

870127
33
2y

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTUDIO COMPARATIVO DE PPD PREPARADO
A PARTIR DE CEPAS DE HOSPITAL Y SU COMPARACION
CON PRODUCTOS NACIONALES.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
LUZ PATRICIA ZAMORA RUBIO

Asesor: Q.F.B. María del Socorro Pulido García
GUADALAJARA, JAL. 1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CAPITULO I.-	INTRODUCCION	1
CAPITULO II.-	GENERALIDADES	4
	A.- HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS	5
	B.- MICOBACTERIAS	6
	C.- <u>Mycobacterium tuberculosis</u>	6
	- Morfología	6
	- Tinción	7
	- Cultivo	7
	- Estructura Antigénica	8
	- Prevención	11
	D.- INMUNOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS	12
	- Respuesta inmunológica	12
	- Hipersensibilidad tardía	13
	- Respuesta cutánea al PPD	15
	- Problemas inmunológicos en el paciente	16
	E.- HISTORIA DE LA TUBERCULINA	18
	F.- ASPECTOS IMPORTANTES DE LA TUBER- CULINA	19
	- Reacciones a la tuberculina	21
	- Interpretación de la prueba	21
	- Uso de la prueba	22
CAPITULO III.-	MATERIAL Y METODOS	23
CAPITULO IV.-	RESULTADOS	49

CAPITULO V.-	CONCLUSIONES	62
CAPITULO VI.-	BIBLIOGRAFIA	65

CAPITULO I

"INTRODUCCION"

La tuberculosis es una enfermedad de gran importancia, especialmente en los países subdesarrollados donde la desnutrición y la ignorancia son dos factores que influyen en su prevalencia.

Es claro que no sólo la virulencia del bacilo es importante para el desarrollo de las distintas formas, sino también el estado inmunológico del paciente. La tuberculosis desde el punto de vista inmunológico, es buen ejemplo de la disociación entre protección y daño mediado por la respuesta inmunológica y también de la coexistencia de ambas.

El descubrimiento de la tuberculina por Roberto Koch y su utilización como elemento de investigación permitieron iniciar el conocimiento de la inmunología y posteriormente, en este siglo, la epidemiología moderna de la tuberculosis.

En la actualidad la prueba de la tuberculina o del PPD ha sido aceptada en la práctica clínica y epidemiológica, tanto en medicina humana como veterinaria. Sin embargo es conocido que personas sanas vacunadas con BCG y enfermos tuberculosos de nuestro medio no responden al PPD, lo cual se podría atribuir a un estado de anergia o bien a que dicho PPD el cual proviene de una cepa virulenta de Mycobacterium tuberculosis de Dinamarca, puede no ser el antígeno homólogo para las cepas de M. tuberculosis nacionales, debido a que puede haber cambios genéticos y ambientales y por consiguiente repercutir en la composición química e inmunológica del bacilo.

Por todo lo anterior el objetivo del presente trabajo es preparar PPD a partir de cepas de hospital y hacer un estudio comparativo por inmunoelectroforesis y electroforesis en geles de poliacrilamida para observar la presencia de un antígeno común en cepas nacionales que sea el responsable de la reacción a la tuberculina. Posteriormente se comparó su actividad biológica con el PPD comercial (procedente de Dinamarca) en una población de 100 personas aparentemente sanas, con lo cual se intenta demostrar que un PPD -

obtenido de cepas nacionales de M. tuberculosis puede ser tanto o más efectivo que el PPD comercial el cual proviene de una cepa virulenta de M. tuberculosis de Dinamarca.

CAPITULO II

"GENERALIDADES"

A.- HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS.

La historia de la enfermedad tuberculosa está ligada a la historia del hombre. Las primeras descripciones que se tienen de la tuberculosis corresponden a las antiguas medicinas china e india, además del descubrimiento de lesiones en momias de Egipto.

Hipócrates (460-370 A.C.) describió la enfermedad con espíritu clínico denominándola "tisis" y Galeno (130-200) consideró por primera vez a la tisis como una enfermedad contagiosa, y recomendó el aislamiento del enfermo.

Durante la Edad Media se consideró a la enfermedad como un castigo de Dios y al surgir el Renacimiento Fracastoro (1483-1553) señaló el contagio intrafamiliar de la tuberculosis y Morton habló por primera vez de la tuberculosis pulmonar. Silvio describió la transformación de los tubérculos en cavernas y, Carlos Linneo expresó que la propagación de el mal dependía de diminutos organismos.

La historia moderna de la tuberculosis se inicia con las aportaciones de Laennec (1781-1826) quien señaló dos hechos básicos, "sólo existe una tuberculosis, la cual puede reventir dos variedades, una con lesiones en forma de tubérculos y otra con infiltraciones"; Villemin (1827-1892) demostró por medio de inoculaciones en animales de laboratorio que la enfermedad era contagiosa; y el 24 de marzo de 1882 Roberto Koch descubrió el germen causante de la enfermedad e identificó el agente etiológico en diferentes cuadros clínicos lo que permitió establecer los mecanismos patogénicos de la enfermedad y los procedimientos o agentes terapéuticos que pudieran emplearse para curarla.

La tuberculosis, como ninguna otra enfermedad, fué un reto para los hombres de ciencia de todos los tiempos y en la actualidad se acepta que es curable con tratamiento médico el cual actúa

sobre el agente causal.

B.- MICOBACTERIAS.

Características:

Las micobacterias pertenecen al orden de los Actinomycetales, Familia Mycobacteriaceae, Género Mycobacterium.

El género Mycobacterium incluye todos los microorganismos de aspecto bacilar que tienen la propiedad de ser ácido resistentes, característica que consiste en que difícilmente se tiñen con colorantes básicos, pero una vez teñidos resisten la decoloración con ácidos minerales diluidos, alcohol u otros solventes por lo cual reciben el nombre de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).

Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza como saprófitos o bien produciendo enfermedades en el hombre y otros animales.

C.- Mycobacterium tuberculosis

Morfología:

Es un bacilo en forma de bastón delgado, su longitud varía de 2 a 6 micras y de 0.3 a 0.6 micras de ancho, mesófilo, aerobio estricto intracelular que es patógeno natural sólo para el humano, no produce toxinas conocidas y su virulencia se relaciona con el "factor cuerda" que es la capacidad que tienen las células de permanecer paralelas unas con otras, formando apretados paquetes de cordones cuando se cultivan "in vitro".

Tinción:

Las células micobacterianas son difíciles de teñir por los métodos usuales, pero una vez teñidas retienen fuertemente los colorantes, los cuales resisten a la decoloración de los ácidos fuertes.

Esta propiedad de ácido resistencia se demuestra con la coloración de Ziehl-Neelsen de la cual hay varias modificaciones.

La ácido resistencia está relacionada a la naturaleza de los complejos lipídicos que están en la célula, especialmente los hidroxíácidos de alto peso molecular, conocidos como ácidos micólicos y además a la integridad física de las células.

Cultivo:

El bacilo tuberculoso es aerobio estricto. Puede crecer en medios simples pero adicionados de glicerol como fuente de carbono y de sales minerales como cloruro de amonio que utiliza como fuente de nitrógeno. Los aminoácidos aceleran el crecimiento, el más empleado es la asparagina. La energía para su crecimiento la obtienen de la oxidación del sustrato orgánico (glucosa o glicerol).

El medio sólido más usual para primocultivo es el Lowenstein-Jensen a base de yema de huevo, glicerol, almidón y sales minerales donde produce colonias rugosas, secas, de bordes irregulares y color paja.

En medios líquidos crece en la superficie formando una película granulosa gruesa.

La velocidad de crecimiento de M. tuberculosis es más lenta que la de la mayoría de las bacterias (crece entre 2 a 4 semanas); los bacilos desarrollan mejor a 37 °C y no lo hacen en absoluto -

por debajo de 30 °C o por encima de 42 °C. Tienen como particularidad que el aumento en la tensión de CO₂ estimula su crecimiento.

Estructura Antigénica:

LÍPIDOS: Junto con las ceras D, de alto peso molecular, son responsables de la reacción de los tejidos ante el bacilo. Hasta un 60% del peso seco de la pared celular del bacilo está compuesto de lípidos, lo que explica la impermeabilidad relativa a las tinciones, la resistencia a los ácidos, a la actividad bactericida del complemento y la digestión intracelular por los macrófagos de este organismo.

- 1) Entre los fosfolípidos están la cardiolipina, fosfatidil-etanolamina, fosfatidilinositol y manofosfatidil inósidos. Los ácidos grasos sustituyentes de estos fosfolípidos son ácidos palmítico, linoleico y linolénico, junto con ácidos ftoico y tuberculoesteárico que son ácidos grasos exclusivos de las micobacterias.
- 2) Una familia de los ácidos α -alquil- β -hidroxil, llamados ácidos micólicos, se encuentran esterificados con el arabinogalactano de la pared celular micobacteriana y su naturaleza y localización son las responsables de las reacciones de tinción ácido resistente de la micobacteria.
- 3) Los glucolípidos son de naturaleza variada e influyen en el factor de crecimiento en cordón que contiene ácido micólico (6-6'-diciciloil- α -D-trehalosa), esta sustancia inhibe la migración de los leucocitos y estimula la formación de granulomas crónicos.

- 4) El complejo peptidoglucolipídico, cera D, contiene arabinosa, galactosa, glucosamina, ácido murámico, ácido micólico y aminoácidos. Este complejo tiene probablemente su origen en degradaciones autolíticas de la pared celular y su importancia radica en el coadyuvante en la respuesta inmunológica.

La porción polisacárida de la cera D retiene algunos determinantes antigénicos. Parece que el determinante antigénico principal (el lado de la arabinosa) está compartido por todas las especies de *Mycobacterium*, *Hocardia* y *Corynebacterium*.

POLISACARIDOS: contiene varios tipos, demostrables por pruebas inmunológicas o químicas.

En estudios realizados por Birnbaum y Affronti (19) se logró identificar el polisacárido de Seibert y se demostró que estaba compuesto principalmente por arabinogalactana de la pared celular micobacteriana. Posteriormente por inmunodifusión demostraron que este antígeno es común en otras especies de *Mycobacterium*, incluyendo *M. kansasii* y *M. intracelulare*. Las arabinogalactanas y arabinomananas dan reacciones de hipersensibilidad inmediata en piel, en cobayos sensibilizados. Los polisacáridos no nitrogenados por lo general no dan reacciones de hipersensibilidad tardía ni ninguno de los fenómenos relacionados en animales sensibilizados. Sin embargo posteriormente Chaparas y col. (19) describieron una excepción en la cual aparentemente un carbohidrato micobacteriano da respuesta de hipersensibilidad tipo tardía en cobayos sensibilizados e induce la inhibición de la migración de macrófagos, pero falla en la estimulación de linfocitos in vitro.

Kuwabara y Tsunittí reportaron la obtención de una proteína purificada tuberculínicamente activa en forma cristalina cuya secuencia de aminoácidos fué determinada, donde describieron que un pequeño péptido triptico (Asn-Gli-Ser-Gln-Met-Arg) derivado de esta proteína tenía actividad retenida de tuberculina (19).

TUBERCULOPROTEINAS: son el principio activo de la producción de hipersensibilidad a la tuberculina y lo positivo de las pruebas cutáneas. Las proteínas unidas a una fracción cética, mediante inyección, pueden inducir la sensibilidad tuberculínica.

En un estudio realizado por Affronti y col. (1) se examinaron filtrados de cultivos preparados a partir de micobacterias. Por electroforesis en geles de poliacrilamida se detectaron proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y constituyentes lipídicos, encontrándose que la mayoría de los componentes individuales fueron de bajo peso molecular. De los componentes encontrados en una cepa de M. tuberculosis H₃₇Rv fueron 42 proteínas, 8 carbohidratos, 11 lípidos y 3 ácidos nucleicos (se utilizó filtrado de cultivo).

