gde			

REALIZO: 

SUPERVISO: 

Abreviaciones: bca (blanca), ama (amarilla), L (lisa), R (rugosa), cre (cremosa), peq (pequeña), gde (grande), med (mediana), b.irreg (bordes irregulares)

- CONTROL (SIN EXPOSICION)

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
 AREA DE PRODUCCION
MONITOREO AMBIENTAL MICROBIOLÓGICO

FECHA: 28/Sep/97

LOTE: L-S06/11/97

PROCESO: Sanitización de las áreas de producción y purificación/dosificación con cloruro de benzalconio al 1%

No. de Caja	No. de Colonias	Observaciones	No. de Caja	No. de Colonias	Observaciones
1	0		24	1	bca, L, reg
2	1	bca, L, reg	25	2	1(bca, L, reg), 1(bca, L, irreg)
3	0		26	0	
4	0		27	1	ama, L, reg, peq
5	1	bca, L, reg, gde	28	0	
6	1	bca, L, reg, peq	29	0	
7	0		30	1	ama, L, reg, peq
8	0		31	1	bca, L, reg, peq
9	0		32	0	
10	0		33	0	
11	0		34	0	
12	0		35	0	
13	0		36	0	
14	1	bca, L, irreg, peq	37	1	bca, L, reg, gde
15	1	bca, L, irreg, peq	38	0	
16	0		39	0	
17	1	bca, L, reg, gde	40	1	bca, R, irreg, peq
18	0		41*	0	
19	0		42*	0	
20	0		43*	0	
21	0		44*	0	
22	0		45*	0	
23	2	1(bca, L, reg, peq), 1(ama, L, peq)			

REALIZO: SUPERVISO: 

Abreviaciones: bca (blanca), ama (amarilla), L (lisa), R (rugosa), cre (cremosa), peq (pequeña),
 gde (grande), med (mediana), b.irreg (bordes irregulares)

* CONTROL (SIN EXPOSICION)

3. Resultados del Proceso de Producción del Lote de Vacuna Contra la Fiebre Tifoidea a Base de Porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d (Lote L-S06/11/97)

3.1. Control en Proceso

3.1.1. Características macroscópicas, microscópicas, bioquímicas y serológicas de la cepa semilla (pág. 83).

La cepa de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d (cepa de trabajo) se produjo a partir de la cepa semilla la cual se obtuvo de la cepa 9993 de la ATCC (PEO clave UIM-PP-01). En los resultados de la caracterización (UIM-CA-01, 02 y 03) de dicha cepa observamos que se trata de un bacilo Gram negativo, que presenta colonias negras lisas en medio XLD y en Sulfito de bismuto, que es ácido sulfhídrico positivo, glucosa positivo, lactosa negativo, indol negativo, movilidad negativo, citrato negativo, ornitina negativo y que presenta los antígenos O:D, Vi y H:d.

3.1.2. Pesada de materia prima y preparación de medio mínimo "A" y suplementos (pág. 84).

En este formato de resultados se muestran las cantidades y tipo de materia prima pesada para la producción del medio mínimo "A" suplementado utilizado para la obtención de la biomasa del lote L-S06/11/97 (UIM-PP-10).

3.1.3. Monitoreo ambiental microbiológico del área de producción (pág. 85)

Aquí observamos los resultados del monitoreo ambiental microbiológico (UIM-PG-03) llevado a cabo en el área de producción para obtener el lote L-S06/11/97. Nos encontramos con un máximo de 1 colonia por caja en 6 cajas de las 40 colocadas en el área.

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

**CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS, MICROSCOPICAS, BIOQUIMICAS Y
SEROLOGICAS (CEPA SEMILLA)**

CEPA SEMILLA: *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, ATCC No. 9993 FECHA: 13/Jul/97
LOTE: L-S06/11/97

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS

No. de Caja	Medio de Cultivo	Observaciones				
		1	2	3	4	5
1	Sulfito de Bismuto	Col. negras, halo transparente	Col. negras, halo transparente	Col. negras, halo transparente	Col. negras, halo transparente	Col. negras, halo transparente
2	XLD	Col. negras,	Col. negras,	Col. negras,	Col. negras,	Col. negras,

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS

Observaciones				
1	2	3	4	5
bacilos cortos, Gram negativos	bacilos cortos, Gram negativos	bacilos cortos, Gram negativos	bacilos cortos, Gram negativos	bacilos cortos, Gram negativos

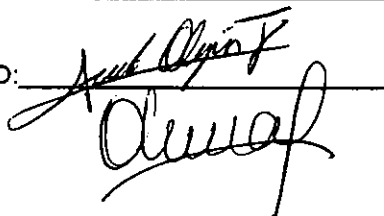
CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

MEDIO DE CULTIVO	PRUEBA BIOQUIMICA	RESULTADO				
		1	2	3	4	5
MIO	MOVILIDAD	-	-	-	-	-
	INDOL	-	-	-	-	-
	ORNITINA	-	-	-	-	-
TSI	GLUCOSA	+	+	+	+	+
	LACTOSA	-	-	-	-	-
	H ₂ S	+	+	+	+	+
CITRATO DE SIMMONS	CITRATO	-	-	-	-	-

CARACTERISTICAS SEROLOGICAS

ANTIGENO	GRADO DE AGLUTINACION				
	1	2	3	4	5
PRESUNTIVO O:D	++	++	++	++	++
CONFIRMATIVO O:D	+++	+++	+++	+++	+++
PRESUNTIVO Vi	++	++	++	++	++
CONFIRMATIVO Vi	+++	+++	+++	+++	+++
H:d	++	++	++	++	++

REALIZO:



SUPERVISO:



UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

**PESADA DE MATERIA PRIMA Y PREPARACION DE MEDIO MINIMO "A" Y
SUPLEMENTOS**

FECHA: 20/Nov/97

LOTE: L-S06/11/97

CULTIVO EN: 6 matraces Erlenmeyer de 4L

MEDIO MINIMO "A"

MATERIA PRIMA	PESO PARA 1L (g)	PESO PARA 9.270 L (g)	PESO REAL (g)
K_2HPO_4	7	64.89	64.9007
KH_2PO_4	3	27.81	27.8200
$(NH_4)_2SO_4$	1	9.27	9.2738
Citrato de Sodio	0.5	4.63	4.6321

EXTRACTO DE LEVADURA

PESO PARA 100 mL (g)	PESO PARA 200 mL (g)	PESO REAL (g)
5	10	10.0033

GLUCOSA

PESO PARA 100 mL (g)	PESO PARA 400 mL (g)	PESO REAL (g)
12.5	50	50.0008

SULFATO DE MAGNESIO

PESO PARA 100 mL (g)	PESO PARA 40 mL (g)	PESO REAL (g)
25	10	10.0017

PREPARACION DE MEDIO MINIMO "A" SUPLEMENTADO

SOLUCION	VOL. PARA INOCULO (mL)	VOL. PARA CULTIVO (mL)
MM"A"	842.4	8,424
EXT. DE LEVADURA 5%	18	180
GLUCOSA 12.5%	36	360
$MgSO_4$ 25%	3.6	36
VOLUMEN TOTAL (mL)	900	9000

REALIZO: 

SUPERVISO: 

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

MONITOREO AMBIENTAL MICROBIOLÓGICO

FECHA: 22/Nov/97

LOTE: L-S06/11/97

PROCESO: Sanitización con hipoclorito de sodio, 500 ppm, área de producción

No. de Caja	No. de Colonias	Observaciones	No. de Caja	No. de Colonias	Observaciones
1	0		24	1	bca., cre., L, peq.
2	0		25	0	
3	1	bca., R, b.irreg.,	26	0	
4	0		27		
5	0		28		
6	0		29		
7	0		30		
8	0		31		
9	1	bca., cre., L, peq.	32		
10	0		33		
11	1	bca., cre., L, peq.	34		
12	0		35		
13	0		36		
14	0		37		
15	0		38		
16	0		39		
17	1	bca., cre., L, peq.	40		
18	0		41*	0	
19	1	ama., cre., L, peq.	42*	0	
20	0		43*	0	
21	0		44*	0	
22	0		45*	0	
23	0				

REALIZO: 

SUPERVISO: 

Abreviaciones: bca (blanca), ama (amarilla), L (lisa), R (rugosa), cre (cremosa), peq (pequeña),
gde (grande), med (mediana), b.irreg (bordes irregulares)

* CONTROL (SIN EXPOSICION)

3.1.4. Curva de crecimiento, pH y cantidad de biomasa obtenida del cultivo de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d en medio mínimo "A" suplementado (pág. 87-88).

Los inóculos se cultivaron en 6 matraces de 1 L cada uno con 150 mL de medio mínimo "A" suplementado, después de 4 horas de incubación, se agregaron a 6 matraces Erlenmeyer de 4 L cada uno con 1.5 L de medio mínimo "A" suplementado (PEO clave UIM-PP-02). Se tomó una muestra cada hora y el cultivo se detuvo al comenzar la fase estacionaria (gráfica 1, pág. 88) (PEO clave UIM-CA-04). A cada una de las muestras, incluyendo las del inóculo, se les determinó el pH por medio de tira reactiva (PEO clave UIM-CA-11).

Posteriormente el cultivo se cosechó por medio de centrifugación y se determinó la cantidad de biomasa húmeda obtenida (PEO clave UIM-PP-03).

3.1.5. Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas del cultivo de producción (pág. 89).

Podemos observar que el cultivo mantiene las mismas características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas que la cepa semilla.

3.1.6. Ruptura de bacteria (pág. 90)

La ruptura de bacteria se llevó a cabo en un molino de células con perlas de vidrio (PEO clave UIM-PP-04). Se realizaron 17 ciclos de 2 minutos de rompimiento por 3 minutos de descanso hasta obtener un color grisáceo característico. Al realizar un frotis y tinción de gram (PEO clave UIM-CA-01) de la suspensión de bacterias rotas, se observaron muy pocas bacterias completas y una gran cantidad de bacterias rotas.

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

CURVA DE CRECIMIENTO

FECHA: 22/Nov/97

LOTE: L-S06/11/97

CULTIVO EN: 6 matraces Erlenmeyer de 4L, cada uno con 1.5L de MM"A" suplementado

INOCULO

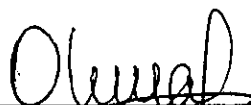
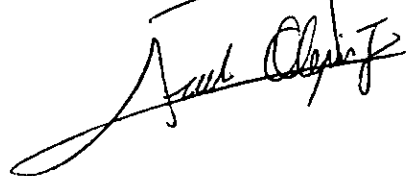
TIEMPO DE MUESTREO (h)	ABSORBANCIA (540 nm)	pH
0	0.1906	7.5
FINAL	0.9821	6.5

CULTIVO


TIEMPO DE MUESTREO (h)	ABSORBANCIA (540 nm)	pH
0	0.1369	7.5
1	0.2649	7.0
2	0.5555	7.0
3	0.7604	6.5
4	0.8247	6.0
5	0.8288	5.0

PESO DE BIOMASA HUMEDA: 25.8 g

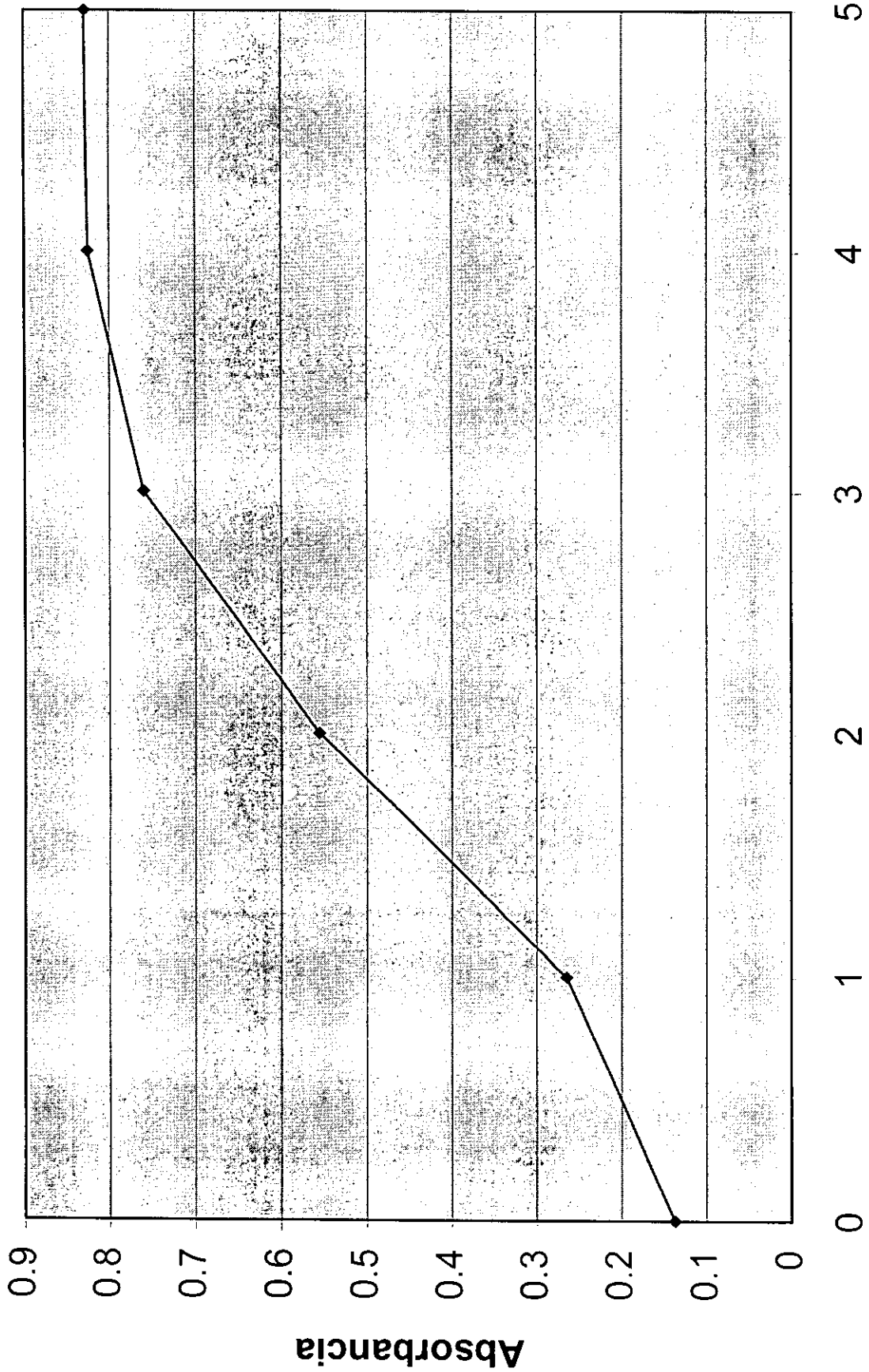
REALIZO:

SUPERVISO:



Curva de Crecimiento
***Salmonella typhi* 9, 12 Vi: d.**
L-SO6/11/97 Fecha 22/Nov/97 540 nm.



UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

**CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS, MICROSCOPICAS Y BIOQUIMICAS
(PRODUCCION)**

CEPA SEMILLA: *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, ATCC 9993
LOTE: L-S06/11/97

FECHA: 23/11/97

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS

No. de Caja	Medio de Cultivo	Observaciones		
		1*	2*	3*
1	Sulfito de Bismuto	Col. negras, halo transparente	Col. negras, halo transparente	Col. negras, halo transparente
2	XLD	Col. negras	Col. negras	Col. negras

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS

Observaciones		
1*	2*	3*
Bacilos Gram negativos, cortos, agrupados en empalizadas	Bacilos Gram negativos, cortos, agrupados en empalizadas	Bacilos Gram negativos, cortos, agrupados en empalizadas

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

MEDIO DE CULTIVO	PRUEBA BIOQUIMICA	RESULTADO		
		1*	2*	3*
MIO	MOVILIDAD	-	-	-
	INDOL	-	-	-
	ORNITINA	-	-	-
TSI	GLUCOSA	+	+	+
	LACTOSA	-	-	-
	H ₂ S	+	+	+
CITRATO DE SIMMONS	CITRATO	-	-	-

REALIZO: _____

SUPERVISO: _____

1* DILUCION DE CEPA SEMILLA

2* INOCULO

3* FERMENTADOR Y/O MATRACES ERLNMEYER

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

RUPTURA DE BACTERIA

FECHA: 23/Nov/97

MICROORGANISMO: *S. typhi* 9,12,Vi:d, ATCC No. 9993

LOTE: L-S06/11/97

VOL. BIOMASA: 100 mL VOL. PERLAS: 60 cm³

CICLO	RUPTURA (min)	DESCANSO (min)	TEMP. (°C)	CICLO	RUPTURA (min)	DESCANSO (min)	TEMP. (°C)
0	2	3	5.6	11	2	3	4.9
1	2	3	6.0	12	2	3	4.9
2	2	3	6.1	13	2	3	4.8
3	2	3	5.9	14	2	3	4.8
4	2	3	5.7	15	2	3	4.7
5	2	3	5.6	16	2	3	4.7
6	2	3	5.3	17	2	3	4.7
7	2	3	5.2				
8	2	3	5.1				
9	2	3	5.0				
10	2	3	4.9				

OBSERVACION MICROSCOPICA DE RUPTURA (100x): Se observaron bacterias rotas, teñidas color safranina y algunas bacterias completas.

OBSERVACIONES GENERALES DEL PROCESO: Se efectuaron más de 12 ciclos debido al color de la biomasa.

REALIZO:

SUPERVISO:

3.1.7 Monitoreo de extracción de porinas (pág. 93)

La extracción de porinas se llevó a cabo por el método de Nikaido (PEO clave UIM-PP-05). Se realizó un gel de poliacrilamida con tinción de Coomassie (PEO clave UIM-CA-05) de los sobrenadantes de los diferentes pasos del proceso para monitorear las diferentes proteínas extraídas en cada uno y la pureza del producto final. En el segundo carril observamos el sobrenadante del lavado con Tris-HCL pH 7.7 en donde casi no se observa la presencia de proteínas; en el tercer carril encontramos el sobrenadante de la primera extracción con Tris-HCl-SDS 2% en donde observamos una gran variedad de proteínas de diferentes pesos moleculares; en el cuarto carril encontramos la segunda extracción con Tris-HCl-SDS 2% en donde tampoco se observan muchas proteínas; y por último, en los carriles cinco y seis observamos los sobrenadantes de la extracción con solución de Nikaido (sin purificar y purificado respectivamente), en donde se observa únicamente la doble banda de peso molecular correspondiente a las porinas.

3.1.8 Monitoreo ambiental microbiológico del área de purificación (pág. 94)

En el monitoreo ambiental realizado en el área de purificación (PEO clave UIM-PG-03) observamos 10 cajas sin desarrollo microbiano, 3 cajas con 1 colonia y 1 caja con 2 colonias.

3.1.9 Purificación de porinas por FPLC, absorbancia a 260/280 nm y pH (pág. 95-96)

Las porinas extraídas por el método de Nikaido se purificaron empleando una columna FPLC (PEO clave UIM-PP-06). En la gráfica 2 (pág. 96) se presenta el perfil cromatográfico de la purificación de porinas a 280 nm. La fracción que eluyó inmediatamente después del volumen vacío corresponde a las porinas, esto se comprobó con el corrimiento electroforético de dicha fracción en el carril 5 del gel mostrado anteriormente (pág. 93), en el observamos dos bandas proteicas que presentan un corrimiento relativo electroforético de 38 Kd a 41 Kd, característico de las porinas.

El DNA y el RNA se eliminaron agregando DNAasa y RNAasa inmediatamente después de la ruptura de la biomasa, en los resultados observamos que ambas disminuyeron considerablemente después de la purificación.

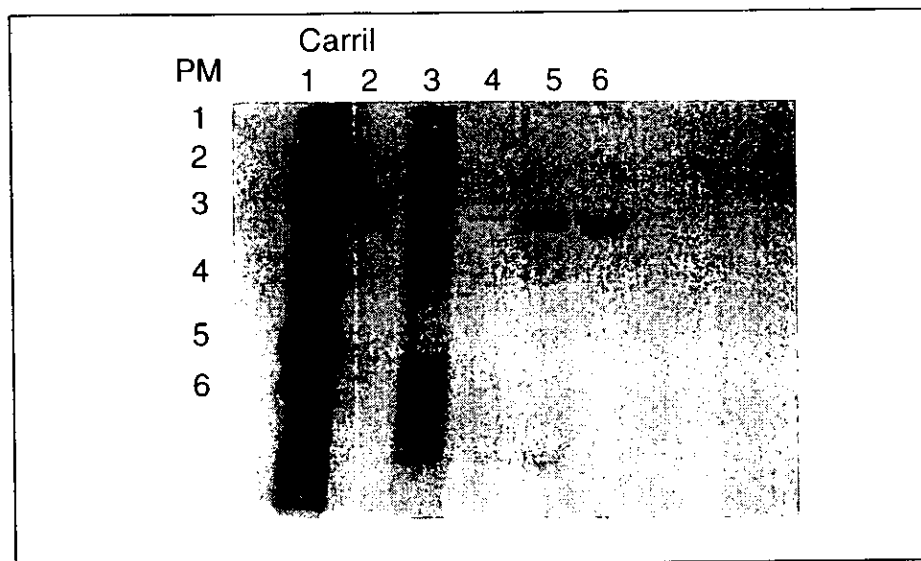
El pH se obtuvo por tira reactiva, aquí observamos que éste no es modificado en forma importante por el proceso de purificación.

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

MONITOREO DE EXTRACCION DE PORINAS (PAGE-SDS)

FECHA: 24/Nov/97

LOTE: L-S06/11/97



No. DE CARRIL	MUESTRA
1	Marcadores Moleculares
2	Lavado con Tris-HCl pH 7.7, 15 μ L de muestra
3	1er extracción, Tris-HCl-SDS 2%, 15 μ L de muestra
4	2da extracción, Tris-HCl-SDS 2%, 15 μ L de muestra
5	Extracción con Nikaido, 15 μ L de muestra (porinas sin purificar)
6	Producto a Granel, 15 μ L de muestra (porinas purificadas)

NUMERO	MARCADOR	PESO MOLECULAR
1	Albúmina bovina de plasma	66,000
2	Albúmina de huevo	45,000
3	Pepsina	34,700
4	Tripsinógeno	24,000
5	β -Lactoglobulina	18,400
6	Lisosima	14,300

REALIZO: _____

[Handwritten signature]

SUPERVISO: _____

[Handwritten signature]

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

MONITOREO AMBIENTAL MICROBIOLÓGICO

FECHA: 22/Nov/97

LOTE: L-S06/11/97

PROCESO: Sanitización con hipoclorito de sodio 500 ppm, área de purificación

No. de Caja	No. de Colonias	Observaciones	No. de Caja	No. de Colonias	Observaciones
1			24		
2			25		
3			26		
4			27	1	bca., cre., L, med.
5			28	0	
6			29	0	
7			30	0	
8			31	1	ama., cre., b. irreg.
9			32	0	
10			33	0	
11			34	0	
12			35	0	
13			36	1	bca., cre., L, gde.
14			37	0	
15			38	0	
16			39	2	bcas., peq., L, b. irreg.
17			40	0	
18			41*	0	
19			42*	0	
20			43*	0	
21			44*	0	
22			45*	0	
23					

REALIZO: _____

SUPERVISO: _____

Abreviaciones: bca (blanca), ama (amarilla), L (lisa), R (rugosa), cre (cremosa), peq (pequeña),
gde (grande), med (mediana), b.irreg (bordes irregulares)

* CONTROL (SIN EXPOSICION)

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

**PURIFICACION DE PORINAS POR FPLC, ABSORBANCIA A 260/280 nm
Y pH**

FECHA: 24/Nov/97

LOTE: L-S06/11/97

PURIFICACION

VOLUMEN DE INYECCION: 22 mL
VELOCIDAD DE FLUJO: 10 mL/min.
SENSIBILIDAD DE DETECTOR: 0.1
VELOCIDAD DE PAPEL DEL GRAFICADOR: 2 mm/min.

Picos de Cromatograma	Absorbancia máxima (detector)	Volumen (mL)	Tiempo (minutos)
No. 1	0.103	aprox. 130 mL	21
No. 2	0.011	aprox. 60 mL	35
No. 3	0.259	aprox. 120 mL	45
No. 4	0.089	aprox. 60 mL	58

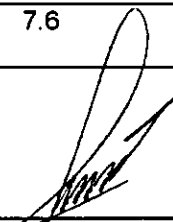
ABSORBANCIA A 260/280 nm

MUESTRA	ABS. 260nm	ABS. 280nm
SIN PURIFICAR	1.5272	2.0331
PURIFICADA	0.0644	0.1375

pH

MUESTRA	pH
SIN PURIFICAR	7.7
PURIFICADA	7.6

REALIZO: 

SUPERVISO: 

