



Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria



Producción y control de tuberculina bovina y aviar

Derivado Proteico Purificado (DPP)



www.senasa.gov.ar

Presidente de la Nación

Dr. Néstor Kirchner

Ministro de Economía y Producción

Dra. Felisa Miceli

Secretario de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

Dr. Javier de Urquiza

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

Presidente

Dr. Jorge Amaya

Vicepresidente

Ing. Agr. Carlos Casamiquela

Directora de Laboratorio y Control Técnico

Lic. Verónica Torres Leedham

Coordinador de Bacteriología, Patología, Parasitología y Zoonosis

Dr. Ramón Sanguinetti



Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria



Producción y control de tuberculina bovina y aviar

Derivado Proteico Purificado (DPP)

Dra. Amelia Bernardelli



Coordinación de Bacteriología, Patología, Parasitología y Zoonosis
Dirección de Laboratorio y Control Técnico

Ciudad de Buenos Aires
Abril de 2007

Indice

I. Introducción	9
Legislación del Senasa (Producción y control de tuberculinas)	11
II. Materiales	14
A. Equipos:	14
B. Materiales:	14
C. Drogas y medios de cultivo:	15
D. Reactivos y soluciones:	16
Tuberculina: definición descriptiva	17
Naturaleza de las tuberculinas	17
Caracterización antigénica	18
1. Tuberculina vieja de Koch	18
2. Tuberculina Vieja de Koch	18
3. Tuberculina Sintética	19
Potencia de las tuberculinas	20
III. Producción y Control de Tuberculinas.	
Derivado Proteico Purificado (DPP)	21
Procedimiento de elaboración	21
A. Conservación de las cepas	21
B. Preparación del cultivo de semilla:	22
C. Producción de la serie:	23
Cálculos para dilución del concentrado	24
Controles de Calidad	25
1. Determinación de la potencia biológica	25
Estándar Internacional	25
Procedimiento:	25
Diluciones de la tuberculina DPP bovina:	25
Diluciones de la tuberculina D PP Aviar:	26
Ensayo de las tuberculinas de referencia y en prueba	26
Distribución al azar	26
Diagrama de plantilla plástica destinada a la lectura de la prueba de potencia	27
Prueba de potencia - Tuberculinas - Dilab - Senasa	27
Cálculo de la potencia biológica	28
2. Esterilidad	31
3. Ausencia de gérmenes	31

4. Control de toxicidad	31
5. pH	31
6. Control químico	31
Método del biuret (modificado):	32
Método semi-micro de Kjeldahl	33
Método:	33
7. Contenido de fenol y de otros agentes conservadores	37
Técnica	37
8. Coloración de las tuberculinas	37
9. Conservación	37
10. Plazo de validez	37
Controles de calidad	38
Folleto de tuberculina bovina	39
Protocolos de Producción	43
Rótulo	49
IV. Bioseguridad en laboratorios microbiológicos	50
A. Prácticas Microbiológicas Estándar	52
B. Prácticas Especiales	52
C. Equipo de Seguridad (Barreras primarias)	55
D. Instalaciones de Laboratorio (Barreras secundarias)	56
Información requerida para acceder a la seguridad de los biológicos veterinarios	57
1. Información básica del producto:	57
2. Manufactura:	57
3. Aseguramiento de la calidad durante la producción	57
4. Control de los tests del producto terminado	57
5. Estabilidad/Plazos de vencimiento	57
V. Bibliografía	58
VI. ANEXO	62
Reactivo del biuret	65
Medio de caldo de carne glicerinado	65
Nitrógeno estándar	67
Mezcla catalítica:	67
Indicador de Conway:	67
Solución de ácido bórico:	67
Solución estándar de ácido sulfúrico:	67
Conservación de microorganismos	68
Fotos	68

El objetivo de este Manual es dar a conocer el compendio de las técnicas empleadas por la Dirección de Laboratorios y Control Técnico (DILAB).

Los procedimientos desarrollados corresponden a métodos de Referencia internacionales adoptados por nuestro Laboratorio y utilizados en su trabajo cotidiano.

Por lo tanto se aclara que los mismos no son autoría de las personas que en cada caso han explicitado y desarrollado las técnicas de uso en sus áreas respectivas y que algunas de ellas han sido sujetas a modificaciones para una mejor implementación.

Versión 2.0.
Elaborado y redactado por:
Dra. Amelia Bernardelli

I. Introducción

El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), en consideración al interés regional del gobierno y al demostrado por los ganaderos, creó la Comisión Nacional de las Luchas contra la Brucelosis y la Tuberculosis (Resolución 831/93 del 23 de agosto), con participación multisectorial e interdisciplinaria para orientar las acciones de control y erradicación de estas enfermedades.

La Comisión Técnica de Tuberculosis, apoyó la realización de un seminario – taller con el propósito de identificar alternativas de intervención para la lucha contra la tuberculosis bovina que pudiera tener aplicación en la República Argentina. La información analizada y el examen de situación efectuado en dicho evento pusieron en evidencia la necesidad de establecer un Plan de lucha para lograr el control y la erradicación de la tuberculosis bovina por los perjuicios ocasionados a la salud pública, la economía pecuaria y ante la inminente integración de políticas sanitarias de las Américas.