En otro trabajo realizado por Nagai, Nagasuga, Matsumoto y Kohda (29) se estudiaron por el mismo método fracciones proteicas obtenidas a partir de filtrados de cultivo de M. tuberculosis cepa H₃₇Rv y se encontró una variedad de proteínas de un peso molecular no menor de 10,000 daltons, las cuales se demostró están comprometidas en la reacción dérmica a la tuberculina.

Prevención:

La vacuna BCG (bacilo de Calmette-Guérin) es una cepa de bacilo de tuberculosis bovina completamente avirulenta y es de interés para la inmunización activa contra la tuberculosis. Tiene por objeto provocar una reacción defensiva semejante a la que produce la primoinfección tuberculosa, pero sin los peligros de ésta.

En México constituye el método preventivo primordial y se ha demostrado que confiere protección considerable con duración aproximada de cinco a diez años.

D.- INMUNOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS.

Respuesta Inmunológica:

La respuesta inmunológica en la tuberculosis está mediada por mecanismos de protección o defensa que pueden ser específicos y no específicos.

- a) No específicos: son los primeros en aparecer, actúan por medio de barreras mecánicas y químicas, por acción de sustancias microbicidas y por la fagocitosis.
- b) Específicos: refuerzan o amplifican la acción de los no específicos. Involucra tanto mecanismos humorales como celulares y puede ser activa y pasiva.

Los mecanismos humorales están representados por los anticuerpos y el complemento, que unidos pueden destruir microorganismos por lisis o facilitando (opsonización) la fagocitosis.

En la respuesta inmune celular participan fundamentalmente - linfocitos T (adiestrados en el timo) y los macrófagos, éstos al ser activados por sustancias derivadas de los linfocitos (linfocinas) destruyen microorganismos que antes no habían podido ser eliminados por ningún otro mecanismo.

El contacto con Mycobacterium tuberculosis o BCG provoca una sensibilización en individuos infectados o vacunados, manifestándose esta sensibilización en pruebas cutáneas con tuberculina o - PPD.

La protección y el daño depende de los linfocitos T específicos los cuales se activan ante la presencia del antígeno homólogo con lo cual empiezan a sufrir transformaciones morfológicas y fisiológicas que provocan que proliferen, se diferencien y se produzcan linfocinas. Las linfocinas tienen infinidad de funciones, en un proceso de daño, cuando están en altas concentraciones provocan destrucción tisular y en procesos de protección tienden a activar a los macrófagos con lo cual habrá aumento de su actividad y des-

trucción del bacilo tuberculoso. Es por lo anterior que muchos autores proponen que hay una disociación entre protección y daño y atribuyen la activación de linfocitos T a otros antígenos diferentes del bacilo (15).

Hipersensibilidad Tardía:

La reacción cutánea a la tuberculina es el prototipo de la hipersensibilidad tardía cuya respuesta retardada está asociada con un infiltrado de células mononucleares que no se puede transferir pasivamente por el suero. Las células responsables de esta reacción son los linfocitos, los cuales no necesariamente son vivos, pues sus productos lisados pueden provocar dicha reacción. La respuesta inmune está mediada por anticuerpos y la llevan a cabo linfocitos sensibilizados (provenientes de linfocitos diferenciados en el timo).

Cuando linfocitos provenientes de sujetos sensibilizados con bacilos tuberculosos se cultivan en presencia de tuberculina o PPD se presenta la "transformación blastoide", fenómeno que consiste en que células sensibilizadas se activan por el antígeno específico, debido a lo cual proliferan y muestran cambios morfológicos que dan apariencia de blastos.

Además de esta transformación, la activación de los linfocitos origina cambios fisiológicos en los cuales hay síntesis y liberación de "linfocinas", sustancias que tienen diversas actividades biológicas como: factor capaz de inhibir la migración de macrófagos (MIF), puede ser la misma que activa a los macrófagos (MAF) y que le permite la mejor digestión de las bacterias fagocitadas. Otras linfocinas que se producen "in vitro" por la estimulación del PPD son: linfotoxina (LT) con actividad citolítica sobre muchos tipos de células; factor mitogénico que induce la proliferación de otros linfocitos normales (MF); factores quimiotácticos para diversos -

tipos de leucocitos (CF); factor que provoca inflamación cutánea (SRF); e interferón.

Actualmente se ha comprobado que en humanos el factor que inhibe la migración de macrófagos (MIF) es diferente del que impide la migración de leucocitos. El MIF tiene un peso molecular de 23,000 y solo afecta a los macrófagos humanos, cobayo o cualquier especie (34).

Metchnikoff postuló que "los macrófagos eran células responsable de los mecanismos de protección", basándose en la observación de que el bacilo es destruido por células mononucleares en los huespedes no susceptibles (15). Posteriormente se demostró que el previo contacto con el bacilo daba origen a un estado de memoria el cual puede manifestarse de nuevo con la entrada al individuo de nuevos bacilos, con lo cual hay activación de macrófagos y por lo tanto fagocitosis de los bacilos.

Mackaness propuso el término "inmunidad celular" para este estado de protección en el cual el antígeno específico (M. tuberculosis o BCG) se une a los receptores específicos que se encuentran en la membrana de los linfocitos timo-dependientes, los activan y comienzan la proliferación en ganglios linfáticos regionales y a reciclar en circulación (15).

La población de linfocitos sensibilizados puede actuar de nuevo con el antígeno y sintetizar linfocinas, de las cuales algunas actuarán directamente sobre macrófagos, favoreciendo con ello la atracción, inmovilización e incremento de la actividad fagocítica y digestiva. La activación requiere energía y provoca que el macrófago incremente su capacidad de adhesividad, movilidad de su membrana, actividad fagocítica, número de lisosomas y enzimas que contiene.

Según Dnneberg (15) hay mayor destrucción de bacilos tuberculosos en lesiones locales que en generalizadas debido a que hay mayor concentración de antígeno y linfocinas con lo cual hay mayor

activación de macrófagos locales (de vida relativamente corta) (15).

Se sostiene que la presencia de micobacterias, ya sea el bacilo tuberculoso, BCG, etc. estimulan que linfocitos T específicos - originen a una población única de linfocitos sensibilizados capaz de provocar hipersensibilidad tardía y protección. Así cuando hay grandes cantidades de antígeno se liberan linfocinas que activan a los macrófagos para fagocitar y destruir al bacilo con lo cual limitan su dispersión y conducen a un estado de protección (hipersensibilidad tardía).

Cuando un sujeto tuberculino positivo vuelve a entrar en contacto con el bacilo, ya sea por reinfección exógena o endógena, el curso del padecimiento es totalmente distinto ya que debido a la hipersensibilidad vá a existir daño tisular importante. El proceso inflamatorio se caracteriza por la formación de granuloma, seguida por necrosis con calcificación. Esta destrucción del tejido se debe a los fenómenos de hipersensibilidad, principalmente por la muerte de los macrófagos y la liberación de enzimas que destruyen los tejidos. El proceso puede terminar en fibrosis pulmonar con calcificación. La reinfección puede facilitarse por cualquier enfermedad debilitante, por desnutrición o por la disminución de la respuesta inmune que vá unida con la edad avanzada.

Respuesta Cutánea al PPD:

Tanto la protección como el daño, son dependientes de la existencia de linfocitos T específicos que son activados por el antígeno homólogo y con ello empiezan a sufrir cambios morfológicos y fisiológicos que producen la proliferación, diferenciación y producción de linfocinas.

En los procesos de daño, las altas concentraciones de linfocinas ocasionan destrucción tisular, en tanto que la protección se debe a que algunas de ellas activan a los macrófagos con los cual

se incrementa su diagnóstico y la destrucción del bacilo intracelular. Algunos autores suponen que hay disociación entre protección y daño inmunológicos y que son antígenos diferentes del bacilo los que activan a subpoblaciones distintas de linfocitos T. Otros, consideran que la misma población de linfocitos es la que se encarga de ambos fenómenos, que la presencia de uno, de otro o de ambos se debe a la concentración relativa de las linfocinas presentes y que al disparar el mecanismo de daño, también se pone en marcha el de protección.

Un estado de inmunosupresión es debido probablemente al contacto continuo con el bacilo tuberculoso, la presencia de linfocitos T supresores. Por otra parte existen factores en el huésped que influyen en la manifestación de la reacción, entre ellos están infecciones virales, tratamiento con corticosteroides, estado nutricional y la edad.

Entre los mecanismos que ayudan a explicar un estado de anergia es la presencia de una subpoblación de linfocitos T, conocida como supresora, que bloquea los linfocitos T que normalmente son capaces de ser activados por antígenos específicos. Otra suposición es que ciertos linfocitos sintetizan mediadores "negativos" que suprimen su actividad propia o la de otros, utilizando diferentes mecanismos de retroalimentación (5).

Problemas Inmunológicos en el Paciente:

Muchos de los problemas inmunológicos en la tuberculosis radican en la disminución de la viabilidad de sus linfocitos (en sangre circulante su valor real es del orden del 60 al 70%) que evitan la expresión total de sus capacidades fisiológicas.

Debido a lo anterior es importante conocer el comportamiento inmune en los pacientes con tuberculosis pues las formas clínicas de esta enfermedad pueden estar más relacionadas con el tipo y mag-

nitid de la respuesta desarrollada por el huésped, que con la actividad metabólica del huésped. Se ha comprobado que la evolución de la infección tuberculosa está en relación directa con la incompetencia del enfermo para desarrollar una respuesta inmune celular eficiente y que, al menos en forma parcial, esta ineptitud reside en la capacidad vital misma de los linfocitos.

Se han hecho estudios inmunológicos en pacientes con tuberculosis y se ha encontrado que tienen depresión de su respuesta inmune celular que incluye valores bajos de linfocitos T y resistencia al tratamiento antifímico. Puede haber intradermoreacciones negativas al PPD, CANDIDINA, TRICOFITINA.

Muchos tienen elevadas las células "B" (rosetas EAC) y elevadas las células T gamma, que es una población enriquecida de linfocitos T supresores. La IgG e IgA están aumentadas y el componente C₃ del complemento está disminuido.

E.- HISTORIA DE LA TUBERCULINA.

La sustancia conocida como tuberculina fue producida primeramente por Roberto Koch. Poco después de haber descubierto el bacilo tuberculoso en 1882, trató de encontrar un tratamiento adecuado de la enfermedad. Cultivó el bacilo tuberculoso durante algunos meses y entonces, mediante el calor, mató a los gérmenes. Después, - condensó ese material y lo pasó a través de un filtro que removió los bacilos tuberculosos y dejó un caldo, a este preparado se le conoce como tuberculina vieja (ot).

El Dr. Koch tenía esperanzas de que este fluido, al que llamó tuberculina, podría curar al enfermo de tuberculosis cuando le era inyectado, pero con el tiempo se demostró que para este fin - resultaba ineficaz.

La tuberculina vieja inoculada por vía intracutánea a un animal infectado produce una reacción de hipersensibilidad tardía entre 48 y 72 horas. Esta reacción se conoce como "reacción a la tuberculina" y nos indica una experiencia inmunológica pasada o presente a Mycobacterium tuberculosis. Muchos estudios se han realizado sobre las proteínas responsables de la reacción. Las proteínas activas son purificadas por precipitación con ácido tricloroacético y son designadas como PPD (derivado proteico purificado). El original PPD contiene considerables cantidades de polisacáridos y ácidos nucleicos, otros productos más purificados se obtienen por ultrafiltración seguida de una precipitación con sulfato de amonio, un producto separado de esta manera es el de Florence Sibert el cual se tomó como estandar (PPD-S) y fue depositado oficialmente en Dinamarca y en Estados Unidos para tomarse de referencia al probar la potencia de nuevos PPD.

