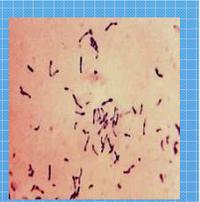


Optimización del Proceso de Producción de Toxoide Diftérico a Granel

Tesis para obtener el Grado de Maestría en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en Vacunología

Desarrollo experimental para la Optimización de los Procesos de Producción de Toxoide Diftérico a Granel llevado a cabo en los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V. en las instalaciones de la Gerencia de Investigación y Desarrollo Bacteriano y del Departamento de Fermentaciones del Instituto Nacional de Higiene.

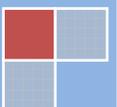


Presenta:

Biol. Mario David Arellano Becerril
becerrildav@gmail.com

Asesores:

M en C. Nelson Jesús Álvarez Anell
QFB. Antonio Sánchez Sánchez
M. en C. Verónica Pérez Enriquez



Índice

| | |
|--|----|
| Glosario | 6 |
| Abreviaturas | 11 |
| Resumen | 13 |
| 1. Antecedentes de la Difteria | 14 |
| 1.1 Aspectos Históricos de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 14 |
| 1.2 Aspectos clínicos..... | 14 |
| 1.2.1 Etiopatogenia de la difteria (<i>Corynebacterium diphtheriae</i>) | 14 |
| 1.2.2 Factores de virulencia | 15 |
| 1.2.3 Métodos de diagnóstico, tratamiento y prevención..... | 16 |
| 1.2.4 Epidemiología | 17 |
| 1.2.5 Grupos de riesgo | 18 |
| 1.2.6 Incidencia y prevalencia en México..... | 18 |
| 1.2.7 Modo de transmisión y reservorios..... | 18 |
| 1.3 Características de la vacuna | 19 |
| 1.3.1 Costo-beneficio de la producción de la vacuna | 19 |
| 1.4 Metodología utilizada, medios de cultivo para mantenimiento y producción | 20 |
| 1.5 Descripción de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> Cepa Park Williams 8..... | 21 |
| 1.6 Problemática en la producción de la vacuna y propuestas de solución | 22 |
| 2. Justificación | 22 |
| 3. Objetivos..... | 23 |
| 3.1 General | 23 |
| 3.2 Particulares | 23 |
| 4. Características del estudio..... | 23 |
| 5. Materiales y métodos..... | 24 |
| 5.1 Material biológico | 24 |



| | |
|---|----|
| 5.2 Reactivos | 24 |
| 5.3 Equipo | 24 |
| 5.4 Metodología | 25 |
| 5.4.1 Preparación de abasto de la cepa <i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW-8 a partir de la semilla de trabajo para producción experimental de Toxina Diftérica | 25 |
| 5.4.2 Propagación de la cepa <i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW-8 | 25 |
| 5.4.3 Determinación de la concentración de Hierro (Fe ⁺⁺) óptima para la producción de la toxina diftérica | 26 |
| 5.4.4 Valoración de la concentración de Hierro (Fe ⁺⁺) óptima para la producción de la toxina diftérica | 26 |
| 5.4.5 Escalamiento a nivel garrafón | 26 |
| 5.4.6 Obtención de la toxina diftérica | 26 |
| 5.4.7 Prepurificación y destoxificación de toxina diftérica | 26 |
| 5.5 Diagrama general de trabajo | 27 |
| 6. Resultados | 28 |
| 6.1 Abasto de la cepa <i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW-8 del semilla maestra CMH-CD2-LI para producción experimental de toxina diftérica | 28 |
| 6.2 Propagación de la cepa <i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW-8 en tubo | 28 |
| 6.3 Determinación de la concentración de Hierro (Fe ⁺⁺) óptima para la producción de la toxina diftérica | 30 |
| 6.4 Valoración de la concentración de Hierro (Fe ⁺⁺) óptima para la producción de la toxina diftérica | 31 |
| 6.5 Escalamiento a nivel garrafón | 31 |
| 6.6 Obtención de la toxina diftérica | 34 |
| 6.7 Prepurificación y destoxificación de toxina diftérica | 35 |
| 6.8 Prueba de funcionalidad del Cloruro de Manganeso (II) tetrahidratado marca Sigma | 37 |
| 7. Discusión | 37 |
| 7.1 Abasto de la cepa <i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW-8 del cultivo maestro CMH-CD2-LI para producción experimental de toxina diftérica | 37 |



| | |
|---|----|
| 7.2 Propagación de la cepa <i>Corynebacterium diphtheriae</i> PW-8..... | 37 |
| 7.3 Determinación y valoración de la concentración de Hierro (Fe ⁺⁺) óptima para la producción de la toxina diftérica..... | 38 |
| 7.4 Escalamiento a nivel Garrafón..... | 38 |
| 7.5 Prepurificación de la Toxina Diftérica..... | 39 |
| 7.6 Prueba de funcionalidad del Cloruro de Manganeso (II) tetrahidratado marca Sigma..... | 40 |
| 8. Conclusiones..... | 41 |
| 9. Perspectivas..... | 41 |
| 10. Implicaciones Bioéticas..... | 43 |
| 11. Implicaciones de Bioseguridad..... | 43 |
| 12. Impactos y perspectivas..... | 43 |
| 13. Referencias Bibliográficas..... | 44 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Propagación de <i>C. diphtheriae</i> Cepa PW-8 semilla de trabajo CTH-CD7-LE en tubo con medio Michigan | 28 |
| Tabla 2. Influencia de la concentración de Fe ⁺⁺ en el medio Müller & Miller en la producción toxina diftérica (Lf's) a nivel matraz | 30 |
| Tabla 3. Cinética de crecimiento de <i>C. diphtheriae</i> cepa PW-8 a nivel de garrafón | 32 |
| Tabla 4. Volumen de toxina diftérica obtenido por cultivo agitado en garrafón | 35 |
| Tabla 5. Cantidad adicionada de formaldehído de acuerdo al volumen final de los lotes experimentales | 35 |
| Tabla 6. Concentración de proteínas y concentración de toxina diftérica en el sobrenadante obtenido del cultivo de <i>C. diphtheriae</i> cepa PW8 | 35 |
| Tabla 7. Destoxificación de la toxina diftérica en cuarto estufa de condiciones estacionarias a 37±1°C | 36 |
| Tabla 8. Rendimientos obtenidos de la prepurificación de toxoide diftérico con sulfato de amonio en tres lotes experimentales | 36 |
| Tabla 9. Título de Toxina Diftérica a nivel matraz con Medio de Müller & Miller formulado con Cloruro de Manganeso (II) tetrahidratado marca Sigma | 37 |

Índice de Gráficos

| | |
|---|----|
| Gráfica 1. Comparación entre los promedios de Lf's Vs Kf's | 29 |
| Gráfica 2. Crecimiento de <i>C. diphtheriae</i> en tubo con medio Michigan para la producción de toxina diftérica | 30 |
| Gráfica 3. Influencia de la concentración de Fe ⁺⁺ en la producción de toxina diftérica | 31 |
| Gráfica 4. Relación de los parámetros de producción de toxina diftérica (Lote TD11EXP01). | 33 |
| Gráfica 5. Relación de los parámetros de producción de toxina diftérica (Lote TD11EXP02). | 33 |
| Gráfica 6. Relación de los parámetros de producción de toxina diftérica (Lote TD11EXP03). | 34 |
| Gráfica 7. Promedio de los parámetros de producción de toxina diftérica | 34 |

Glosario

Agua para fabricación de inyectables (AFI): Agua producida a partir de agua potable que se purifica en su etapa final por destilación u otra tecnología equivalente o superior, que muestre la eliminación de sustancias químicas, microorganismos, endotoxinas y que no contienen sustancias adicionadas.

Almacenamiento: Conservación de materias primas, materiales de envase primario, material de acondicionamiento, productos intermedios y fármacos en áreas con condiciones controladas de orden y limpieza.

Antitoxina: Es un anticuerpo formado en un organismo como respuesta específica a la presencia de una toxina o toxoide en su interior, a la cual puede neutralizar.

Área Clase A: Área limpia cuyas características ambientales se adecua a la NOM-059-SSA-2006, presenta un límite de partículas no viables las cuáles deben ser de tamaño menor o igual a 0.5 micras y cuyo número por unidad de volumen no sea mayor de 3,520 partículas/m³ y no más de 29 partículas por metro cúbico mayor o igual a 5 micras bajo flujo unidireccional y las partículas viables no deben ser más de 1 UFC/m³ (unidades formadoras de colonias por m³).

Área aséptica: Área diseñada, construida y mantenida con el objeto de tener dentro de los límites preestablecidos el número de partículas viables y no viables en superficies y medio ambiente.

Asada: Muestra que se toma de un cultivo de microorganismos con un asa bacteriológica, para sembrar un medio de cultivo estéril, o para hacer una preparación para la observación de microorganismos al microscopio previamente teñidos.

Biomasa: Contenido celular de un cultivo que puede ser concentrado por un método físico o químico.

Buenas Prácticas de Fabricación: Al conjunto de lineamientos y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos farmacéuticos elaborados tengan y mantengan la identidad, pureza, concentración, potencia e inocuidad, requeridas para su uso.

Cámara fría: Área o espacio diseñado y construido bajo ciertas especificaciones de aislamiento térmico y acabados, que mediante un sistema de enfriamiento se mantiene a una temperatura de 2 a 8 °C.

Campana de Seguridad Biológica (CSB): Equipo diseñado para reducir los peligros inherentes al manejo de materiales biológicos de riesgo bajo a riesgo alto, protegiendo al operador, al ambiente y al material de trabajo, suministra un área de trabajo clase "A".

Centrífuga de flujo continuo: Equipo que sirve para separar componentes de diferentes masas por medio de un motor de eje vertical que hace girar a gran velocidad a un recipiente cuyo contenido se haya sometido a una fuerza centrífuga.

Cepa microbiana: Conjunto de microorganismos de la misma especie, los cuales pueden no ser de la misma cepa.

Congelador: Es una unidad de congelación que puede alcanzar, mantener y conservar productos a temperaturas bajas y que va del intervalo de - 4 °C hasta -30 °C, por medio de un sistema de congelación en cascada.

Contaminación: A la presencia de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables.

Cosecha: Obtención del producto al final de un proceso físico, químico o biológico.

Cuarto estufa: Área o espacio diseñado y construido bajo ciertas especificaciones de acabados y aislamiento térmico, que mediante un sistema de calefacción se mantiene a una temperatura constante dentro de un intervalo preestablecido.

Semilla de Trabajo (Cultivo de Trabajo): Cultivo proveniente de la semilla maestra o cultivo maestro, que se conserva liofilizado o congelado y se emplea para realizar un lote de producción de acuerdo al sistema lote semilla.

Semilla Maestro (Cultivo Maestro): Cultivo proveniente de una Gran Semilla Maestra, que se conserva liofilizado o congelado, es un lote único, de composición uniforme y se mantiene en los centros de producción.

Cultivo joven de *C. diphtheriae*: Cultivo que se encuentra en fase logarítmica (Log) de crecimiento se caracteriza por la presencia de bacilos cortos o cocobacilos aislados Gram positivos.

Cultivo de *C. diphtheriae* en fase de adaptación: Cultivo que se encuentra en fase Lag, se caracteriza por la presencia de bacilos largos en forma irregular Gram positivos y presentan un alto porcentaje de formas filamentosas, tienen estructuras curvadas o arreglos en forma de "V".

Curva de precipitación al toxoide diftérico: Es una secuencia de precipitaciones con diferentes concentraciones de sulfato de amonio expresadas en porcentaje que se adicionan a una solución con proteínas solubles. Sirve para definir la cantidad de sulfato de amonio a adicionar a la solución proteica para obtener una precipitación más selectiva de proteínas.

Desferratación: Proceso mediante el cual se elimina de una solución o medio de cultivo el contenido del ion hierro con ayuda de un agente quelante.

Destoxificación: Acción de transformar la actividad biológica de la toxina diftérica para eliminar su capacidad toxigénica convirtiéndola en toxoide y hacerla inocua para su uso en el ser humano.

Equipo de flujo laminar (Campanas y Módulos): Equipo diseñado para crear un área de trabajo clase "A" en el cual sean protegidos todos los productos, soluciones, suspensiones, medios de cultivo y materiales susceptibles de ser contaminados por el medio ambiente, asegurando un flujo de aire limpio y sin turbulencias a nivel del área de trabajo.

Especificación: A la descripción de un material, sustancia o producto, que incluye los parámetros de calidad, sus límites de aceptación y la referencia de los métodos a utilizar para su determinación.

Estabilizador: Sustancia que tiene la propiedad de mantener estable la estructura y función de la molécula de toxoide diftérico.

Esterilización por filtración: Proceso de esterilización mediante el cual se retienen partículas viables y no viables haciéndolo pasar a través de un filtro absoluto con poro de 0.22 micras de diámetro en condiciones asépticas.

Esterilización: Procedimiento físico o químico mediante el cual se elimina por retención ó inactivación cualquier forma de vida en un objeto, medio de cultivo o solución.

Glicina: Es un aminoácido que forma parte de las proteínas de los seres vivos, es el aminoácido más pequeño y el único no quiral, su fórmula química es $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, con peso molecular de 75.07 y se emplea como estabilizador del Toxoide Diftérico para evitar la reversión de la molécula.

Gran Semilla Maestra: Es un cultivo único y de composición uniforme que se establece con posterioridad al aislamiento (este cultivo puede ser aislado de casos clínicos), o después de establecer que una cepa tiene ciertas características microbiológicas, bioquímicas e inmunológicas de interés, este cultivo se propaga a fin de disponer de suficientes células para preparar varios contenedores de cultivo conservados en congelación, ya sea en un ultracongelador o en un tanque con nitrógeno líquido.

Inactivación: A la acción de transformar la actividad química/biológica de los residuos medicamentosos inutilizándolos para su uso farmacéutico.

Incubación: Proceso mediante el cual, un material biológico se mantiene un tiempo determinado, a una temperatura establecida en un equipo que mantenga dichos parámetros dentro de los límites establecidos, con el fin de observar o verificar un cambio en las condiciones originales del material biológico, muestra o producto a incubar.

Incubadora: Equipo o cámara construida para mantener la temperatura de incubación en límites predeterminados e incubar diferentes materiales biológicos y permitir un ambiente favorable para su crecimiento. Las incubadoras mantienen una temperatura constante mediante un termostato.

Incubadora con agitación orbital: Equipo o cámara construida para mantener la temperatura de incubación en límites predeterminados, cuenta con un sistema de agitación por rotación orbital para incubar diferentes cultivos bacterianos en agitación.

Insumos: A todas aquellas materias primas, material de envase primario, material de acondicionamiento y producto que se reciben en una planta.

Instrumento: Dispositivo destinado a ser utilizado para hacer mediciones, sólo o asociado a uno o varios dispositivos anexos.

Límite de floculación (Lf): Cantidad de Toxina o Toxoide que cuando se mezcla con una unidad de antitoxina de referencia, se forma un complejo que precipita o flocula.

Lote: Cantidad de un fármaco o medicamento, que se produce en un ciclo de fabricación y cuya característica esencial es su homogeneidad.

Materia prima: Sustancia de cualquier origen que se usa para la fabricación de fármacos o medicamentos.

Medio de cultivo: Medio líquido, sólido o semisólido que contiene la cantidad de nutrientes necesaria para el crecimiento y desarrollo de un microorganismo.

Medio de cultivo Michigan: Medio de cultivo utilizado para la propagación de *C. diphtheriae cepa PW8* a nivel de tubo (cultivo estacionario).

Medio de cultivo Müller y Miller (M & M): Medio de cultivo utilizado para el desarrollo de *Corynebacterium diphtheriae cepa PW8* a nivel de matraz, garrafón y fermentador (cultivo sumergido).

Microscopio: Es un instrumento de alta resolución conformado por subsistemas ópticos; mecánicos y eléctricos que interactúan entre sí para amplificar las imágenes de objetos de tamaño reducido, cuyas características no alcanzan a ser detectadas por el ojo humano.

Muestra: A la parte o porción extraída de un conjunto (objeto, sustancia, etc.) por métodos que permiten considerarla como representativa del mismo.