Purificación de porinas por FPLC

29/Nov/97 Lote L-S06/11/97

Vol. de inyec = 22 mL

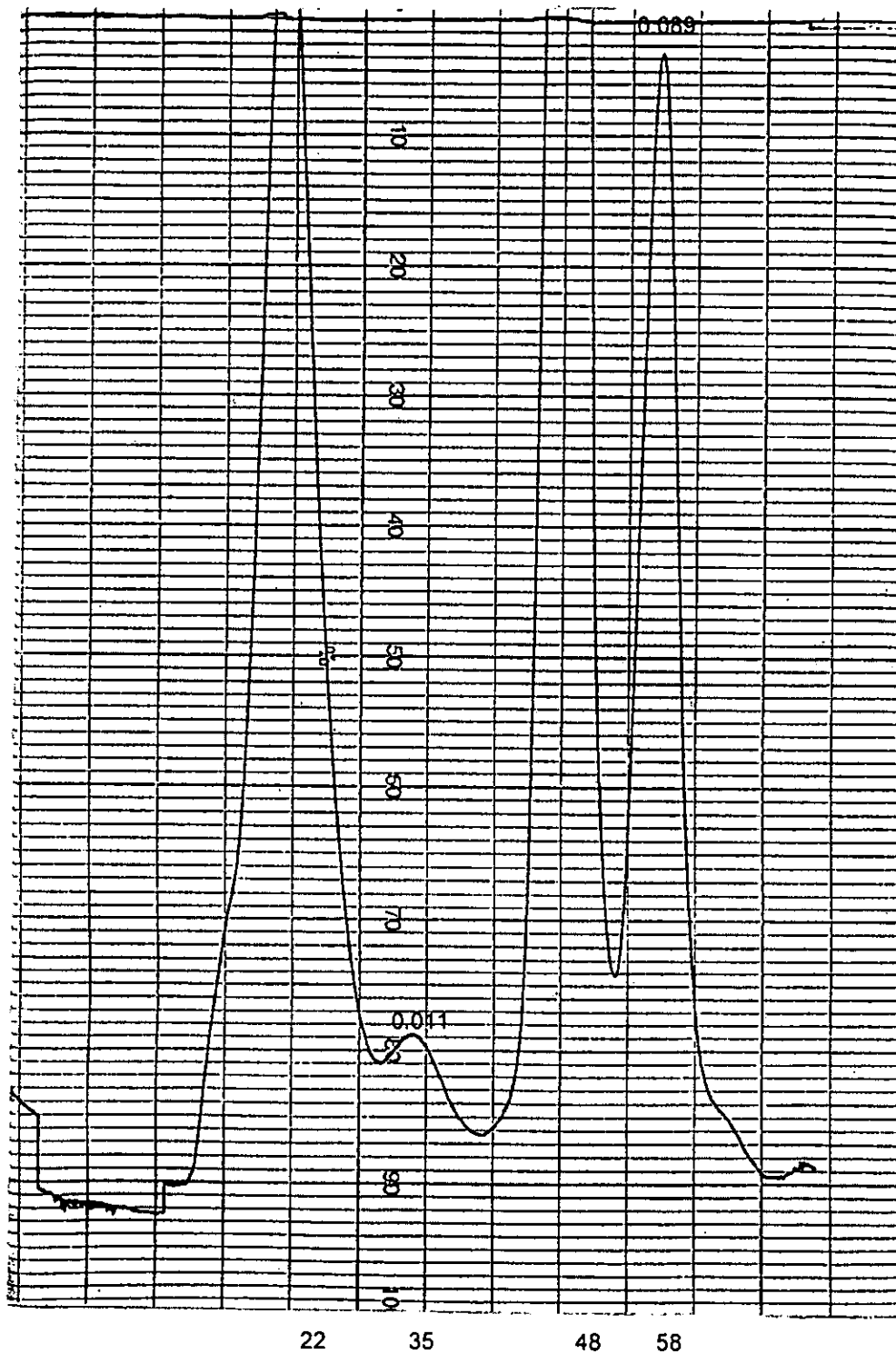
Sensibilidad: 0.1

Vel. de flujo = 10 mL/min

Velocidad del papel: 2 mm/min

0.103

0.259

Absorbancia

22

35

48

58

Tiempo (minutos)

3.2 Control de Producto a Granel

3.2.1 Monitoreo de eliminación de LPS por medio de tinción de plata (pág.98)

Para monitorear visualmente la eliminación de LPS durante los procesos de extracción y purificación, se realizó un corrimiento electroforético (PEO clave UIM-CA-05) de los sobrenadantes en cada uno de los pasos involucrados en los procesos anteriores. Posteriormente el gel fue revelado por el método de tinción de plata (PEO clave UIM-CA-05). En el observamos que una gran parte del LPS fue eliminado en la primera extracción con Tris-HCl-SDS 2% y en menor cantidad en la segunda extracción con Tris-HCl-SDS 2%, el resto, extraído junto con las porinas en el método de Nikaido fue eliminado, casi en su totalidad, en la purificación por FPLC.

3.2.2. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry y rendimiento del producto a granel (pág. 99-101)

Para determinar la concentración de porinas en el producto a granel se llevó a cabo el método de determinación de proteínas de Lowry en el cual se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) que presentó un coeficiente de correlación de 0.9945 (PEO clave UIM-CA-07). La concentración se obtuvo por intrapolación en dicha curva y fue de 192 µg/mL con un rendimiento del 96%.

3.2.3. Antigenicidad del producto a granel (pág. 102-103)

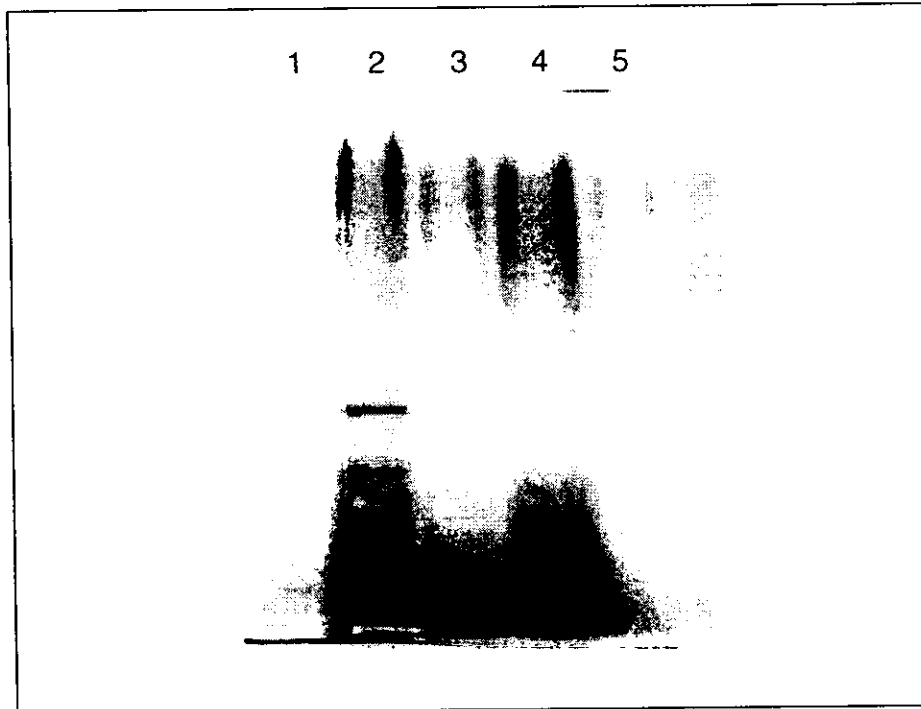
Para poder determinar la capacidad de las porinas de ser reconocidas por un anticuerpo dirigido contra ellas, se realizó una ELISA (PEO clave UIM-CA-10) en donde se fijaron diluciones seriadas de porinas como antígeno, posteriormente se agregó una dilución seriada de suero de conejo previamente inmunizado con porinas de *S. typhi* y se reveló con un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa. En la gráfica 3 (pág. 103) observamos que los anticuerpos del suero de conejo inmunizado con porinas reconocen a las porinas fijadas en la placa.

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

TINCION DE PLATA

FECHA: 04/Dic/97

LOTE: L-S06/11/97



No. DE CARRIL	MUESTRA
1	Lavado con Tris-HCl pH 7.7, 15 μ L de muestra
2	1ra extracción con Tris-HCl-SDS 2%, 15 μ L de muestra
3	2da extracción con Tris-HCl-SDS 2%, 15 μ L de muestra
4	Porinas de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d sin purificar, 15 μ L de muestra
5	Producto a granel, Porinas de <i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d purificadas, 15 μ L de muestra

REALIZO: _____

SUPERVISO: _____

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

**CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY Y RENDIMIENTO
PRODUCTO A GRANEL**

Pág. 1 de 2

FECHA: 24/Nov/97

LOTE: L-S06/11/97

ALBUMINA

PESO REAL: 0.6256 g

PORCIENTO DE NITROGENO: 15.6%

PORCIENTO DE HUMEDAD: 1.1%

LOTE: 42H0018

CURVA PATRON*

µg DE ASB	µg REALES DE ASB	TUBO	ABSORBANCIA	PROMEDIO	AJUSTE A CERO
0	0	2	0.0550	0.0584	0.0
		3	0.0610		
		4	0.0592		
20	20.0192	5	0.3020	0.3142	0.2558
		6	0.3207		
		7	0.3200		
30	30.0288	8	0.4489	0.4483	0.3899
		9	0.4480		
		10	0.4479		
40	40.0384	11	0.5789	0.5626	0.5042
		12	0.5461		
		13	0.5629		
50	50.0480	14	0.6237	0.6250	0.5666
		15	0.6241		
		16	0.6272		
60	60.0576	17	0.7336	0.7359	0.6775
		18	0.7442		
		19	0.7298		
70	70.0672	20	0.8285	0.8211	0.7627
		21	0.8078		
		22	0.8269		

COEFICIENTE DE CORRELACION: 0.9945

PENDIENTE: 0.0108

ORDENADA AL ORIGEN: 0.0350

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

**CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY Y RENDIMIENTO
PRODUCTO A GRANEL**

Pág. 2 de 2

FECHA: 24/Nov/97

LOTE: L-S06/11/97

MUESTRA

ABSORBANCIA	TUBO	SIN PURIFICAR		PURIFICADO	
		50 μ L	100 μ L	50 μ L	100 μ L
	1	0.6231	1.0025	0.1825	0.3172
	2	0.6637	1.0137	0.1799	0.2918
	3	0.6265	1.0298	0.1769	0.3154
PROMEDIO		0.6378	1.0153	0.1798	0.3081
AJUSTE POR BLANCO		0.5794	0.9569	0.1214	0.2497
μ g DE ASB POR INTRAPOLACION EN LA CURVA		50.52	/	/	19.93
CONCENTRACION DE ASB POR FORMULA (mg/ml)		0.974	/	/	0.1922

RENDIMIENTO

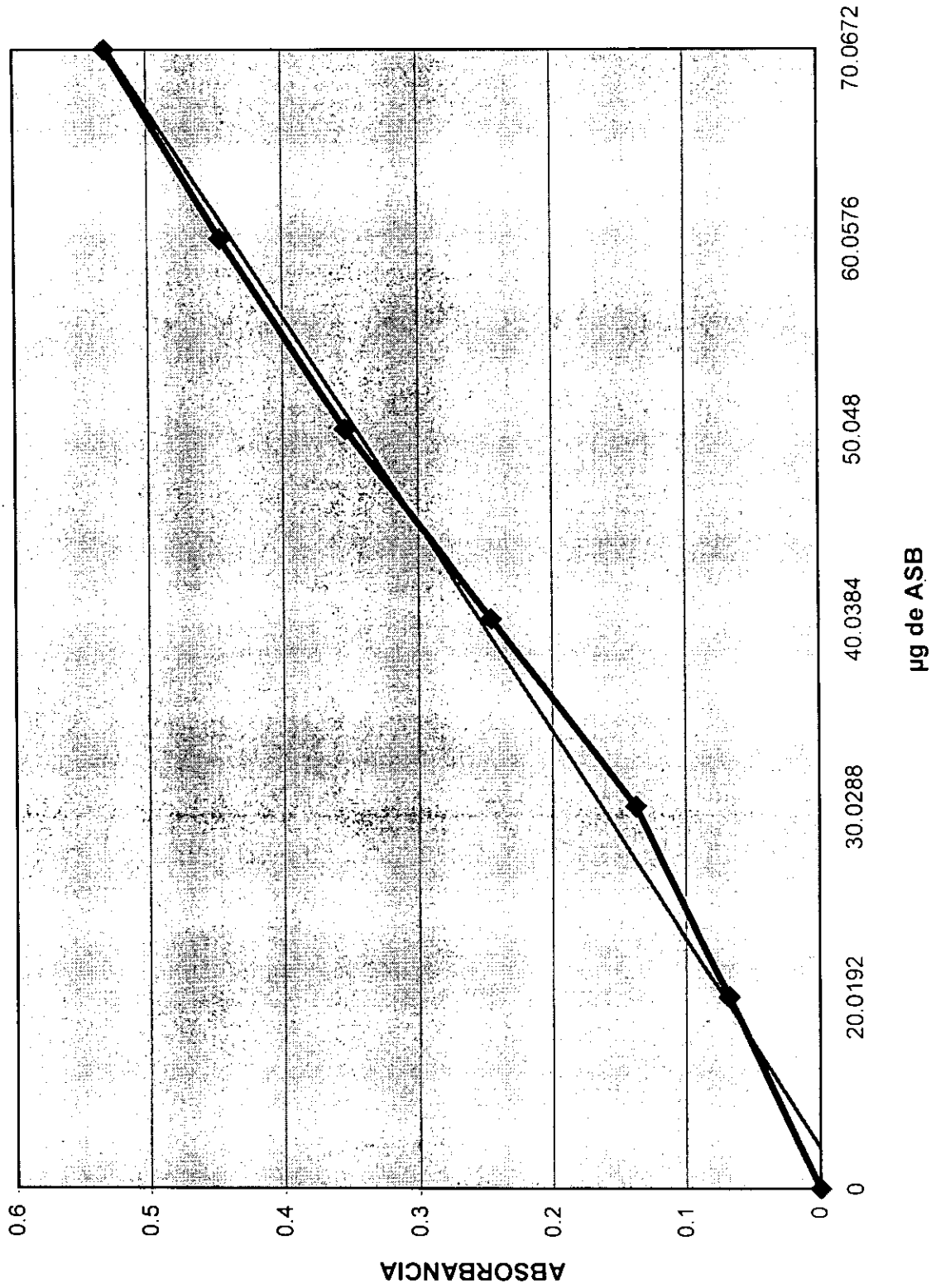
MUESTRA	VOL. TOTAL (mL)	mg TOTALES DE PROT.	RENDIMIENTO
SIN PURIFICAR	25	24	100%
PURIFICADA	120	23	96%

OBSERVACIONES: Los resultados de los cálculos para las muestras sin purificar de 100 μ L y purificada de 50 μ L no aparecen en la hoja de resultados ya que sus absorbancias no entran en la curva patrón.