Morisawa en 1960 obtiene de la tuberculina vieja un péptido cristalizabile capaz de producir la reacción de tuberculina.

Moulton en 1972 pasó PPD por una columna de Sephadex G-200 y obtuvo tres fracciones que presentaron reacción de tuberculina en cobayos inmunizados con M. tuberculosis.

En 1975 Nagai, Nagasuga, Matsumoto y Kohda determinaron de una cepa de M. tuberculosis una variedad de proteínas con un peso molecular menor de 10,000 daltons, las cuales estaban implicadas en la reacción a la tuberculina.

En 1975 Affronti preparó PPD de M. kansasii, de M. intracelulare y de Nocardia asteroides por el método de Seibert, los cuales presentaron reacción de tuberculina con todos los animales sensibilizados, pero el grado de la reacción fué mayor cuando se aplicó el PPD homólogo a cada animal.

Con el descubrimiento de la tuberculina por Roberto Koch en 1890 y su utilización como elemento de investigación permitieron iniciar el conocimiento de la inmunología y posteriormente, en este siglo, precisar la epidemiología moderna de la tuberculosis.

F.- ASPECTOS IMPORTANTES DE LA TUBERCULINA.

Durante la primoinfección el huésped adquiere hipersensibilidad al bacilo tuberculoso. Esto se hace evidente por el desarrollo de una reacción positiva a la tuberculina. La sensibilidad tuberculínica puede ser inducida por bacilos tuberculosos completos o por tuberculoproteínas en combinación con cera soluble en cloroformo del bacilo tuberculoso, pero no por tuberculoproteínas solas.

La prueba cutánea de la tuberculina no dá información diagnóstica relativa a una cierta enfermedad determinada, a menos que pueda establecerse que la reacción a la prueba ha virado de negativo a positivo en un lapso relacionado con dicha enfermedad. De otra manera, una prueba cutánea positiva sólo indicará que el enfermo ha sufrido tuberculosis o alguna infección por micobacterias

alguna vez en su pasado. La prueba cutánea positiva a la tuberculina indica la presencia de linfocitos "T" específicamente sensibilizados. Se piensa que una prueba cutánea intensamente positiva representa una mayor labilidad a la infección activa, ya que tendría que hallarse presente una mayor masa de bacilos tuberculosos para que se mantuviera una intensa hipersensibilidad a la tuberculina.

El derivado proteico purificado (PPD) se prepara por precipitación con sulfato de amonio del filtrado de cultivo y se estandariza en términos de la reactividad biológica como "unidades de tuberculina" (UT).

Una unidad de tuberculina es la actividad contenida en un peso específico de PPD de Seibert en un amortiguador especial (PPD-S). La tuberculina de potencia inicial tiene 1 UT, la de potencia intermedia tiene 5 UT y la de potencia segunda 250 UT de actividad.

Existen varios métodos para aplicar la prueba tuberculínica; el de Mantoux (1908); el de punciones múltiples (Heaf 1951); el de Von Pirquet (1907); el de Von Pirquet con adrenalina; el de parche gelatinado, de Moró y otros más. El método que aconseja la Campaña Nacional contra la Tuberculosis es el de Mantoux por ser confiable y reproducible.

Experiencias nacionales e internacionales hacen recomendable el uso de dos unidades de PPD en lugar de una. La induración cutánea que se produce con dos unidades es del mismo tamaño que la provocada por una unidad, pero es más consistente y por lo tanto facilita la lectura. Por lo anterior a partir de 1964 en México, el PPD se distribuye exclusivamente en dosis de 2 UT las que están contenidas en un décimo de centímetro cúbico del diluyente y equivalen a 0.00004 mg. del producto seco. La cantidad inyectada intradérmicamente es generalmente de 0.1 ml.

Reacciones a la tuberculina:

Una persona que no ha tenido contacto con el bacilo tuberculoso no reacciona a el PPD-S. Una persona que ha tenido primoinfección con bacilos tuberculosos reacciona desarrollando una induración de más de 10 mm. de diámetro, edema, eritema y, en ocasiones en reacciones fuertemente positivas, forma necrosis central en 24 a 48 horas. La prueba se lee entre 48 y 72 horas después que la prueba ha sido aplicada. Una respuesta positiva consiste en 10 mm. o más de eritema o induración. Las pruebas positivas pueden permanecer por varios días y las reacciones débiles tienden a desaparecer rápidamente.

La prueba de la tuberculina se hace positiva de 4 a 6 semanas después de la infección (o de la inyección de bacilos avirulentos).

Puede ser negativa cuando hay infección tuberculosa debido a que se desarrolla "anergia" causada por una tuberculosis masiva, narampión, sarcoidosis, enfermedad de Hodgkin o drogas inmunosupresoras.

La reacción a la tuberculina se presenta entre 6 y 8 semanas después de adquirida la infección o de la vacunación con BCG, después de la vacunación la reacción se mantiene positiva por 3 a 7 años.

Interpretación de la pruebas

Una prueba de tuberculina positiva solo indica que el individuo ha sido infectado por bacilos tuberculosos en el pasado; no indica que exista enfermedad actual activa.

Las personas sanas tuberculino positivas tienen cierta resistencia a la enfermedad diseminada, pero tienen el riesgo de desarrollar la enfermedad debido a la activación de la primoinfección.

Uso de la prueba:

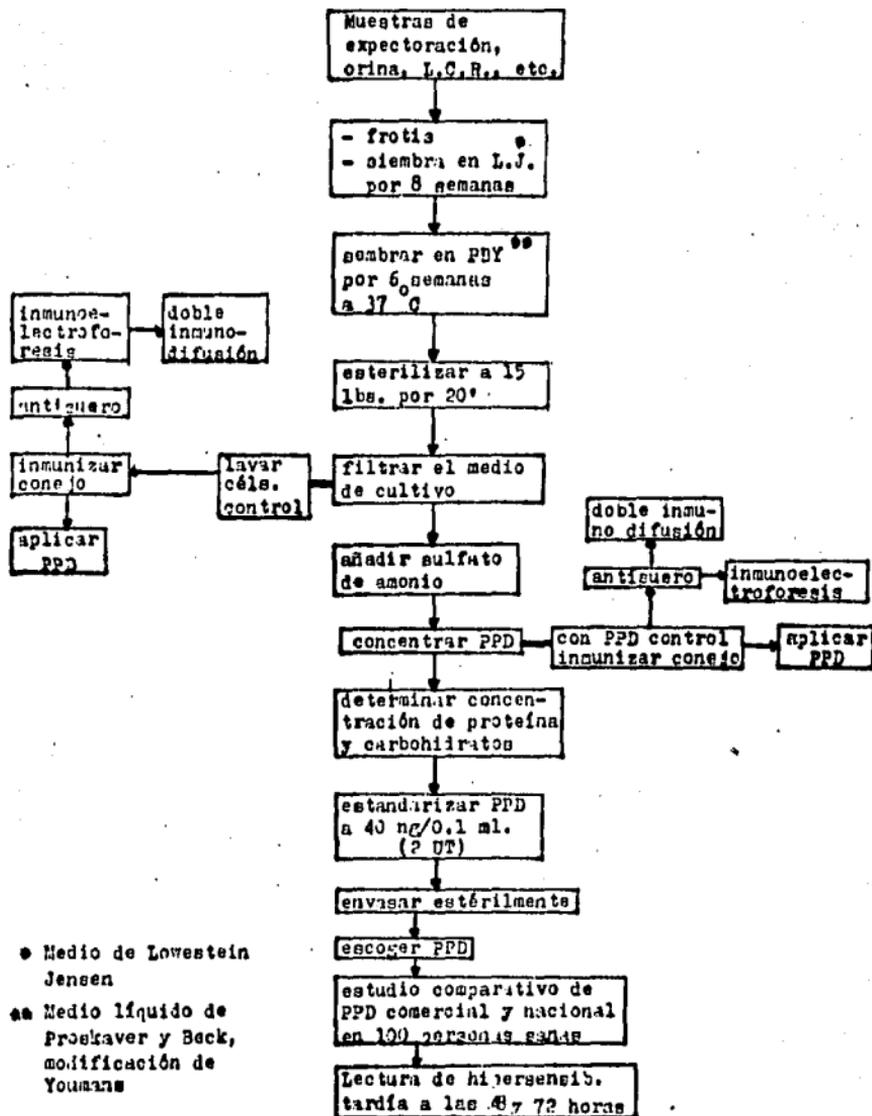
La prueba de la tuberculina constituye una parte importante - de las diversas medidas comprendidas en todo programa contra tuberculosis, encuestas sobre la incidencia y prevalencia de la infección tuberculosa, descubrimiento de casos y vacunación con BCG. En vacunación con BCG sus indicaciones son; investigaciones previas a dicha vacuna para incluir en ella a los no reactivos y, en estudios post-vacunales, para conocer la conversión o "viraje" tuberculínico y determinar por cuánto tiempo se mantiene la reacción que se interpreta como expresión de inmunidad.

En epidemiología su uso principal es para diferenciar las personas a las que se debe aplicar vacuna BCG de las que no deben recibirla. En trabajos rutinarios de vacunación, el PPD se emplea en México en las personas de los 6 meses a 20 años de edad y siempre debe preceder a la vacunación con BCG.

CAPITULO III

"MATERIAL Y METODOS"

DIAGRAMA DE FLUJO



M A T E R I A L Y M E T O D O S

Las muestras utilizadas para este estudio fueron obtenidas en un periodo comprendido entre julio de 1984 a febrero de 1985. Se analizó toda muestra proveniente del Hospital Angel Leaño y Hospital Militar (ambos en Guadalajara, Jal.) con solicitud de bacilos-copia y sumaron un total de 378 muestras.

Las muestras de expectoración, orina, pus, líquido cefalorraquídeo, jugo gástrico, etc. fueron recogidas en recipientes adecuados, estériles y debidamente etiquetados.

Se analizaron tres muestras seriadas de cada paciente si se trataba de expectoración, lavado bronquial o jugo gástrico. Si era orina diez muestras seriadas y si consistía la muestra de LCR, pus, tejidos, etc. con una sola muestra por paciente fué suficiente.

En expectoración o pus se practicó frotis directo, se fijó - con calor y se coloreó por el método de Kinyoun; asimismo tratándose de muestras de orina, jugo gástrico, tejidos, LCR u otro tipo de líquido se procesó por el método de concentración y se practicó frotis fijado al calor para posteriormente colorearse por el método de Kinyoun.

Se buscaron al microscopio bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) por todo el frotis reportándose de acuerdo al siguiente esquema:

NEGATIVO: No presencia de BAAR

ESCASOS: 1 a 10 BAAR en todo el frotis

POCOS: Más de 10 BAAR en todo el frotis

NUMEROSOS: uno o más BAAR por campo

Cuando la muestra resultaba positiva se procesó por el método de Petroff o simplemente por concentración y con este material se inoculó con pipeta Pasteur estéril en medio de Lowenstein-Jensen, incubándose a 37°C con una atmósfera de 5-10% de CO₂.

En un inicio se revisaron los medios a los cinco días de su siembra para detectar la presencia de micobacterias de crecimiento rápido, posterior a ésto se revisaron cada semana durante ocho semanas, anotando siempre características morfológicas, de pigmentación, número y textura de las colonias. Siempre que hubo desarrollo en el cultivo se realizó frotis y coloración de Kinyoun de las colonias para comprobar la presencia de BAAR y descartar una probable contaminación.

Posterior a las ocho semanas de incubación de los cultivos con desarrollo se procedió a hacer la clasificación bioquímica de las micobacterias de acuerdo a la referencia (27). Hasta aquí el trabajo se realizó conjuntamente.