Pase: A la transferencia del organismo de un cultivo a un medio de cultivo fresco, cada ciclo de congelación, descongelación y reactivación en un medio fresco se considera como una transferencia.

pH: Se le denomina potencial de hidrógeno y se define como el logaritmo negativo de la actividad del ion hidrógeno [H⁺] presente en una solución; la escala de pH es una serie de números que expresan el grado de acidez o alcalinidad de una solución basada en la determinación de la actividad de los iones hidrógeno.

Potencia: A la actividad terapéutica del producto farmacéutico tal como es indicada por pruebas apropiadas de laboratorio o por datos clínicos controlados y desarrollados en forma adecuada.

Potenciómetro: Instrumento que se utiliza para determinar la concentración en una solución de iones hidrógeno [H⁺], mediante un método electroquímico, utilizando un electrodo de vidrio sensible a los iones.

Precipitación: Es la separación de un sólido que se encuentra en suspensión y que se deposita en el fondo del recipiente en el que está contenido.

Procedimiento Normalizado de Operación: Al documento que contiene las instrucciones necesarias para llevar a cabo de manera reproducible una operación.

Procedimiento de Producción: A la orden o fórmula maestra de producción a la cual se le asigna un número de lote y se utiliza para el surtido y registro de los componentes para la producción de un lote de medicamento.

Producción: A las operaciones involucradas en el procesamiento de insumos para transformarlos en un producto a granel.

Producto Intermedio: Material parcialmente procesado que será sometido a etapas posteriores de producción antes de convertirse en producto a granel final.

Prueba de esterilidad: Metodología que tiene como finalidad demostrar la ausencia de microorganismos viables en una muestra de producto o materiales previamente esterilizados, usando medios de cultivo adecuados.

Prueba de pureza: Procedimiento que se realiza al desarrollo microbiano para verificar si el cultivo presenta solo las características de desarrollo establecidas mediante morfología colonial, sembrando ésta en diferentes medios de cultivo, o por morfología microscópica, observando un frotis de la muestra en el microscopio.

Pureza proteica: Es la relación que existe entre el Límite de floculación (Lf) con los miligramos de nitrógeno proteico.

Residuo Peligroso Biológico Infeccioso (RPBI): Son aquellos materiales generados durante los servicios de atención médica que contengan agentes biológico-infecciosos según son definidos en la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, y pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Sanitización: A la acción de eliminar o reducir los niveles de partículas viables por medio de agentes físicos o químicos posterior a la actividad de limpieza.

Sanitizante: Agente químico o físico que tiene la capacidad de destruir o inhibir el crecimiento de los microorganismos.

Sanitizar: Limpieza en superficies realizada con una solución que tiene acción antimicrobiana.

Semilla: Cultivo de microorganismos en un fermentador de pequeña escala (50 a 200L) y que sirve de inóculo para un fermentador de gran escala en donde se fabrica el lote de producción.

Sephadex G-50: Es una resina en forma de esfera preparada por uniones cruzadas de dextrán con epíclorhidrina y que se utiliza como fase estacionaria para procesos de cromatografía por filtración en gel.

Siembra: Transferencia de una determinada cantidad de microorganismos de un cultivo desarrollado como cultivo semilla a otro recipiente de mayor capacidad conteniendo medio de cultivo estéril.

Sobrenadante: Fase soluble que resulta de la separación por gravedad, centrifugación o precipitación, entre otros, de la fase insoluble de una mezcla de componentes que poseen diferentes características de solubilidad, densidad, forma y peso.

Sulfato de amonio: Sal que se utiliza como floculante y/o reactivo para precipitar proteínas solubles. Es un excelente compuesto para la precipitación fraccionada de proteínas, haciendo que la proteína precipite.

Temperatura: Magnitud física que expresa el grado o nivel de calor de los cuerpos o del ambiente

Tinción de Gram: Tinción diferencial que se emplea para demostrar las propiedades de tinción de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Tiomersal: Compuesto químico que contiene mercurio y a bajas concentraciones sirve como preservativo, también se usa para inactivar ciertos microorganismos y toxinas.

Toxina diftérica: Sustancia microbiana de naturaleza proteica producida y liberada al medio de cultivo por la bacteria *C. diphtheriae* cepa PW8 de peso molecular de 62000 dalton patogénica para el hombre.

Toxoide diftérico: Producto derivado de la toxina diftérica obtenida de *Corynebacterium diphtheriae*, propagado en cultivo sumergido en el medio de cultivo Müller y Miller, la cual es destoxificada por la adición de formaldehído y temperatura, perdiendo la toxicidad y conservando su capacidad antigénica e inmunogénica.

Ultracongelador: Es una unidad de refrigeración que puede alcanzar y mantener a temperaturas extremadamente bajas y que va del intervalo de -35 °C hasta -150 °C, por medio de un sistema de congelación en cascada.

Ultrafiltración: Método de filtración tangencial por el cual se filtra una solución conteniendo solutos de diferente peso molecular, utilizando un ultrafiltro capaz de retener moléculas de soluto de un peso molecular mayor al del poro del filtro o cassette y dejando pasar otros solutos de peso molecular menor al de las moléculas retenidas.

Verificación de esterilidad de los medios de cultivo: Metodología que tiene como finalidad realizar una inspección visual para descartar la presencia de microorganismos a las 18-24 horas de incubación de un medio de cultivo, previamente sometido a un proceso de esterilización.

Abreviaturas

ADP. Adenocín difosfato

BCA. Ácido Bicinconínico

BIRMEX. Laboratorio de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V.

C. diphtheriae PW8. *Corynebacterium diphtheriae* Cepa Park Williams 8

CRETI. Corrosivo, Reactivo, Explosivo, Tóxico e Inflamable

DPT. Vacuna Antitosferina Tétanos y Difteria

DTaP. Vacuna de Toxoide Diftérico y Tetánico en combinación con anti Pertussis acelular

DTwP. Vacuna de Toxoide Diftérico y Tetánico en combinación con anti Pertussis de células completas



FEUM. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos

FE2. Factor de Alargamiento tipo 2

Hib. *Haemophilus influenzae tipo b*

INH. Instituto Nacional de Higiene

KDa. Kilodaltones

Kf's. Tiempo que tarda hacer reacción la antitoxina diftérica con la toxina o toxoide diftérico.

Lf. Límite de floculación

M&M. Medio de Cultivo Müller & Miller

OMS. Organización Mundial de la Salud

Td. Vacuna de toxoides diftérico y tetánico Adulto

TD. Vacuna de toxoides diftérico y tetánico Infantil

UI. Unidades Internacionales

UI/mL. Unidades Internacionales por mililitro

Resumen

El Instituto Nacional de Higiene (INH), perteneciente a BIRMEX preparó el primer lote de toxoide diftérico en condiciones estáticas a nivel de garrafón utilizando la cepa de *C. diphtheriae* PW8 en 1926; en el año de 1991 se lleva a cabo en cultivo agitado a nivel de fermentador (Azteca-1000) y posteriormente se optimiza la producción de toxina diftérica mediante el empleo de sistemas computarizados en un fermentador de 1500 litros marca Bioengineering incrementando la producción de toxina diftérica. Actualmente el laboratorio de Producción de Biomasa produce toxina diftérica a partir del cultivo en lote-semilla de *C. diphtheriae* PW8 obtenido de dichos fermentadores. El laboratorio de Producción de Toxoide Diftérico purifica el toxoide diftérico a granel a partir de la toxina obtenida por el laboratorio de Producción de Biomasa. Debido a que el Toxoide Diftérico es un producto de origen biológico, es susceptible a la variabilidad en los rendimientos de lote a lote, por lo que es necesario estandarizar y optimizar el proceso de producción de la toxina diftérica a granel para cumplir con las especificaciones establecidas por los organismos regulatorios nacionales e internacionales en materia de salud. La optimización del proceso de producción tiene un impacto a nivel nacional debido a que se tendría disponibilidad de este componente para producir en México las vacunas en las cuales se incluye el toxoide diftérico y con lo cual se apoyan los programas nacionales de vacunación. El objetivo de este trabajo fue optimizar el proceso de producción de Toxoide Diftérico a Granel mediante la adecuación de sus procesos y la modificación de la destoxicación de la toxina, para disminuir la cantidad de lotes rechazados y mejorar en la calidad de este. En este trabajo se realizó un estudio a nivel experimental de producción de toxoide. Se desarrollaron una serie de ensayos de laboratorio empleando cultivos bacterianos de *C. diphtheriae* PW8, se estandarizó la propagación del cultivo semilla, determinó la concentración de Fe^{++} en el medio de cultivo M&M, se obtuvo Toxina Diftérica y se prepurificó. Se realizaron pruebas de actividad biológica con un modelo animal descrito en la FEUM y las recomendaciones de la OMS, finalmente se destoxificó y se realizó la prueba de toxicidad residual. Con ello, se obtuvieron 20 viales con cultivo bacteriano puro de *C. diphtheriae* Cepa PW-8. En los lotes experimentales con medio Michigan se observó producción de toxina. Se determinó que la concentración de Fe^{++} existente en el medio Müller & Miller oscila entre 0.5 – 1.0 mg/L, en la cinética de crecimiento se observó que la mayor cantidad de toxina se produce a partir de las 27 horas de incubación con mayor concentración celular y menor tiempo de floculación. La determinación de proteínas por el método de BCA mostró que la mayor concentración de proteínas está dada por el medio de cultivo M&M y al prepurificar la Toxina disminuye considerablemente la concentración de estas. Los rendimientos de los lotes experimentales obtenidos con el método propuesto en este trabajo fluctuaron entre 83 y 91.5 % sin embargo no se destoxificaron todos los lotes experimentales producidos. Debido a lo anterior se concluye que es necesario asegurar que la cepa este activa y efectuar las transferencias del cultivo bacteriano a matraz con medio de cultivo M&M entre los pases 3 a 6. La concentración de Fe^{++} en el medio M&M debe oscilar entre 0.5-0.7 mg/L; se deben realizar las transferencias del cultivo celular a nivel fermentador de 75 L entre las 18 y 24 horas de incubación. Se debe reanalizar la prepurificación de la toxina diftérica antes de la destoxicación debido a que puede no favorecer a la destoxicación. El Cloruro de Magnesio (II) tetrahidratado marca Sigma puede ser una alternativa para la producción de la toxina diftérica, ya que mantiene las mismas características y no interfiere con la producción de toxina diftérica.

1. Antecedentes de la Difteria

1.1 Aspectos Históricos de *Corynebacterium diphtheriae*

La difteria es una enfermedad potencialmente grave ocasionada por *Corynebacterium diphtheriae*, bacteria productora de exotoxinas. La toxina diftérica es responsable de la morbilidad y mortalidad por difteria puede generar pseudomembranas obstructivas en las vías respiratorias altas (laringitis diftérica) o provocar daños en el miocardio y en otros tejidos. ⁽⁵⁾

Tras el descubrimiento de *C. diphtheriae* como el organismo causante de la difteria en 1884, la demostración de que la bacteria secreta una toxina responsable de la mayoría de las lesiones que se observan en la enfermedad y la prueba de que los anticuerpos (antitoxina) dirigidos específicamente contra la toxina protegen contra la enfermedad, el mecanismo de su patogénesis parecía claro por ello la difteria se convirtió en un modelo de comparación con otras enfermedades bacterianas infecciosas, que implican una toxina. ⁽¹¹⁾

La fabricación de vacunas contra toxina diftérica tuvo lugar a inicios en el siglo XIX. Las investigaciones de Paul Ehrlich y de Adolf von Behring culminaron con la obtención de un preparado toxina-antitoxina que se utilizó por primera vez como agente inmunizante en 1914, y en 1924 Gastón León Ramón consiguió la destoxicación efectiva de la toxina.

Se descubrió que bajas concentraciones de formaldehído pueden inactivar la toxina y al mismo tiempo mejorara su capacidad para inducir formación de anticuerpos específicos en el hombre. Este hecho abrió el camino para desarrollar una vacuna de inmunización masiva y la eliminación virtual de una enfermedad que no mucho antes había sido la principal causa de muerte en la población infantil. ⁽²⁹⁾

La prevención de la enfermedad causada por *C. diphtheriae* se consigue mediante la inmunización con Toxoide Diftérico que se suministra en vacunas combinadas con el Toxoide Tetánico (T) Td o TD, o en vacunas DPT, en combinación con componentes Antitetánico y Antitosferínico. El Toxoide Diftérico puede también combinarse con otros antígenos vacunales, como los de la Hepatitis B y *Haemophilus influenzae* tipo b. ⁽⁴²⁾

Para la producción de la vacuna antidiftérica convencional se utiliza la cepa de *C. diphtheriae* cepa PW8, la exotoxina producida en cultivos estacionarios o sumergidos se cosecha y es destoxicada con formaldehído, purificada y adsorbida en sales de aluminio. ⁽²⁰⁾

1.2 Aspectos clínicos

1.2.1 Etiopatogenia de la difteria (*Corynebacterium diphtheriae*)

Corynebacterium diphtheriae es un bacilo Gram positivo, inmóvil, no esporulado ni capsulado, pleomórfico y patógeno exclusivo del ser humano que puede ser o no toxigénico. La capacidad para producir la exotoxina, la que le confiere su poder patógeno, está mediada por la infección de la bacteria por un bacteriófago. La exotoxina se libera por la bacteria generalmente en la mucosa faríngea, y provoca necrosis celular local; después, se disemina por vía hematogena y tiene un tropismo especial por el sistema nervioso periférico y el miocardio. ^(21, 38)

A lo largo de la historia, se han descrito epidemias de difteria devastadoras que han afectado principalmente a los niños en muchos países. En países desarrollados, la difteria se manifiesta, en la mayoría de las ocasiones, como casos esporádicos o en pequeños brotes epidémicos. La mayoría de las infecciones por *C. diphtheriae* son asintomáticas o su evolución clínica es relativamente leve. ^(27, 28)

En países donde la difteria aún es endémica, afecta principalmente a los niños en edad preescolar y escolar; en la mayoría de los países industrializados, la difteria ha dejado de ser endémica y se producen casos muy esporádicos o bien casi ha desaparecido como el caso de México en donde se han presentado tres casos en la última década. ⁽¹⁸⁾

La difteria se transmite por contacto íntimo con enfermos o con portadores, a través de las secreciones, especialmente las respiratorias. ^(2, 3) El período de incubación es de 2 a 7 días, aunque puede ser más prolongado. Las manifestaciones clínicas varían según la localización anatómica de la enfermedad: nasal, faringoamigdal, laringotraqueal (crup diftérico), cutánea, conjuntival, ótica y vaginal. La forma de presentación más frecuente es la faringoamigdal, que se inicia con fiebre poco elevada, taquicardia, disfagia, voz gangosa y reacción adenopática submaxilar uni o bilateral; rápidamente se forman las típicas membranas, inicialmente blanco-nacaradas, que se extienden fuera de las amígdalas y que sangran con facilidad al intentar desprenderlas⁽⁷⁾. La difteria laríngea puede ser la única localización del proceso o producirse como consecuencia de la propagación de una difteria faríngea o nasal ⁽³⁾. Esta última forma se caracteriza por rinorrea sanguinolenta y por la presencia de membranas en el tabique nasal. Las principales complicaciones de la difteria son polineuritis, en forma de parálisis del velo del paladar, de la acomodación, diafragmática o de las extremidades inferiores, miocarditis y alteraciones renales. ^(3, 7, 27)

1.2.2 Factores de virulencia

La producción de la Toxina Diftérica se debe a la inserción del fago β en forma lisogénica en el cromosoma de la bacteria. Este fago porta el gen *tox* que codifica para la Toxina Diftérica. ^(8, 9, 12) La Toxina Diftérica provoca la muerte de las células eucariotas al inactivar el factor de alargamiento 2 (FE-2) durante la síntesis de las proteínas. ⁽⁴⁰⁾

La virulencia de *C. diphtheriae* está ligada a su capacidad invasiva y producción de exotoxinas; en la patogenia de la enfermedad además de la exotoxina bacteriana, son importantes los componentes de la pared celular como los antígenos O y K. El antígeno O, termoestable, es común a todas las corinebacterias, mientras que el antígeno K, termolábil, es variable y permite diferenciar entre cepas particulares. ^(4, 6, 13)

La toxina diftérica es un polipéptido termolábil (62 KDa), que puede ser mortal en dosis de 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y se produce a niveles máximos cuando declina el crecimiento bacteriano o cuando las concentraciones de hierro en el medio disminuyen. Esto parece estar regulado de forma que cuando hay hierro en el medio se forma un complejo represor-hierro que se une específicamente al gen operador *tox* del fago β . ^(16, 21)