La tuberculosis bovina se evidencia como un problema de todos, por lo que se necesita el compromiso de cada uno de los sectores involucrados, sin lo cual las metas para el plan de lucha no podrán alcanzarse. Quedó aceptado que las normas y procedimientos técnicos a ser tenidos en cuenta por la aplicación de un Programa de Control y Erradicación están lo suficientemente ajustadas para su implementación. Se recomendó que el Plan a elaborar brindara un marco de normatización centralizada y ejecución descentralizada. Por otra parte, la implementación de un emprendimiento de esta naturaleza implica asumir roles de responsabilidad por parte de los diversos sectores involucrados, y cada uno de ellos aceptó fijar la proporcionalidad del aporte económico-financiero que le corresponda para conseguir el bien común.

Con estos antecedentes inmediatos y con el consenso de todos los sectores que respondieron a la convocatoria, concientizados de la necesidad de contar con un Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina, se elaboró la propuesta de acción para todo el país.

Los programas de erradicación de la tuberculosis bovina y la pasteurización obligatoria de la leche, han reducido notablemente la incidencia de la tuberculosis humana provocada por el *Mycobacterium bovis*.

En relación al ganado, la tuberculosis llega a ser un problema grave en rebaños lecheros.

Es por ello que la tuberculinización y el sacrificio de los animales reactivos siguen siendo los elementos fundamentales en las campañas de control y erradicación.

Los requerimientos comerciales solicitan alimentos con sanidad certificada de origen, por lo tanto es necesario lograr calidad en el inicio de los mismos.

Los países organizan estos controles para insertarse en los grupos internacionales y la República Argentina no ha permanecido ajena a esta actividad, ha implantado desde el año 1993: el Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina.

Legislación del Senasa (Producción y control de tuberculinas)

Referencias: DE: Decreto Poder Ejecutivo; RE: Resolución Secretaría de Estado; RS: Resolución Senasa; RX: Resolución ex - Secretaría de Agricultura y Ganadería; RY: Resolución ex - Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca; RZ: Resolución ex – Senasa.

Resolución N° 001 (3 de enero de 1983).

Establece que todas las series ó partidas de tuberculinas producidas por la industria privada quedarán sujetas a control permanente y periódico por parte de la GELAB-SENASA.

Resolución N° 274 (9 de junio de 1983) RX 274/83.

BIOLOGICO-TUBERCULINA-ELABORACION

Fija las condiciones que deben tener los establecimientos elaboradores de PPD (tuberculina) y establece los requisitos para la aprobación y controles de series

Resolución N°406 (14 de agosto de 1984) RX 406/84

ENFERMEDAD-TUBERCULOSIS-TUBERCULINA-DIAGNOSTICO

Establece pruebas diagnósticas oficiales de Tuberculosis animal.

Resolución N°695 (2 de octubre de 1987) RY 695/87

ENFERMEDAD-BRUCELOSIS-TUBERCULOSIS-DIAGNOSTICO

Se prohíbe la elaboración, uso y comercialización de toda otra tuberculina que no sea el Derivado Proteico Purificado (D.P.P.).

Resolución Ex SENASA N° 831 (23 de agosto de 1993) RZ 831/93

ENFERMEDAD-BRUCELOSIS-TUBERCULOSIS-COMISION

Creación de la Comisión Nacional de Lucha contra la Brucelosis y Tuberculosis. Representación de todos los sectores comprendidos con el agro. Reglamento interno.

Resolución N° 1287 (19 de noviembre de 1993) RZ 1287/93

IMPLANTASE EL PROGRAMA DE CONTROL Y ERRADICACION DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

Pone en marcha el programa de control y erradicación de la Tuberculosis
Fija las normas y procedimientos a los cuales deben ajustarse los establecimientos para ser incluidos en el plan.

Resolución N°259 (12 de mayo de 1995) RZ 259/95

ENFERMEDAD-TUBERCULOSIS-BRUCELOSIS-LEUCOSIS-PROFESIONAL-REGISTRO

Regula la acreditación de médicos veterinarios privados a través de cursos de capacitación para realizar tareas de vacunación, tuberculinización y saneamiento.

Resolución N°217 (7 de abril de 1995) RZ 217/95

LABORATORIOS-RED-REGISTRO

Establece las condiciones de registro, autorización y permanencia de laboratorios privados autorizados para emitir resultados con validez oficial.

Resolución Ex SENASA N°205 (17 de abril de 1996) RZ 205/96

BIOLOGICO-TUBERCULINA-PATRON

Modifica la Resolución N°279/83 en relación al Patrón de uso y cantidad de proteína que deben contener las series de tuberculina.

Resolución N° 115/99 (1 de marzo de 1999) RE 115/99

ENFERMEDAD-BRUCELOSIS-TUBERCULOSIS-PLAN SANITARIO- PLAN NACIONAL

Aprueba el Plan Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis y Tuberculosis. Obligatoriedad de vacunación y movimiento de hacienda.

Resolución N° 189/99 (23 de junio de 1999) RE 189/99

ENFERMEDAD-BRUCELOSIS-TUBERCULOSIS-COMISION

Crea la Comisión de Lucha contra la Brucelosis y Tuberculosis.

Resolución SENASA N° 1540 (25 de septiembre 2000) RS 1540/00

BOVINO-TUBERCULOSIS-INMUNOGENO-TUBERCULINA-CONTROL

Aprobar los procedimientos de aprobación y control de series de tuberculinas PPD (Derivado Proteico Purificado).