Obtención de la proteína:

Ya clasificadas bioquímicamente las micobacterias se procedió a pasarlas del medio de Lowenstein-Jensen a tubos conteniendo 12 ml. de medio líquido de PBY (Proskaver y Beck, modificación de Youmans), se incubaron a 37 °C por seis semanas para permitir que se formara una película de colonias en la superficie del medio. Como control se utilizó una cepa virulenta de M. tuberculosis, previamente identificada en Estados Unidos (cepa H₃₇Rv).

Posteriormente esta película se pasó cuidadosamente a frascos estériles conteniendo 150 ml. de medio líquido PBY (dos frascos por cada cepa), procurando siempre inocular la superficie del medio, se incubaron a 37 °C por 6 a 8 semanas. Transcurrido este tiempo los frascos se esterilizaron a 15 lbs. de presión por 20 minutos y el medio de cultivo se filtró con papel filtro.

Las células se lavaron tres veces con agua caliente y se seccionaron al aire libre.

Como paso siguiente, al sobrenadante obtenido de cada cultivo se añadió 0.75 gr. de sulfato de amonio por mililitro de medio (para obtener una solución saturada de sulfato de amonio) y se dejó en refrigeración toda la noche. Posterior a esto se extrajo con pipeta Pasteur toda la proteína contenida en la superficie (de cada cultivo) y se centrifugó a 10,000 rpm. durante 20 minutos en centrífuga Sorball cabezal SS-34.

El precipitado resultante (la proteína) fué disuelto en agua y sometido a diálisis a 4 °C contra PBS (buffer salino de fosfatos) durante 2 a 3 días para eliminar el sulfato de amonio y posteriormente se concentró por hiperventilación, el concentrado de cada PPD se distribuyó en alícuotas y se sometió a congelación. Por el método de Lowry se determinó de cada PPD la concentración de proteína y por el método de Antrona la concentración de carbohidratos.

Se hizo a los diferentes PPD una electroforesis en geles de -

poliacrilamida y una inmunolectroforesis en gel de agar contra un suero hiperinmune procedente de un conejo previamente inmunizado con células muertas y adyuvante incompleto de Freund.

Posterior a ésto se procedió a estandarizar el PPD a 40 ng/0.1 ml (2 UT) en solución salina el cual se esterilizó por filtro milipore de 0.22 μ y se envasó en frascos color ámbar estériles.

De acuerdo a la inmunolectroforesis, electroforesis en geles de poliacrilamida y a la reacción biológica en una persona PPD positiva se seleccionó el PPD procedente de la cepa número 18 para realizar el estudio comparativo con el PPD comercial en una población de 100 personas aparentemente sanas.

Otros procedimientos:

Se trituraron finamente las células de la cepa H₃₇Rv de M. tuberculosis y se pesaron 0.06 mg. para preparar el antígeno, cuyo volumen final fué de 6 ml. habiéndole agregado el adyuvante de Freund. Con este antígeno se inmunizó un conejo aplicándole 1 ml. semanalmente durante 6 semanas después de las cuales se sangró para obtener antisuero anti-células H₃₇Rv.

Posteriormente se le aplicaron a este conejo los diferentes PPD obtenidos para observar la reacción biológica a las 48 horas.

Se obtuvo un concentrado de PPD a partir de la cepa H₃₇Rv de M. tuberculosis con el cual se preparó un antígeno que se utilizó para inmunizar otro conejo, aplicándole 1 ml. semanalmente durante 10 semanas, después de las cuales se sangró y se obtuvo antisuero anti-PPD. Posteriormente se le aplicaron a este conejo los diferentes PPD obtenidos.

Como paso final se hicieron inmunolectroforesis y doble inmunodifusión de cada PPD, usando como antisuero, el obtenido a partir de la cepa control H₃₇Rv de M. tuberculosis.

METODO DE PETROFF.-

El método de Petroff fué introducido en el año de 1915 y ha demostrado ser el más eficiente de los métodos de concentración.

Se basa en la adición de NaOH al 4% como descontaminante pues destruye todo organismo no ácido resistente; la muestra se neutraliza con HCl 2N usando previamente fenolftaleína como indicador. El NaOH por actuar como mucolítico tiene la ventaja de ayudar a homogenizar la muestra, además promueve la concentración por centrifugación.

Para la utilización de este método se debe considerar que el hidróxido de sodio es tóxico para el bacilo tuberculoso y por lo tanto debe usarse a la menor concentración posible sin que proporcione una tasa de contaminación muy alta. Hay variación en el uso del porcentaje de NaOH en el laboratorio y ésto generalmente ocurre cuando en climas templados las muestras se examinan después de ser reunidas, mientras que en regiones tropicales puede ocurrir que un retardo aumente los microorganismos diferentes a las micobacterias en la muestra.

Procedimiento:

- Se añade un volumen igual de NaOH al 4% en aproximadamente 4 ml. de muestra en un recipiente adecuado (asegurándose que el recipiente que contiene el NaOH no se ponga en contacto con el cuello de el frasco que contiene la muestra.
- Agitarse con la mano o en una máquina mezcladora durante 15'.
- Cerrar los tubos herméticamente.
- Centrifugar a 3,000 rpm. durante 20' tomando las debidas precauciones como la de balancear el contenido de los tubos.
- NO ABRIR LA CENTRIFUGA; ESPERAR HASTA UN RATO DESPUES QUE SE HAYA DETENIDO POR COMPLETO PARA EVITAR LA SALIDA DE AEROSOLLES.
- Descartar el sobrenadante en un recipiente adecuado conteniendo fenol al 10%, secando con papel secante cualquier ensuciamiento en el exterior de el cuello de el tubo.

- Agregar al sedimento una gota de fenolftaleína y neutralizar con HCl 2N. Evitando que el pH final no sea ni muy ácido ni muy alcalino.
- Tomar con pipeta Pasteur estéril de este sedimento y sembrar la pendiente del medio de Lowestein-Jensen y con el residuo preparar los frotis (cuando la muestra se requiera por concentración).
- Incubar los medios con una atmósfera de 5-10% de CO₂ en posición horizontal durante toda la noche y luego por 8 semanas más en posición vertical.

MÉTODO DE KINYOUN (coloración en frío de BAAR).-

Este método fué descrito en 1915 por Kinyoun. La ventaja de este método de Kinyoun sobre el de Ziehl Neelsen, es que requiere menos tiempo para colorear y no requiere calor. Con la adición en la superficie activa del agente detergente tergitol 7, el tiempo de teñir se puede reducir.

El término ácido alcohol resistente puede ser definido con el significado "no se decolora rápidamente por ácidos y otros medios, dicha bacteria". El mecanismo responsable de la resistencia ácido alcohol de la cual depende, es la composición de lípidos de las células o bien de la integridad física de la célula misma. La coloración primaria es de fucsina básica que es un colorante triaminofenil metano (rosalin), éste es actualmente una mezcla de para-rosalin, rosanilin y dimetil fucsina, este colorante imparte un color rojo a los bacilos de la tuberculosis.

Reactivos:

1.- Carbol fucsina:

Fucsina básica	4 gr.
Cristales de fenol	8 gr.
Etanol 95%	20 ml.
Agua destilada	100 ml.

- a) disolver la fucsina en alcohol en un matraz.
- b) a la solución de fucsina, agregar 100 ml. de agua destilada, lentamente mientras se agita.
- c) fundir el fenol a 56 °C en baño maría inmediatamente antes de usarse.
- d) añadir el fenol fundido al colorante.

2.- Alcohol-ácido:

alcohol etílico al 95% 97 ml.
 HCl concentrado 3 ml.
 (agregando el ácido en el alcohol para que no se proyecte)

3.- Contraste:

Azul de metileno 0.3 gr.
 Agua destilada 100 ml.

Procedimiento:

- Preparar un frotis tomando con pipeta Pasteur una gota la cual se extiende sobre un área de 2-3 cm.
- Fijar el frotis con una plataforma caliente a 65 ó 75 °C por dos horas o usar un mechero con flama y pasar el portaobjetos sobre éste tres veces. No sobrecalentar.
- Cubrir con colorante de Kinyoun por 5 ó 10 minutos.
- Enjuagar con chorro de agua corriente.
- Decolorar con alcohol ácido.
- Enjuagar con agua corriente.
- Decolorar el frotis hasta rosa descolorido.
- Enjuagar con agua corriente.
- Cubrir el portaobjetos con contraste por 15-30".
- Enjuagar con agua corriente y secar al aire.
- Examinar con aceite de inmersión al microscopio, limpiar los lentes después de cada espécimen, especialmente si es positivo.

Reporte:

Debe establecer el método de tinción usado y el número de bacilos viatos en el frotis, reportando bajo el siguiente esquema:

NEGATIVO: No presencia de BAAR

ESCASOS: 1 a 10 BAAR en todo el frotis

POCOS: Más de 10 BAAR en todo el frotis

NUMEROSOS: Uno o más BAAR por campo

MEDIO DE LOWESTEIN-JENSEN.-

El medio recomendado para Micobacterias es el medio de Lowestein-Jensen, es un medio simple de preparar, a base de huevo coagulado y puede ser usado para aislamiento, identificación y pruebas de sensibilidad a micobacterias.

El medio descrito por Jensen en 1932 contiene almidón de papa, posteriormente omitido por él mismo en el año de 1955.

Es un medio completo que contiene varios fosfatos, sulfatos y citratos, así como glicerol, el cual proporciona carbón y energía por la oxidación del sustrato inorgánico.

También contiene asparagina como fuente de nitrógeno (aminoácido que acelera el crecimiento).

Principio:

El uso de un medio con base de huevo para aislamiento primario de micobacterias tiene dos ventajas:

- 1.- El medio soporta una amplia variedad de micobacterias.
- 2.- El crecimiento de micobacterias en huevo es satisfactorio para la prueba de la niacina.

La principal desventaja de los medios con base de huevo es la de la contaminación por organismos proteolíticos, que pueden provocar la licuefacción del medio.

La modificación de Jensen al medio de Lowestein emplea una concentración moderada de verde de malaquita para evitar el crecimiento de la mayoría de los contaminantes, a la vez que dá potencia al rápido crecimiento de posibles micobacterias.

Fórmula:

(Medio Base)

Aparagina	3.6 gr.
Fosfato monopotásico	2.4 gr.
Sulfato de magnesio	0.24 gr.
Citrato de magnesio	0.6 gr.
Harina de patata	30 gr.
Verde de malaquita	0.4 gr.

(Complemento)

Glicerol	12 ml.
Agua destilada	600 ml.
Huevo homogenizado	1 lt.

Procedimiento:

- 1.- Para hidratar la base se suspende 37.2 gr. de ésta en 600 ml. de agua destilada o desionizada que contenga 12 ml. de glicerol y se calienta hasta ebullición con agitación constante.
- 2.- Esterilizar en autoclave durante 15' a 15 lbs. de presión y enfriar hasta 45-60 °C.
- 3.- Se preparan 1,000 ml. de una suspensión uniforme de huevo fresco, que haya sido recogida y suspendida bajo condiciones asépticas.
(nota: antes de quebrarse los huevos se lavan con agua destilada y jabón y posteriormente con alcohol yodado).
- 4.- Bajo condiciones de gran asepsia se añade la base estéril a la suspensión de huevo, se mezcla completamente, evitando la inclusión de burbujas de aire.
- 5.- Distribuir el medio completo en tubos estériles, preferen-

temente con tapón de rosca, en cantidades de 9 ml. a cada tubo, evitando siempre la formación de burbujas.

- 6.- Cerrar herméticamente el tapón y colocar los tubos en el coagulador en posición horizontal de tal manera que permita que el medio forme un plano inclinado con el tubo - pero sin llegar a tocar el tapón. Coagular a 85 °C durante 45'.
- 7.- Sacar los tubos de el coagulador e incubarlos a 37 °C por 48 horas para comprobar su esterilidad y guardarlos en refrigeración bien tapados para evitar su desecación.