En condiciones de baja concentración de hierro en el medio, el complejo se disocia y el gen *tox*, se desreprime y se sintetiza la toxina. La toxina se sintetiza a nivel de los polisomas de la membrana de *C. diphtheriae* y es secretada co-traduccionalmente como una cadena polipeptídica no tóxica. La molécula adquiere su toxicidad al actuar la tripsina

que rompe la molécula y pone al descubierto los sitios enzimáticos activos. Es un modelo A-B de toxina, en el cual el fragmento A tiene un peso molecular de 24 KDa y el fragmento B de 38 KDa, el fragmento B (sitio de unión a la célula eucariota) se encuentra unido al fragmento A (sitio enzimático activo) por un puente disulfuro. ^(8, 14) El modo de acción involucra el ingreso de la toxina a la célula y al llegar al citoplasma altera la síntesis proteica. La subunidad A produce una ADP-ribosilación del factor de alargamiento EF-2, lo que produce su inhibición. Los ribosomas al poseer un solo EF-2, quedan inhibidos por una sola subunidad A. De esta forma se produce la inhibición de la síntesis proteica lo que lleva rápidamente a la lisis celular, produciendo necrosis e inflamación local de la mucosa. Además, esta toxina es la responsable de los efectos sistémicos de la enfermedad ya que produce toxicidad cardíaca afectando además el sistema nervioso central, periférico y daño renal. ^(10, 25, 39)

1.2.3 Métodos de diagnóstico, tratamiento y prevención

El diagnóstico de confirmación se realiza mediante la identificación de *C. diphtheriae* en las membranas faringoamigdalares por examen directo, cultivo y demostración de la capacidad toxigénica de la cepa ⁽²⁶⁾. La técnica de detección del gen de la toxina mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es más útil para un diagnóstico rápido, por lo que es el método de elección. ⁽¹⁵⁾

La prevención de la enfermedad causada por *C. diphtheriae* se consigue mediante la inmunización con Toxoide Diftérico que se suministra en combinación con el Toxoide Tetánico (T), o incluida en vacunas DTP (en combinación con los componentes toxoide tetánico y el mosaico antigénico antitosferínico) ^(30, 36). El Toxoide Diftérico puede también combinarse con otros antígenos vacunales, como los de la Hepatitis B y *Haemophilus influenzae* tipo b. ^(26, 29, 36)

Existen dos tipos de formulaciones de toxoide diftérico: la formulación tipo infantil (D) que contiene entre 10 y 25 Lf, o no menos de 30 UI, indicado para niños menores de 7 años, y el toxoide en formulación tipo adulto (d) con un contenido inferior a 2 Lf o no menos de 4 UI, indicado en niños mayores de 7 años, adolescentes y adultos. ^(3, 8)

Los Toxoides Diftérico y Tetánico inducen respuestas inmunitarias por lo general satisfactorias en lactantes menores de 6 semanas; sin embargo, las vacunas DTP (toxoides diftérico y tetánico combinados con vacuna antipertussis de células completas) o DTPa (toxoides diftérico y tetánico combinados con vacuna antipertussis acelular) se recomiendan sólo para lactantes de 6 semanas o más, para mejorar la respuesta inmunitaria al componente antitosferínico. Prácticamente todos los lactantes cuentan con concentraciones protectoras de antitoxina después de la serie primaria de tres dosis de Toxoide Diftérico, así mismo, se logran respuestas serológicas similares o mejores tras la vacunación primaria de adultos. ^(4, 23, 26, 27)

En nuestro país, la antitoxina diftérica de origen equino no se recomienda para la prevención de la enfermedad en los contactos que han recibido una adecuada quimioprofilaxis, debido a la falta de evidencia de su eficacia y por el elevado riesgo (5-20%) de reacciones anafilácticas producidas por el suero de caballo. ^(2, 17)

En países de Centro y Sudamérica la antitoxina diftérica es una alternativa de tratamiento para la enfermedad causada por difteria ⁽²⁴⁾. Se suministra en casos positivos y se prepara

a partir del plasma o suero de caballos sanos inmunizados contra la toxina o el toxoide diftérico ⁽²³⁾, se utiliza para la inmunización pasiva en casos sospechosos de difteria sin esperar la confirmación bacteriológica de la infección e inicialmente, se administra una dosis de prueba para descartar hipersensibilidad. La antitoxina diftérica no se utiliza en la profilaxis de la difteria a causa del riesgo de hipersensibilidad a los componentes. ⁽³⁰⁾

La antitoxina diftérica no actúa sobre la toxina que se ha fijado en los tejidos. La posología es entre 20.000 y 120.000 U ⁽²⁴⁾, según la gravedad y la localización de la enfermedad, la administración es por vía intramuscular, aunque en casos muy graves puede usarse por vía intravenosa, pero se deben adoptar las medidas necesarias para evitar un shock anafiláctico, con perfusión lenta y diluida en suero fisiológico al 1/20^(3, 18); la cantidad total se administra en una sola dosis, pero en las formas tóxicas de la enfermedad se pueden añadir pequeñas dosis en días sucesivos para neutralizar la toxina circulante que pueda liberarse. ⁽³⁷⁾

Como medidas de control, a los portadores de la enfermedad se les proporciona tratamiento con penicilina benzatínica de 600,000 UI, intramuscular, dosis única, o con eritromicina 30-40 mg/kg/día por vía oral durante 7 días. ^(2, 31, 37)

El tratamiento de elección es el estolato de eritromicina, la dosis en los menores de 12 años es de 35-50 mg/kg/día (sin pasar de un gramo por día), dividida en cuatro tomas durante 14 días, en las personas de 12 años en adelante, la dosis es de 1 a 2 g por día, dividida en 3 a 4 tomas durante el mismo período. ⁽²⁾

1.2.4 Epidemiología

La epidemiología de la Difteria se modificó de forma espectacular con el descubrimiento del Toxoide Diftérico por Gastón León Ramón, hasta entonces, era una enfermedad de distribución mundial, de presentación epidémica, con ciclos de aproximadamente 10 años y de predominio en los meses fríos. ^(5, 7, 34). En México aparece en 1939⁽³⁶⁾ el primer reporte donde se informaba que el país producía los suficientes biológicos para la demanda nacional, para el año de 1948 se dispone de vacuna combinada contra la tosferina-difteria y en 1954 se empezó a producir el toxoide tetánico, por lo que al año siguiente ya se preparaba la vacuna DPT. ^(7, 36)

La evolución epidemiológica ha sido similar en la mayor parte de los países europeos, con la casi total eliminación de la enfermedad a partir de 1970. Sin embargo, la aparición posterior de dos brotes epidémicos hizo resurgir el interés por esta enfermedad: el primero, ocurrido entre 1982 y 1985, afectó a varios países y alcanzó su incidencia máxima en 1983 (1.917 casos declarados); el segundo brote, se inició en 1990 en Rusia y ha sido el más importante de los últimos años. El número de casos declarados fue: 1.214 en 1990, 3.126 en 1991, 5.744 en 1992, 19.461 en 1993, 47.808 en 1994 y 50.412 en 1995 ^(22, 34, 41). La epidemia se extendió a 14 estados independientes de la antigua Unión Soviética (Armenia, Bielorrusia, Estonia, Georgia, Kazajstán, Kirguizistán, Letonia, Lituania, Moldavia, Tayikistán, Turkmenistán, Ucrania, Uzbekistán), y se alcanzaron tasas de incidencia de hasta 31 casos por 100.000 habitantes, en Tayikistán en 1994 ⁽⁴¹⁾. La letalidad osciló entre el 3% y el 4%. Las campañas masivas de vacunación, llevadas a cabo en 1995 y 1996, dieron lugar a una progresiva disminución de la incidencia de la enfermedad. ⁽³⁾

México es uno de los países con amplia cobertura de vacunación a nivel nacional; la eficacia de las medidas preventivas ha conseguido la práctica eliminación de la Difteria en los países industrializados, pero es todavía un problema sanitario importante en los países en desarrollo y subdesarrollo, con una letalidad mundial estimada de 5.000 personas/año 2001. ⁽⁷⁾

1.2.5 Grupos de riesgo

Los principales grupos de riesgo en México son los niños menores de 5 años, adultos mayores y la población que habita en zonas marginadas y con bajo poder adquisitivo. La difteria es una enfermedad que se presenta en los meses más fríos y afecta principalmente a niños no inmunizados menores de 5 años, el único reservorio que presenta *C. diphtheriae* es el hombre y su modo de transmisión es por contacto directo con las secreciones de un paciente o portador. Cuando sucede el contagio la bacteria se incuba por lo general de 2 a 5 días y su periodo de transmisibilidad es variable y dura hasta que los bacilos virulentos han desaparecido de las secreciones y lesiones, por lo general dos semanas y rara vez excede de 4 semanas. Los portadores pueden expulsar microorganismos durante 6 meses o más. ^(7, 15, 36)

1.2.6 Incidencia y prevalencia en México

La incidencia de esta enfermedad ha disminuido considerablemente en muchos países, debido al mejoramiento de la inmunización activa, la presentación continua de casos y de brotes epidémicos en algunas partes señalan su importancia como problema de salud pública ^(3, 11, 40). La difteria fue registrada por primera vez en México en 1863. En el periodo de 39 años de 1896 a 1934 el total de las defunciones registradas por difteria en la ciudad de México, ascendió a 2025 y la tasa de mortalidad fluctuó alrededor de 7.4 a 15.3/100 mil habitantes. Entre los años de 1941 a 1979, se modificaron a 17 754 casos y la tasa de frecuencia anual disminuyó de 13.6 en 1941 a 0.01/100 mil en 1979. La tasa de mortalidad era de casi 5.9 en 1943, a partir de este año la incidencia de casos decreció, en 1979 se registraron sólo nueve casos y 5 defunciones, en 1985 ocurrieron cuatro casos en la ciudad de Ticul, Yucatán, con una defunción. ⁽⁷⁾

A través de la historia de nuestro país la difteria prácticamente ha desaparecido ya que el último reporte de un caso de difteria fue en el año de 1991, en la actualidad no se reportan casos de difteria en México, sin embargo, se continúa con la inmunización debido a que no es una enfermedad que se haya erradicado a nivel mundial. ^(6, 35)

1.2.7 Modo de transmisión y reservorios

El ser humano es el único hospedador natural de *C. diphtheriae*, la transmisión se produce únicamente por contacto físico cercano y secreciones nasofaríngeas, oculares o cutáneas; la difteria cutánea es muy contagiosa y común en algunas zonas de los trópicos, en climas templados, la mayoría de los casos se producen durante la estación fría, mientras que en los climas cálidos la transmisión tiene lugar durante todo el año. ^(27, 28)

Actualmente *C. diphtheriae* ha sido aislado en el sistema auditivo de los gatos domésticos que presentan otitis severa bilateral, en un estudio realizado en el Hospital Veterinario de la Universidad de Virginia y aunque describen que es no toxigénica en la mayoría de los

casos y no hay evidencia de transmisión zoonótica, si representa un riesgo de salud pública. ^(17, 19)

1.3 Características de la vacuna

En este caso una vacuna efectiva se considera que protege cuando tiene la capacidad para inducir una respuesta de anticuerpos de antitoxina diftérica igual o superior a 0,01 UI/mL, aunque para garantizar una protección absoluta se requieren títulos superiores a 0,1 UI/mL. Entre el 95 y el 100% de los niños vacunados con 4 dosis de DTP alcanzan concentraciones séricas de anticuerpos superiores a 0,01 UI/mL, con cifras medias entre 0,1 y 1 UI/mL. Esta inmunidad adquirida persiste elevada durante 5 años y disminuye de forma progresiva hasta los 10 años. ^(8, 37)

Aunque no se han realizado ensayos clínicos de eficacia de la vacuna antidiftérica, estudios de casos y controles muestran cifras de efectividad superiores al 85%. La casi completa desaparición de la enfermedad en los países con elevada cobertura de vacunación y la experiencia adquirida en el control de brotes mediante campañas de vacunación son pruebas evidentes de su efectividad. ^(2, 3, 19, 40)

La eficacia de la vacuna puede afectarse si la persona se encuentra bajo tratamiento con inmunosupresores, la vacuna no debe mezclarse con otras vacunas inyectables excepto el liofilizado de Hib, la administración intravenosa puede producir choque anafiláctico y la administración intradérmica o subcutánea reduce la respuesta inmune. ^(2, 36)

La vacuna no se debe suministrar a personas con hipersensibilidad a alguno de los componentes de la fórmula: personas con inmunodeficiencias (excepto infección por VIH en estado asintomático), niños con historia personal de convulsiones u otros eventos graves (encefalopatía) temporalmente asociados a dosis previa de la vacuna. Niños transfundidos o que han recibido inmunoglobulina deberán esperar 3 meses para ser vacunados. ^(2, 36)

Para los eventos temporalmente asociados a la aplicación de la vacuna pentavalente, se ha observado que del 5 a 10% de los vacunados presentan eventos locales en el transcurso de las 24 a 48 horas posteriores a la vacunación: dolor, induración, enrojecimiento y calor en el sitio de la aplicación. Para eventos sistémicos dentro de las 48 horas, después de la vacunación se ha notificado fiebre en el 40% de los vacunados; llanto persistente por más de tres horas, somnolencia, irritabilidad y malestar general en el 5 %; cefalea, convulsiones, escalofrío, mialgias y artralgias en menos del 3%. ⁽²⁾

1.3.1 Costo-beneficio de la producción de la vacuna

La producción de la vacuna contra la difteria ayuda a la prevención de la enfermedad por lo que directamente recae en el ahorro de recursos como lo son los gastos de hospitalización, tiempo de inactividad del paciente y la familia así como los recursos asociados a las actividades económicas de los sujetos en edad productiva, de este modo se puede mejorar la inversión en el desarrollo de los sistemas de salud y prevención de otras enfermedades para la ciudadanía. ⁽⁷⁾

1.4 Metodología utilizada, medios de cultivo para mantenimiento y producción

Las investigaciones de Freeman (1951) demostraron la posibilidad de transformar cepas atóxicas de *C. diphtheriae* en cepas toxigénicas a través de la infección fágica y la inducción de este fago para que se establezca el estado de lisogenia (integración del ácido nucleico del fago al cromosoma bacteriano) de las bacterias. ⁽¹²⁾

La tecnología para la producción de Toxina Diftérica es dependiente de las condiciones ambientales bajo las que se cultiva la cepa productora. En particular, se ha observado que tanto el contenido de hierro en el medio de cultivo como la fuente de carbono, son esenciales para el crecimiento bacteriano y que tienen un efecto directo sobre la producción de toxina. ^(32, 33, 38)

Se conoce que el hierro en altas concentraciones tiene un efecto inhibitor sobre la producción de la toxina, en otras palabras, que la producción de toxina está regulada negativamente por el hierro. Así que para la preparación de toxina, se utiliza un medio de cultivo con baja concentración de hierro con un intervalo de 50-150 µg/L. ⁽³³⁾

El Instituto Nacional de Higiene (INH), perteneciente a BIRMEX, en 1926 preparó el primer lote de Toxoide Diftérico en condiciones estáticas a nivel de garrafón utilizando la cepa de *C. diphtheriae* PW8 (cepa Park Williams No.8) y se mantuvo la producción así hasta el año de 1991 en donde, después de un proceso experimental, se lograron establecer las condiciones para la producción de la Toxina Diftérica en medio de cultivo Müller & Miller agitado a nivel del fermentador (IF-70 y Azteca-1000) y a partir de 1992 se produjo de forma rutinaria la Toxina Diftérica en fermentador (IF-70 y Azteca-1000) a partir del cultivo de *C. diphtheriae* cepa PW8 utilizando el medio de cultivo Müller & Miller y manteniendo la cepa en conservación bajo el sistema de elaboración de cultivos maestros liofilizados y cultivos de trabajo congelados, ambos almacenados en congelación a -70°C.

En el año de 1996 se adquirió un fermentador de 1500 litros marca Bioengineering con sistema computarizado para el control de los parámetros de fermentación, con lo cual a partir del año 1998 se incrementó considerablemente la producción de Toxina Diftérica y posteriormente Toxoide Diftérico.

Entre los años 2003 y 2004 se adquirieron cuatro fermentadores de diferente capacidad con el objetivo de optimizar el escalamiento de la producción de Toxina Diftérica con parámetros controlados por sistema computarizado (Modelos: BE-250, BE-75-R1 y R2, BE-NFL-16).