REALIZO:

SUPERVISO:

DETERMINACIÓN DE PROTEINAS (METODO DE LOWRY MODIFICADO)
PRODUCTO A GRANEL 24/NOV/97



UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

ANTIGENICIDAD (ELISA)

FECHA: 04/Dic/97

LOTE: L-S06/11/97

ANTIGENO: Porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d., Producto a Granel

DILUCIONES DE Ac

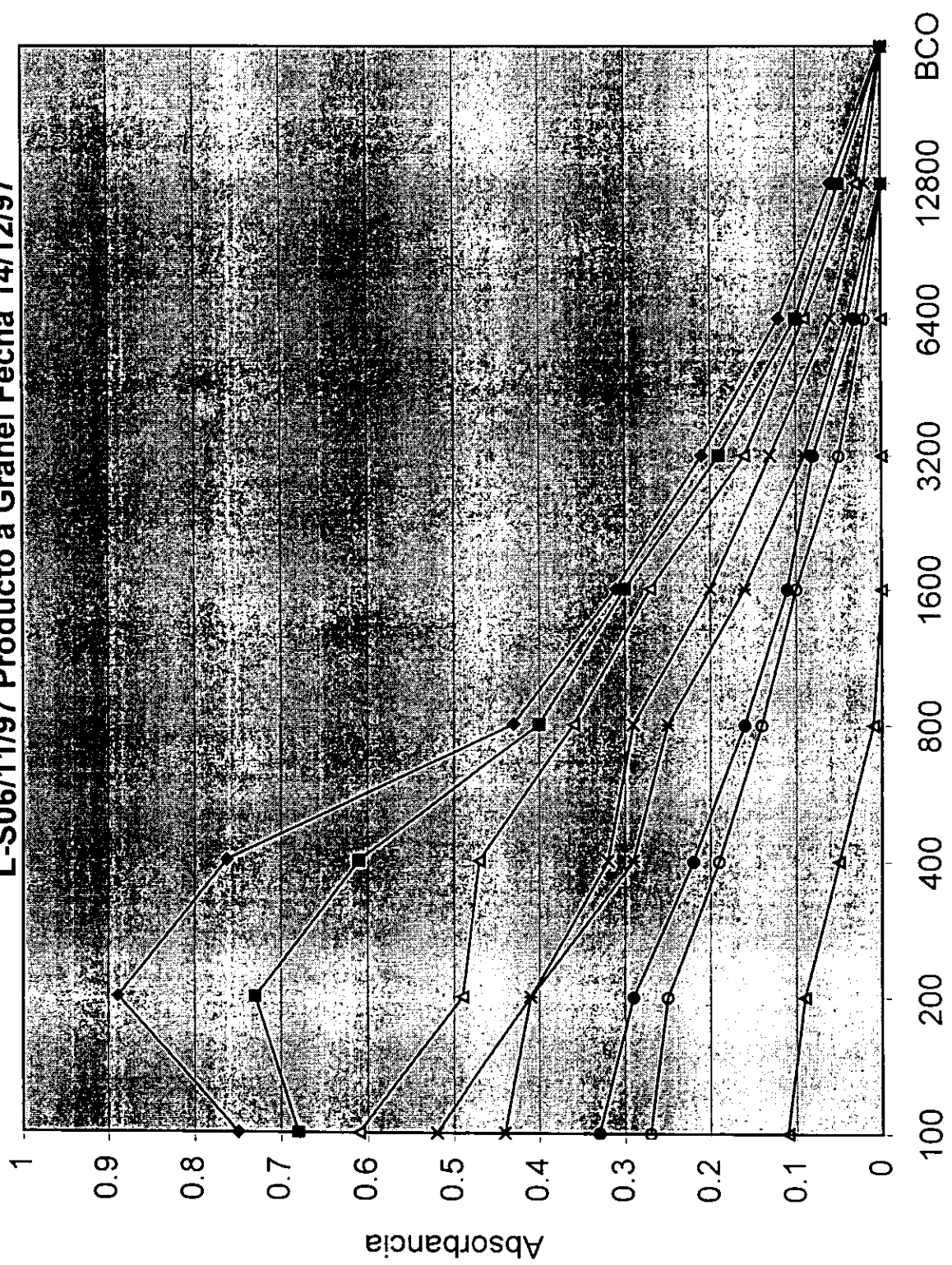
		1:100	1:200	1:400	1:800	1: 1600	1: 3200	1: 6400	1: 12800	Bco. sin Ag	Bco. sin Ag.	Bco. con Ag	Bco. con Ag
Ag (µg/mL)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
50.000	A	0.75	0.89	0.76	0.43	0.31	0.21	0.12	0.06	0	0	0	0
25.000	B	0.68	0.73	0.61	0.40	0.30	0.19	0.10	0.05	0	0	0	0
12.500	C	0.61	0.49	0.47	0.36	0.27	0.16	0.09	0.03	0	0	0	0
6.250	D	0.52	0.41	0.32	0.29	0.20	0.13	0.06	0.02	0	0	0	0
3.125	E	0.44	0.41	0.29	0.25	0.16	0.09	0.04	0	0	0	0	0
1.562	F	0.33	0.29	0.22	0.16	0.11	0.08	0.03	0	0	0	0	0
0.781	G	0.27	0.25	0.19	0.14	0.10	0.05	0.02	0	0	0	0	0
0.390	H	0.11	0.09	0.05	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0

OBSERVACIONES: Lector Miniread II

REALIZO:

SUPERVISO:

Antigenicidad ELISA
Porinas de *Salmonella typhi* 9,12, Vi:d. Purificadas
L-S06/11/97 Producto a Granel Fecha 14/12/97



Recíproco de la dilución Ac anti-Porinas

3.2.4. Monitoreo ambiental microbiológico del área de dosificación (pág. 105)

Se realizó un monitoreo ambiental microbiológico (PEO clave UIM-PG-03) en esta área, después de la sanitización correspondiente a este paso del proceso. Como podemos observar, la sanitización fue eficiente y solamente se presentó una colonia en una de las 14 cajas colocadas en el área.

3.2.5. Dilución y dosificación (pág. 106)

Basados en la concentración de porinas del producto a granel determinada por el método de Lowry, mostrada en el punto 3.1.11, se realizaron los cálculos necesarios para obtener los siguientes viales (PEO clave UIM-PP-07):

40 viales con 2.125 mL de porinas 20 $\mu\text{g/mL}$ = Dosis de 10 $\mu\text{g}/0.5$ mL

40 viales con 2.125 mL de porinas 60 $\mu\text{g/mL}$ = Dosis de 30 $\mu\text{g}/0.5$ mL

40 viales con 2.125 mL de porinas 100 $\mu\text{g/mL}$ = Dosis de 50 $\mu\text{g}/0.5$ mL

Sin embargo, al realizar la determinación de la concentración de proteínas del producto terminado (3.3.1) se encontró que la concentración real de la dosis de 30 $\mu\text{g}/0.5$ mL era de 25 $\mu\text{g}/0.5$ mL.

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

MONITOREO AMBIENTAL MICROBIOLOGICO

FECHA: 27/Nov/97

LOTE: L-S06/11/97

PROCESO: Sanitización con hipoclorito de soido 500 ppm, área de dosificación

No. de Caja	No. de Colonias	Observaciones	No. de Caja	No. de Colonias	Observaciones
1			24		
2			25		
3			26		
4			27	0	
5			28	0	
6			29	0	
7			30	0	
8			31	0	
9			32	0	
10			33	0	
11			34	0	
12			35	0	
13			36	0	
14			37	0	
15			38	1	bca., L, peq.
16			39	0	
17			40	0	
18			41*	0	
19			42*	0	
20			43*	0	
21			44*	0	
22			45*	0	
23					

REALIZO: *[Signature]*

SUPERVISO: *[Signature]*

Abreviaciones: bca (blanca), ama (amarilla), L (lisa), R (rugosa), cre (cremosa), peq (pequeña),
gde (grande), med (mediana), b.irreg (bordes irregulares)

* CONTROL (SIN EXPOSICION)

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

DILUCION Y DOSIFICACION

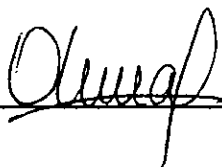
FECHA: 01/Dic/97

LOTE: L-S06/11/97

CONC. DE PRODUCTO A GRANEL ($\mu\text{g/mL}$)	VOL. DE PRODUCTO A GRANEL (mL)	VOL. DE AGUA INYECTABLE (mL)	VOL. FINAL (mL)	CONC. FINAL ($\mu\text{g/mL}$)	NUMERO DE VIALES DOSIFICADOS
192	9.38	80.62	90	20	40
	28.13	61.87	90	60	40
	46.88	43.12	90	100	40

OBSERVACIONES: La dosificación se realizó utilizando micropipetas y puntas despirogenizadas. Cada vial se llenó con un volumen total de 2.125 mL.

REALIZO:



SUPERVISO:



3.3 Control de Producto Terminado

3.3.1. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry del producto terminado (pág. 108-110)

Para determinar la concentración de porinas en el producto terminado se llevó a cabo el método de determinación de proteínas de Lowry en el cual se realizó una curva patrón (pág. 110) de albúmina sérica bovina (ASB) que presentó un coeficiente de correlación de 0.9970 (PEO clave UIM-CA-07). Las concentraciones de las diferentes dosis se obtuvieron por intrapolación en dicha curva y fueron las siguientes:

Dosis de 10 $\mu\text{g}/0.5\text{ mL}$, concentración real: 22.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Dosis de 30 $\mu\text{g}/0.5\text{ mL}$, concentración real: 51.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Dosis de 50 $\mu\text{g}/0.5\text{ mL}$, concentración real: 109.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3.3.2. Determinación del peso molecular del producto terminado (pág. 111)

Para poder determinar la identidad de las proteínas analizadas por el método de Lowry se realizó un corrimiento electroforético (PEO clave UIM-CA-05) de las tres dosis de producto terminado. En el observamos la característica doble banda de entre 38 Kd y 41 Kd para cada una de las tres dosis en comparación con el corrimiento del producto a granel.

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

**CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY
PRODUCTO TERMINADO**

Pág. 1 de 2

FECHA: 19/Ene/98

LOTE: L-S06/11/97

ALBUMINA

PESO REAL: 0.6256 g

PORCIENTO DE NITROGENO: 15.6%

PORCIENTO DE HUMEDAD: 1.1%

LOTE: 42H0018

CURVA PATRON*

µg DE ASB	µg REALES DE ASB	TUBO	ABSORBANCIA	PROMEDIO	AJUSTE A CERO
0	0	2	0.0649	0.0487	0
		3	0.0445		
		4	0.0368		
5	5.0048	5	0.1163	0.1166	0.0679
		6	0.1167		
		7	0.1170		
10	10.0096	8	0.1841	0.1861	0.1374
		9	0.1912		
		10	0.1830		
20	20.0192	11	0.2992	0.2941	0.2454
		12	0.2895		
		13	0.2936		
30	30.0288	14	0.3971	0.4032	0.3542
		15	0.4092		
		16	0.4034		
40	40.0384	17	0.4927	0.4946	0.4459
		18	0.5057		
		19	0.4855		
50	50.0480	20	0.5810	0.5796	0.5309
		21	0.5792		
		22	0.5786		

COEFICIENTE DE CORRELACION: 0.9970

PENDIENTE: 0.0105

ORDENADA AL ORIGEN: 0.0199

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

**CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY
PRODUCTO TERMINADO**

Pág. 2 de 2

FECHA: 19/Ene/98

LOTE: L-S06/11/97

MUESTRA

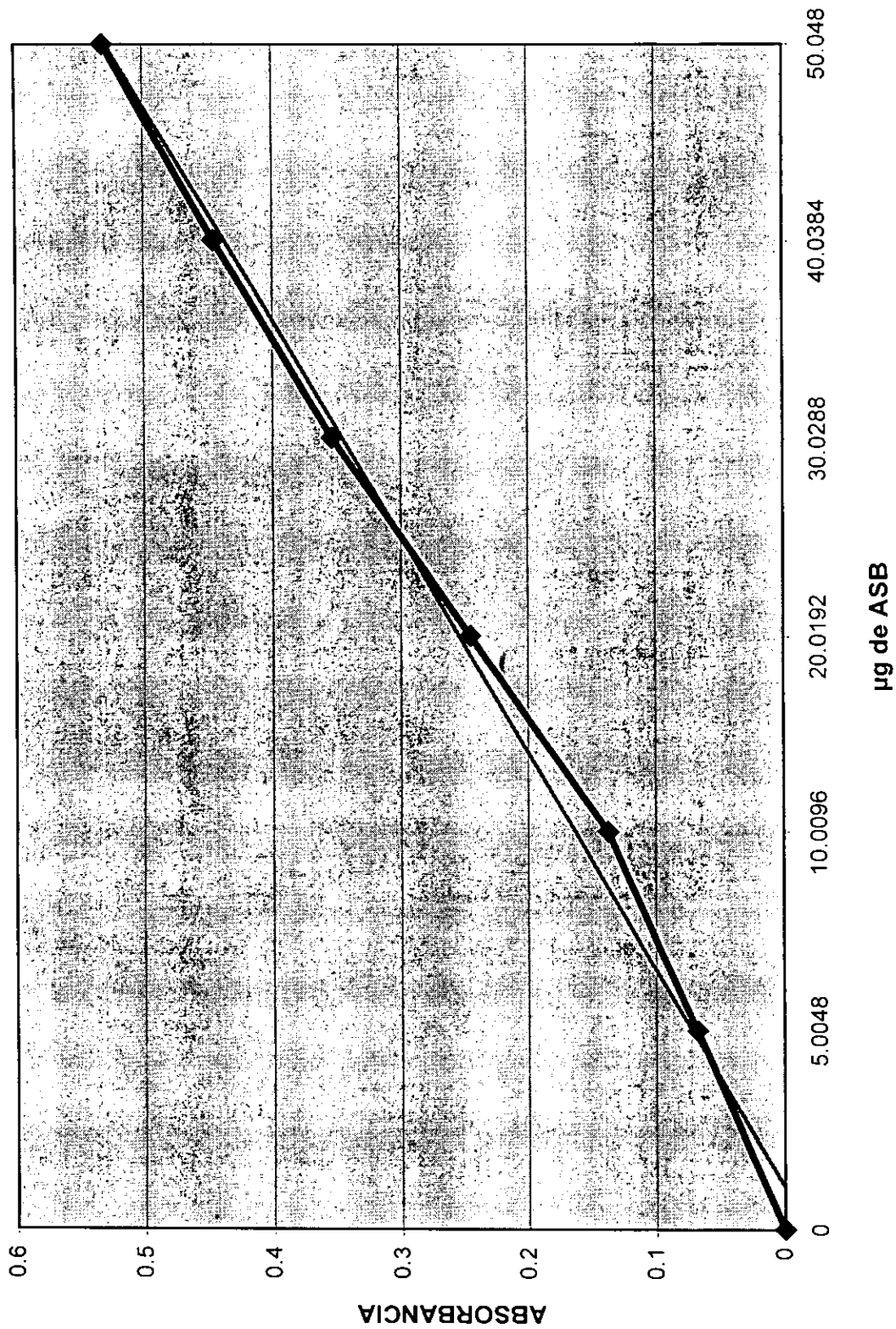
ABSORBANCIA	TUBO	DOSIS		
		10 µg/0.5 mL	30 µg/0.5 mL	50 µg/0.5 mL
	1	0.1167	0.1267	0.1817
	2	0.1211	0.1273	0.1921
	3	0.1182	0.1223	0.1927
PROMEDIO		0.1186	0.1254	0.1888
AJUSTE POR BLANCO		0.0699	0.0767	0.1401
µg DE PORINAS POR INTRAPOLACION EN LA CURVA		23.61	53.65	113.54
CONCENTRACION DE PORINAS POR FORMULA (µg/mL)		22.75	51.71	109.44