No usarse después de 4 meses.

La respuesta típica al cultivo se obtiene después de 2 u 3 - semanas de incubación a 37 °C con una atm. de 5-10% de CO₂, donde las colonias de M. tuberculosis son rugosas, secas, irregulares y semejantes a "migas de pan".

MEDIO LIQUIDO PRY.-

Medio líquido de Proskaver y Beck (modificación de Youmanns). Es un medio líquido selectivo para micobacterias.

Contiene glicerol como fuente de carbono; asparagina, aminoácido que acelera el crecimiento de las micobacterias por proporcionarle el nitrógeno; sales minerales de F, K, S, Mg.

El bacilo de la tuberculosis por ser aerobio estricto debe sembrarse en la superficie del medio líquido en el cual forma una película granulosa gruesa.

Fórmula:

Asparagina	5.0 gr.
Fosfato de potasio monobásico	5.0 gr.
Sulfato de potasio	0.5 gr.
Citrato de magnesio	1.5 gr.
Glicerol	20 ml.
Agua destilada c.b.p.	1 lt.

Procedimiento:

- Los ingredientes se disuelven en agua destilada por separado cada uno de ellos, en el orden dado.
- Cada uno de los componentes debe estar bien disuelto antes de adicionar el siguiente.
- Después de añadir el glicerol, ajustar el pH a 7.0 con NaOH 2 N.
- Pasar 9 ml. de medio a tubos de vidrio con tapón de rosca.
- Esterilizar en autoclave a 10 lbs. de presión por 20'.
- Incubar a 37 ° C por 24 horas para prueba de esterilidad.
- Inocular la superficie del medio con asa estéril.

Recomendaciones:

- El uso de agua bidestilada puede ser esencial o no dependiendo de la pureza del agua disponible ya que el agua destilada contiene sustancias que pueden inhibir el crecimiento del bacilo de la tuberculosis, por lo que es recomendable el uso de agua bidestilada.
- Algunas veces el medio esterilizado tiende a formar un precipitado, lo cual puede deberse al uso de una temperatura muy alta, un largo período de esterilización o a ciertos lotes de magnesio. Dicho precipitado está compuesto de fosfato de magnesio y puede ser removido por filtración a través de papel filtro.
- Este medio puede ser reesterilizado y empleado sin que interfiera en los resultados.

METODO DE LOWRY (Determinación de Proteínas).-

La cuantificación colorimétrica de proteína por uso de reactivo Folin-Ciocalteu depende del contenido de tirosina y triptófano de la proteína.

El desarrollo de la intensidad de color puede variar con diferentes proteínas por lo que es esencial establecer una curva de calibración basada en el análisis del nitrógeno para la mezcla de proteínas a investigar. Se observa una relación lineal entre la cantidad de proteína y la intensidad de color seguida al tratamiento con el reactivo de Folin-Ciocalteu por lo que la concentración de proteína debe diluirse y ensayarse de nuevo si la primera determinación da una densidad óptica arriba del límite superior de la curva de calibración.

Su rango de ensayo está aproximadamente en 0.05 y 0.2 mg de proteína y tiene un incremento de sensibilidad veinte veces mayor que el método de Biuret.

Reactivos:

- Solución A:

sulfato de cobre pentahidratado al 1% 0.1 ml
 tartrato doble de sodio y potasio al 2% 0.1 ml
 carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1 N 10 ml
 (20 gr. de Na_2CO_3 en 400 ml de NaOH 0.1 N)

- Solución de albúmina bovina (100 gamas/ml) -----> Estándar

- Agua destilada

- Reactivo Folin 1 N

Procedimiento:

- 1.- Se coloca en tubo de ensaye 0.1 ml de las diluciones de la muestra (1:10, 1:100 y 1:1,000).
- 2.- Se completan a 1 ml con agua destilada.
- 3.- Se incluyen diluciones del estándar de 100, 50 y 25 μ gr/ml y un blanco con agua destilada.
- 4.- Se añaden 3 ml de la "solución A" a cada tubo.
- 5.- Se agitan dejándose posteriormente en reposo 10' a temperatura ambiente.
- 6.- Se añaden a cada tubo 0.3 ml del reactivo de Folin 1 N.
- 7.- Se agitan y dejan 30' en reposo a temperatura ambiente.
- 8.- Se efectúa lectura en el espectrofotómetro a 750 m μ .
- 9.- Se grafica concentración contra densidad óptica.

Nota:

1 ml de albúmina = 100 μ gr/ml = estándar de 100 gr/ml
 estándar 50 μ gr/ml = 0.5 ml albúmina
 estándar 25 μ gr/ml = 0.25 ml albúmina

{ se completan a
 1 ml con agua
 destilada

METODO DE ANTRONA (Determinación de Azúcares).-

En la estimación de carbohidratos en presencia de proteínas, los métodos de análisis de azúcares basados en la reducción, o en la rotación óptica, no son aplicables, porque las proteínas poseen poder reductor, y capacidad para rotar el plano de la luz polarizada. Debido a ésto, recientemente se han desarrollado numerosas reacciones de color para determinar cantidades relativamente pequeñas de carbohidratos en presencia de cantidades grandes de proteína.

A la reacción del método de Antrona se han hecho numerosas - modificaciones, las cuales han sido desarrolladas desde su introducción por Dreywood, esta reacción se basa en la formación de derivados de furfural.

Este método tiene aplicación en la determinación de hexosas - totales.

Reactivos:

- Antrona al 2% en H₂SO₄ al 96% (preparar al momento).
- Solución estandar de galactosa (100 gamas/ml = 0.010 mgs/100ml)

Procedimiento:

- 1.- Se hacen dilusiones de la muestra.
- 2.- Se depositan 2 ml de reactivo de antrona en los tubos y se ponen an baño frío de 10 a 15° C.
- 3.- Se coloca un blanco con 1 ml. de PBS o agua destilada y 2ml. de reactivo.
- 4.- Se elabora un estándar de galactosa conteniendo concentraciones de 100, 50 y 25 gamas/ml.
- 5.- Se homogeniza sin sacar los tubos del medio frío.
- 6.- Se coloca la serie de tubos en baño maría a ebullición durante 16 min.

- 7.- Se pasan al baño de agua fría.
- 8.- Se lee a 625 mU en el espectrofotómetro.
- 9.- Se grafica concentración contra densidad óptica.

PBS (Buffer de fosfatos salinos).-

- Preparar una solución 0.15 M de Na_2HPO_4 21.29 gr/lt.
- Preparar una solución 0.15 M de KH_2PO_4 20.41 gr/lt.
- Hacer una mezcla de las soluciones anteriores en proporción de 8 volúmenes de solución Na_2HPO_4 + 1 volumen de solución KH_2PO_4 .
- Preparar una solución 0.15 M de NaCl 8.77 gr/lt.
- Se toman volúmenes iguales de la mezcla de soluciones de fosfatos y solución salina 0.15 M.
- Ajustar pH a 7.2

ADYUVANTE DE FREUND.-

Freund en 1947 fué el primero en demostrar la capacidad que tienen las emulsiones de aceite en agua, y especialmente de agua en aceite, para hacer aumentar las respuestas inmunitarias. Desde entonces se han estudiado diversos adyuvantes aceitosos de composición diversa. El descubrimiento de que la adición de micobacterias a las sustancias aceitosas aumentaba la acción adyuvante fué un gran adelanto y el origen del adyuvante completo de Freund el cual es el más empleado en el animal.

El "adyuvante incompleto de Freund" (AIF), es una emulsión simple de agua que contiene el antígeno en aceite mineral. El agente emulsionante puede ser lanolina o arlacel A, que es un monooleato de manida. Se presenta en forma de emulsión cremosa en la cual gotas de agua muy pequeñas que contienen al antígeno están rodeadas de aceite mineral. El "adyuvante completo de Freund" (ACF) se obtiene con el AIF, pero agregándole micobacterias muertas.

Tiene como gran ventaja el AIC y ACF el que aumentan de manera importante la producción de anticuerpos y hasta se vuelven inmunógenas las dosis de antígenos que no lo eran espontáneamente.

Adyuvante incompleto de Freund.-

Reactivos:

- Aceite mineral al 85%
 - Lanolina 15%
- } ADYUVANTE

Procedimiento:

- Fundir lanolina a 60 °C (teniendo cuidado de que no se quemé).
- Esterilizar a 15 lbs. de presión por 15 minutos.
- Al adyuvante se le agrega $\frac{v}{v}$ del antígeno a inocular y se homogeniza en el vortex hasta obtener una emulsión perfecta.

INMUNOPRECIPITACION.-Fundamento:

Cuando un antígeno y un anticuerpo se introducen en un medio gelatinoso en diferentes puntos, allí se difunden y pueden formarse precipitados en el punto en que se encuentran, cuando se prestan las concentraciones de antígeno y anticuerpo.

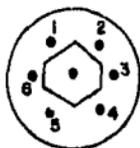
Inmunodifusión Doble:

Es una adaptación de la técnica de inmunoprecipitación en tubo, en donde las soluciones de antígeno y anticuerpo, colocadas en pozos diferentes, difunden libremente en el gel y dan precipitados a equivalencia. Tiene como ventaja el permitir una comparación directa entre distintas preparaciones de antígeno.

Consiste en colocar distintas preparaciones antigénicas en diferentes pozos dispuestos sobre un círculo en cuyo centro se encuentra un pozo donde se introduce antisuero.

- a) Reacción de identidad: cuando se introduce una preparación de antígeno simultáneamente en dos pozos adyacentes, los trazos de precipitación se reúnen y fusionan cuando los dos pozos que contienen el antígeno no están muy separados.

- b) Reacción de no identidad: cuando en dos pozos adyacentes se colocan dos soluciones antigénicas distintas y los trazos de precipitación se cortan.
- c) Reacción de identidad parcial: cuando dos soluciones antigénicas dan lugar a reacciones cruzadas y una de ellas haya servido a la producción del antisuero, las bandas se fusionan.



IDENTIDAD

IDENTIDAD
PARCIAL

NO IDENTIDAD

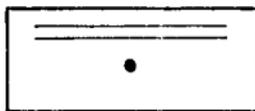
INMUNOELECTROFORESIS (IEF).-

Combina la difusión por separación electroforética y la precipitación inmunitaria de las proteínas. Por lo cual la identificación y la medición aproximada pueden lograrse para las proteínas individuales presentes en el suero, orina o algún otro líquido biológico.

Técnica:

Una laminilla de vidrio cubierta con agar fundido o con agarosa en solución amortiguadora (pH 8.2, potencial iónico 0.025).

Se excava una depresión larga y estrecha para el anticuerpo y un pozo para el antígeno. La muestra del suero (Ag) es colocada en el pozo para el antígeno y se separa en un campo eléctrico con una diferencia de potencial de 3.3 v/cm durante 60-120 minutos. Después se coloca el antisuero en la depresión y se deja difundir el suero y los anticuerpos durante 18 a 24 horas.



POZO LLENADO CON ANTIGENO



LINEAS DE PRECIPITACION
(PROTEINAS)

GELES DE POLIACRILAMIDA.-

Tanto la sensibilidad como la resolución de una técnica por electroforesis se ven altamente aumentadas usando un medio de soporte que consiste en un polímero sintético, como lo es la poliacrilamida. Tales geles son no iónicos y pueden producirse en diferentes tamaños de poro. Otras propiedades deseables son inercia química, transparencia, rigidez y termoestabilidad. La separación de los componentes de una mezcla ocurre tanto por el tamaño (peso molecular) como por la carga (electroforesis).