Actualmente el laboratorio de Producción de Biomasa del Departamento de Fermentaciones produce Toxina Diftérica en forma industrial a partir del cultivo en lote-semilla de *C. diphtheriae* PW8 obtenido de dichos fermentadores.

En los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México, S.A. de C.V. (BIRMEX), se produce el Toxoide Diftérico a Granel y al paso del tiempo se ha modificado el proceso de producción para desarrollar un producto de mejor calidad para la elaboración de las vacunas Td y DPT. La obtención de este producto se realiza en el Departamento de Fermentaciones con la siguiente metodología:

Obtención de sobrenadante con Toxina Diftérica

El sobrenadante conteniendo la Toxina Diftérica y otras proteínas producidas por *C. diphtheriae* es resultante del cultivo bacteriano desarrollado en el Fermentador BE-1500, y se obtiene mediante la separación de la biomasa por centrifugación, con ayuda de una centrífuga de flujo continuo (marca West-Falia). El sobrenadante conteniendo la toxina y otras proteínas, es posteriormente clarificado por filtración y se ajusta a pH 7.0 (neutro).

Destoxificación

El sobrenadante conteniendo la toxina clarificada y a pH neutro es tratado con formaldehído a una concentración final 0.7%, ajustando su pH a 7.0 durante varios días hasta que este se mantenga estable. Posteriormente se esteriliza por filtración y se incuba durante seis semanas a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ para su completa destoxificación. Al final de la destoxificación se toman muestras del producto y se realiza la prueba de toxicidad residual en cobayos para determinar si la toxina esta biológicamente inactiva (pérdida de la capacidad toxigénica), si el resultado es negativo a partir de este momento se le considera como Toxoide Diftérico, el cual carece de toxicidad pero debe mantener sus propiedades antigénicas que le permiten estimular al sistema inmune de los individuos y protegerlos contra la enfermedad la cual se demostrará mediante las pruebas fisicoquímicas de Control de Calidad.

Purificación de Toxoide Diftérico por precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel por cromatografía en columna utilizando Sephadex G-50

La purificación del Toxoide Diftérico se realiza mediante una concentración por filtración tangencial y una doble precipitación con sulfato de amonio. Antes de realizar la precipitación se lleva a cabo una curva de precipitación con una muestra del Toxoide concentrado de aproximadamente 100 mL, la cual tiene como objetivo principal determinar la concentración de sulfato de amonio necesaria para precipitar las proteínas no específicas presentes en el sobrenadante y que no corresponden al toxoide diftérico para mantener en solución las proteínas correspondientes al Toxoide. Posteriormente se realiza una segunda precipitación adicionando una concentración adicional de sulfato de amonio al sobrenadante para precipitar el toxoide diftérico. El toxoide diftérico precipitado es separado por centrifugación y se redisuelve adicionando agua para fabricación de inyectables, se diafiltra utilizando un sistema de filtración tangencial con membranas de un corte de peso molecular de 10 KDa para eliminar el sulfato de amonio presente en la solución, así como para concentrar el toxoide diftérico; el Toxoide Diftérico concentrado se termina de purificar mediante una filtración en gel utilizando Sephadex G-50, concluido el proceso se concentra de nuevo el Toxoide Diftérico purificado a 2500 Lf/mL.

1.5 Descripción de *Corynebacterium diphtheriae* Cepa Park Williams 8

En 1896 Parker y Williams aislaron una cepa de *Corynebacterium diphtheriae* que tenía la capacidad de producir grandes cantidades de Toxina Diftérica. Este bacilo, cepa PW8, es de particular importancia debido a que ha servido por 73 años como la fuente universal para producir la toxina que se utiliza para la preparación de Toxoide Diftérico, inmunógeno empleado para la inmunización de las personas contra la difteria. En 1954, se observó que la cepa PW8 tiene integrado a su cromosoma un bacteriófago (β) el cual lleva el gen que codifica para la toxina diftérica y que se ha designado como $P^{\text{tox+}}$. La cepa PW8 se

considera como avirulenta, dado el hecho de que esta cepa bacteriana ha sido manipulada para producir lotes de cultivos por numerosos laboratorios en los últimos seis decenios sin signos de infecciones. ⁽²⁰⁾

La cepa PW8 fue aislada originalmente de un paciente y pertenece al grupo serológico K (D-5) de Huang ⁽²¹⁾. La cepa PW8 de *Corynebacterium diphtheriae* produce la toxina diftérica igual que las toxinas diftéricas producidas por las cepas de *C. diphtheriae* conocidas. La producción de toxina es inhibida específicamente por la un exceso de hierro en el medio de cultivo, por lo que se recomienda para la producción de la toxina el uso de un medio de cultivo fabricado con materia prima previamente desferrada y que al final de la fermentación se suplemente con una concentración de hierro óptima. ⁽²⁰⁾

La Gerencia de Producción de Vacunas Bacterianas cuenta, en sus archivos provenientes del Departamento de Fermentaciones, con el Historial de los abastos elaborados de *Corynebacterium diphtheriae cepa PW8*. En este historial se establece que a principios de 1986, el Laboratorio de Producción de Toxoide Diftérico, contaba con ampollas liofilizadas etiquetadas como *C. diphtheriae CDE 21-20-II-1986*. Debido a que esta cepa es de interés en la producción de la Toxina Diftérica, a estas ampollas se les designó como Semilla Maestra identificándose con la siguiente clave: CMH-CD2-L1; para generar semillas de trabajo, el 21 de Junio de 2004 se realizó la apertura de vial de *Corynebacterium diphtheriae cepa PW8 lote CMH-CD2-L1*. A esta cepa se le hicieron dos pases, uno en medio de cultivo Michigan y el segundo en medio de cultivo Müller & Miller modificado, con lo cual se obtuvieron 50 viales y 57 ampollas y se les designó como semilla de trabajo CTH-CD8-L1.

1.6 Problemática en la producción de la vacuna y propuestas de solución

Actualmente algunos lotes de Toxoide Diftérico a granel han sido rechazados por problemas de toxicidad residual así como por el no cumplimiento de la especificación de pureza antigénica del Toxoide Diftérico a granel (1500 Lf/mg N₂ protéico), lo cual ha provocado la realización de reprocesos y retrabajos de estos lotes y por ende una disminución en sus rendimientos y aumento de costos. Por otra parte, no se tiene estandarizada la propagación de la semilla para la producción de toxina, que dio como resultado que los lotes tengan una variación en la concentración de la toxina.

Por lo antes expuesto, es necesario optimizar el proceso de producción de Toxoide Diftérico a granel en sus etapas de propagación de la semilla de *C. diphtheriae Cepa PW8*, prepurificación con sulfato de amonio y destoxificación con formaldehído, para obtener un Toxoide Diftérico a granel que cumpla con las especificaciones de control de calidad establecidos por Birmex y de las especificaciones de los organismos nacionales e internacionales. Esto generará una economía en: insumos de producción, horas hombre, costos de análisis, así como una mejora de los rendimientos de fabricación y lograr una producción consistente y controlada.

2. Justificación

Debido a que el Toxoide Diftérico es un producto de origen biológico, es susceptible a la variabilidad, por lo que es necesario estandarizar y optimizar puntos críticos del proceso de producción de Toxoide Diftérico a granel con el principal propósito de cumplir las especificaciones establecidas por los organismos regulatorios nacionales e

internacionales en materia de salud, así como mejorar los rendimientos de los procesos de fabricación.

Por lo anterior, existe la necesidad de optimizar el proceso de producción debido a que los reprocesos y/o retrabajos provocan una demora y un incremento en los costos de producción, esto genera una problemática para la fabricación de las vacunas combinadas ya que este producto se requiere para formular las vacunas Td y DPT, por otro lado, el Toxoide Diftérico a Granel tiene un alto costo en el mercado internacional y pocos laboratorios lo distribuyen como materia prima para la elaboración de éstas.

El Instituto Nacional de Higiene cuenta con la tecnología necesaria para producir el Toxoide Diftérico a granel, optimizando el proceso de producción se evitaría la dependencia de otros laboratorios para la adquisición de este insumo necesario para la producción de vacunas en México y posiblemente una reducción en los costos de producción.

Esta investigación tendrá un impacto a nivel nacional debido a que se tendría disponibilidad en México de las vacunas en las cuales se incluye este toxoide y con lo cual se apoyarían los programas nacionales de vacunación.

3. Objetivos

3.1 General

Optimizar el proceso de producción de Toxoide Diftérico a Granel mediante la adecuación de sus procesos y la modificación de la Destoxificación de la Toxina, para evitar el rechazo de los lotes y mejorar su calidad.

3.2 Particulares

Estandarizar el proceso de propagación de la semilla de *C. diphtheriae* Cepa PW8 empleando un análisis de cinéticas de crecimiento y propagación de semilla para mejorar el rendimiento y producción de la Toxina Diftérica.

Realizar un proceso de prepurificación de la Toxina Diftérica antes del proceso de destoxificación y purificación final y obtener un Toxoide Diftérico a Granel que cumpla con el requisito de pureza antigénica establecido.

4. Características del estudio

En el presente trabajo se realizó un estudio a nivel experimental, el cual se desarrolló mediante una serie de ensayos de laboratorio, empleando cultivos bacterianos de *Corynebacterium diphtheriae* cepa PW8 de los cuales se realizaron ensayos de prepurificación de la toxina diftérica. Para los ensayos de actividad biológica de la toxina se utilizó un modelo animal de acuerdo a las pruebas establecidas por la FEUM para este biológico, con ello se determinó la influencia que tiene la implementación de una etapa previa de prepurificación de la toxina antes de destoxificarse por métodos químicos.

Cabe resaltar que el presente estudio experimental se desarrolló bajo los lineamientos de seguridad en las áreas de investigación y producción del Instituto Nacional de Higiene que cuentan con los equipos necesarios y la tecnología con el propósito de mejorar los procesos de producción, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo son de gran

utilidad para la producción futura del proceso de producción de Toxoide Diftérico a nivel industrial.

5. Materiales y métodos

5.1 Material biológico

- *Corynebacterium diphtheriae* cepa PW8, cultivo de trabajo con lote CTH.CD8.L1 conservada en congelación a -70°C.
- Estándar secundario de Antitoxina Diftérica con una concentración de 888 Lf/mL conservada de 2-8 °C suministrada por el Departamento de Control de Calidad de Birmex (Producida de acuerdo a las Preparaciones Regionales de Referencia)
- Cobayos hembras o machos de 250-350 g de peso para las pruebas de Toxicidad Residual (FEUM, 2008)

5.2 Reactivos

- Medio de cultivo Michigan
- Medio de cultivo Müller & Miller
- Cloruro de calcio dihidratado marca Merck
- Sulfato de amonio marca Merck
- Cloruro de Sodio marca Merck
- Tiomersal marca Spectrum

5.3 Equipo

- Campana de Seguridad Biológica Clase A marca VECO
- Espectrofotómetro U.V. marca EVOLUTION
- Equipo de filtración Tangencial marca MILLIPORE
- Incubadora de agitación orbital
- Cámara fría
- Cuarto estufa

5.4 Metodología (diagrama 5.5)

5.4.1 Preparación de abasto de la cepa *Corynebacterium diphtheriae* PW-8 a partir de la semilla de trabajo para producción experimental de Toxina Diftérica

Se realizó la apertura de vial del cultivo liofilizado de *Corynebacterium diphtheriae* Cepa PW-8 denominado CMH-CD2-LI en cuatro tubos conteniendo medio de cultivo Michigan, los cuales se incubaron a 35 °C por 72 h, se realizaron pruebas de pureza (cultivo y morfología microscópica), posteriormente, se realizaron tres pases adicionales en tubos con medio de cultivo Michigan (48 h por pase) incubándose bajo las mismas condiciones de trabajo; al finalizar el tiempo de incubación del último pase se sembraron tres matraces conteniendo 100 mL de medio de cultivo Müller & Miller y se incubaron a 35 °C durante 48 h determinándose Lf's y absorbancias de cada pase.

Al concluir el tiempo de incubación se procedió a sembrar dos garrafones conteniendo 1.5 L de medio de cultivo Müller & Miller con el volumen total de los matraces, uno por cada garrafón, se incubaron a 35 °C durante 48 h en agitación a 250 rpm, durante esta etapa del proceso se realizaron las pruebas de: límite de floculación, morfología microscópica y pureza.

A las 48 h se realizó la cosecha del cultivo bacteriano y se obtuvo el sobrenadante por decantación, al sobrenadante se le realizó la prueba de límite de floculación y se determinó la pureza mediante la observación de la morfología microscópica del paquete celular.

El paquete celular obtenido de la cosecha se resuspendió con leche descremada estéril en relación 1:1 (v/v), se homogeneizó y se dosificó en viales estériles, se codificó con la denominación CTH-CD7-LE y se conservó en un intervalo de temperatura -20 a -35°C.

5.4.2 Propagación de la cepa *Corynebacterium diphtheriae* PW-8

La cepa *Corynebacterium diphtheriae* Cepa PW-8 se descongeló directamente en el vial donde se encontraba congelada a temperatura ambiente, el volumen total se transfirió a un tubo conteniendo medio de cultivo Michigan, cuidando que el inóculo quedara en la superficie del medio, se incubó en condiciones estacionarias a 35°C durante 72 h, a partir de este cultivo se realizó un cultivo secundario empleando 3 tubos con el medio de cultivo y las condiciones descritas anteriormente pero con un tiempo de incubación de 48 horas, una vez transcurrido el tiempo de incubación se determinó el Límite de Floculación a cada tubo por el método de Dean Webb (Lf/mL), la cual es una prueba de reacción antígeno-anticuerpo empleada para conocer la cantidad de toxina producida por *C. diphtheriae*. Además se realizó la determinación de la morfología microscópica (técnica de Gram) con la finalidad verificar la pureza del cultivo y la densidad óptica para determinar la concentración celular. De la misma forma se realizaron seis transferencias consecutivas de cultivo de tubo a tubo realizando las determinaciones mencionadas para estandarizar los pases que se emplearán en la transferencia a nivel de matraz.

Es importante puntualizar que por razones de bioseguridad este procedimiento se llevó a cabo en Área Aséptica en una Campana de Seguridad Biológica Clase A.

5.4.3 Determinación de la concentración de Hierro (Fe⁺⁺) óptima para la producción de la toxina diftérica

Debido a que la producción de la Toxina Diftérica es dependiente de las concentraciones de hierro (Fe⁺⁺) en el medio de cultivo, se realizó una prueba de producción de Toxina Diftérica a nivel matraz con medio de Müller & Miller. Se determinó la concentración óptima de este elemento existente en el medio de cultivo que se produce en Birmex mediante la producción de toxina diftérica en los matraces con cultivo bacteriano. Lo anterior se realizó determinando la concentración de Fe en el medio de cultivo empleando un Kit comercial (Kit Hach 2007, Kit para determinación de Fe⁺⁺).

5.4.4 Valoración de la concentración de Hierro (Fe⁺⁺) óptima para la producción de la toxina diftérica

Una vez determinadas las concentraciones de hierro se procedió a realizar las pruebas de producción de Toxina a nivel matraz, para lo cual se utilizó el crecimiento bacteriano en tubo en medio Michigan del paso anterior y con los cuales se inocularon matraces conteniendo 100 mL de medio de cultivo Müller & Miller conteniendo 0.5, 0.75 y 1.0 mg/L de Hierro, se incubó a 35°C/250rpm/48h, al final se realizaron las siguientes determinaciones: concentración de Toxina (Lf/mL), concentración de proteínas totales (D.O. a 280 nm) y determinación de la morfología microscópica (técnica de Gram), esto con la finalidad de estandarizar la propagación a nivel de matraz.

5.4.5 Escalamiento a nivel garrafón

Establecida la concentración óptima de Fe⁺⁺ para la producción de la toxina en el medio de cultivo Müller & Miller, se realizaron subcultivos a nivel matraz a partir de los tubos de propagación del crecimiento en medio Michigan, seleccionando el número de pase óptimo (con mejor producción de toxina y mayor densidad óptica) y utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente.

De los cultivos obtenidos a nivel de matraz se tomaron 300 mL y con ellos se inocularon, cinco garrafones conteniendo 1.5 L de medio de cultivo cada uno, manteniendo una relación inóculo-volumen de medio del 5% (v/v).