Resolución SENASA N°192 (4 de marzo 2002) RS 192/02

CONTROL SANITARIO-ANIMAL EN PIE-EXPOSICION RURAL-PALERMO- DEROGACION

Fija los requisitos de los establecimientos y animales para ingresar a la exposición de Palermo.

Resolución SENASA N°617 (18 de julio de 2002) RS 617/02

PRODUCTO FITOSANITARIO-LABORATORIO-BIOTERIO-HABILITACION

Requisitos y condiciones para habilitar bioterios, ensayos de productos, informes de campo, informes analíticos.

Resolución SENASA N°55 (24 de abril de 2003) RS 55/03

SENASA-LABORATORIO DE REFERENCIA-MISION –VISION-POLITICA DE LA CALIDAD

Aprobar la misión,visión y política de calidad que regirán las actividades de la Dirección de Laboratorios y Control Técnico, Laboratorio de Referencia del SENASA.

Resolución SENASA N°200 (19 de abril de 2006) R 200/06

PRODUCTO BIOLOGICO-EVALUACION TECNICA DILAB

Requisitos para evaluaciones técnicas experimentales para productos biológicos en desarrollo.

II. Materiales

A. Equipos:

- *Estufa (37°C).*
- *Heladera (+5°C).*
- *Peachímetro Oakton pH/ mV /°C meter-510 Series pH/Ion 510 (Entech Instruments ISO 9001)*
- *Espectrofotómetro Perkin Elmer, Lambda 25 UV/VIS anexo con Registro Computación DELL Optiplex 745-Impresora Epson Stylus C87 Plus*
- *Soporte tipo Seitz, para placa filtrante, diámetro 14 cm y 30 cm.*
- *Recipiente de acero inoxidable para utilizar en filtración.*
- *Compresor "AT".*
- *Freezer (-70°C) "Cindy" H 15.*
- *Autoclave.*
- *Centrífuga Avanti J-26XP-Beckman Coulter™*
- *Coagulador de medios de cultivo.*
- *Máquina afeitadora eléctrica Oster-*
- *Agitador magnético "Precytec" Modelo AG.*
- *Balanza "Mettler" PN 1210.*
- *Balanza "Mettler" AT 261 Delta Range*
- *Microscopio binocular Leica DMLS-Objetivo 100 X/125Oil*
- *Cabina de bioseguridad con filtro HEPA.*
- *Horno Tipo Pasteur "Rosmar" Modelo OHRI N° 41777.*
- *Estufa de cultivo de mesa "Ionomex" N° 00445.*
- *Computadora HP 7540 Hewlett Packard*
- *Impresora Laserjet 4050N Hewlett Packard*

B. Materiales:

- *Placas filtrantes clarificantes K2 ó similar, diámetro 14 cm.y 30 cm.*
- *Placas filtrantes esterilizantes EKS ó similar, diámetro 14 cm y 30 cm.*
- *Tubos a rosca, diámetro 1,5 cm, largo 16 cm.*
- *Fascos para diluciones por 1000 mL.*
- *Erlenmeyer por 250 mL.*
- *Matraces aforados por 500 mL, 250 mL, 100 mL y 50 mL.*
- *Espátulas metálicas.*
- *Asa metálica espiral con mango de Kolbe.*
- *Frasco de vidrio borosilicato base rectangular, capacidad 2000 mL.*

- *Tamices de malla metálica fina de 180 u de apertura.*
- *Frasco de vidrio borosilicato, capacidad 20.000 mL.*
- *Frasco de vidrio borosilicato, capacidad 9.000 mL.*
- *Frasco de vidrio borosilicato, capacidad 6.000 mL.*
- *Varillas indicadoras de pH rango 0 a 14.*
- *Pipetas: 5 mL, de un solo aforo.*
- *Pipetas: 1 mL, de un solo aforo.*
- *Cobayos albinos machos, de 400 a 600 gramos de peso.*
- *Jaulas para cobayos.*
- *Morteros de porcelana.*
- *Jeringas inyectables: 5 mL y aguja.*
- *Jeringa Becton-Dickinson: 1 mL y aguja.*
- *Placa de material transparente con circunferencias grabadas, de 6 mm hasta 26 mm de diámetro.*
- *Regla transparente graduada al milímetro.*
- *Marcador indeleble.*
- *Frascos de vidrio borosilicato por 5 mL, boca 20.*
- *Tapón de goma, tipo penicilina, boca 20.*
- *Cápsula de aluminio para boca 20.*
- *Rótulo.*
- *Folleto.*

C. Drogas y medios de cultivo:

- *Aceite de inmersión p.a.*
- *Acido sulfúrico p.a.*
- *Asparragina p.a.*
- *Azul de metileno p.a.*
- *Bicromato de potasio p.a.*
- *Carbonato de sodio anhidro p.a.*
- *Carbonato de sodio monohidratado p.a.*
- *Citrato de magnesio p.a.*
- *Citrato de sodio p.a.*
- *Citrato férrico p.a.*
- *Cloruro de calcio anhidro p.a.*
- *Cloruro de cobalto p.a.*
- *Cloruro de manganeso p.a.*
- *Cloruro de potasio p.a.*
- *Cloruro de sodio p.a.*
- *Dextrosa anhidra p.a.*
- *Dubos medio base.*