Los geles de poliacrilamida están formados de mezclas de acrilamida (monómero) y N,N-Metilenbiscrilamida (co-monómero), al cual se ha agregado un iniciador de radicales libres. La propagación de los radicales libres puede ser inducida químicamente con persulfato de amonio o fotoquímicamente con riboflavina y luz UV.

El propósito del N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED) es la conservación de los radicales libres. El enlazamiento cruzado produce una matriz de gel, el tamaño del poro, del cual depende la concentración total de monómero y co-monómero y también la proporción de Bis y acrilamida.

Para moléculas que varían en peso molecular, puede cambiarse el tamaño del poro alterando también la concentración total del gel o la concentración del enlazador cruzado.

Los geles de poro grande, como se requieren para supramoléculas, por ejemplo: DNA y virus, son inobtenibles con acrilamida. Sin embargo pueden prepararse geles apropiados de agarosa o mezclas de poliacrilamida y agarosa.

Los geles de poro pequeño para fraccionamiento de péptidos, están formados por el incremento del enlazador cruzado y también agregando urea 8 M.

Deben usarse solventes durante la polimerización y electroforesis, en los cuales los componentes de la muestra puedan ser resueltos sin precipitación. La urea y el dodecil sulfato de sodio - (SDS) son los agentes más comúnmente usados. Además de ser un agente solubilizante, el SDS es una proteína desnaturizante que se une a la proteína. Como el SDS se une con aproximadamente la mitad del número de residuos de aminoácidos en una cadena polipeptídica, las cargas nativas de la mayoría de las proteínas son modificadas y se obtiene una carga neta negativa aproximadamente constante por unidad de masa. Las moléculas de la mayoría de las proteínas llegan a ser partículas de peso molecular alto, sin embargo la excepción son las proteínas de muy alta carga, aquellas de bajo peso molecular o aquellas con enlaces químicos cruzados.

Se obtendrá un peso molecular exacto de las muestras desconocidas si se incluyen estándares de peso molecular conocido. Dichos marcadores deben estar presentes en el mismo gel con la muestra desconocida.

Preparación de geles en Tris-SDS-Glicina (para proteínas).-

GEL INFERIOR (Gel de 10% de acrilamida, para un peso molecular de 10,000 a 70,000 daltons).

Acrilamida 30%	10 ml.
Acrilamida 1 %	3.9 ml.
Tris base 2M pH 8.8	7.5 ml.
Agua	8.2 ml.
SDS al 10%	0.3 ml.
TEMED	0.02 ml.
Persulfato de amonio 10% (10 mg/ml)	0.2 ml

Solidificar por dos horas.

GEL SUPERIOR:

Acrilamida 30%	3.5 ml.
Acrilamida 1%	2 ml.
Tris HCl 2M pH 6.8	0.65 ml.
SDS al 10%	0.1 ml.
Persulfato de amonio (10 mg./ml.)	0.2 ml.
Agua destilada	11.5 ml.
TEMED	0.1 ml.

Añadir 0.1 ml. de muestra y 0.1 ml. de coctel y dejar en baño María hirviendo por 2 minutos.

Añadir 0.05 ml. de esta mezcla en los geles y correr a 10 mA por placa (gel) hasta que corra toda la muestra.

BUFFER DE CAMARA (Tris Glicina 5X).-

Tris base	12 gr.
glicina	57.6 gr.
Agua destilada	1 lt.

Para preparar corrida:

Tris Glicina	200 ml.
SDS al 10%	8 ml.
Agua c.b.p.	1 lt.

Mezcla para diluir la muestra (COCTEL):

SDS	0.3 gr.
Mercapto etanol	100 ml.
EDTA	0.0074 gr.
Glicerol	1 ml.
Tris HCl 0.05 M pH 6.8	hasta 10 ml.
Azul de Bromofenol	unos gra. para dar color

Para sacar y secar el Gel:

Acido acético 10%	15'
Dimetil sulfóxido (DMSO)	30'
Dimetil sulfóxido	30'
DMSO + Difenil oxazona 22%	3 horas
H ₂ O	30'
Secar	2 horas

Tinción:

Azul de Coomassie	300 mgs.
Metanol al 30%	150 ml.
Acido acético	50 ml.
H ₂ O	500 ml.

Se usaron como estándares de peso molecular el Citocromo C con un peso molecular de 12,600 daltons y albúmina bovina con peso molecular de 60,000 daltons.

METODO DE MANTOUX.-

Rutinariamente la prueba se debe aplicar en la cara externa - del antebrazo izquierdo, aproximadamente a la mitad de su longitud.

Si es necesario practicar otras pruebas la segunda se aplicará en la cara palmar del antebrazo izquierdo, también en la parte media de su longitud y siempre en el orden indicado.

Se inyecta intradérmicamente en el antebrazo izquierdo, manteniendo el bisel de la aguja hacia arriba, un décimo de centímetro cúbico de la dilución de la tuberculina. La inyección debe producir una pápula pálida de aproximadamente 8 a 10 mm. y con un perímetro bien definido, dando el aspecto de corteza de naranja o piel de gallina. Para medir con exactitud la cantidad aplicada la jeringa deberá estar graduada en centésimos de centímetro cúbico y bien ajustada.

Es importante que la prueba no se aplique en el mismo lugar que se hizo anteriormente pues las reacciones a la tuberculina difieren de las obtenidas en otro lugar: aparecen más pronto, se disipan pronto y son más violentas, presentando una mayor frecuencia de flictema y por lo tanto cuando se hagan repeticiones periódicas de pruebas se deberá seguir sistemáticamente el método de rotación.

Se recomienda no usar jeringas que hayan sido usadas con coccidioidina o histoplasmina pues son productos biológicos difíciles de remover y darían lugar a error.

CAPITULO IV

"RESULTADOS"

" R E S U L T A D O S "

Se analizaron un total de 378 muestras con solicitud de baciloscopia procedentes del Hospital Angel Leaño y Hospital Militar - de Guadalajara obteniéndose los siguientes resultados.

	MUESTRAS OBTENIDA	BACILOSCOPIA(+)	BACILOSCOPIA(-)
HOSPITAL ANGEL LEAÑO	174	18	156
HOSPITAL MILITAR	204	5	199
TOTAL	378	23	* 355

* 3 muestras con baciloscopia negativa su cultivo resultó positivo.

Las muestras que tuvieron crecimiento en el medio líquido PBY fueron siete y los resultados de las pruebas realizadas a los diferentes PPD fueron los siguientes.

NO. DE CULTIVO	ESPECIE	CONCENTRACION DE PROTEINAS	CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS	INMUNOELECTROFORESIS	CANTIDAD DE CONCENTRADO DE PPD OBTENIDA
3	<i>M. tuberculosis</i>	2,100 μ g/ml	263 μ g/ml	(+)	40 ml
5	<i>M. tuberculosis</i>	2,500 μ g/ml	240 μ g/ml	(+)	35 ml
13	<i>M. tuberculosis</i>	8,300 μ g/ml	1,150 μ g/ml	(+)	5 ml
14	<i>M. tuberculosis</i>	1,450 μ g/ml	380 μ g/ml	(+)	16 ml
16	<i>M. kansasii</i>	3,300 μ g/ml	178 μ g/ml	(+)	5 ml
18	<i>M. tuberculosis</i>	2,100 μ g/ml	500 μ g/ml	(+)	15 ml
CONTROL	CEPA H37 Rv <i>M. tuberculosis</i>	2,176 μ g/ml	2,600 μ g/ml	(+)	15 ml

- Se hizo la intradermoreacción en conejo inmunizado por seis semanas con células de la cepa control (H₃₇Rv). Aplicándose los PPD: comercial, control, 3, 5, 13, 14, 16 y 18.

RESULTADO: reacción negativa a todos los PPD.

- Se hizo intradermoreacción en conejo inmunizado por diez semanas con PPD obtenido de la cepa control (H₃₇Rv). Aplicándose los PPD: comercial, control, 3, 5, 13, 14, 16 y 18.

RESULTADO: reacción negativa a todos los PPD.

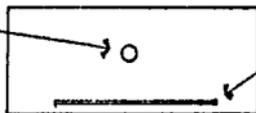
- Se aplicaron los PPD a una persona tuberculínica positiva para medir la reacción biológica.

RESULTADOS:

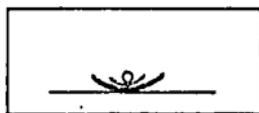
PPD comercial	25 mm
PPD control	20 mm
PPD 18	20 mm
PPD 16	10 mm

RESULTADOS DE LA INMUNOELECTROFESIS

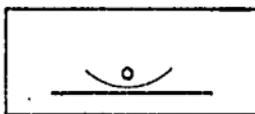
POZO PARA
EL ANTIGENO
(PPD)



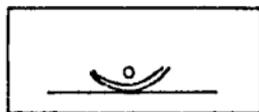
RANURA PARA EL ANTISUERO (Acs)
OBTENIDO DE SENSIBILIZACION A
CONEJO CON CELLS.
DE LA CEPA CONTROL DE M.
tuberculosis (H37 Rv).



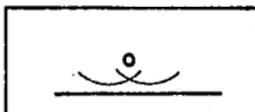
Ag: PPD CONTROL
CEPA H37 Rv
DE M tuber-
culosis.



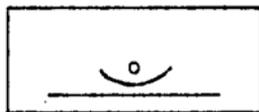
Ag: PPD 14



Ag: PPD 3



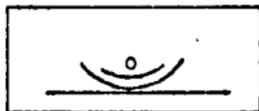
Ag: PPD 16



Ag: PPD 5

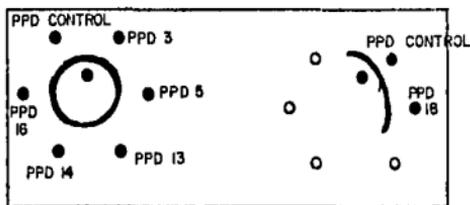
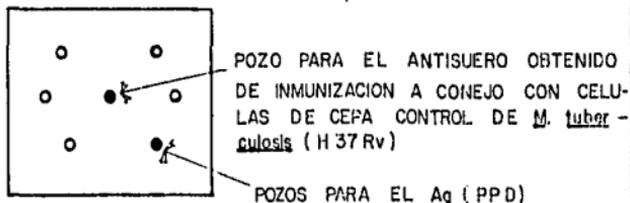


Ag: PPD 18

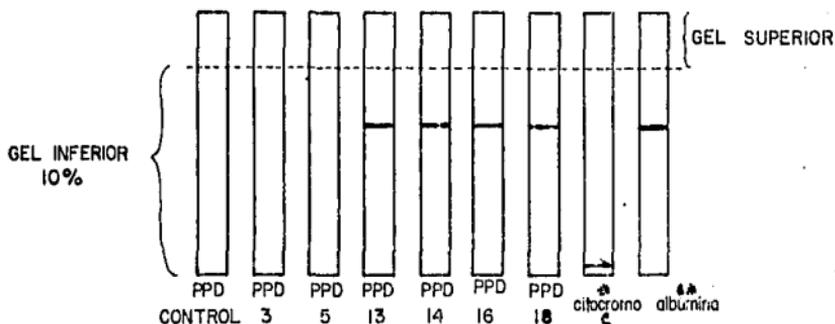


Ag: PPD 13

" RESULTADOS DE LA DOBLE INMUNODIFUSION "



" DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LOS RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA "



● citocromo c: peso molecular 12,600 } controles de PM
 ●● albumina bovina, peso molecular 60,000

RESULTADO: Se encontró un antígeno común en los PPD 13, 14, 16 y 18 el cual tiene un PM comprendido entre 60,000 y 100,000 daltons, mismo que no se halló presente en los otros PPD.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la inmunolectrofore-
sis, determinación de proteínas y la reacción biológica en una per-
sona PPD positiva se seleccionó el PPD procedente de la CEPA NUMERO
18 para realizar el estudio comparativo con el PPD comercial en una
población de 100 personas aparentemente sanas.