Se incubaron los cultivos bacterianos en garrafón bajo condiciones de fermentación a 35°C/ 250rpm/ 48h, tiempo durante el cual se realizó la cinética de crecimiento del microorganismo con el propósito de determinar el tiempo de producción de la toxina diftérica, para ello se tomaron muestras del garrafón cada 3 h a cada muestra se le determinó: pH, D.O. a 280 nm, Límite de floculación (Lf/mL) y morfología microscópica. Se corrieron tres lotes experimentales en esta etapa.

5.4.6 Obtención de la toxina diftérica

Establecidas las condiciones óptimas de producción de Toxina Diftérica a nivel garrafón de 4 L, se procedió a centrifugar el cultivo para separar el paquete celular. Esto se realizó bajo las siguientes condiciones: 250 rpm, 6°C, 15 min, se separó el paquete celular residual y al sobrenadante resultante se le determinó el Título de la Toxina Diftérica (Lf/mL) y determinación de proteínas.

5.4.7 Prepurificación y destoxificación de toxina diftérica

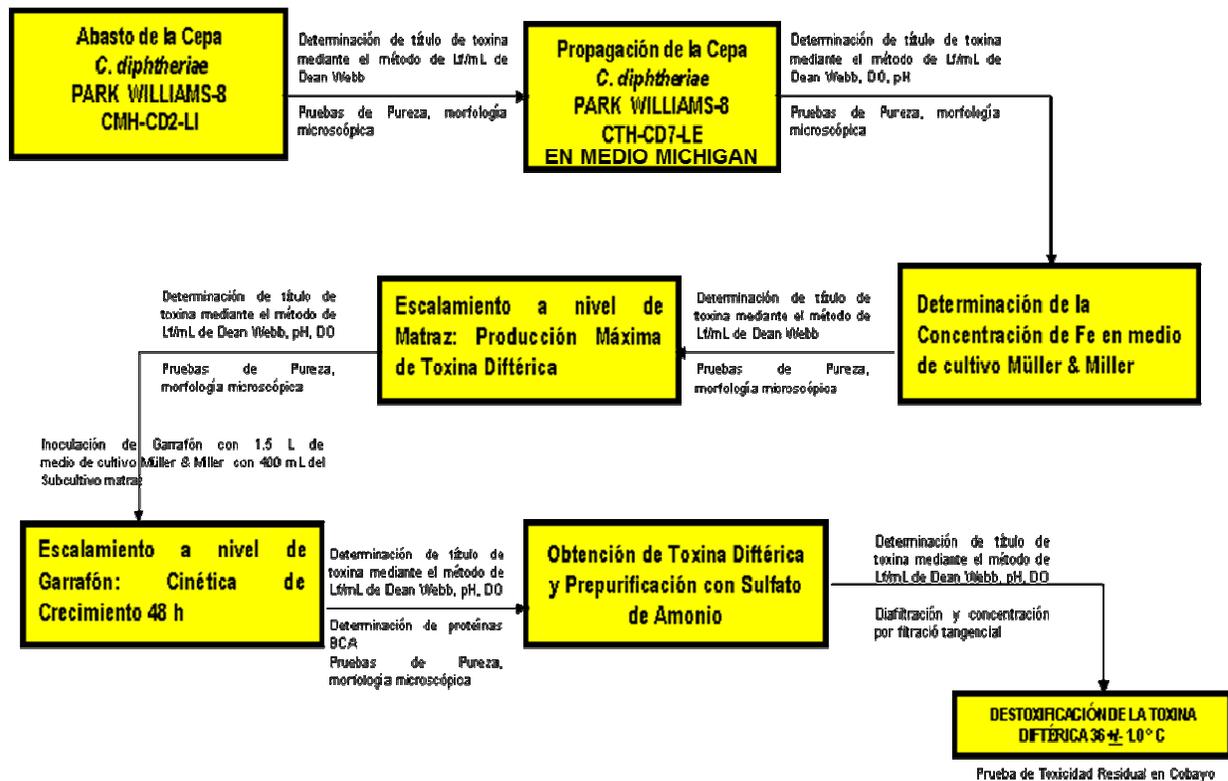
Para la destoxificación de la Toxina Diftérica en primera instancia se precipitó el sobrenadante con sulfato de amonio al 27 % y se centrifugó a 3000 rpm por 20 min, se

eliminó el sedimento, posteriormente el sobrenadante recuperado del proceso anterior se diafiltró con solución salina 0.85% y concentró hasta un volumen de 2 L, utilizando un sistema de filtración por flujo tangencial con un cassette de 10KDa de corte molecular. A la Toxina Diftérica prepurificada y concentrada se le realizó determinación de Límite de Floculación (Lf/mL) y determinación de proteínas por el método de BCA y se ajustó el volumen de la Toxina diftérica para tener una concentración de 80 ± 10 Lf's/mL con solución salina 0.85%.

A la Toxina Diftérica prepurificada se le adicionó formaldehído concentrado para obtener una concentración final del 0.7 % de acuerdo a las recomendaciones de la OMS (2005). (42)

La Toxina Diftérica se incubó de acuerdo, al método de producción actual 36 ± 1 °C por 42 días (6 semanas) con una agitación manual diaria homogenizando el producto; durante este tiempo se tomaron muestras del garrafón cada semana y se evaluó para determinar si se había logrado la destoxicación del producto mediante la prueba de Toxicidad Residual en cobayo, descrita en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM 2011).

5.5 Diagrama general de trabajo



6. Resultados

6.1 Abasto de la cepa *Corynebacterium diphtheriae* PW-8 del semilla maestra CMH-CD2-LI para producción experimental de toxina diftérica.

Como resultado del abasto (semilla de trabajo) realizado para el desarrollo experimental, se obtuvieron 20 viales con cultivo bacteriano puro de *C. diphtheriae* Cepa PW-8 identificados con el lote CTH-CD7-LE y se almacenaron en un ultracongelador a una temperatura de -70°C , hasta su uso.

6.2 Propagación de la cepa *Corynebacterium diphtheriae* PW-8 en tubo

Se desarrollaron 3 lotes experimentales para la propagación de *C. diphtheriae* Cepa PW-8 en tubo con medio de cultivo Michigan a partir del cultivo de trabajo CTH-CD7-LE, los resultados obtenidos de las pruebas realizadas en esta etapa se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Propagación de *C. diphtheriae* Cepa PW-8 semilla de trabajo CTH-CD7-LE en tubo con medio Michigan

| LEXPO1 | | | | LEXPO2 | | | |
|--------|---------|------------|-----------------------|-----------|---------|------------|-----------------------|
| Pase | Lf's/mL | Kf's (min) | Absorbancias (550 nm) | Pase | Lf's/mL | Kf's (min) | Absorbancias (550 nm) |
| 1 | 0 | 160 | 0.08 | 1 | 12.5 | 15 | 0.35 |
| 2 | 12.5 | 100 | 0.67 | 2 | 8.3 | 22 | 0.4 |
| 3 | 12.5 | 100 | 0.55 | 3 | 12.5 | 20 | 0.55 |
| 4 | 25 | 60 | 0.817 | 4 | 16.6 | 15 | 0.4 |
| 5 | 25 | 30 | 0.47 | 5 | 25 | 15 | 0.37 |
| 6 | 25 | 160 | 0.5 | 6 | 25 | 15 | 0.5 |
| 7 | 8.3 | 160 | 0.37 | 7 | 8.3 | 30 | 0.4 |
| 8 | 0 | 120 | 0.35 | 8 | 0 | 120 | 0.3 |
| 9 | 0 | 120 | 0.3 | 9 | 0 | 120 | 0.35 |
| 10 | 0 | 120 | 0.3 | 10 | 0 | 120 | 0.3 |
| LEXPO3 | | | | Promedios | | | |
| Pase | Lf's/mL | Kf's (min) | Absorbancias (550 nm) | Pase | Lf's/mL | Kf's (min) | Absorbancias (550 nm) |
| 1 | 0 | 120 | 0.05 | 1 | 4.2 | 98.3 | 0.160 |
| 2 | 0 | 120 | 0.45 | 2 | 6.9 | 80.7 | 0.507 |
| 3 | 8.3 | 60 | 0.48 | 3 | 11.1 | 60.0 | 0.527 |
| 4 | 12.5 | 60 | 0.8 | 4 | 18.0 | 45.0 | 0.672 |
| 5 | 31.25 | 60 | 0.75 | 5 | 27.1 | 35.0 | 0.530 |
| 6 | 25 | 15 | 0.5 | 6 | 16.7 | 63.3 | 0.500 |
| 7 | 8.3 | 25 | 0.4 | 7 | 5.5 | 71.7 | 0.390 |
| 8 | 0 | 120 | 0.33 | 8 | 2.8 | 120.0 | 0.327 |
| 9 | 0 | 120 | 0.22 | 9 | 0.0 | 120.0 | 0.290 |
| 10 | 0 | 120 | 0.2 | 10 | 0.0 | 120.0 | 0.267 |

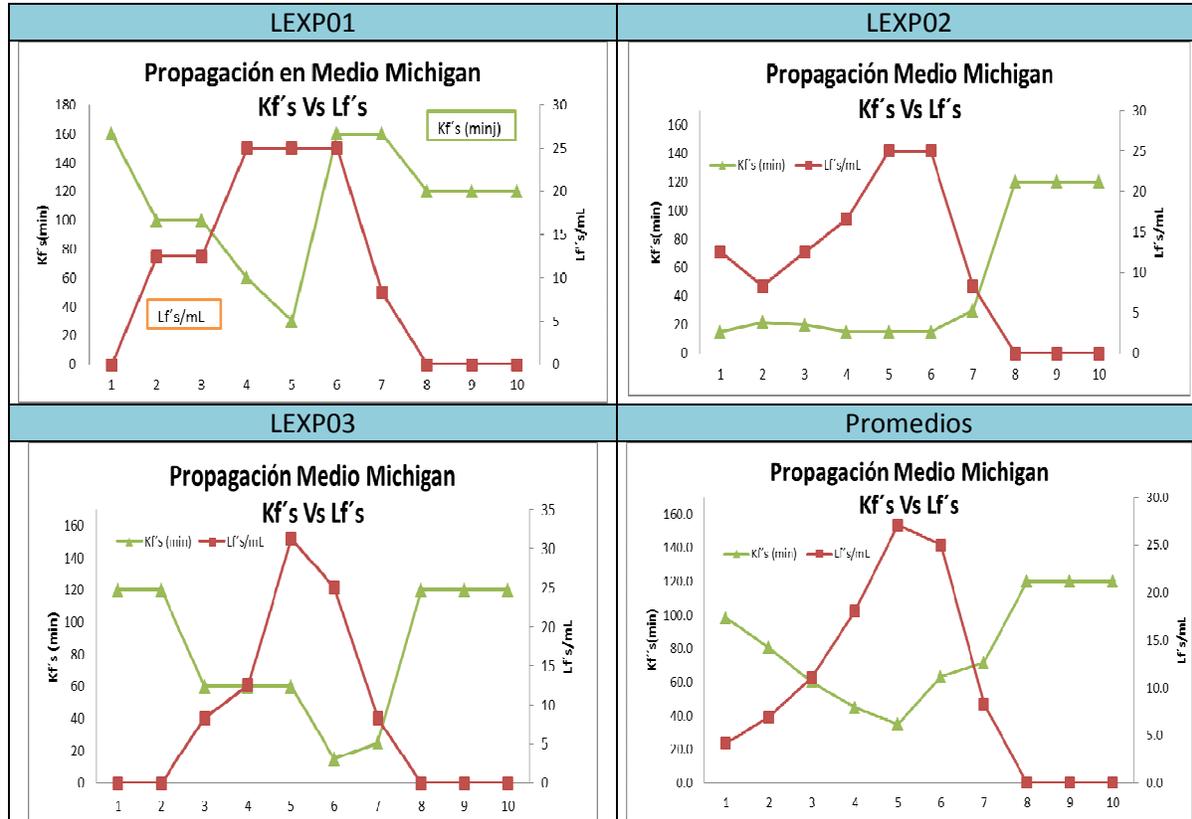
*Promedio de los 3 Lotes Experimentales

** Cultivo en tubo de 48h por pase

La Tabla 1 muestra que durante la propagación de la cepa a nivel de tubo, el desarrollo bacteriano óptimo para el escalamiento a nivel de matraz se puede realizar entre los pases 4 y 6 ya que en estos pases se encuentra el título de Toxina Diftérica (Lf's/mL) más

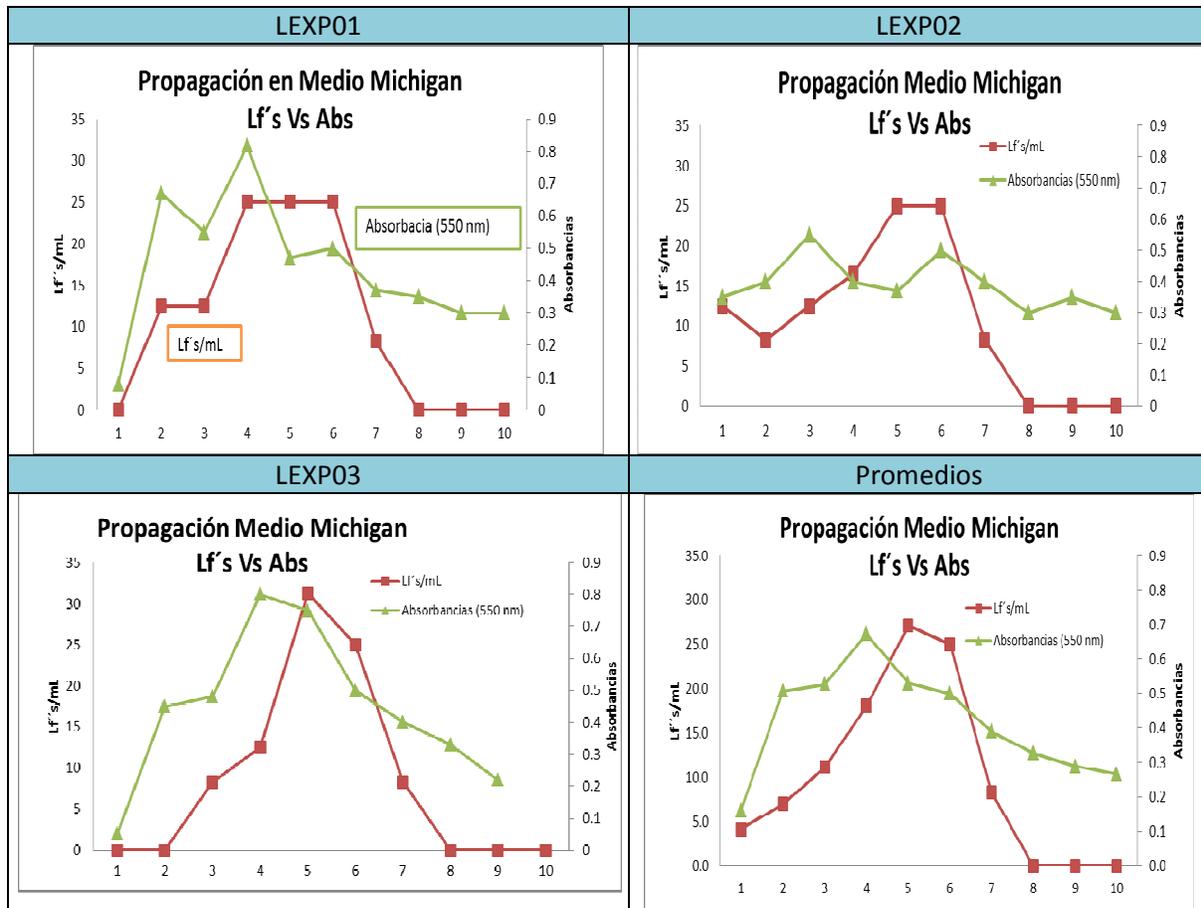
alto así como la concentración celular, lo que nos indica una mayor actividad de *C. diphtheriae* en el medio de cultivo Michigan.

En la Gráfica 1 se comparan los datos de Lf's Vs Kf's y se puede observar el comportamiento del cultivo bacteriano en relación a estos parámetros de manera que se identifica que conforme el aumento de la concentración de Toxina Diftérica (Lf's) se reduce el tiempo de la reacción de floculación (Kf's), por lo que se determina que los subcultivos óptimos para la transferencia del cultivo y la producción de lotes se debe llevar a cabo utilizando tubos con cultivo que se encuentren entre el 4° y 6° pase.