OBSERVACIONES: Se tomaron 100 µL de muestra para cada dosis

REALIZO:

SUPERVISO:

DETERMINACIÓN DE PROTEINAS (METODO DE LOWRY MODIFICADO)
PRODUCTO TERMINADO 19/ENE/98

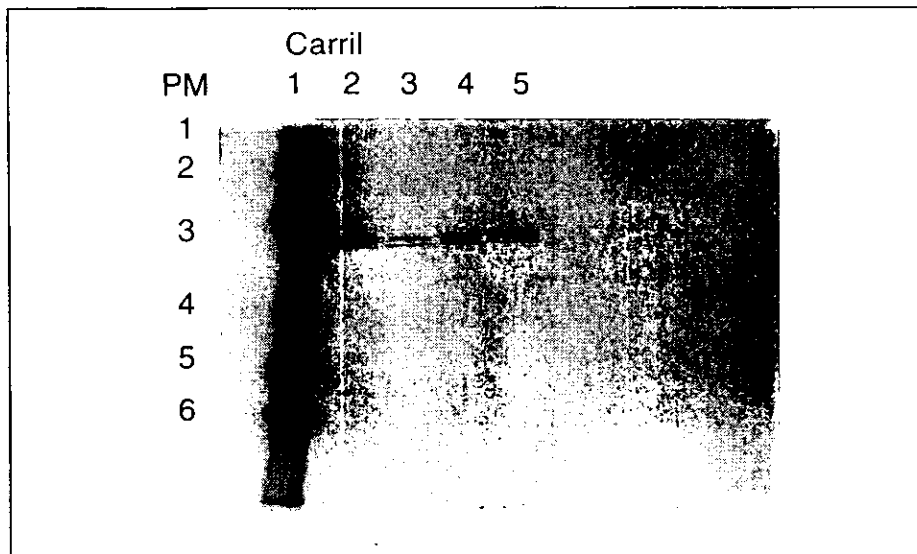


UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

PESO MOLECULAR (PAGE-SDS)

FECHA: 13/Ene/98

LOTE: L-S06/11/97



No. DE CARRIL	MUESTRA
1	Marcadores Moleculares
2	Producto a granel, 15 μ L de muestra
3	Dosis 10 μ g/0.5 mL, 15 μ L de muestra
4	Dosis 25 μ g/0.5 mL, 15 μ L de muestra
5	Dosis 50 μ g/0.5 mL, 15 μ L de muestra

NUMERO	MARCADOR	PESO MOLECULAR
1	Albúmina bovina de plasma	66,000
2	Albúmina de huevo	45,000
3	Pepsina	34,700
4	Tripsinógeno	24,000
5	β -Lactoglobulina	18,400
6	Lisosima	14,300

REALIZO: _____

SUPERVISO: _____

3.3.3. Antigenicidad del producto terminado (pág. 113-118)

Para poder determinar la capacidad de las porinas de ser reconocidas por un anticuerpo dirigido contra ellas, se realizó una ELISA (PEO clave UIM-CA-10) en donde se fijaron diluciones seriadas de las diferentes dosis de porinas como antígeno, posteriormente se agregó una dilución seriada de suero de conejo previamente inmunizado con porinas de *S. typhi* y se reveló con un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con γ -peroxidasa. En las gráficas 5, 6 y 7 (págs. 114, 116, 118) observamos que los anticuerpos del suero de conejo inmunizado con porinas reconocen a las porinas fijadas en la placa lo cual indica que el producto terminado conserva su antigenicidad.

3.3.4. Esterilidad y Pirógenos en producto terminado (pág. 119)

Para determinar si la vacuna podría ser utilizada en humanos, se realizaron las pruebas de esterilidad y pirógenos en la Unidad de Control Técnico de Insumos del IMSS.

Como lo indica el formato, la prueba de esterilidad se efectuó utilizando una mezcla de las tres dosis que constituían al lote L-S06/11/97. En ella se observó la presencia de un bacilo gram negativo, ácido sulfhídrico negativo (*Salmonella typhi* es ácido sulfhídrico positivo).

En la prueba de pirógenos, solamente la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dio un resultado que no cumplió con las especificaciones.

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

ANTIGENICIDAD (ELISA)

FECHA: 14/Dic/97

LOTE: L-S06/11/97

ANTIGENO: Porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d., Producto terminado, Dosis 50 µg/0.5 mL

DILUCIONES DE Ac

		1:100	1:200	1:400	1:800	1: 1600	1: 3200	1: 6400	1: 12800	Bco. sin Ag	Bco. sin Ag.	Bco. con Ag	Bco con Ag
Ag (µg/mL)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
50.000	A	0.72	0.78	0.69	0.65	0.45	0.30	0.24	0.20	0	0	0	0
25.000	B	0.68	0.78	0.64	0.58	0.44	0.33	0.25	0.19	0	0	0	0
12.500	C	0.62	0.71	0.66	0.49	0.41	0.27	0.20	0.17	0	0	0.01	0
6.250	D	0.55	0.67	0.59	0.43	0.35	0.21	0.16	0.15	0	0	0	0
3.125	E	0.50	0.61	0.54	0.41	0.33	0.18	0.15	0.11	0.01	0	0	0
1.562	F	0.52	0.58	0.50	0.38	0.26	0.17	0.12	0.08	0	0	0	0
0.781	G	0.44	0.57	0.36	0.22	0.16	0.11	0.06	0.06	0	0	0	0
0.390	H	0.40	0.51	0.35	0.24	0.18	0.10	0.04	0	0	0	0	0

OBSERVACIONES: Lector Miniread II

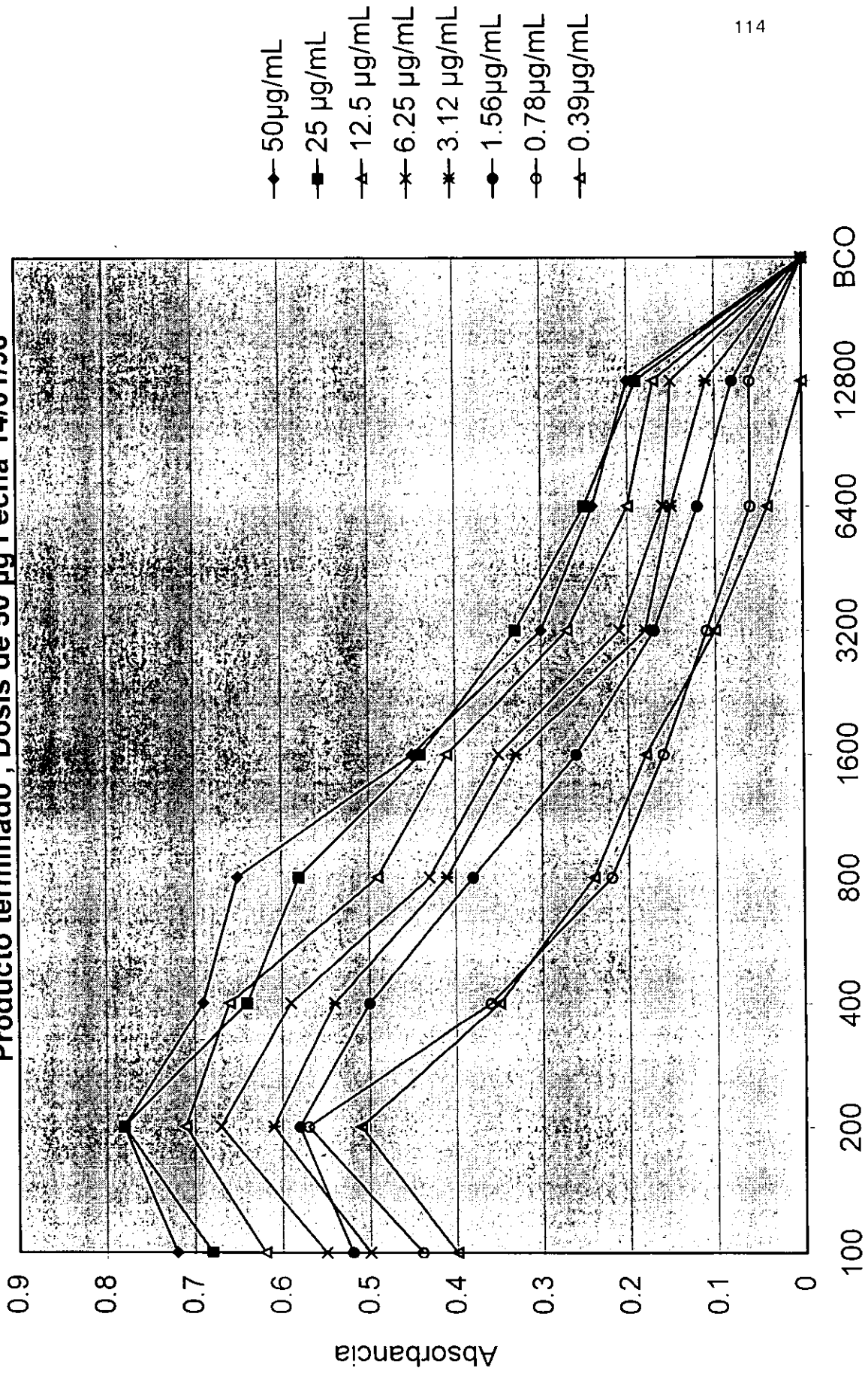
REALIZO:

SUPERVISO:

Antigenicidad ELISA

Porinas de *Salmonella typhi* 9,12, Vi:d.