- *Extracto de carne*
- *Fenol p.a.*
- *Fosfato de potasio monobásico p.a.*
- *Fosfato dibásico de potasio anhidro p.a.*
- *Fosfato disódico dodecahidratado. p.a.*
- *Fucsina p.a.*
- *Glicerina p.a.*
- *Hidróxido de potasio p.a.*
- *Hidróxido de sodio p.a.*
- *May Grünwald solución.*
- *Middlebrook 7-H 11 Agar.*
- *Middlebrook 7H9 caldo.*
- *Nitrato de cobalto p.a.*
- *Nitrato de sodio p.a.*
- *Peptona p.a.*
- *Piedra pómez.*
- *Piruvato de sodio p.a.*
- *Púrpura de bromocresol.*
- *Rojo fenol p.a.*
- *Sulfato de cobre p.a.*
- *Sulfato de manganeso p.a.*
- *Tartrato de sodio y potasio p.a.*
- *Vaselina líquida p.a.*
- *Verde de Malaquita p.a.*

D. Reactivos y soluciones:

- *Acido tricloroacético al 4%.*
- *Acido tricloroacético al 40%.*
- *Buffer pH 7,38 para prueba de potencia.*
- *Cloruro de sodio al 5%.*
- *Medio de Dorset - Henley.*
- *Medio de Semilla.*
- *Medio de Stonebrink.*
- *Reactivo de Folin-Ciocalteus.*
- *Reactivo del biuret.*
- *Solución antibacteriana, 5 veces concentrada.*
- *Solución de Carbonato de sodio al 20%.*
- *Solución diluyente de Tuberculina D.P.P.*
- *Solución reguladora Molar / 3.*
- *Solvente alcalino.*
- *Verde de Malaquita al 2%.*

Tuberculina: definición descriptiva

Se entenderá por Derivado Proteico Purificado de tuberculina (DPP), una preparación obtenida a partir de productos solubles sometidos a tratamiento térmico del cultivo y la lisis de bacilos tuberculosos (*Mycobacterium bovis*) capaz de poner de manifiesto la hipersensibilidad tardía en un animal sensibilizado por microorganismos de la misma especie.

Las tuberculinas utilizadas en las técnicas diagnósticas son preparadas de acuerdo con los requerimientos de la Organización Mundial de la Salud en lo que respecta a: orígenes de los materiales, métodos de producción, precauciones, sustancias agregadas libres de contaminantes, identidad, seguridad, potencia, especificidad y ausencia de agentes sensibilizantes. El bioensayo para la actividad biológica tiene especial importancia, y la potencia deberá expresarse en Unidades Internacionales (IUs).

Naturaleza de las tuberculinas

El contenido de proteínas totales puede ser estimado mediante el método del Biuret, o bien, por determinación de nitrógeno, con el procedimiento de Kjeldahl.

El peso molecular de las proteínas es calculado por gradiente de densidad. Se estableció que para el Derivado Proteico Purificado de Seibert existen tres componentes con pesos moleculares que oscilan entre 8.000 y 12.000, hay publicaciones que indican en los D.P.P. preparados mediante precipitación con Sulfato de amonio, productos con peso molecular de 800.000.

Los carbohidratos están presentes en cantidades variables y usualmente uno ó más de estos polisacáridos, tienen un peso molecular que varía de 8.000 a 100.000.

Cuando la precipitación del D.P.P. se realiza con ácido Tricloroacético, se obtienen 25% de estos compuestos, mientras que si el material se precipita con Sulfato de amonio, los carbohidratos presentes no exceden del 3-6% del total.

Los ácidos nucleicos son el tercer componente de las tuberculinas D.P.P., que se encuentran en un rango del 1%, cuando se producen las precipitaciones con Sulfato de amonio y en valores del 26% para las que utilizan ácido Tricloroacético.

Caracterización antigénica

Los diferentes antígenos, se pueden caracterizar mediante técnicas de inmunolectroforesis, cromatografía e inmunodifusión. No ha sido demostrado que la actividad biológica sea debida a un solo componente antigénico específico, pero se conoce que distintas fracciones en varias especies tienen igual potencia biológica. Uno de los problemas ha sido comparar los resultados de varios estudios y ello es debido a que los métodos de separación utilizados, tales como: electroforesis por gel de poliacrilamida, ultrafiltración a través de membrana, etc., no producen la suficiente cantidad de material como para permitir una evaluación en los diferentes Centros de Investigación y realizar un estudio comparativo de los resultados.

Un método que ha dado buena resolución, ha sido el de inmunolectroforesis bidimensional.

Mientras que por inmunolectroforesis se han demostrado de 10 a 18 antígenos en extractos de células, mediante la técnica bidimensional ha sido posible separar entre 27 a 48 antígenos en las especies heterólogas y hasta 60 antígenos en sistemas homólogos.

Debido a que las micobacterias contienen componentes antigénicos comunes, existen respuestas cruzadas, es decir, producidas por sensibilizaciones a una micobacteria diferente a aquella con la que se preparó el D.P.P.. Así hay Micobacterias No Tuberculosas (MNT) que pueden originar en el ganado bovino, reacciones débiles a las tuberculinas bovina y aviar; son micobacterias denominadas escotocromógenas, de rápido desarrollo, correspondiendo a los Grupos IV y V de la clasificación de Runyon.