Gráfica 1. Comparación entre los promedios de Lf's Vs Kf's

Del mismo modo, al analizar la Gráfica 2 se determina que con el aumento de la concentración celular (absorbancia) aumenta la concentración de Toxina Diftérica (Lf's) por lo que se considera que la producción de toxina es directamente proporcional a la concentración celular, ya que al descender el número de células de acuerdo a las absorbancias determinadas, se observa que también disminuye la concentración de Toxina Diftérica (Lf's).



Gráfica 2. Crecimiento de *C. diphtheriae* en tubo con medio Michigan para la producción de toxina diftérica

6.3 Determinación de la concentración de Hierro (Fe⁺⁺) óptima para la producción de la toxina diftérica

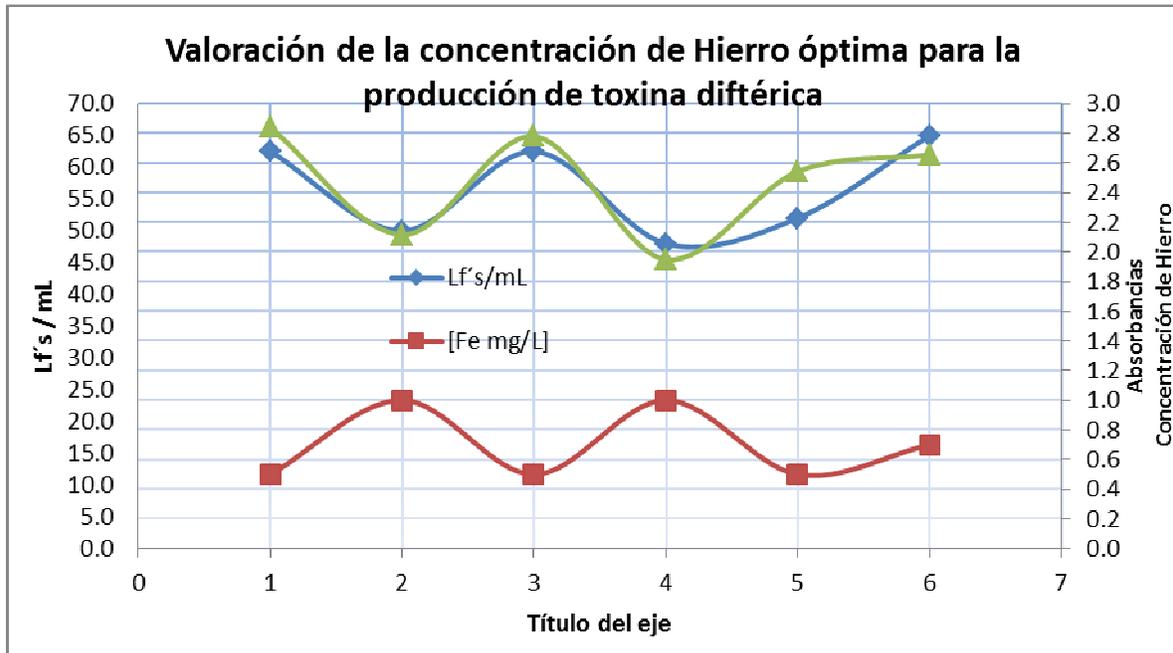
Se realizaron seis determinaciones de concentración de Fe⁺⁺ existente en el medio de cultivo Müller & Miller (Tabla 2), durante este ensayo se demuestra, mediante el Kit comercial (Kit Hach 2007), que la cantidad de Fe⁺⁺ existente en medio oscila entre 0.5 – 1.0 mg/L por lo que no se realizó ningún ajuste de Fe⁺⁺.

Tabla 2. Influencia de la concentración de Fe⁺⁺ en el medio Müller & Miller en la producción toxina diftérica (Lf's) a nivel matraz

| Lote Prueba | Lf's/mL | Absorbancias (550 nm) | [Fe ⁺⁺ mg/L] |
|-------------|---------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | 62.5 | 2.840 | 0.5 |
| 2 | 50.0 | 2.117 | 1.0 |
| 3 | 62.5 | 2.780 | 0.5 |
| 4 | 48.0 | 1.950 | 1.0 |
| 5 | 52.0 | 2.543 | 0.5 |
| 6 | 65.0 | 2.656 | 0.7 |

6.4 Valoración de la concentración de Hierro (Fe⁺⁺) óptima para la producción de la toxina diftérica

En la Gráfica 3 se observa a nivel de matraz que con el aumento de la concentración de Fe⁺⁺ por arriba de 0.7 mg/L se inhibió la producción de Toxina (Lf's), así mismo una concentración de 0.5-0.7 mg/L favoreció la producción de Toxina Diftérica. Se observa de la misma manera que la concentración de Fe⁺⁺ afecta directamente en el crecimiento del cultivo bacteriano, dada esta aseveración se demuestra que si existe una menor concentración de Fe⁺⁺ aumenta el crecimiento bacteriano y del mismo modo la producción de toxina.



Gráfica 3. Influencia de la concentración de Fe⁺⁺ en la producción de toxina diftérica

6.5 Escalamiento a nivel garrafón

Se produjeron tres lotes experimentales denominados TD11EXP01, TD11EXP02 y TD11EXP03, los cuales se desarrollaron en medio de Cultivo Müller & Miller con una concentración de Fe⁺⁺ de 0.50 mg/L y se emplearon los subcultivos de los pases número cuatro de la propagación celular en medio Michigan así como matraces con 48 horas de incubación presentando una absorbancia mayor de 2.500 para la producción de los lotes experimentales.

Los resultados obtenidos se muestran por lote en las gráficas No. 4, 5, 6 y 7 así como en la tabla 3. La tabla 3 corresponde a los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento de los tres lotes de producción experimental a nivel de garrafón con 1.2 L de medio de cultivo Müller & Miller bajo las siguientes condiciones: tiempo de incubación 48 h, temperatura de 35°C y velocidad de agitación de 250 rpm. Durante las cinéticas de crecimiento de los lotes producidos experimentalmente, se realizó para cada una de las muestras obtenidas las siguientes determinaciones: título de la toxina diftérica (Lf's) y concentración bacteriana (abs), pH, tiempo de floculación (Kf's). En la Tabla tres se observa que la producción de toxina comienza a partir de las 27 horas de incubación alcanzando su máximo nivel a las 48 horas, así mismo presenta mayor concentración celular y menor tiempo de floculación.

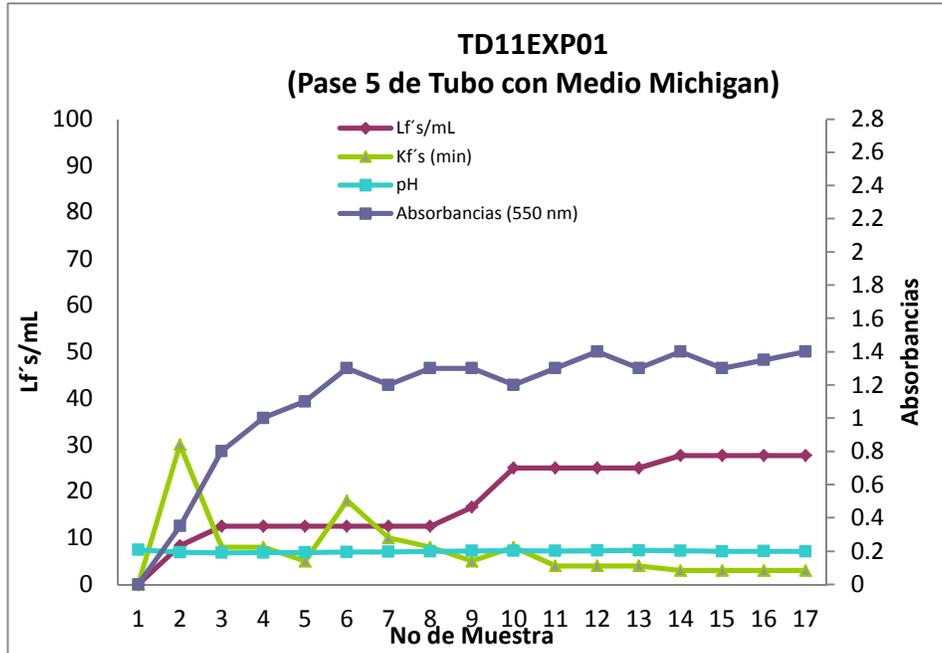
Tabla 3. Cinética de crecimiento de *C. diphtheriae* cepa PW-8 a nivel de garrafón

| TD11EXP01 | | | | | TD11EXP02 | | | | |
|--------------|---------|------------|-----------------------|------|--------------|---------|------------|-----------------------|------|
| Tiempo (hrs) | Lf's/mL | Kf's (min) | Absorbancias (550 nm) | pH | Tiempo (hrs) | Lf's/mL | Kf's (min) | Absorbancias (550 nm) | pH |
| 3 | 8.3 | 30 | 0.35 | 6.9 | 3 | 8.3 | 90 | 0.8 | 6.96 |
| 6 | 12.5 | 8 | 0.8 | 6.8 | 6 | 8.3 | 30 | 0.906 | 6.77 |
| 9 | 12.5 | 8 | 1 | 6.83 | 9 | 8.3 | 27 | 1.141 | 6.74 |
| 12 | 12.5 | 5 | 1.1 | 6.86 | 12 | 8.3 | 20 | 1.285 | 6.79 |
| 15 | 12.5 | 18 | 1.3 | 6.96 | 15 | 13.88 | 3 | 1.804 | 6.96 |
| 18 | 12.5 | 10 | 1.2 | 7 | 18 | 13.88 | 5 | 1.925 | 7.02 |
| 21 | 12.5 | 8 | 1.3 | 7.1 | 21 | 16.6 | 4 | 1.816 | 7 |
| 24 | 16.6 | 5 | 1.3 | 7.2 | 24 | 16.6 | 4 | 1.89 | 7.2 |
| 27 | 25 | 8 | 1.2 | 7.23 | 27 | 25 | 3 | 1.99 | 7.2 |
| 30 | 25 | 4 | 1.3 | 7.2 | 30 | 25 | 3 | 1.998 | 7.12 |
| 33 | 25 | 4 | 1.4 | 7.28 | 33 | 25 | 3 | 2.143 | 7.22 |
| 36 | 25 | 4 | 1.3 | 7.3 | 36 | 27.7 | 3 | 2.21 | 7.25 |
| 39 | 27.7 | 3 | 1.4 | 7.25 | 39 | 31.25 | 2 | 2.211 | 7.16 |
| 42 | 27.7 | 3 | 1.3 | 7.1 | 42 | 31.25 | 2 | 2.3 | 7.15 |
| 45 | 27.7 | 3 | 1.35 | 7.15 | 45 | 31.25 | 6 | 2.35 | 7.2 |
| 48 | 27.7 | 3 | 1.4 | 7.1 | 48 | 32.89 | 3 | 2.36 | 7.1 |
| TD11EXP03 | | | | | Promedios | | | | |
| Tiempo (hrs) | Lf's/mL | Kf's (min) | Absorbancias (550 nm) | pH | Tiempo (hrs) | Lf's/mL | Kf's (min) | Absorbancias (550 nm) | pH |
| 3 | 8.3 | 90 | 0.8 | 7 | 3 | 8.3 | 70.0 | 0.650 | 6.95 |
| 6 | 8.3 | 5 | 1.322 | 7.04 | 6 | 9.7 | 14.3 | 1.009 | 6.87 |
| 9 | 8.3 | 4 | 1.559 | 7.09 | 9 | 9.7 | 13.0 | 1.233 | 6.89 |
| 12 | 12.5 | 5 | 1.707 | 7.17 | 12 | 11.1 | 10.0 | 1.364 | 6.94 |
| 15 | 12.5 | 5 | 1.86 | 7.18 | 15 | 13.0 | 8.7 | 1.655 | 7.03 |
| 18 | 12.5 | 3 | 1.966 | 7.26 | 18 | 13.0 | 6.0 | 1.697 | 7.09 |
| 21 | 25 | 5 | 2.044 | 7.35 | 21 | 18.0 | 5.7 | 1.720 | 7.15 |
| 24 | 25 | 5 | 2.145 | 7.36 | 24 | 19.4 | 4.7 | 1.778 | 7.25 |
| 27 | 27.7 | 4 | 2.15 | 7.33 | 27 | 25.9 | 5.0 | 1.780 | 7.25 |
| 30 | 27.7 | 2 | 2.177 | 7.17 | 30 | 25.9 | 3.0 | 1.825 | 7.16 |
| 33 | 27.7 | 2 | 2.256 | 7.32 | 33 | 25.9 | 3.0 | 1.933 | 7.27 |
| 36 | 27.7 | 2 | 2.324 | 7.39 | 36 | 26.8 | 3.0 | 1.945 | 7.31 |
| 39 | 31.25 | 3 | 2.377 | 7.4 | 39 | 30.1 | 2.7 | 1.996 | 7.27 |
| 42 | 31.25 | 3 | 2.408 | 7.45 | 42 | 30.1 | 2.7 | 2.003 | 7.23 |
| 45 | 35.71 | 2 | 2.455 | 7.5 | 45 | 31.6 | 3.7 | 2.052 | 7.28 |
| 48 | 35.71 | 2 | 2.477 | 7.53 | 48 | 32.1 | 2.7 | 2.079 | 7.24 |

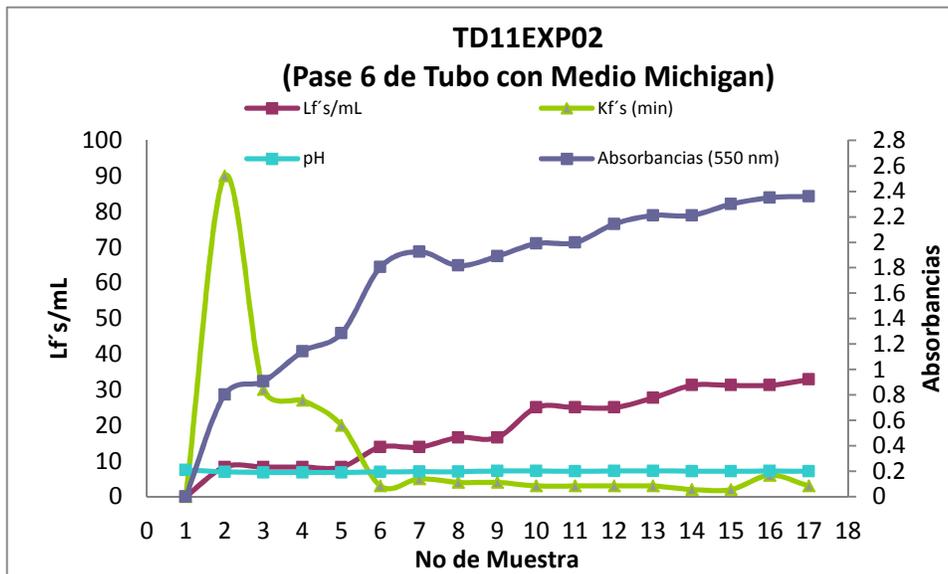
***Lotes experimentales producidos en condiciones:
35°C/ 250 rpm / 0.50 mg/L de hierro /48 h de incubación**

En las Gráficas 4, 5 y 6 se muestra el comportamiento de los tres lotes experimentales, estos lotes conservan una tendencia similar entre las variables medibles durante la cinética por lo que al obtener los promedios (Gráfica 7) se obtiene el comportamiento del proceso a través del tiempo de producción y la relación entre las variables, observándose el aumento de la producción de la Toxina Diftérica (Lf's/mL), el decremento del tiempo de floculación (Kf's) así como un aumento de la concentración bacteriana (abs). Durante todo

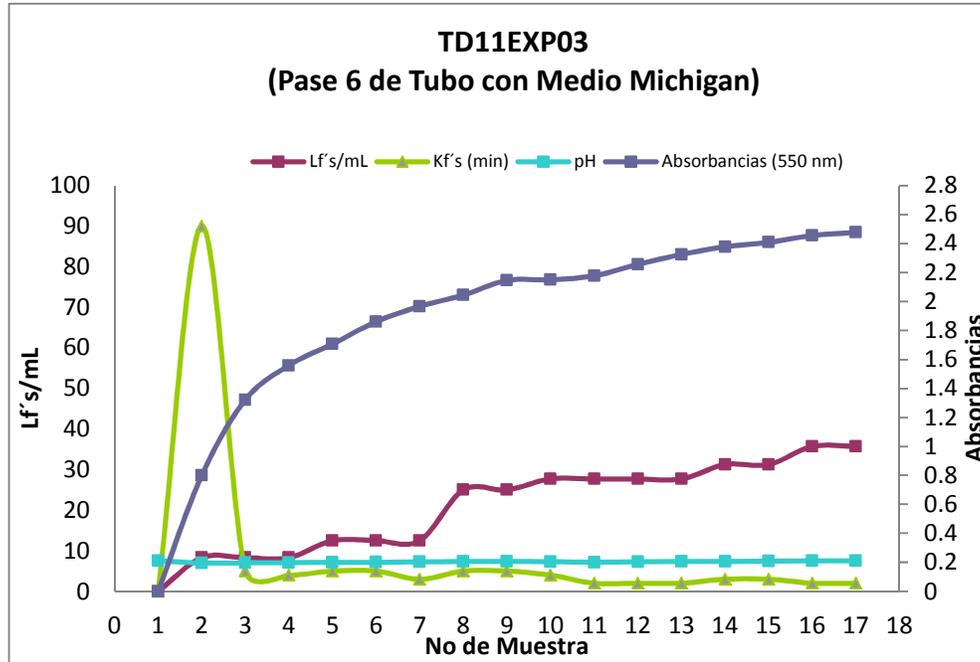
el proceso el pH osciló entre 6.8 - 7.4, por lo que al analizar los gráficos de las cinéticas de crecimiento se observa reproducibilidad en el proceso.