Producto terminado , Dosis de 50 µg Fecha 14/01/98



UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

ANTIGENICIDAD (ELISA)

FECHA: 14/Dic/97

LOTE: L-S06/11/97

ANTIGENO: Porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d., Producto terminado, Dosis 25 µg/0.5 mL

DILUCIONES DE Ac

		1:100	1:200	1:400	1:800	1: 1600	1: 3200	1: 6400	1: 12800	Bco. sin Ag	Bco. sin Ag.	Bco. con Ag	Bco con Ag
Ag (µg/mL)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25.000	A	0.63	0.68	0.64	0.59	0.46	0.35	0.26	0.19	0	0	0	0.01
12.500	B	0.64	0.66	0.58	0.57	0.43	0.31	0.26	0.20	0	0	0	0
6.250	C	0.60	0.65	0.61	0.54	0.37	0.30	0.23	0.17	0	0	0	0
3.125	D	0.55	0.61	0.58	0.49	0.32	0.24	0.19	0.15	0	0	0	0
1.562	E	0.42	0.59	0.45	0.39	0.30	0.27	0.20	0.13	0	0	0	0
0.781	F	0.49	0.53	0.38	0.31	0.25	0.18	0.11	0.08	0	0	0	0
0.390	G	0.44	0.47	0.38	0.30	0.17	0.16	0.09	0.07	0	0	0	0
0.195	H	0.39	0.46	0.33	0.26	0.19	0.11	0.04	0.04	0	0	0	0

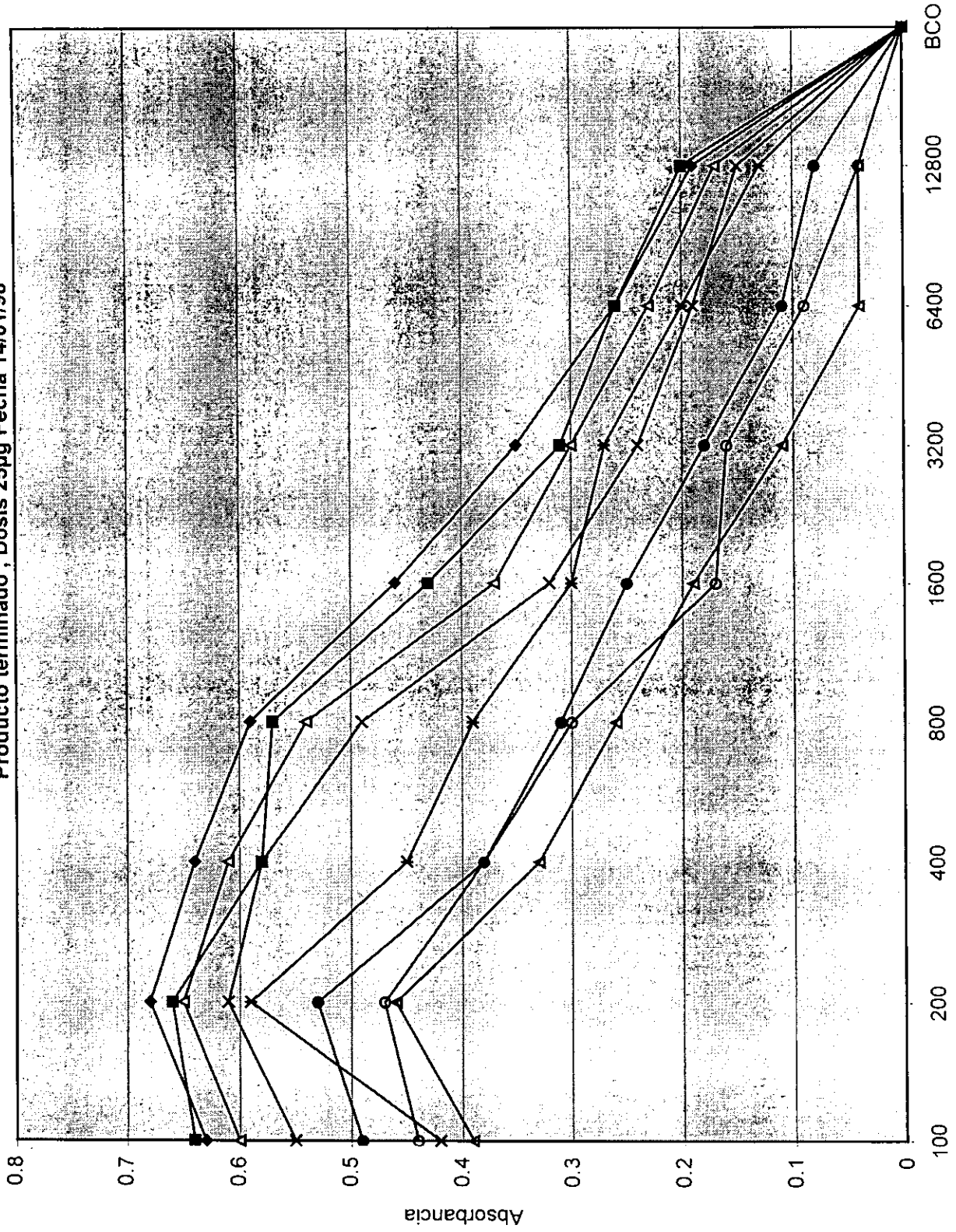
OBSERVACIONES: Lector Miniread II

REALIZO:

SUPERVISO:

Antigenicidad ELISA

Porinas de *Salmonella typhi* 9,12, Vi:d.
Producto terminado, Dosis 25µg Fecha 14/01/98



Reciproco de la dilución Ac anti-Porinas

UIM EN INMUNOQUIMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS,
AREA DE PRODUCCION

ANTIGENICIDAD (ELISA)

FECHA: 14/Dic/97

LOTE: L-S06/11/97

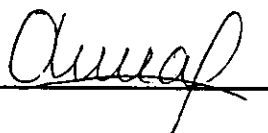
ANTIGENO: Porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d., Producto terminado, Dosis 10 µg/0.5 mL

DILUCIONES DE Ac

		1:100	1:200	1:400	1:800	1: 1600	1: 3200	1: 6400	1: 12800	Bco. sin Ag	Bco. sin Ag.	Bco. con Ag	Bco con Ag
Ag (µg/mL)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10.000	A	0.55	0.55	0.46	0.43	0.40	0.34	0.26	0.19	0.02	0	0	0
5.000	B	0.54	0.59	0.55	0.52	0.41	0.33	0.28	0.19	0	0	0	0
2.500	C	0.52	0.58	0.51	0.47	0.39	0.30	0.27	0.21	0	0	0	0
1.250	D	0.47	0.49	0.44	0.41	0.33	0.26	0.19	0.13	0	0	0	0
0.625	E	0.45	0.51	0.42	0.40	0.31	0.25	0.20	0.14	0	0	0	0
0.312	F	0.44	0.46	0.41	0.39	0.27	0.20	0.14	0.13	0	0	0	0
0.156	G	0.39	0.43	0.38	0.29	0.24	0.19	0.12	0.08	0	0	0	0
0.078	H	0.32	0.36	0.29	0.19	0.14	0.11	0.06	0.02	0	0	0	0

OBSERVACIONES: Lector Miniread II

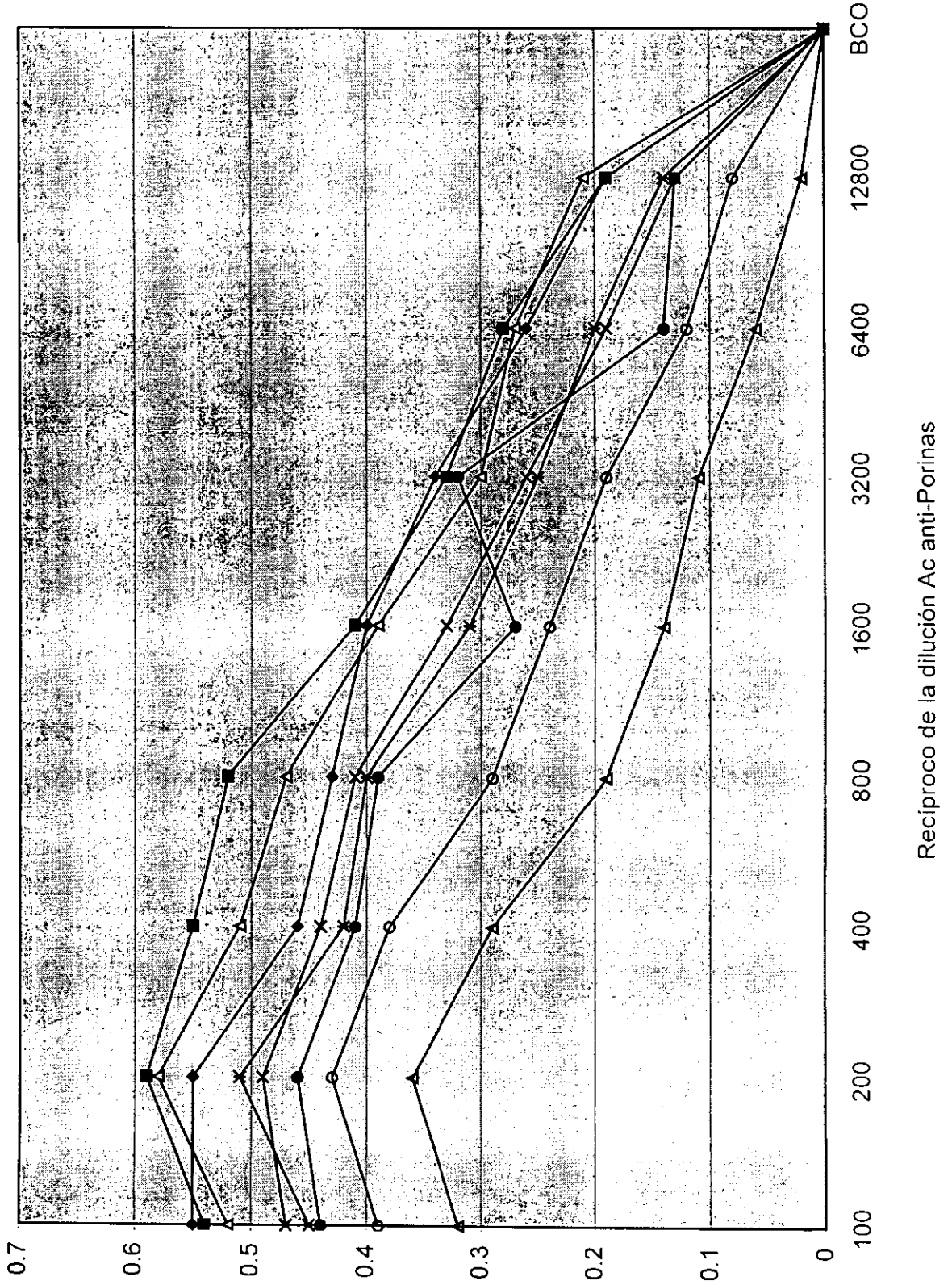
REALIZO:



SUPERVISO:



Antigenicidad ELISA
Porinas de *Salmonella typhi* 9,12, Vi:d.
Producto terminado Dosis 10µg Fecha 14/01/98





INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE CONTROL TECNICO DE INSUMOS

MÉXICO, D. F., 3 DE ABRIL DE 1998

OFICIO 30.022.3/ 1467

DR. ARMANDO ISIBASI ARAIJO
JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA
(DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA)
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

EN ATENCIÓN A SU OFICIO DEL 30 DE ENERO DE 1998, EN DONDE SOLICITA SE EFECTÚE EL CONTROL BIOLÓGICO Y MICROBIOLÓGICO DE LA VACUNA ANTITIFOÍDICA ISIPOR, ME PERMITO INFORMARLE EL RESULTADO OBTENIDO EN LOS ANÁLISIS DE ESTERILIDAD Y PIRÓGENOS, REALIZADOS EN ESTA UNIDAD.

PRUEBA	PRESENTACION DE LA VACUNA	RESULTADO
ESTERILIDAD	*	NO CUMPLE
PIRÓGENOS	PRESENTACIÓN: 20 MCG/ML	CUMPLE
	" 50 MCG/ML	NO CUMPLE
	" 100 MCG/ML	CUMPLE

(*) LA PRUEBA DE ESTERILIDAD SE EFECTUÓ CON LA MEZCLA DE LAS TRES CONCENTRACIONES. EL MICROORGANISMO CONTAMINANTE SE RECUPERÓ EN AMBOS MEDIOS DE CULTIVOS A PARTIR DE LAS 48 HORAS DE INCUBACIÓN, MORFOLÓGICAMENTE ES UN BACILO GRAM NEGATIVO, LECTOSA (-), H₂S (-).

LAS PRUEBAS DE POTENCIA Y SEGURIDAD NO SE REALIZARON POR EL RESULTADO OBTENIDO EN LA PRUEBA DE ESTERILIZACIÓN.

ATENTAMENTE
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

DR. RODOLFO A. DE MUCHA MACIAS
DIRECTOR

CON COPIA:

- DIRECCIÓN DE LA UCTI.
- QBP. AMADA JUÁREZ GONZÁLEZ, JEFE DEL AREA DE BIOLÓGICOS Y REACTIVOS.
- QBP. LYLIA I. GUTIÉRREZ NUCIÑO, JEFE DEL LABORATORIO DE BIOLÓGICOS.

~~QBP~~ LIGN'CMO

IMSS

VI. DISCUSION

La fiebre tifoidea es una enfermedad que, aún en nuestros días, sigue causando serios problemas en países subdesarrollados. Las altas temperaturas que provoca pueden poner en peligro la vida de los enfermos especialmente en el caso de los niños pequeños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos (9).

La primera inmunización experimental para la protección contra la fiebre tifoidea se realizó en el año de 1886 (46) y desde entonces se han producido una gran variedad de candidatos a vacuna (33). Debido al alto contenido de LPS en la membrana externa de *Salmonella typhi* y a la dificultad implícita en su eliminación, la mayoría de estas vacunas no han tenido éxito y las pocas que se encuentran actualmente en el mercado presentan efectos secundarios importantes o confieren una protección de corto plazo (33).

El Dr. Armando Isibasi, jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, del Hospital de Especialidades, del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del IMSS, al entrar en contacto con este problema, comienza una línea de investigación encaminada hacia la obtención de una vacuna alternativa contra la fiebre tifoidea, que confiriera una protección duradera con pocas inmunizaciones y disminuyendo, en lo posible, los efectos secundarios provocados por el LPS. Después de más de once años de investigación básica y de haber realizado pruebas en el modelo murino (4), se proponen a las Porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d como el candidato alternativo a vacuna contra la fiebre tifoidea para ensayos de fase I en humanos.

En el presente trabajo se abordó el problema de lograr obtener dicha vacuna cumpliendo con las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) para productos biológicos inyectables (58) y siguiendo las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (70). La idea de realizar un manual de producción para la vacuna surgió con la necesidad de organizar la gran variedad de

información y procesos involucrados. El manual de producción se basa en Procedimientos Estándares de Operación (PEO) (70) los cuales describen detalladamente cada uno de los pasos involucrados tanto en la producción como en el control de calidad de la vacuna, siguiendo el sistema de calidad total llamado ISO-9002 (50).