De acuerdo con los diferentes métodos de elaboración, existen distintos tipos de tuberculinas:

1. Tuberculina vieja de Koch

Método original
(Old Tuberculin: **O.T.**).

Los microorganismos crecían en infusión de caldo glicerinado durante 6 a 8 semanas, los cultivos se esterilizaban por calor y el filtrado del cultivo se concentraba hasta 10% del volumen original.

El filtrado final tenía una concentración de glicerina entre 40-50%.

2. Tuberculina Vieja de Koch

(Koch's Old Tuberculin: **K.O.T.**).

Los cultivos crecían en caldo de carne glicerinado.

Se utilizaban cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*.

Se incubaba durante 8 a 10 semanas.

Los cultivos se esterilizaban mediante autoclavado ó por vapor fluente.

Las células eran filtradas.

El filtrado se concentraba a 10% del volumen original.

Se clarificaba y filtraba.

Se agregaba fenol como conservador.

3. Tuberculina Sintética

(Heat Concentrate Synthetic Medium: **H. C. S. M.**).

El medio de cultivo tiene composición química definida; Dorset-Henley.

Provee aminoácidos por la asparragina que contiene, además de sales, dextrosa y glicerina.

Se utilizaban las cepas "C", "Dt" y "Pn" de *Mycobacterium tuberculosis*.

Incubación: 10 semanas.

Los cultivos se esterilizaban a vapor fluente durante 3 horas, se filtraba y se concentraba a 20% del volumen original, mediante calor.

Se produce desnaturalización e hidrólisis de las proteínas por calentamiento al concentrar el reactivo, dando como resultado una pérdida parcial de la actividad biológica. Con el fin de evitar estas acciones indeseables, se han realizado esfuerzos para la purificación. Los estudios iniciales de Seibert utilizaban Sulfato de amonio para la precipitación de la proteína, la que se concentraba y dializaba. Esta preparación fue llamada "Derivado Proteico Purificado" (Purified Protein Derivative: PPD), pero está lejos de ser una sustancia pura. En su composición se encuentran: proteínas, polipéptidos de distinto peso molecular, ácidos nucleicos y polisacáridos.

Las proteínas tienen un peso molecular de 10.000 a 20.000 con un valor máximo de 1.000.000. El pico máximo de actividad biológica aparece en sustancias de alto peso molecular de 60.000 a 125.000 especialmente en polipéptidos.

El Derivado Proteico Purificado es más específico, puede ser normalizado más fácilmente y con mayor exactitud.

Con el fin de que este reactivo biológico tenga todavía mayor sensibilidad, se han preparado hasta ahora solamente en forma experimental, numerosas fracciones.

Kuwabara purificó una proteína que se ha encontrado mil veces más activa que el PPD, este producto fue aislado mediante cromatografía por D.E.A.E. celulosa y Sephadex G200 y se obtuvo una fracción de peso molecular de 9.700.

M. Hall y C. Thoen han preparado componentes biológicamente activos, utilizando un detergente no iónico, Triton X-100, para solubilizar las célu-

las de la membrana micobacterial y los componentes de la pared celular y un inhibidor de las proteasas: Acido chaotrópico, en su forma de sal, para disminuir la degradación enzimática inducida de proteínas, durante la extracción.

Se propone asimismo, la extracción de componentes micobacterianos antes del autoclavado. Los autores hallaron respuestas similares a las producidas con el DPP bovino.

De acuerdo con el microorganismo utilizado se produce:

1. Tuberculina mamífera:
Mycobacterium tuberculosis cepas “C”, “Dt” y “Pn”.
2. Tuberculina bovina:
Mycobacterium bovis cepa “AN₅”.
3. Tuberculina aviar:
Mycobacterium avium cepa “D4 ER”.

Potencia de las tuberculinas

La medida de la actividad se conoce mediante el valor de la potencia biológica.

La Organización Mundial de la Salud ha recomendado que la potencia biológica de las tuberculinas, se debe expresar en términos de Unidades Internacionales, para que el ensayo biológico sea válido, en cualquier condición.

En los casos de tuberculinas de baja concentración, como las de uso humano, es necesario agregar un agente tensioactivo tal como Tween 80, debido a que pierden rápidamente su potencia, por absorción de las proteínas al vidrio.

1. Tuberculina Vieja de Koch:
Cada mililitro del Patrón Internacional contiene 90.000 U.I. (Unidades Internacionales).
2. PPD Mamífera:
Contiene: 100.000 U.I. por mililitro, con una concentración de proteína de 2 mg / mL.
3. PPD Bovina:
Contiene: 32.500 U.I. / mg / mL.
La concentración de proteína es de 1 mg / mL.
4. PPD Aviar:
Contiene: 25.000 U.I. por mililitro.
Concentración de proteína: 0,5 mg / mL.

secundarios, que no deben tener mas de CUATRO pases en cultivo del inóculo primario.

El inóculo secundario se utiliza para sembrar los cultivos de producción.

Ref.: Manual de las Pruebas de Diagnósticos de las Vacunas para los Animales Terrestres (mamíferos, aves y abejas) Quinta Edición, 2004, Capítulo 2.3.3. Tuberculosis bovina, pág.497.