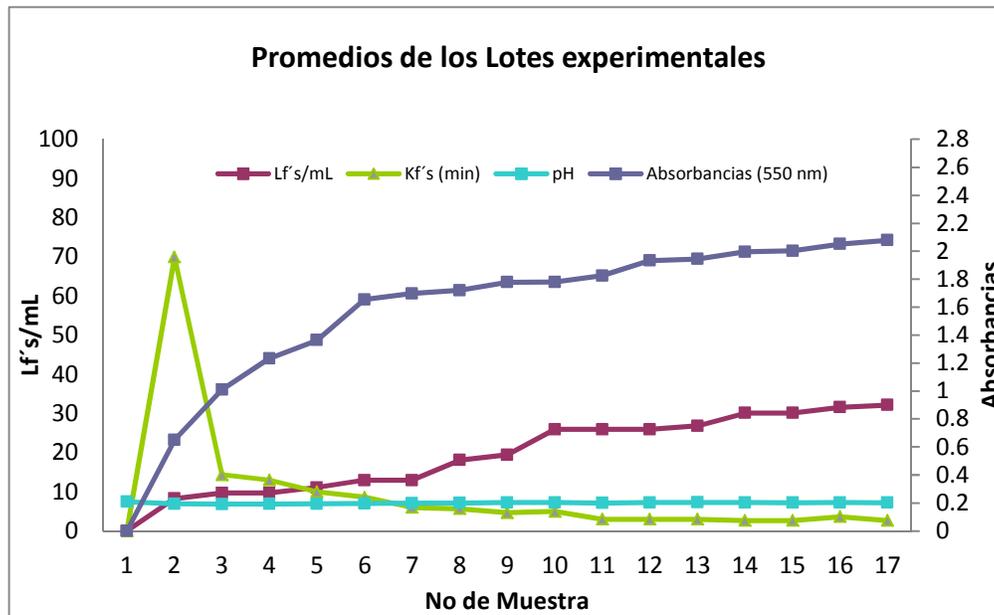
Gráfica 4. Relación de los parámetros de producción de toxina diftérica (Lote TD11EXP01). Lote obtenido de subcultivo en matraz con 50 Lf's y 2.536 de absorbancia



Gráfica 5. Relación de los parámetros de producción de toxina diftérica (Lote TD11EXP02). Lote obtenido de subcultivo en matraz con 62.5 Lf's y 2.757 de absorbancia



Gráfica 6. Relación de los parámetros de producción de toxina diftérica (Lote TD11EXP03). Lote obtenido de subcultivo en matraz con 62.5 Lf's y 2.832 de absorbancia



Gráfica 7. Promedio de los parámetros de producción de toxina diftérica

6.6 Obtención de la toxina diftérica

De los lotes experimentales producidos en garrafón se obtuvo el sobrenadante por medio de centrifugación, desechando el paquete celular, el sobrenadante conteniendo la toxina diftérica fue clarificado por filtración para eliminar las células residuales. En la Tabla 4 se muestran los volúmenes obtenidos de Toxina Diftérica, la concentración de proteínas y los Títulos (Lf's) por cada lote experimental:

Tabla 4. Volumen de toxina diftérica obtenido por cultivo agitado en garrafón.

| Lote | Volumen (mL) | Título de la Toxina (Lf's) | Tiempo de Floculación (Kf's) | Concentración de proteínas de Toxina Diftérica |
|-----------|--------------|----------------------------|------------------------------|--|
| TD11EXP01 | 8500 | 30.48 | 3 | 0.01082 g/L |
| TD11EXP02 | 8650 | 32.89 | 3 | 0.01505 g/L |
| TD11EXP03 | 8700 | 35.71 | 2 | 0.01501 g/L |

6.7 Prepurificación y destoxicación de toxina diftérica

Los tres lotes de Toxina Diftérica fueron prepurificados por precipitación con sulfato de amonio a una concentración del 27 %, este porcentaje se determinó con base a una curva de precipitación realizada con muestras de los tres lotes experimentales; se eliminó el precipitado por centrifugación y el sobrenadante se concentró por filtración tangencial (ultrafiltración).

Al sobrenadante concentrado obtenido se le determinó el título de la toxina (Lf's), posteriormente dependiendo del título de toxina obtenido, se concentró o diluyó la toxina para ajustar la concentración a 80 ± 5 Lf's/mL y un volumen aproximado de 3000 mL y se volvió a determinar el Título de la Toxina (Lf's); para la destoxicación se adicionó formaldehído a una concentración final del 0.7% en solución de acuerdo a las recomendaciones de la OMS (2005)⁽⁴¹⁾, se ajustó el pH a 7.0 y se esterilizó la toxina diftérica por filtración. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Cantidad adicionada de formaldehído de acuerdo al volumen final de los lotes experimentales

| Lote | Volumen (mL) | Título de la Toxina (Lf's) | Tiempo de Floculación (Kf's) | Vol. De Formaldehído 0.7 % (mL) | Toxina Diftérica Prepurificada conc. de prot. |
|-----------|--------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------------|---|
| TD11EXP01 | 3000 | 78.12 | 2 | 21.00 | 0.00155 g/L |
| TD11EXP02 | 3125 | 83.3 | 2 | 21.87 | 0.00201 g/L |
| TD11EXP03 | 3125 | 83.3 | 3 | 21.87 | 0.00150 g/L |

Al realizar la determinación de proteínas por el método de BCA se observa que la mayor concentración de proteínas está dada por el medio de cultivo Müller & Miller y al prepurificar la Toxina disminuye considerablemente la concentración de proteínas, en la Tabla 6 se muestra la concentración de proteínas existentes en las diferentes etapas del proceso.

Tabla 6. Concentración de proteínas y concentración de toxina diftérica en el sobrenadante obtenido del cultivo de *C. diphtheriae* cepa PW8

| Lote | Medio de Cultivo Müller & Miller | Medio M&M+Toxina Diftérica | Toxina Diftérica Prepurificada |
|-----------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| TD11EXP01 | 0.01207 g/L | 0.01082 g/L | 0.00155 g/L |
| TD11EXP02 | 0.01705 g/L | 0.01505 g/L | 0.00201 g/L |
| TD11EXP03 | 0.01669 g/L | 0.01501 g/L | 0.00150 g/L |

(Determinación por el método de BCA)

Posteriormente los lotes de toxina diftérica se introdujeron a un cuarto estufa a una temperatura de 36 ± 1 °C por 42 días (6 semanas) con agitación diaria en forma manual, durante este tiempo de destoxificación se tomaron muestras cada semana a las cuales se les realizó la prueba de toxicidad residual en cobayo, descrita en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM 2011). En la Tabla 7, se muestran los resultados del proceso de destoxificación de los tres lotes experimentales a nivel garrafón y se compararon con tres lotes experimentales fabricados de acuerdo al proceso actual de producción, se puede observar que dos lotes (TD11EXP01 y TD11EXP02) no cumplen con la prueba de toxicidad residual así como un lote con el proceso de producción actual (TD11TM03).

Tabla 7. Destoxificación de la toxina diftérica en cuarto estufa de condiciones estacionarias a 37 ± 1 °C

| Lote | Semana | | | | | |
|-----------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| TD11EXP01 | Tox | Tox | Tox | Tox | Tox | Tox |
| TD11EXP02 | Tox | Tox | Tox | Tox | Tox | Tox |
| TD11EXP03 | Tox | Tox | Tox | Tox | Tox | Des |
| TD11TM01 | Tox | Tox | Tox | Tox | Tox | Des |
| TD11TM02 | Tox | Tox | Tox | Tox | Tox | Des |
| TD11TM03 | Tox | Tox | Tox | Tox | Tox | Tox |

(Tox=tóxica, Des=destoxificada)

Cálculo de rendimiento:

Se calcularon los rendimientos de los tres lotes experimentales mediante los datos obtenidos de los Lf's totales de los títulos de la toxina antes y después de su proceso de purificación y destoxificación, los valores se sustituyen en la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = (\text{Lf's}_{\text{T}} \text{ finales} / \text{Lf's}_{\text{T}} \text{ iniciales}) * 100 \dots;$$

en los cuales se obtienen rendimientos del 83% al 91.5%. En la Tabla 8 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 8. Rendimientos obtenidos de la prepurificación de toxoide diftérico con sulfato de amonio en tres lotes experimentales.

| Lote | Volumen Inicial (mL) | Título de la Toxina (Lf's/mL) | Volumen Final (mL) | Título de la Toxina (Lf's/mL) | Rendimiento (%) |
|-----------|----------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|-----------------|
| TD11EXP01 | 8500 | 30.48 | 3000 | 78.12 | 90.45 |
| TD11EXP02 | 8650 | 32.89 | 3125 | 83.3 | 91.49 |
| TD11EXP03 | 8700 | 35.71 | 3125 | 83.3 | 83.78 |

Los rendimientos obtenidos bajo el pretratamiento de la Toxina son superiores al 80%, los rendimientos de los lotes de producción históricos del laboratorio muestran rendimiento,

después de la purificación con sulfato de amonio, de 80-85%, esto muestra que se puede aplicar el pretratamiento con sulfato de amonio y obtener rendimientos de producción similares a los históricos, sin embargo la presencia de la toxicidad en dos de los lotes no permite modificar el proceso.

6.8 Prueba de funcionalidad del Cloruro de Manganeso (II) tetrahidratado marca Sigma

Se produjeron 6 lotes experimentales a nivel matraz para evaluar la funcionalidad del reactivo marca Sigma los resultados se presentan en la Tabla 9, en esta se muestran los títulos de Toxina obtenidos a nivel matraz con medio de Müller & Miller; los títulos de la toxina oscilan entre 50-62.5 Lf's/mL, en la misma tabla se presentan los títulos de producción de toxina a nivel matraz con el reactivo Cloruro de Manganeso (II) tetrahidratado marca Merck que se emplea en la formulación del medio de cultivo actual.

Tabla 9. Título de Toxina Diftérica a nivel matraz con Medio de Müller & Miller formulado con Cloruro de Manganeso (II) tetrahidratado marca Sigma comparado con lotes de producción históricos

| Lote Experimental | Título de la Toxina Diftérica (Lf's/mL) | Lote de producción (histórico) | Título de la Toxina Diftérica (Lf's/mL) |
|-------------------|---|--------------------------------|---|
| MATRAZEXP01 | 50.0 | L-TD-01 | 41.6 |
| MATRAZEXP02 | 62.5 | L-TD-02 | 50 |
| MATRAZEXP03 | 62.5 | L-TD-03 | 60 |
| MATRAZEXP04 | 52.0 | L-TD-04 | 52.5 |
| MATRAZEXP05 | 48.0 | L-TD-05 | 48 |
| MATRAZEXP06 | 65.0 | L-TD-06 | 65 |

7. Discusión

7.1 Abasto de la cepa *Corynebacterium diphtheriae* PW-8 del cultivo maestro CMH-CD2-LI para producción experimental de toxina diftérica.

La producción del abasto se llevó a cabo con base al sistema de lote semilla utilizado en Birmex, los cultivos de lote semilla de trabajo o experimentales mantienen las características que los cultivos de la cepa de la cual fue derivado el lote semilla original, con un número de pases estandarizado y pruebas de pureza que se le realizan a los abastos para cualquier lote que se produzca, lo cual permite obtener reproducibilidad en el proceso.

7.2 Propagación de la cepa *Corynebacterium diphtheriae* PW-8

Actualmente los métodos de producción de Toxina Diftérica en Birmex no incluyen la determinación de la presencia de Toxina en la propagación de la cepa a nivel de tubo con medio de cultivo Michigan, lo cual se consideró relevante, ya que se debe asegurar que la cepa este activa para la producción de toxina diftérica; al iniciar con una cepa activa puede generar mejores rendimientos durante todo el proceso, esta activación se puede visualizar por medio de la determinación del título de la toxina diftérica. Por ello se desarrolló en esta investigación la determinación de Lf's/mL.

Los resultados resumidos en la tabla 1 y las gráficas 1 y 2, muestran que a nivel de cultivo en tubo con medio de Michigan la cepa de *C. diphtheriae* se encuentra activa para la producción de toxina diftérica y que los números de pases óptimos para el inicio de la producción de un lote de toxina diftérica se encuentran entre los pases 4, 5 y 6, debido a que es en donde se tiene una mayor producción de toxina y una mayor concentración celular.

7.3 Determinación y valoración de la concentración de Hierro (Fe⁺⁺) óptima para la producción de la toxina diftérica

Righelato R.⁽³³⁾ realizó estudios sobre las concentraciones de Fe⁺⁺ en el medio de cultivo a nivel de matraz para favorecer la producción de toxina diftérica. Estableció que la concentración óptima de este oligoelemento es de 50-150 µg/L, produciendo un título de Toxina de 50-60 Lf's /mL en 1.2 L de medio de cultivo. Los medios de cultivo fabricados en Birmex tienen una concentración de Fe⁺⁺ que oscila entre 500 - 1000 µg/L, estas concentraciones de Fe⁺⁺ favorecen la producción de Toxina en Birmex ya que la producción en 500 mL de medio Müller & Miller produjo entre 48-65 Lf's/mL de toxina diftérica. Sin embargo, las concentraciones óptimas de Fe⁺⁺ para una mayor producción de toxina diftérica encontradas experimentalmente en este trabajo fueron de 500-700 µg/L.

De acuerdo a lo anteriormente descrito se espera que al escalar la producción experimental a nivel fermentador de 50 L se observe el mismo comportamiento con respecto a la producción de toxina y así a su vez hasta llegar a un fermentador de 1500 L.

Las concentraciones de Fe⁺⁺ encontradas en el medio de cultivo pudiesen variar de acuerdo a la sensibilidad de la prueba ya que las determinaciones realizadas en este trabajo se llevaron a cabo con un Kit (Kit Hach 2007) que es un método de comparación visual con un patrón de color, debido a ello, es de considerar realizar otras pruebas con mayor sensibilidad para la determinación de Fe⁺⁺ en el medio de cultivo Müller & Miller.

De acuerdo con Algecira ⁽¹⁾ otro factor por el cual se pudiesen obtener altos títulos es la presencia de Oxígeno Disuelto (OD) en el medio de Cultivo a nivel matraz. La agitación de las incubadoras estimula la oxigenación pero debido a que no es un cultivo totalmente controlado a este nivel, no se realizaron mediciones de OD. Se propone emplear el sistema computarizado del fermentador BE-NLFL-16 con capacidad de producir 16 litros de cultivo en ambiente controlado (Agitación, OD, pH, presión, temperatura).