Para lograr nuestros objetivos, en primer lugar, fue necesario acondicionar el área en donde se produjo la vacuna. Una área aséptica diseñada específicamente para la obtención de productos parenterales incluye un sistema de filtración de aire de flujo laminar y presión positiva (60). A pesar de que fue imposible contar con estas condiciones dentro del área asignada en el laboratorio, gracias a la construcción del túnel de acceso y de la implementación del programa de sanitización, se logró reducir la contaminación microbiana ambiental a niveles adecuados para la producción con resultados reproducibles en todos los procesos de sanitización realizados a lo largo del proceso general de producción.

La sanitización es el proceso mediante el cual se reduce al máximo la carga microbiológica por medio de agentes químicos (59). Los resultados de los monitoreos ambientales realizados antes y después del acondicionamiento del área de producción y de la aplicación del sistema de sanitización (Pág. 79-81) demostraron que tanto el hipoclorito de sodio a 500 ppm como el cloruro de benzalconio al 1% funcionaron como agentes sanitizantes efectivos para la reducción de la contaminación microbiana ambiental dentro del área de producción.

La implementación del manual de producción incluyó la estandarización del proceso general de producción (realizado de manera habitual en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica para obtención de porinas para investigación) y control de calidad de las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, modificándolo y adaptándolo a las nuevas instalaciones y especificaciones. Al producir el lote de vacuna contra la fiebre tifoidea L-S06/11/97, siguiendo los procedimientos involucrados en el manual, se puso a prueba su funcionalidad y efectividad.

Los resultados obtenidos se vaciaron en formatos especialmente creados para seguir el flujo del proceso general de producción.

La cepa semilla se produjo a partir de la cepa liofilizada 9993 de la ATCC (16). Las caracterizaciones macroscópica, microscópica, bioquímica y serológica de dicha cepa dieron resultados correspondientes a *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d (Pág. 83) (9).

Se realizó la primera sanitización del proceso de producción utilizando hipoclorito de sodio a 500 ppm como sanitizante. En los resultados del monitoreo ambiental correspondiente (Pág. 85) observamos una disminución de la contaminación microbiana a niveles adecuados para la producción.

El cultivo de *Salmonella typhi* se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 4L para lograr obtener una gran cantidad de biomasa. La cantidad de porinas expresadas en la membrana de la bacteria está controlada por un complejo sistema de regulación relacionado con factores como la temperatura, el pH, la oxigenación, la osmolaridad, etc. (11). Las condiciones ideales para la obtención de la biomasa se encuentran especificadas en el procedimiento "Preparación de Inóculo y Fermentación en Matraz" (UIM-PP-02). En los resultados de la curva de crecimiento (Pág. 87-88) se observa que la fermentación se detuvo al inicio de la fase estacionaria, esto se realizó para obtener la mayor cantidad de biomasa posible (Pág. 87) y para lograr cosechar a las bacterias con una alta expresión de porinas.

Se realizaron caracterizaciones macroscópicas, microscópicas y bioquímicas al diluir la cepa semilla en SSI, al final de la incubación de los inóculos y de la cosecha de la biomasa. En todos los casos, los resultados correspondieron a *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d (Pág. 89).

Para que una vacuna a base de subunidades bacterianas tenga éxito, éstas deben conservar su estructura nativa, de otra manera, al haber infección natural, el sistema inmune no

reconocería a dichas subunidades como parte de la bacteria completa y no se daría la protección esperada (5). Para poder extraer las porinas de la membrana externa, las bacterias se fraccionaron en un molino de células por medio de la fricción entre perlas de vidrio y la biomasa. Debido a la opacidad de la solución obtenida, fue imposible monitorear la ruptura por medio de espectrofotometría, sin embargo, la experiencia en el uso del molino permite calcular el momento en que se alcanza una ruptura máxima ya que ésta está correlacionada con el tono del color grisáceo obtenido (Pág. 90). Al terminar la ruptura, se realizó una tinción de Gram en donde se observaron, en su mayoría, bacterias rotas y algunas bacterias completas (Pág. 90)

Las porinas de *Salmonella typhi* se extrajeron de los segmentos de membrana externa a través del método de Nikaido (52). La solución de Nikaido permite solubilizar los componentes de la membrana externa manteniendo estables los trímeros de porinas en el detergente no iónico SDS (52). El monitoreo se realizó mediante un corrimiento electroforético (PAGE-SDS) de los sobrenadantes tomados en los diferentes pasos de la extracción (Pág. 93). En el carril No. 5 observamos la extracción específica de las porinas (sin purificar) las cuales presentan un peso molecular de entre 31 y 48 Kd. La doble banda es característica de las porinas ya que, como se mencionó anteriormente, están constituidas por un trímero de diferentes proteínas (50).

El área de purificación/dosificación es independiente del área de producción, por lo tanto, fue necesario realizar la sanitización de esta área antes de comenzar la purificación. El monitoreo ambiental correspondiente (Pág. 94) mostró una disminución de la contaminación ambiental a niveles adecuados para la purificación.

Ya que las porinas se encuentran asociadas a la capa subyacente de peptidoglicana a través de enlaces no covalentes y que el LPS también se encuentra unido a él a través de enlaces covalentes, es extremadamente difícil eliminar completamente el LPS de las porinas (65). Para disminuir al máximo su concentración en el producto terminado, las porinas se purificaron pasándolas a través de una columna de FPLC, el proceso de eliminación de LPS fue monitoreado

visualmente a través del corrimiento electroforético (PAGE-SDS) y tinción de plata de los sobrenadantes obtenidos en la purificación (Pág. 95-96, 98). En este gel observamos que el producto a granel (porinas purificadas) contenía una concentración de LPS no detectable en el gel de tinción de plata. En la UIM en inmunquímica se determinó que la cantidad residual de LPS después de la purificación por FPLC es de aproximadamente 0.06% (Resultados no mostrados). Esta concentración es suficientemente baja como para no provocar reacciones adversas significativas, sin embargo, se cree que el LPS actúa como un adyuvante para la estimulación de la respuesta inmune específica por lo que no se intentó eliminar esta concentración residual de la vacuna (36).

El SDS y la velocidad de ultracentrifugación utilizados para la extracción de las porinas, arrastran también algo del DNA y RNA de las bacterias rotas. Para eliminarlos, se agregaron DNAasa y RNAasa después de la ruptura. Adicionalmente, estos se separan de las porinas en la columna de FPLC (Pág. 95).

El pH de las porinas antes y después de la purificación no mostró cambio aparente (Pág. 95).

El control de calidad del producto a granel y del producto terminado incluyó pruebas que determinaron la identidad, la cantidad y la calidad de las porinas obtenidas así como la posibilidad de poder utilizarlas para inmunizar a seres humanos.

Entre las pruebas de determinación de identidad y de calidad, encontramos la determinación del peso molecular en geles PAGE-SDS y las pruebas de antigenicidad por el método de ELISA (12). En el gel de determinación de peso molecular (Pág. 111), observamos la doble banda característica de peso molecular entre 38 y 41 Kd correspondiente a las porinas de *S. typhi* (55). Las pruebas de antigenicidad (Pág. 102-103, 113-118) demostraron que las porinas obtenidas son capaces de ser reconocidas por anticuerpos específicos.

Determinar la concentración de porinas tanto en el producto a granel como en el producto terminado fue de vital importancia ya que, antes de poder comenzar con la fase I, se debe establecer la dosis ideal a utilizar en el humano. Es por ello que se obtuvieron tres concentraciones diferentes, para indagar, en ensayos posteriores, cuál de ellas induce la mejor respuesta con el menor número e intensidad de reacciones secundarias. El método de Lowry, utilizado para determinar la concentración de las porinas, es un método colorimétrico cuantitativo en donde los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con cobre en condiciones alcalinas produciendo Cu^+ , la reacción se pone de manifiesto por medio de la solución de Folin-Ciocalteu, la cual, al oxidar los aminoácidos aromáticos, da una coloración azul fuerte, de intensidad directamente proporcional a la cantidad de tirosinas y triptofanos presentes (47). Es obvio que la cantidad de principio activo indicado en un marbete debe cumplirse al pie de la letra. Para lograrlo, este método se estandarizó y validó adaptándolo específicamente para la cuantificación de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d en esta vacuna (64). Los resultados mostraron que se obtuvo un producto a granel con una concentración de porinas de 192 $\mu\text{g/mL}$ (Pág. 99-101). Después de la dilución del producto a granel con agua inyectable (Pág. 106), se obtuvieron 3 concentraciones de 22.75 $\mu\text{g/mL}$, 51.71 $\mu\text{g/mL}$ y 109.44 $\mu\text{g/mL}$ (Pág. 108-110).

Dentro de las características obligatorias que debe tener un producto inyectable para poder ser administrado en humanos, encontramos la de esterilidad y el cumplir con los límites establecidos para pirógenos (14, 49). Estas pruebas se realizaron en la Unidad de Control Técnico de Insumos del IMSS (Instituto reconocido a nivel internacional) (Pág. 119). En los resultados observamos que la mezcla de las tres dosis presentó contaminación por una bacteria Gram negativa, ácido sulfhídrico negativa. De aquí dedujimos que la contaminación no se debió a *Salmonella typhi* ya que esta bacteria es productora de ácido sulfhídrico (44). La gran diversidad de bacterias Gram negativas existentes en el medio ambiente no nos permite deducir la procedencia exacta de esta contaminación, sin embargo, podemos mencionar los diferentes puntos en donde pudo haber sido generada:

- Contaminación generada por el operador (descamaciones de la piel, pestañas, cabello, etc.)
- Contaminación humana o ambiental generada al abrir y manipular los diferentes recipientes involucrados en la dosificación.
- Contaminación de las pipetas y/o viales de vidrio posterior a la despirogenización por un almacenamiento inadecuado.
- Sellado deficiente de los viales dosificados

Estos puntos se tomaron en cuenta dentro de los procedimientos finales, incluidos en el presente trabajo. Solamente la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no cumplió con las especificaciones para la prueba de pirógenos, por lo tanto, es lógico suponer que la contaminación observada en la prueba de esterilidad provenía de esta dosis. Gracias a este resultado es posible decir que sí se puede obtener una vacuna contra la fiebre tifoidea a base de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d con la calidad y concentración deseadas ya que dos de las tres dosis cumplieron con las pruebas críticas para uso en humanos. La contaminación observada en este primer lote piloto se puede evitar fácilmente siguiendo los procedimientos que constituyen el manual de producción, capacitando al personal involucrado con la producción de nuevos lotes piloto y haciendo hincapié en el cuidado de los pasos críticos del proceso ya que se trabaja en un área que no fue diseñada para la obtención de inyectables.

VII. CONCLUSIONES

Obtener una vacuna contra la fiebre tifoidea que confiera una protección a largo plazo, que pueda administrarse por vía subcutánea, en un volumen pequeño y con un mínimo de efectos secundarios, es obviamente de gran importancia especialmente para los países en desarrollo en donde las enfermedades diarreicas son un problema que enfrenta la población día a día.

En México, tradicionalmente, la investigación y la tecnología para la obtención de nuevas vacunas se importaban de otros países, en el presente proyecto nos encontramos con la oportunidad de participar en la obtención de una vacuna 100% mexicana. La investigación básica, encaminada a la obtención de la vacuna contra fiebre tifoidea a base de porinas de *Salmonella typhi*, comenzó hace más de diez años y a lo largo de su desarrollo ha contado con la participación de un gran número de investigadores y estudiantes de diferentes áreas de la biomedicina.

Los resultados de la implementación del Manual de Producción de la vacuna contra la fiebre tifoidea a base de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, objetivo de la presente tesis, nos indican que es posible obtener una vacuna con una buena calidad y en cantidad necesaria para realizar los ensayos de fase I en humanos. De estos resultados podemos concluir lo siguiente:

- Se logró implementar el Manual de Producción de la vacuna contra fiebre tifoidea a base de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, lográndose producir el lote piloto L-S06/11/97.
- Se acondicionaron las áreas de producción y purificación/dosificación para la obtención de la vacuna.
- Se implementó un programa de sanitización en donde se disminuyó la carga microbiana a niveles adecuados para la producción.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Acharya, I.L., Lowe, C.L., Thapa, R., Gurubacharya, V.L., Shrestha, M.B., Bact, D., Cadoz, D., Schulz J., Armand, J. Bryla, D.A., Trollfors, B., Cramton, R., Scheerson, R. and Robbins, J.B., 1987. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary report. N. Engl. J. Med. 317:1101-1104.
2. Adamus, G., Mulczka, M., Witkowska, D., and Romanowska E. 1980. Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella sp.* Infect. Immun. 30:321-324.
3. Blanco, F., Arreguín, C., González, C.R., Paniagua, J., Pelayo, R., Muy, M., Isibasi, A. y Kumate, J. , 1989. Respuesta inmune celular a antígenos de *Salmonella typhi* en humanos. VIII Congreso Nacional de Inmunología. SLP; México.
4. Blanco, F., Isibasi, A., González, C.R. , Ortiz, V., Paniagua, J. Arreguín, C. and Kumate, J. 1993. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. Scan. J. Infect. Dis., 25:73-80.
5. Brown, F., Dougan, G., Hoey, E. M., Martin, S. J., 1993. Vaccine Design; Molecular Medical Science Series; John Wiley and Sons Ltd. England. pp 25-32, 71-95.
6. Centers for disease control. 1990. Typhoid Immunization. Recommendations of the Immunization.- Practices Advisory Committee. Morbidity and Mortality Weekly Report., Atlanta, Georgia, USA, 39:1-5.
7. Cowan, W. Schirmer, T., Rummel, G., Fteiert, M., Ghosh, R., Rosenbuch, P. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. Nature. 358: 723-733.
8. Christie, B.A.; 1987. Typhoid and Paratyphoid Fever. In Infectious Diseases. Churchill Livingstone. New York. USA., 100-164.