Mantenimiento de los microorganismos

Las cepas no deben exceder los CINCO pasajes desde el cultivo original

Ref. : « Microbial Limit and Bourden Tests » Validation Approaches and Global Requirements-Lucía Clontz-Ed.Interpham Inc.1998-Cap.4:« Validation of the USP Microbial Limits Test (Preparatory testing,pág76 –Maintenance of the Microorganisms.

« USP 29 cap.<61 >Microbiological Examination of non sterile products : Microbial enumeration tests ,cap.< 62>Microbiological examination of nonsterile products : Tests for specified microorganisms ».

Control de las cepas

- Viabilidad y Pureza

Condiciones de mantenimiento de las cepas

- Sistema de preservación
- Temperatura
- Contaminación
- Tipificación

B. Preparación del cultivo de semilla:

Después de un crecimiento durante 3 a 4 semanas en medio de Stonebrink, es necesario adaptar a la cepa al crecimiento en medio líquido en la superficie.

Para ello al sembrar inclinar el erlenmeyer que contiene el medio de semilla en un ángulo de 45°, apoyar el ansa con cultivo sobre la pared del mismo, distribuir suavemente y nuevamente inclinar el recipiente con el fin de que arrastre el cultivo, finalmente enderezar el erlenmeyer, para que la siembra permanezca en la superficie. Incubar a 37°C durante 15 días, hasta la aparición de una delgada película.

Realizar un segundo repique, tomando con un ansa en forma de espiral una porción de cultivo, colocar sobre la superficie de un erlenmeyer conteniendo

do medio de semilla inclinar hasta el desarrollo de una nueva película entre 7 a 10 días a 37°C.

No utilizar más de tres ó cuatro repiques en el medio de semilla para iniciar la producción.

C. Producción de la serie:

Repicar con un ansa en forma de espiral el cultivo semilla en frascos de vidrio de base rectangular de 2 litros de capacidad en los cuales se ha colocado 1 litro de medio de Dorset – Henley.

Incubar durante 8 a 10 semanas a 37°C, hasta la formación de una gruesa película rugosa.

Autoclavar las botellas del lote de producción a vapor fluente: 100°C, durante 3 horas.

Dejar en contacto el cultivo con el medio líquido, durante 24 a 48 horas, agitando los frascos periódicamente a lo largo de este lapso.

Separar la masa bacilar utilizando tamices de malla metálica de 180 micrones. El líquido se clarifica por placa K2 ó similar.

Precipitar la proteína proveniente de los metabolitos producidos por la micobacteria durante su desarrollo y posterior lisis.

Agregar 1 volumen de solución de ácido tricloroacético al 40% por cada 9 volúmenes de la filtración clarificante.

Mezclar mediante agitación enérgica y dejar en contacto durante toda la noche. Se producirá la sedimentación del precipitado.

Evitar un contacto más prolongado del ácido tricloroacético con el producto. Por ello aspirar el líquido sobrenadante y lavar el precipitado con solución de ácido tricloroacético al 1% y una ó dos veces con solución de cloruro de sodio al 5%.

En cada lavado se deberá levantar el precipitado del fondo del vaso de la centrífuga con una varilla de vidrio de diámetro 1,50 a 20 mm, de borde redondeado, deberá realizarse prolijamente mediante agitación de modo tal de permitir el contacto entre el sólido y las soluciones de lavado.

Los lavados con la solución de cloruro de sodio deberán producirse hasta que el líquido sobrenadante proveniente de la centrifugación, alcance un pH de 2,7.

Controlar este valor, ya que un aumento de la alcalinidad, producirá redisolución de la proteína, con la consiguiente pérdida de dosis.

Para la realización de este procedimiento deberán utilizarse vasos de centrífuga de gran capacidad: 500 ml a 700 ml; centrifugar entre cada lavado a 3000 rpm durante 30 a 60 minutos.

Resuspender el precipitado en solvente alcalino, hasta que mediante agitación, se hayan disuelto todas las partículas, el líquido de marrón oscuro

tendrá un pH de 6,7 a 7,0.

Centrifugar para eliminar partículas insolubles a 2500-3000 r.p.m. durante 30 minutos.

Cálculos para dilución del concentrado

Se deberán considerar las siguientes definiciones:

- Volumen de solvente alcalino Huitema utilizado en la redisolución del precipitado (**a**).
- Volumen total obtenido (**b**).
- Volumen de proteínas (**c**).

El volumen de proteína se calcula realizando la diferencia: $c = b - a$

El valor de **c** se multiplicará por 4, tratándose de la producción de PPD bovino: **$d = c \times 4$**

La dilución de la proteína se continuará con:

- Solución reguladora M/3, en la siguiente proporción = $\frac{d - a}{10}$

- Solución antibacteriana 5 veces concentrada = $\frac{d}{5}$

El siguiente ejemplo permitirá la comprensión de los cálculos:

Volumen de solvente alcalino utilizado en la disolución del precipitado: 150 mL (**a**)
Volumen total: 250 mL (**b**)
Volumen de proteína: 100 mL (**c**),

$$250 \text{ (b)} - 150 \text{ (a)} : \text{(c)}$$

- Dilución del concentrado: hasta alcanzar cuatro veces su volumen de proteína = **$100 \times 4 = 400 \text{ mL}$**

$$\text{Solución reguladora M/3 (e)} = \frac{d - a}{10} = \frac{400 - 150}{10} = 2,5 \text{ mL}$$

$$\text{Solución antibacteriana } \times 5 \text{ (f)} = \frac{d}{5} = \frac{400}{5} = 80 \text{ mL}$$

Volumen final = **$d = 400 \text{ mL}$**

$$\begin{aligned} \text{Agua destilada esterilizada} &= d - (e + f + b) \\ \text{" " "} &= 400 - (2,5 + 80 + 250) \\ \text{" " "} &= 400 - 275,5 = 67,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Controles de Calidad

1. Determinación de la potencia biológica

Se realiza en cobayos previamente sensibilizados.