Como paso siguiente se procedió a la estandarización del PPD
18 a una concentración de 40 ng/0.1 ml (2 UT) en solución salina,
se obtuvieron 50 ml de PPD 18 el cual se esterilizó por filtro mili-
pore de 0.22 y se envasó estérilmente en frascos color ámbar con-
teniendo 10 ml cada uno.

CONCENTRACION FINAL DEL PPD 18: 42 ng/0.1 ml (2 UT).

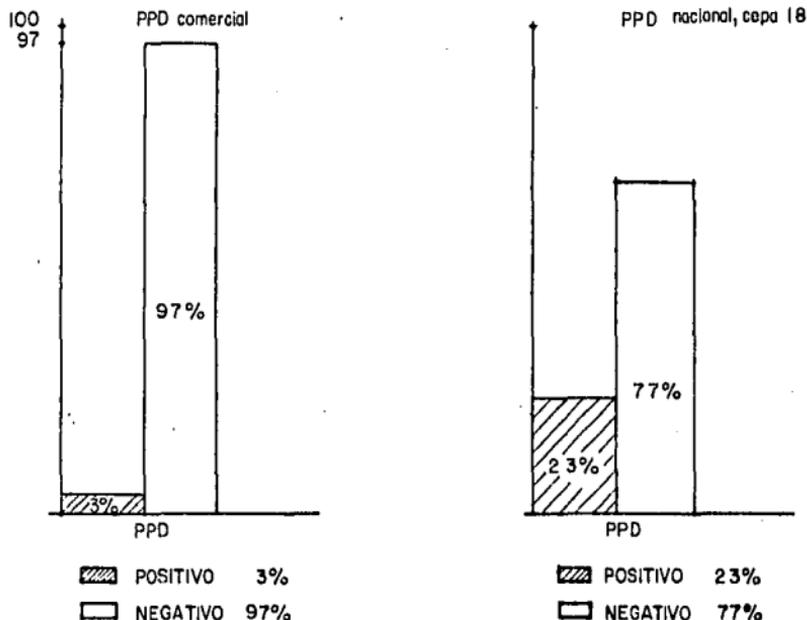
RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE
PPD COMERCIAL Y PPD NACIONAL

No.	EDAD	SEXO	ESTAT.	PESO	BCC	FECHA	PPD	
							COMERCIAL	NACIONAL
1.-	20 años	M	1.70m	85 kg	si	1972	10 mm	17 mm
2.-	20	F	1.60	54	si		0	0
3.-	20	F	1.63	54	si		0	0
4.-	20	F	1.64	44	si		0	0
5.-	22	M	1.74	60	si	1974	0	0
6.-	23	F	1.63	52	si		0	8
7.-	20	F	1.70	72	si	1974	0	8
8.-	22	F	1.74	54	si	1982	0	9
9.-	20	F	1.62	63	si		9	25
10.-	21	F	1.58	54	si		4	11
11.-	21	M	1.78	64	si		0	11
12.-	23	F	1.60	49	si		0	10
13.-	22	F	1.61	56	no		0	19
14.-	22	F	1.69	54	si		3	3
15.-	21	F	1.57	47	si		0	6
16.-	21	F	1.57	47	si		0	2
17.-	24	F	1.63	54	si		0	3
18.-	23	F	1.68	63	si		4	7
19.-	23	M	1.70	58	si		0	2
20.-	25	M	1.72	67	si		8	18
21.-	23	M	1.70	74	si	1972	0	16
22.-	22	M	1.78	70	si	1970	0	0
23.-	24	F	1.60	57	si	1972	8	14
24.-	24	F	1.55	55	si	1970	0	19
25.-	22	M	1.72	62	si	1972	0	14
26.-	23	F	1.72	67	si	1975	0	14
27.-	23	F	1.60	57	si		20	20
28.-	23	M	1.75	62	si	1984	0	0
29.-	24	F	1.65	62	si	1975	0	4
30.-	26	M	1.70	65	si		0	15
31.-	24	M	1.90	82	si	1972	0	3
32.-	22	M	1.80	100	si		0	13
33.-	19	M	1.72	63	si	1979	0	6
34.-	22	M	1.72	70	si	1971	0	0
35.-	26	F	1.63	53.5	si	1979	0	9
36.-	26	F	1.63	65	si	1970	0	0
37.-	19	F	1.71	57	si		0	0
38.-	18	M	1.70	65	si		0	10
39.-	22	M	1.67	65	si	1972	0	13
40.-	21	M	1.80	84	si	1971	0	9
41.-	20	F	1.63	53	si		11	17
42.-	19	M	1.86	75	si		0	0

43.-	25 años	M	1.70m	69 kg	si	0 mm	0 mm
44.-	19	M	1.75	53	si	0	0
45.-	19	F	1.60	53	si	5	11
46.-	20	M	1.70	68	si	0	0
47.-	19	F	1.56	43	no	0	3
48.-	19	F	1.55	56	si	0	12
49.-	20	F	1.60	49	si	0	2
50.-	19	F	1.64	54	si	0	8
51.-	19	F	1.65	49	si	0	7
52.-	19	F	1.60	54	si	0	7
53.-	19	M	1.68	63	si	0	3
54.-	19	M	1.64	58	si	0	4
55.-	19	F	1.52	47	si	0	0
56.-	19	F	1.65	51	si	6	9
57.-	19	F	1.62	55	si	0	0
58.-	22	F	1.62	68	si	0	0
59.-	20	F	1.61	53	si	0	5
60.-	19	F	1.60	60	si	0	4
61.-	28	F	1.58	73	si	0	0
62.-	20	F	1.68	60	si	0	4
63.-	26	M	1.80	79	si	0	0
64.-	24	M	1.72	90	si	0	11
65.-	23	F	1.62	47	si	1970	0
66.-	21	F	1.60	55	si	0	0
67.-	21	M	1.72	63	si	0	0
68.-	26	F	1.65	52	si	1968	0
69.-	35	M.	1.75	71	no	0	0
70.-	19	F	1.60	45	si	0	0
71.-	28	M	1.75	75	si	1966	6
72.-	35	M	1.70	85	no	0	7
73.-	20	M	1.75	70	si	0	0
74.-	20	M	1.79	80	si	1974	0
75.-	19	M	1.78	77	si	0	0
76.-	24	M	1.68	66	si	0	0
77.-	21	M	1.89	90	si	1979	0
78.-	20	M	1.85	84	si	1979	4
79.-	20	M	1.75	65	si	0	0
80.-	20	M	1.85	84	si	0	0
81.-	19	M	1.82	70	si	0	0
82.-	19	M	1.71	71	si	0	0
83.-	21	M	1.70	82	si	1975	0
84.-	22	M	1.72	65	si	0	0
85.-	19	M	1.75	70	si	0	0
86.-	21	M	1.78	72	si	0	0
87.-	22	M	1.75	75	no	0	0
88.-	22	M	1.78	70	si	0	0
89.-	20	M	1.70	67	si	1978	0
90.-	20	M	1.82	85	si	1978	0

91.-	21 años	M.	1.83m	82 kg	si	1978	0 mm	4 mm
92.-	23	M	1.74	72	si	1969	0	0
93.-	23	M	1.80	80	si	1975	0	0
94.-	21	M	1.81	110	si	1971	0	0
95.-	22	M	1.76	73	si		0	0
96.-	26	M	1.75	65	si		0	0
97.-	21	M	1.70	57	no		0	0
98.-	21	F	1.65	51	si		0	9
99.-	22	M	1.70	82	si		0	14
100.-	20	F	1.65	52	si		0	7

" RESULTADOS DEL ESTUDIO COMPARATIVO DE EL
PPD COMERCIAL Y PPD NACIONAL "



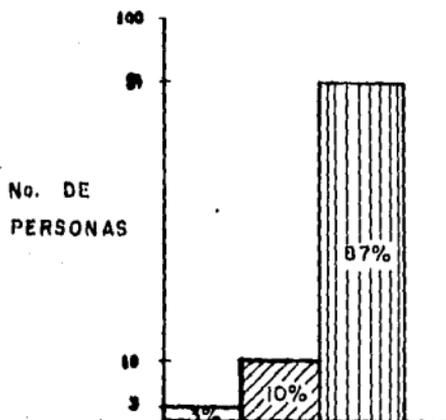
PPD COMERCIAL

PPD comercial positivo (≥ 10 mm) = $3/100 = 3\%$
 PPD comercial negativo con muy leve reacción ($0 < 10$ mm) = $10/100 = 10\%$ } PPD negativo
 PPD comercial negativo (sin reacción absoluta) = $87/100 = 87\%$
 PPD comercial (+) = 3%
 PPD comercial (-) = 97%
 100%

PPD NACIONAL, CEPA 18

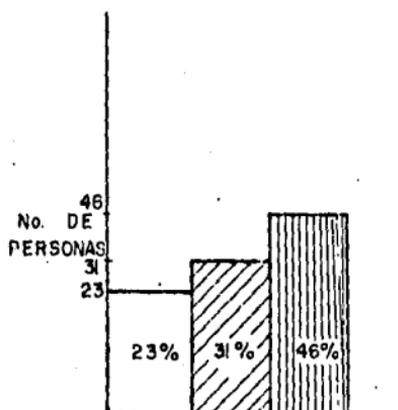
PPD nacional positivo (≥ 10 mm) = $23/100 = 23\%$
 PPD nacional negativo con muy leve reacción ($0 < 10$ mm) = $31/100 = 31\%$ } PPD negativo
 PPD nacional negativo (sin reacción absoluta) = $46/100 = 46\%$
 PPD nacional (+) = 23%
 PPD nacional (-) = 77%
 100%

PPD comercial



	PPD positivo (>10mm)	3%
	PPD negativo (>0<10mm)	10%
	PPD negativo (0 mm)	87%
		<u>100%</u>

PPD nacional 18



	PPD positivo (>10mm)	23%
	PPD negativo (>0<10mm)	31%
	PPD negativo (0 mm)	46%
		<u>100%</u>

RESULTADOS:

Como resultado final del estudio comparativo de la intrademo-reacción a la tuberculina, el PPD obtenido de la cepa de hospital número 18 fué 20% más positivo que el PPD comercial, el cual proviene de una cepa de M. tuberculosis de Dinamarca.

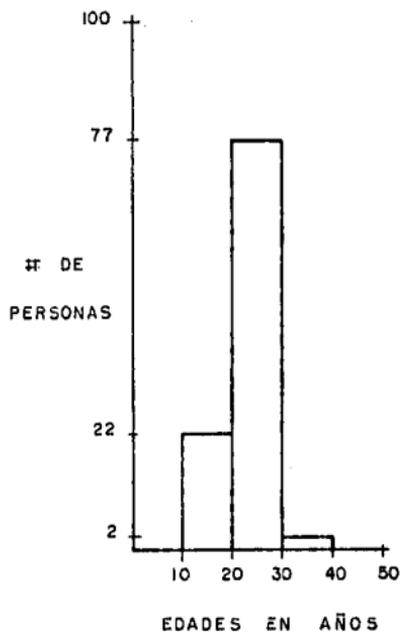
ESTÁ TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

La población que se analizó en el estudio comparativo fué de 100 personas cuya edad promedio estaba entre 22 años.