7.4 Escalamiento a nivel Garrafón

Los datos resaltados en color amarillo pertenecientes a la Tabla 3 (18-24 horas de incubación) refieren a los puntos que se emplearían en el escalamiento a nivel Fermentador. Se debe a que, de acuerdo a la biología del microorganismo, a partir de las 18 h el cultivo comienza la producción de toxina en función del comportamiento mostrado por las variables monitoreadas además de estar con crecimiento en fase logarítmica.

El sistema de agitación de las incubadoras, a nivel garrafón, afecta la presencia de Oxígeno Disuelto por lo que se promueve (con agitación) o inhibe (sin agitación o variaciones en ella) el crecimiento del cultivo bacteriano.

La implementación de la cinética de crecimiento de *C. diphtheriae* Cepa PW-8 monitoreando los parámetros de pH, D.O. y Límite de Floculación permite determinar el tiempo óptimo de propagación del cultivo celular, tomando en cuenta que el organismo se encuentra en la fase logarítmica de crecimiento. Esta fase es en donde se produce la mayor cantidad de biomasa y el microorganismo puede ser empleado para realizar la transferencia a fermentador de 75 L, este punto se encuentra entre las 18-24 horas de incubación.

A partir de las 27 horas de incubación y hasta las 39 horas se produce la mayor cantidad de toxina diftérica ya que la toxina, por ser un metabolito secundario, se produce en mayores cantidades en la fase estacionaria.

En las cinéticas de crecimiento ilustradas en las Gráficas 4, 5 y 6 se puede observar que hay mayor producción de toxina en aquellos lotes en donde se les agregó el subcultivo de nivel matraz con mayores valores de Lf's y absorbancia generando así la recomendación de ocupar aquellos subcultivos con valores por arriba de los 50 Lf's y 2.5 de absorbancia.

7.5 Prepurificación de la Toxina Diftérica

Al realizar la prueba de Toxicidad Residual los resultados obtenidos muestran que después del proceso de destoxificación se mantienen tres lotes tóxicos y tres cumplen con la prueba (Tabla 7), dos de ellos realizados con el proceso de prepurificación de la toxina y uno de ellos con el proceso de producción actual. De acuerdo con la FEUM la prueba de Toxicidad Residual se realiza después de la destoxificación de la Toxina-Toxoide, esta prueba se realiza en una etapa del proceso donde el producto no se encuentra purificado por lo que sería viable analizar el proceso de destoxificación y buscar la validación del proceso.

Para Birmex, la Organización Mundial de la Salud y los productores de este biológico en el mundo, la destoxificación es un proceso muy importante que debe ser rigurosamente controlado. Por sus características puede presentar toxicidad y/o ocurrir reversión del toxoide hacia toxina, por ello establece en sus requisitos la prueba de Toxicidad Específica para verificar la eficiencia de la destoxificación (no presencia de toxina).

La prepurificación de la Toxina Diftérica muestra que el rendimiento es equivalente al obtenido con el proceso de purificación con sulfato de amonio del Toxoide Diftérico; los lotes de Toxoide Diftérico producido en Birmex muestran rendimientos después de la purificación con este reactivo de 80-85%. De acuerdo con Uchida J ⁽³⁹⁾, al realizar la prepurificación se eliminan proteínas no específicas suspendidas en el producto lo cual permite obtener una toxina con mayor grado de pureza y rendimientos del 83 al 91.5% para su posterior destoxificación, sin embargo se tiene que analizar con mayor profundidad la prepurificación realizada debido a los resultados obtenidos después de la destoxificación y sería conveniente realizar otras pruebas en las cuales se pueda incluir la adición de glicina como estabilizador de la molécula o disminuir el porcentaje de tratamiento con sulfato de amonio para la prepurificación.

7.6 Prueba de funcionalidad del Cloruro de Manganeso (II) tetrahidratado marca Sigma

La producción de la Toxina Diftérica se lleva a cabo con Cloruro de Manganeso (II) tetrahidratado marca Merck, sin embargo se decidió probar otra marca de reactivo pero con las mismas características (marca Sigma); el reactivo marca Sigma no interfirió con la producción de Toxina Diftérica en el Medio Müller & Miller, la producción de Toxina mantiene títulos similares a nivel de matraz, por lo que se empleó este reactivo para la producción de los lotes experimentales. Estos resultados nos permiten tener la marca Sigma como una marca alternativa para su uso en la producción de lotes de toxina diftérica ya que se demuestra en este trabajo el que Cloruro de Manganeso (II) tetrahidratado no es un reactivo esencial para la producción y puede emplearse esta marca como alternativa, de este modo se garantizaría la disponibilidad del reactivo sin alterar la formulación original de los medios de cultivo y a su vez de la producción a granel de la toxina.

8. Conclusiones

Demostrada la presencia de Toxina Diftérica en el proceso de propagación de la cepa *C. diphtheriae* en medio de cultivo Michigan es necesario que durante la fabricación de lotes de producción se determine la presencia de toxina diftérica con la finalidad de asegurar que la cepa este activa, además, iniciar estudios para la estandarización del inóculo ya que se aseguraría que los subcultivos mantengan las mismas características.

Se debe efectuar las transferencias de *C. diphtheriae* contenido en medio de cultivo Michigan entre los pases 4 a 6 a matraz con medio de cultivo Müller & Miller, manteniendo el mismo número de pase, ya que se obtiene mayor producción de toxina diftérica y se encuentra en el medio una mayor concentración celular.

La concentración de Fe++ que debe contener el medio Müller & Miller para la óptima producción de toxina debe oscilar entre 500-700 µg/L.

Realizar la transferencia del cultivo celular a nivel fermentador de 75 L entre las 18 y 24 horas de incubación ya que el microorganismo se encuentra en fase logarítmica de desarrollo y realizar cinéticas de crecimiento a nivel fermentador de 75 L para determinar el tiempo óptimo de transferencia a fermentador de 1500 L.

Replantear la prepurificación de la toxina diftérica antes de la destoxificación ya que aunque se demostró que los rendimientos obtenidos en la fase experimental son equivalentes a los obtenidos en la purificación con sulfato de amonio al toxoide diftérico el producto se mantiene tóxico y el objetivo de la prepurificación es mejorar la calidad del producto que no se logró conseguir en este trabajo.

Validar el proceso de destoxificación de la toxina diftérica para disminuir los riesgos de rechazo de los lotes a granel.

En el desarrollo de este trabajo se probó la funcionalidad del Cloruro de Magnesio (II) tetrahidratado marca Sigma lo cual se concluye que al no ser un componente esencial puede ser una marca de reactivo alternativa para la producción de la toxina diftérica ya que mantiene las mismas características y no interfiere con la producción de toxina diftérica.

9. Perspectivas

Debido a la búsqueda continua de mejora en procesos de producción y calidad en Birmex, se recomienda:

Analizar el procedimiento de destoxificación, ya que se obtuvieron tres lotes tóxicos y tres atóxicos, uno de ellos con el proceso actual de producción y el restante con el tratamiento experimental, la OMS establece evaluar la destoxificación con la Prueba de Toxicidad Específica, debido a ello es necesario someter los lotes a una prueba de toxicidad específica, así se conseguirá obtener un enfoque distinto y se podrá valorar la eficiencia de la destoxificación.



Escalar la producción experimental a nivel fermentador y realizar los análisis propuestos en este trabajo para seguir evaluando la producción de toxina en sistemas computarizados con variables controladas a diferentes escalas.

10. Implicaciones Bioéticas

El material biológico es de uso exclusivo para las pruebas de control señaladas por la Organización Mundial de La Salud (OMS) ⁽⁴⁷⁾, y en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). ⁽⁴³⁾

11. Implicaciones de Bioseguridad

El manejo del material biológico y el desarrollo experimental se llevó a cabo bajo las Normas de Bioseguridad especificadas para un Laboratorio de Nivel 2 de Bioseguridad, los desechos biológicos y químicos generados del proceso experimental fueron tratados como Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) y Corrosivo Reactivo Explosivo Tóxico e Inflamable (CRETI) de acuerdo a las siguientes regulaciones:

- Ley General para el Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA)⁽⁴⁶⁾
- Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR)⁽⁴⁵⁾
- Reglamento de Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (RLGPGR)⁽⁴⁴⁾
- NOM-087-SEMARNAT-SSA/20002
- NOM-052-SEMARNAT/2005

12. Impactos y perspectivas

El desarrollo de este trabajo de investigación repercute en el ahorro de recursos financieros y humanos, así como la mejora de la calidad del producto, obteniéndose de esta forma un Toxoide Diftérico que cumple con las especificaciones de calidad de acuerdo a los estándares establecidos por organismos nacionales e internacionales, para su inclusión en la formulación de vacunas de Td y DPT utilizadas en el esquema nacional de vacunación. Disminuye rechazos y retrabajos del producto lo que se traduce en menor costo, mejor calidad y disponibilidad del producto

13. Referencias Bibliográficas

1. Algecira N et al, 2000, Evaluación de la fermentación en la producción de toxina diftérica, Microbiología Msc, Instituto Nacional de Salud, pp 10
2. Arístegui J, 2006, Vacunaciones en el niño, Junta de Andalucía Consejería de Salud, pp 316-356
3. Asociación Española de Pediatría, "Vacunas", Comité Asesor de Vacunas y Asociación Española de Pediatría, Abril 2005, pp: 1-11
4. Barksdale L, 1970, "Corynebacterium diphtheriae and Its Relatives", Bacteriological Reviews, American Society for Microbiology, pp. 378-422
5. Bloomfield A, 1956. A bibliography of internal medicine: Diphtheria. Stanford Medical Bulletin; 14 (4): 205-220.
6. Brock T, Madigan. 1993. Microbiología 6ta. Edición. Edit. Prentice-Hall, México.
7. Carrada B, 1987, "Epidemiología de la difteria en México: investigación preliminar", Revista Mexicana de Pediatría, 54(5): 185-6, 188-9, 192, passim, sept-oct, ilustr, Tab.
8. Choe S, Bennett MJ, Fujii G, Curmi PMG, Kantardjieff KA, Collier RJ, Eisenberg D. 1992. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 357:216-222.
9. Collier RJ. 1975. Diphtheria toxin: Mode of action and structure. *Bacteriol Rev* 39:54-85
10. Drazin R, Kandel J, Collier RJ. 1971. Attack by trypsin at a specific site within the intact toxin molecule. *J Biol Chem* 246:1504-1510
11. English P. 1985. Diphtheria and theories of infectious disease. *Pediatrics*; 76 (1): 1-9.
12. Freeman VJ. 1951. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol* 61:675-688.
13. García F, 1996, Avances sobre los mecanismos de acción de exotoxinas bacterianas que actúan intracelularmente, Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, San José Costa Rica, pp 85-96
14. Groman N, Cianciotto N, Bjorn M, Rabin M, 1983, Detection and Expression of DNA Homologous to the tox Gene in Nontoxinogenic Isolates of *Corynebacterium diphtheria*, INFECTION AND IMMUNITY, Vol. 42, No. 1, p. 48-56
15. Grupo de Vigilancia y control de enfermedades transmisibles, 2009, "Protocolo de vigilancia de difteria", Vigilancia y Control en salud pública, Bogotá Colombia, int-020025030, pp 18

16. Greenfield L, Bjorn MJ, Horn G, Fong D, Buck GA, Collier RJ, Kaplan carried by corynebacteriophage 8. *Proc Natl Acad Sci LISA* 80:6853.
17. Hall A et al, 2010, Novel *C. diphtheria* in domestic cats, *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 16, No. 4, April 2010
18. J.R. de Juanes Pardo, M^a P. Arrazola Martínez, 2004, “Vacunación frente a difteria, Tétanos y tosferina”, Servicio de Medicina Preventiva, Hospital 12 de Octubre. Madrid, *Emergencias*; 16:S54-S58.
19. Karzon D., Edwards K. 1988. Diphtheria outbreaks in immunized population. *N Engl J Med*; 318:41-43
20. Lampidis T. and Barksdale L., 1970, Park-Williams Number 8 Strain of *Corynebacterium diphtheria*, *Journal of Bacteriology*, Jan. 1971, p. 77-85 Vol. 105, No.1
21. Macedo M. & Vola M., 2008, “Principales grupos de Bacilos Gram Positivos Aerobios”, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Uruguay, CEFA, pp 339-353
22. Management of the child with a serious infection or severe malnutrition. Guidelines for care at the first-referral level in developing countries. Ginebra, WHO, 2000 (WHO/FCH/CAH/001).
23. Martin A, 2000, “Vacuna contra la Difteria, Tosferina y Tétanos (DPT)”, Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría, Departamento de Pediatría. Servicio de Pediatría Médica Infecciosa. Hospital Universitario de Caracas, Vol. 63 Suplemento 3.
24. Ministerio de Salud, 2008, Antitoxina Diftérica, Centro de Atención Farmacéutica, Dirección General de Alimentos, Insumos y Drogas, Perú, pp 1-5
25. Morris RE, Gerstein AS, Bonventre PF, Saelinger CB. 1985. Receptor mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: Electron microscopic evaluation. *Infect Immunol* 50:721-727.
26. Ochoa F. et al, 2006, Reactogenicidad e inmunogenicidad de una nueva vacuna de toxoide tetánico y diftérico con concentración reducida en adolescentes cubanos, Instituto Finlay, La Habana Cuba, *VacciMonitor* 2006; Año 15 No. 2, pp 13-18
27. OMS, 2006, “Vacuna contra la Difteria”, Organización Mundial de la Salud, pp:1-8
28. OMS, 2006, Control de la difteria, la tosferina, el tétanos, la infección por *Haemophilus influenzae* tipo b y la hepatitis B, Guía Práctica, Publicación Científica y Técnica No. 604, pp 1-10
29. Pappenheimer M, 1977, “Diphtheria toxin”, Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge Massachusetts, *Ann. Rev. Biochem.* 1977. 46:69-94

30. Pineda V, 2007, Vacunas Disponibles. Difteria, Asociación Española de Pediatría, pp 346-352
31. Ramos A, Elias P, Barrucand I. 1984. The protective effect of carnitine in human diphtheric myocarditis. *Pediatr Res*; 18: 815-819
32. Righelato R & Hemert P, 1969, "Growth and Toxin Synthesis in Batch and Chemostat Cultures of *Corynebacterium diphtheriae*", *J. gen. Microbiol*, Netherlands, 58, 403-410
33. Righelato R, 1969, "The distribution of Iron in Iron-deficient Toxin-synthesizing and in Excess-Iron Non-Toxin-synthesizing *Corynebacterium diphtheriae*", *J. gen. Microbiol*, Netherlands, 58, 411-419
34. Ruíz, J. et. al. 1994, Pasado y un nuevo concepto en la producción de biológicos en la Secretaría de Salud. México, Secretaría de Salud Gerencia General de Biológicos y Reactivos. p.28-30.
35. Sandvig K, Olsnes S. 1980. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J Cell Biol* 87:828-832
36. SSA, 2002, Manual de Procedimientos Técnicos de Vacunación, México, pp 290
37. Tuells J, 2006, La difteria, un camino a la suero terapia y las anatoxinas, *Revista Vacunas* 2006; 7(1): 43-46
38. Uchida T, Gill DM, Pappenheimer AM. 1971. Mutation in the structural gene for diphtheria toxin carried by temperate phage *P*. *Nature New Biol* 233:8-11.
39. Uchida T, 1973, Diphtheria Toxin and Related Proteins, *The Journal of Biological Chemistry, USA*, Vol. 248, No 11, pp 3838-3844
40. Van Ness BG, Howard JB, Bodley JW. 1980. ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. *JBiol Chem* 255:10710-10716.
41. Vite C, Wharton M. 1998. Diphtheria in the former Soviet Union: Reemergence of a pandemic disease. *Emerg Infect Dis*; 4: 539-550
42. WHO, 2005, *Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines*, Technical Reports Series of the WHO, N° 927, Anexo 5. N° 800, 1990, Anexo 2; *Recommendations for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines* (Modified en 2003).
43. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), 2011, Décima Edición, Vol. II, México 2011
44. Reglamento de la Ley de General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos, 30 de Noviembre de 2006, Diario Oficial, Séptima Sección, México



45. Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos, Nueva Ley Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 8 de Octubre de 2003, texto vigente, Última Reforma Publicada DOF 19-06-2007, Estados Unidos Mexicanos.
46. Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, Nueva ley Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de Enero de 1988, texto vigente, Última Reforma Publicada DOF 06-04-2010; Estados Unidos Mexicanos
47. World Health Organization, Technical Report Series, No 800, 1990, Anexo 2