Con la suspensión del Anexo, inocular a cada cobayo con 0,5 mL por vía intramuscular utilizando jeringas con camisa y émbolo de vidrio de 1 mL, adaptador de rosca tipo Luer-lock y aguja 20 SWG x 18 mm.

Después de realizado este procedimiento autoclavar todo el material utilizado a 120°C durante 30 minutos.

Dejar transcurrir cinco semanas hasta su utilización.

Los cobayos así sensibilizados se pueden utilizar hasta seis meses posteriores a la inoculación.

Estándar Internacional

Basado en un ensayo colaborativo internacional en cobayos y bovinos en el año 1986, la World Health Organization (WHO) entregó oficialmente el estándar internacional de tuberculina D.P.P. bovina: 32,500 U.I / mg / mL.

La potencia estimada de Tuberculina bovina deberá ser, no inferior al 66% ni mayor del 150%.

A los fines de no utilizar en forma continua, este reactivo biológico, es necesario que los países establezcan su propio patrón de referencia nacional calibrado contra el estándar internacional en cobayos y bovinos.

Para los sucesivos controles en los lotes de tuberculinas producidos por la actividad privada ú oficial, los mismos serán realizados con la serie establecida de referencia nacional.

Procedimiento:

En cobayos sensibilizados con la cepa de *Mycobacterium bovis* AN₅ realizar la depilación mediante afeitadora y crema depilatoria de ambos flancos de cada animal, dos horas antes de la prueba de potencia.

Realizar este esquema con la tuberculina de referencia y con la serie en control.

Diluciones de la tuberculina DPP bovina:

2,5 mL de PPD	500 mL diluyente buffer	1/200
20 mL (1/200)	100 mL diluyente buffer	1/1000
20 mL (1/1000)	100 mL diluyente buffer	1/5000

Diluciones de la tuberculina D PP Aviar:

2,5 mL de P.P.D.	250 mL diluyente buffer	1/100
20 mL (1/200)	100 mL diluyente buffer	1/500
20 mL (1/1000)	100 mL diluyente buffer	1/2500

Mezclar bien los matraces aforados, pasar a tubo de ensayo con tapón de goma reversible para poder llenar las jeringas. Enjuagar cada jeringa con la dilución 2 ó 3 veces antes de llenarlas, finalmente enrasarlas y colocarlas numeradas en una bandeja. Se inyecta 0,2 mL por dilución, tres diluciones a cada lado del cobayo. Se numeran de 1 a 3 para la preparación de referencia y de 4 a 6 para la tuberculina de prueba.