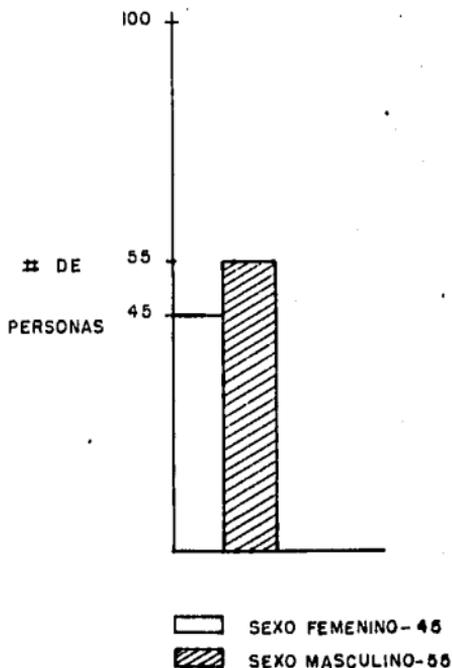
Incluyó el estudio 55 personas del sexo masculino ($55/100=55\%$) y 45 personas del sexo femenino ($45/100=45\%$).

De este grupo de 100 personas, 94 de ellas habían recibido la vacunación con BCG y las otras seis no.

GRAFICA QUE REPRESENTA
LA EDAD DE LA POBLACION
ANALIZADA



DISTRIBUCION DE LA POBLACION
ANALIZADA DE ACUERDO AL
SEXO.



Resultados de el estudio comparativo entre PPD COMERCIAL y PPD NACIONAL, cepa 18, donde se representa el porcentaje de positividad y negatividad obtenido tomando en cuenta el sexo de la población analizada.

	PPD COMERCIAL (+)	PPD NACIONAL +
SEXO MASCULINO	1/55 = 1.81%	12/55 = 21.81%
SEXO FEMENINO	2/45 = 4.45%	11/45 = 24.45%

	PPD COMERCIAL -	PPD NACIONAL -
SEXO MASCULINO	54/55 = 98.19%	43/55 = 78.18%
SEXO FEMENINO	43/45 = 95.55%	34/45 = 75.55%

CAPITULO V

" CONCLUSIONES "

" CONCLUSIONES "

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que el PPD nacional obtenido a partir de una cepa de Mycobacterium tuberculosis proveniente de hospital, reunió muchas características similares al PPD control (cepa H₃₇Rv de M. tuberculosis) entre ellas, mismas bandas de proteínas en inmunoelectroforesis, doble inmunodifusión, determinación de proteínas, intradermoreacción en persona PPD positiva, por lo cual se procedió a seleccionar el PPD de la cepa 18 para realizar el estudio comparativo con el PPD comercial en una población de 100 personas aparentemente sanas.

Por los resultados obtenidos en el proceso comparativo se llegó a la conclusión de que el PPD de la cepa número 18 tuvo una efectividad como producto biológico 20% mayor que el PPD comercial, lo cual comprueba la teoría planteada al inicio de este estudio en la que se señala que muchos individuos de nuestro medio, aún vacunados con BCG, no responden al PPD, lo cual podría atribuirse a un estado de anergia, poco probable en individuos aparentemente sanos, o bien a que dicho PPD comercial proveniente de una cepa virulenta de Mycobacterium tuberculosis de Dinamarca no es el antígeno específico para cepas nacionales de Mycobacterium tuberculosis debido a que puede haber cambios genéticos y ambientales y por consiguiente repercutir en la composición química e inmunológica del bacilo, razón por la cual no hay reacción manifiesta en la prueba tuberculínica.

Otra razón que podría explicar la poca efectividad de la tuberculina comercial sería el hecho de que su fecha de caducidad no debe pasar de seis meses o estar lo menos cercana posible a este período de tiempo, pues su potencia biológica empieza a declinar. Es por esta razón que en la actualidad su fecha de caducidad se cambió de un año a seis meses.

Como complementación de el estudio, se corrieron todos los PPD por electroforesis en geles de poliacrilamida, esperándose -

encontrar en todos ellos un antígeno común que fuese el causante de la reacción biológica a la tuberculina. Como resultado se obtuvo un sólo antígeno en los PPD 13 , 14 , 16 y 18 con un peso molecular aproximadamente entre 60,000 y 100,000 daltons, mismo que no apareció en el PPD control (cepa H₃₇Rv de Mycobacterium tuberculosis) por lo cual se concluye que el antígeno que causa la reacción biológica debe encontrarse en un peso molecular que fluctúa entre los 10,000 daltons o menos.

CAPITULO VI

"BIBLIOGRAFIA"

" BIBLIOGRAFIA "

- 1.- Infection and Immunity.
Affronti, L. F., Wright, G. L., Reich, M., Characterization and comparison of Mycobacterial antigens by discontinuous pore gradient gel electrophoresis, Vol. 5, 1972, 474-481.
- 2.- Mycobacteria; Aislamiento, identificación y pruebas de sensibilidad.
Allen, B. W., Baker, P. J.; 1a. edición, México, Editorial El Manual Moderno, S. A., 1976.
- 3.- Rev. Inv. Salud Pública.
Amezcuca, M. E., Bernal, M. A., Producción in vitro de LIP con dosis bajas de PPD, Vol. 35, 1975, 213-218.
- 4.- Inmunología.
Bach, J. F.; 1a. edición en español, México, Editorial Limusa, S. A., 1984.
- 5.- Rev. Inv. Salud Pública.
Bernal, M. A., Escobar, A., Respuesta cutánea al PPD y a la sensibilización con dinitrobenceno, Vol. 35, 1975, 187-196.
- 6.- Microbiología Médica.
Bojalil, M. A., Santonaco, G., Rodríguez, M., Martínez, J. S.; 1a. edición, editado por Franciaco Méndez Oteo, México, 1981.
- 7.- Tratado de Microbiología de Burrows.
Freeman, B. A.; 21a. edición, México, Editorial "Nueva Editorial Interamericana", 1983.
- 8.- Microbiología.
Carpenter, P. L.; 4a. edición, México, Editorial Interamericana, S.A. de C. V., 1979.
- 9.- Salud Pública de México.
Con Motivo del Centenario del Descubrimiento del Bacilo de la Tuberculosis, 102 Aniversario; Vol. XXIV, No. 3, 1982.

- 10.- American Thoracic society.
Farer, L. S., Flynn, J. P., Reza, R. J., Bailey, W. C.,
Albert, R. K., Control of Tuberculosis, March, 1983,
336-341.
- 11.- American Review of Respiratory Disease.
Daniel, T. M., Good, R. C., Janicki, B. W., Immunoelec-
trophoresis of Mycobacterium tuberculosis antigens, Vol.
112, 1975, 639-644.
- 12.- Diagnóstico clínico por el laboratorio.
Davidson, I., Henry, J. B.; 6a. edición, España, Editor-
ial SALVAT Editores, S. A., 1978.
- 13.- Manual Difco
10a. Edición. 1984.
- 14.- Tubercle.
El-Ansary, E. H., Grange, J. M., Qualitative differences
in tuberculin reactivity in patients with tuberculosis,
occupational contacts and non-contacts, Vol. 65, 1984,
191-194.
- 15.- Rev. Inv. Salud Pública.
Encobar, A., Conceptos actuales sobre la respuesta inmune
en la tuberculosis, Vol. 35, 1975, 175-186.
- 16.- Salud Pública de México.
Estrada-Parra, S., La respuesta inmunológica y la tuber-
culosis, Vol. 25, No. 4, 1983, 403-409.
- 17.- Inmunología Básica y Clínica.
Fudenberg, H. H., Wells, J. V., Stited, D. P., Stobo, J.
D.; 4a. edición, México, Editorial El Manual Moderno, S.
A. de C. V., 1983.
- 18.- Methods in Immunology.
Garvey, Gremer, Suschnorf; third edition, USA, Edit. Ad-
vanced Book Program, 1977.
- 19.- Tubercle.
Goren, M. B., Immunoreactive substances of Mycobacteria,
Vol. 45, 1984, 246-288.

- 20.- Rev. Inv. Salud Pública.
Gorodezky, C., Bernal, M. A., Escobar, A., Viabilidad
linfocitaria en condiciones de cultivo in vitro, Vol. 35,
1975, 213-218.
- 21.- Journal of Medical Microbiology.
Hass, H., Davidson, Y., Sacks, T., Taxonomy of mycobac-
teria studied by polyacrylamide-gel electrophoresis of
cell proteins, Vol. 5, 1972, 31-41.
- 22.- Manual de Microbiología Médica.
Jawetz, E., Melnich, J. L., Adelber, E. A.; 7a. edición,
México, Editorial El Manual Moderno, S. A., 1977.
- 23.- Review of Infectious Diseases.
Koch, R., The etiology of tuberculosis, Vol. 4, No. 6,
1982, 1270-1274.
- 24.- Inmunología experimental.
Kabat, E. A.; la. edición en español, México, Editorial
"La Prensa Médica Mexicana", 1968.
- 25.- Diagnóstico Microbiológico.
Konecun, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Sommers, H.
M.; la. edición, Argentina, Editorial Médica Panamericana,
1983.
- 26.- Departamento de Epidemiología, S.S.A.
La tuberculosis en México. Campaña nacional contra la tu-
berculosis, Editado por S.S.A., México, 1964.
- 27.- López, P. G., Prevalencia de diferentes especies del gé-
nero mycobacterium y su identificación bioquímica en pa-
cientes con diagnóstico presuntivo de tuberculosis, Tesis
Profesional U.A.G., Guadalajara, Jal., 1985.
- 28.- Métodos de Laboratorio.
Lynch, J. J., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P.
D., Inwood, J. J. H.; 2a. edición, México, Editorial In-
teramericana, 1972.

- 29.- American Review of Respiratory Disease.
Nagai, S., Nagasuga, T., Matsumoto, J., Konda, K., Iso-
lation of tuberculin skin test reactive proteins from hea-
ted culture filtrate of Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv,
Vol. 109, 17-28.
- 30.- Chest.
Nash, D. R., Douglass, J. E., Anergy in active pulmonary
tuberculosis. Vol. 77, No. 1, 1980, 32-37.
- 31.- Rev. lat-amer. Microbiol.
Ortiz, L., Rivas, G., Bojalil, L. F., Tuberculin activity
of somatic fractions obtained from Mycobacterium, Vol. 13,
1971, 35-39.
- 32.- Dirección general de control de la Tuberculosis y de las
Enfermedades del Aparato respiratorio, S.S.A. "A cien años
del descubrimiento del bacilo de la tuberculosis".
Pacheco, C. R., Magaña, P.; la edición, México, Editori-
al Intersistemas, S.A. de C.V., 1982.
- 33.- Salud Pública de México.
Quesada Pascual, F., Diagnóstico inmunológico de la tu-
berculosis, Vol. 25, No. 6, 1983, 601-611.
- 34.- Medicina Interna.
Stein, J. H.; la edición, México, Editorial SALVAT, S. A.,
1983.
- 35.- Rev. Inv. Salud Pública.
Villanueva, G., Bernal, M. A., Escobar, A., Determinación
de Rosetas T y de rosetas B, Vol. 35, 1975, 205-211.
- 36.- Methods in immunology and immunochemistry, Vol. II.
Williams, C. A., Chase, M. W.; la edición, Editorial
Academic Press, 1968.
- 37.- American Review of Respiratory Disease.
Janicki, B. W., Chaparas, S. D., Daniel, T. M., Kubica,
G. P., Wright, G. L., Yoo, G. S., A reference system for
antigens for Mycobacterium tuberculosis, Vol. 104, 1971,
602-604.

INSTANTESIS

TESIS • INFORMES • MEMORIAS
COPIAS • REDUCCIONES • EN-
CUADERNADO • IMPRESIONES •
COPI-OFFSET • TRANSCRIPCIO-
NES IBM EN LINO • DIBUJO DE
GRAFICAS, PLANOS Y ORGANI-
GRAMAS • HELIOGRAFICAS •
REVELADO KODAK.

ENRIQUE G. MARTINEZ No. 30
(ANTES PARROQUIA)
TEL. 13-00-23 GUADALAJARA