9. Davies, B.D., Dulbeco, R., Eisen, H.N., Gingberg, H.S., Wood, W.B. and McCarty, M. 1980. Tratado de Microbiología, Ed. Salvat Editores. Barcelona España; 783-800.
10. DeSain C.; 1993. Drug, Device and Diagnostic Manufacturing (The Ultimate Resource Handbook); Ed. INTERPHARM; 2a. ed.; USA. pp. 8-14, 235-241.
11. Di Rienzo, J.M., Nakamura, K., Inouye, M. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: Biosynthesis, assembly, and functions. Ann. Rev. Biochem., 1978, 47:481-532.
12. Engvall, E. and Parlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunochemistry. 8:874-879.
13. Farías González Marcela. 1997. Implantación del Sistema de Calidad ISO 9002 en un Laboratorio de Investigación. Tesis. Facultad de Química; UNAM., México D.F.
14. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 1994., 6a. Edición. México. Pp. 212-213, 253-261, 301-302, 852..
15. Fleming, D.O., Richardson, J.H., Tulis, J.I. and Vesley D.; 1995. Laboratory Safety (principles and practices); 2ª. Edición, Ed. ASM Press; Washington D.C.; pp 219-237.
16. Folleto Informativo ATCC.
17. Folleto Informativo, Vacuna Poliósídica capsular Vi contra Fiebre Tifoidea TYPHIMVI. Lab. PASTEUR MERIEUX.
18. Foust, T.R. Lewis, G. K. and Hone, D. M. 1993. Construction and characterization of a *Salmonella*- based HIV-1 vector vaccine. In: Vaccines 93 Modern Approaches to New Vaccines Includig Prevention of AIDS. Ginsberg, H.S., Brown, F., Chanoc, R.M., and Lerner, R.A. eds. CSHL, press USA; pp 95-100.

19. Gaines, S., Sprinz, A. y Tully, J. 1968. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VII. The distribution of *Salmonella typhi* in chimpanzee tissue following oral challenge and the relationship between the numbers of bacilli and morphological lesions. *J. Infect. Dis.*, 118:293-306.
20. García, J.A., Paniagua, J., Pelayo, R., Isibasi A., Kumate, J., 1992. Factores de virulencia de *Salmonella typhi* en relación al desarrollo de nuevas vacunas; *Salud Pública; México*. 34:262-267.
21. Germanier, R. 1986. The live oral typhoid vaccine Ty21a: Recent field trial results. In *International Conference on Bacterial Vaccines and Local Immunity*. Siena, Italy; pp. 10-12.
22. Germanier, R. and Furer, E. 1975. Isolation and characterization of *Salmonella typhi* galE mutant Ty21a: a candidate strain for a live typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.*; 131:553-558.
23. Gilleland, H.E., Parker, M.G., Matthews, J.W. y Berg, R.D. 1984. Use of purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. *Infect. Immun.*, 44:49-54.
24. Girón, J.A., Xu, J.G. González, C.R., Hone, D., Kaper, J.B., and Levine, M.M. 1995. Simultaneous expression of CFA/I and CS3 colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* by *DaroC DaroD*, *Salmonella typhi* vaccine strain CDV908. *Vaccine*. 13: 939-946.
25. González, C., Isibasi, A., Ortiz, V., Blanco, F., Moreno, J. y Kumate, J. 1989. Cell-mediated immune response to porins from *Salmonella typhi* in mice. 7th International Congress of Immunology, Berlin, RFA.
26. González, C.R., Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., García, J., Blanco, F. and Kumate, J. 1993. Lymphocytic proliferative response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol and Immunol*. 37: 793-799.

27. González, C.R., Mejía, M.V., Paniagua, J., Ortiz-Navarrete, V., Ramirez, G., Isibasi, A. 1996. Immune response to porins isolated from *Salmonella typhi* in different mouse strains. Arch. Med. Res. 26:S99-S103.
28. Graham C. Cole,. 1993. Pharmaceutical Production Facilities, Design and Applications. Ed. Ellis Horwood Limited, Londres; pp. 180-205.
29. Guling, P.A., McCracken, G.H., Frich, C.F., Johnston, K.H. and Hansen, E.J. 1982. Antibody response of infants to cell surface-exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b after systemic *Haemophilus* disease. Infect. Immun., 37:82-88.
30. Hancock, R.E.W. 1987. Role of porins in outer membrane permeability. J. Bacteriol., 169:929-933.
31. Hoop, T.P. and Woods, K.R., 1981. Prediction of protein antigenic determinants from aminoacid secuencias , Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 78:3824.
32. Hornick, R.B., Greisman, T.E., Woodward, T.E., Dupont, H.L., Drawings, A.T. and Snyder, M.J. 1970. Typhoid fever, pathogenesis and immunological control. N. Engl. J. Med.; 283:686-691.
33. Hsu, H.S. 1989. Pathogenesis and Immunity in murine Salmonellosis. Microb. Rev. 53: 390.
34. Huckstep, R.L. 1983. Typhoid fever and other *Salmonella* infections. De. E. y S. Livingstong, L.T.D., London; 4-9.
35. Isibasi, A., Ortiz, V., Moreno, J., Paniagua, J., Vargas, M., González, C. y Kumate, J. 1988. The role of outer membrane proteins from gram negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever. Monoclonal antibodies against *Salmonella typhi* porins. En: Cañedo, L.E., Todd, L.E., Packer, L. y Jaz, J. eds. Cell function and disease. Plenum. Press., N.Y. , USA; 281-292.

36. Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. y Kumate, J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d. Infect. Immun., 56:2953-2959.
37. Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Pelayo, R., Muy, M., González, C.R., Garcia, J.A. y Kumate, J. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. Vaccine 10:811-813.
38. Kaufmann, S.H.E. 1991. Role of T-cell subsets in bacterial infections. Curr. Opin. In Immunol., 3:465-470.
39. Koneman, E.W., Allen, O.S., Dowell, V.R., 1992. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana., 3a. Edición. Buenos Aires; pp 230.
40. Kumate, J. 1980. Fiebre tifoidea. En Manual de Infectología. Séptima edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México.
41. Kussi, N., Nurminen, M., Saxén, H. y Mäkelä, P.H. 1981. Immunization with major outer membrane protein (porin) preparation in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. Infect. Immun., 34:328-332.
42. Kussi, N., Nurminen, M., Saxén, H., Valtonen, M. y Mäkelä, P.H. 1979. Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis in mice. Infect. Immun., 25:857-862.
43. Laboratory Safety Manual, 1993. 2a. Edición , Geneva; World Health Organization,
44. Levine, M.M. 1994. Typhoid Fever Vaccines. In Vaccines. Plotking, S.A., Mortimer, E.A. eds. W.B Saunders, Co. Philadelphia, USA. 597-634.
45. Levine, M.M., Dupont, H.L., Hornick, R.B., Snyder, M.J., Woodward, W., Gilman R.H. and Libonati J.P. 1976. Attenuated, streptomycin dependent *Salmonella typhi* oral vaccine: potential deleterious effects of lyophilization. J. Infect. Dis., 133:424-429.

46. Levine, M.M., Ferreccio, C., Black, R.E., Tacket, C.O., Germanier, R. and the Chilean Typhoid Comité. 1989. Progress in vaccines against typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.*, 11:S552-S567.
47. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fan, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
48. Molinari, J. and Larralde, C. 1974. Acquired Immunity to murine typhoid induced in mice with ribosomal fraction of *Salmonella typhimurium*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 16:189-197.
49. Multi-test Limulus Amebocyte Lysate Pyrogen® U.S License No. 709 Cat. No. N183, N184.
50. Nakae, T. Outer membrane of *Salmonella*. 1976. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels. *J. Biol. Chem.*, 251:2176-2178.
51. Nakae, T., 1976. Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71:877-884.
52. Nikaido, H. 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods in Enzymology.*, 97:85-101.
53. Normas para Sustancias Biológicas (Vacunas). 1982. En Comité de Expertos de la Organización de Mundial de la Salud en Patrones Biológicos. 42º Informe Ginebra, (Organización Mundial de la Salud; Serie de Informes Técnicos. No 822). Anexo 7.
54. Obrien, A.D. 1986. Influence of host genes on resistance of inbred mice to lethal infection with *Salmonella typhimurium*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 124:37-48.
55. Ortiz, V., Isibasi, A., Garcia-Ortigoza, E. y Kumate, J. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.*, 27:1640-1645.

56. Osborn, M.J. y Wu, H. C. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 34:369-422.
57. Paniagua, J., Platan, O.A., Pelayo, R. Ortiz, V., González, C.R., Islas, S., Isibasi, A., Kumate, J. 1990. Respuesta celular a péptidos de Porinas de *Salmonella typhi* por esplenocitos de ratón a C3HeB/Fej. XXI Congreso Nacional de Inmunología. Villa Hermosa, Tab. Mex.
58. Pelayo, R., Isibasi, A., Paniagua, J., Ortiz, V., Muiy, M., Gonzalez, C., Islas, S. y Kumate, J. 1989. Elaboración de un inmunoabsorbente para la purificación de porinas de *Salmonella typhi*. 9,12, Vi:d. *Arch. Invest. Med. (Mex)*, 20:279-286.
59. Pérez Ruelas, J., Alpizar, R. S. 1994. Manual de Prácticas de Laboratorio de Tecnología Farmacéutica II; Laboratorio de Tecnología Farmacéutica; Facultad de Química; UNAM. Sep.
60. Prácticas Adecuadas para la Fabricación de Productos Biológicos. 1982. En Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud. En Comité de Expertos de la Organización de Mundial de la Salud en Patrones Biológicos. 42º Informe Ginebra, Organización Mundial de la Salud; Serie de Informes Técnicos. No 822. Anexo 1.
61. Prácticas adecuadas para la fabricación de productos farmacéuticos. 1982. En comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas. 32º Informe Ginebra, (Organización Mundial de la Salud; Serie de Informes Técnicos. No 823). Anexo 1.
62. Robbins, J.D. and Robbins, J.B. 1984. Re-examination the immunopathogenic role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella typhi*. *J. Infect. Dis.*, 47:436-449.
63. Rosenbusch, J.P., 1974. Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecyl sulfate binding. *J. Biol. Chem.* 249:8019-8029.

64. Sánchez Sanabria Martha; 1997. Procedimientos Estándar de Operación; Manual de Producción de Vacuna contra FiebreTifoidea a base de porinas de *Salmonella typhi* 9, 12 Vi: d. Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.
65. Schindler, H., Rosenbusch, J.P. 1981. Matrix protein in planar membranes: Clusters of channels in a native environment and their functional reassembly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:2302-2306.
66. Schnaitman, C.A. 1971. Effect of ethylenediamine tetracetic acid, Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 108: 553-563.
67. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología; No. 2; Vol 15; Semana 2. 1998; pp. 10. No. 29, Vol.15 Semana 32.1998; pp 10.
68. Spaun, J. 1964. Studies on the influence of the immunization in the active mouse protection test with intraperitoneal challenge for potency assay to typhoid vaccines. Bull. WHO., 31:793-798.
69. Svenson, S.B., Nurminen, M. y Lindberg, C.A., 1979. Artificial *Salmonella* vaccines: O antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 25:863-872.
70. Sztein M.B. Wasserman, S.S. , Tacket C.O. Edelman, R. , Hone, D. Lindberg, A.A. and Levine, M.M. 1994. Cytokine production and lymphoproliferative responses on volunteers orally immunized with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi*. J. Infect. Dis.; 170:1508-1517.
71. Sztein, M.B., Tanner, M. K., Polotsky, Y., Orenstein, J.M., and Levine, M.M. .1995. Cytotoxic T lymphocytes after oral immunization with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi* in humans. J. Immunol. 155:3987-3993.

72. SZU, S.C., Stone, A.L., Robbins, J.D., Schneerson, R. and Robbins, J.B. 1987. Vi capsular polysaccharide-protein conjugates for prevention of typhoid fever. *J. Exp. Med.*, 166:1510-1521.
73. Tacket, C.O. and Levine M.M. 1995. Human typhoid vaccines-Old and New. In: *Molecular and Clinical aspects of bacterial vaccine development*. Ala'Aldeen, D.A. and Hormaeche, C.E., eds. Wiley; New York; USA; pp 155-178.
74. Tacket, C.O., Hone, D.M., Losonosky, G.A., Guers, L., Edelman, R., and Levine, M. 1992. Clinical acceptability and immunogenicity of CVD908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine*. 10:443-446.
75. The Jordan Report: Accelerated Development of Vaccines. 1998. Division of Microbiology and Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health. Pp. 9-10.
76. Tully, J.G., Gaines, S. and Tigertt, W.D. 1963. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV Role of H antigen in protection. *J. Infect. Dis.*; 112:118-124.
77. Ulevitch, R.J., Tobias, P.S., 1995. Receptor-dependent mechanism of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.*, 13:437-57.
78. Warren, J.W. and Hornik, R. 1979. Immunization against typhoid fever. *Ann. Rev. Med.* 30:457-472.
79. Wayne, P., Olsen, M., Graves, J. 1987. *Aseptic Pharmaceutical Manufacturing*; De. Interpham Press, USA; pp. 151-175.
80. Yoshimura, F., Shaltiel, L.Z., Nikaido, H., 1983. Purification and properties of *Pseudomonas aeruginosa* porin. *J. Biol. Chem.*, 258: 2308-2314.