Ensayo de las tuberculinas de referencia y en prueba

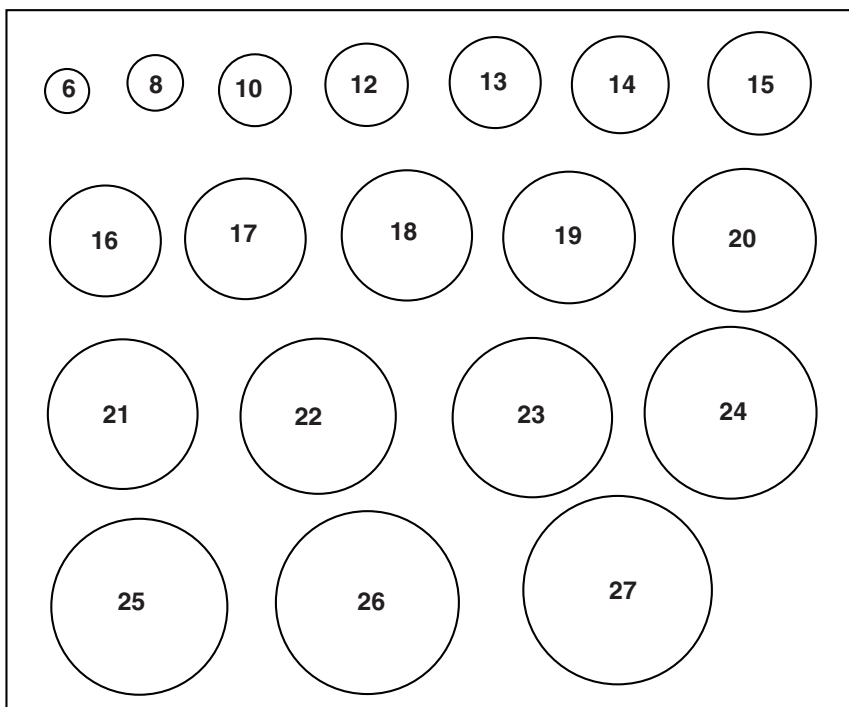
Distribución al azar

Los seis sitios a usar en cada cobayo (tres en cada flanco) son denominados, en sentido oral a caudal, con las letras a, b, c para el costado izquierdo y e, f, g para el derecho. La dilución de la tuberculina a ser aplicada en cada sitio se determina mediante el empleo de números aleatorios. Este procedimiento se sigue para cada animal y se preparará el protocolo de trabajo (Tabla I, pág. 20) dejando un espacio al lado del número de la dilución para anotar la respuesta. En un ensayo de seis puntos usando nueve cobayos, las diluciones son asignadas en forma conveniente en los sitios de inyección, empleando dos cuadrados latinos de seis puntos por lado (6 x 6). Esta distribución asegura que cada dilución tiene el mismo sitio en solo dos cobayos. Transcurridas 24 horas se realiza la lectura de la pápula, induración y eritema, mediante una plantilla plástica (pág. 21).

Los datos consignados en la Tabla I se vuelcan a un programa informático de Cálculo producido por el sistema WINDOWS.

A los fines de uniformar la metodología, se adjuntan al Manual de Procedimiento: una plantilla plástica con circunferencias grabadas de los diámetros entre 6 mm y 27 mm y un C.D. con el programa informático de cálculo.

Diagrama de plantilla plástica destinada a la lectura de la prueba de potencia



Prueba de potencia - Tuberculinas - Dilab - Senasa

Jaula	Flanco Izquierdo			Flanco Derecho			Fecha:
	a	b	c	a	b	c	
Cabeza	1	2	3	4	5	6	En Análisis:
Lomo	2	3	6	1	4	5	
Cola	3	6	2	5	1	4	Estándar:
Cabeza	4	5	1	2	6	3	
Lomo	5	1	4	6	3	2	Sensibilización de cobayos:
Cola	6	4	5	3	2	1	
Cabeza	4	5	6	1	2	3	Observaciones:
Lomo	5	1	4	2	3	6	
Cola	1	4	5	3	6	2	

Cálculo de la potencia biológica

Valoración biológica de PPD

Los datos generales son:

Código	
Fecha prueba	
Origen del producto	
Enviado por	
Cepa	
Nº y desc. de lote	
PPD estándar util.	
Concent. proteínas	

Resultados de las inoculaciones:

		PPD ESTANDAR			PPD PRUEBA		
		1	2	3	4	5	6
X	Log. dosis	1	0	-1	1	0	-1
Σ	Total	0	0	0	0	0	0
σ	Des. Stand.	####	####	####	####	####	####
MED	Media	####	####	####	####	####	####

Valoración biológica de PPD

Cálculo por método gráfico:

PPD	YMED	XMED	b	ECUACION
ESTANDAR	#¡DIV/0!	0,0	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
PRUEBA	#¡DIV/0!	0,0	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!

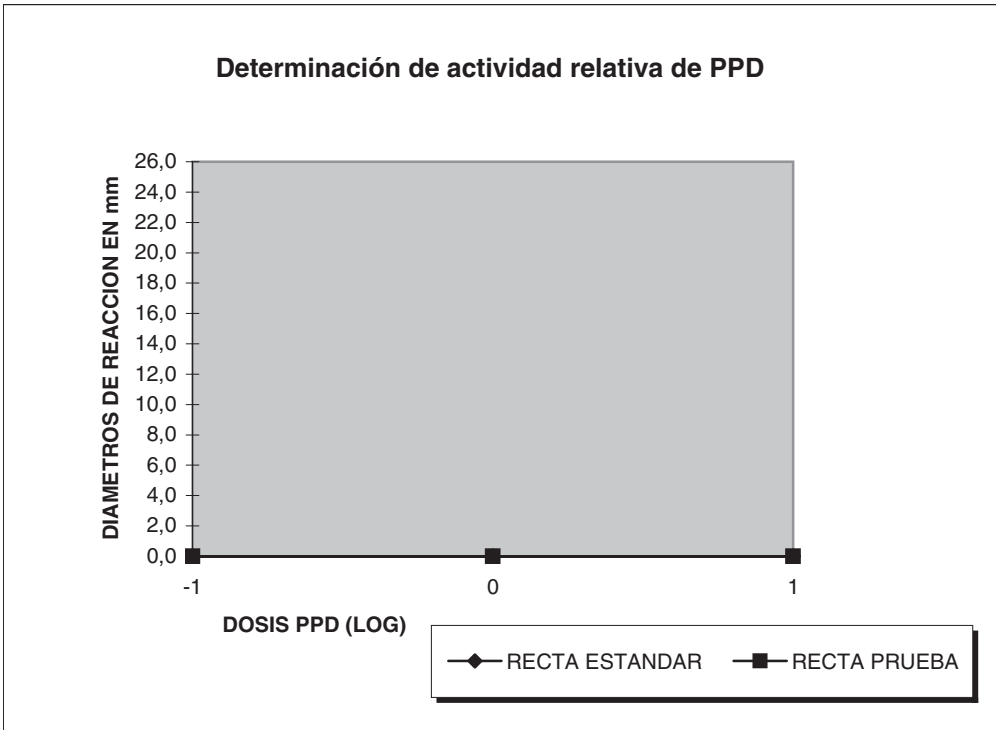
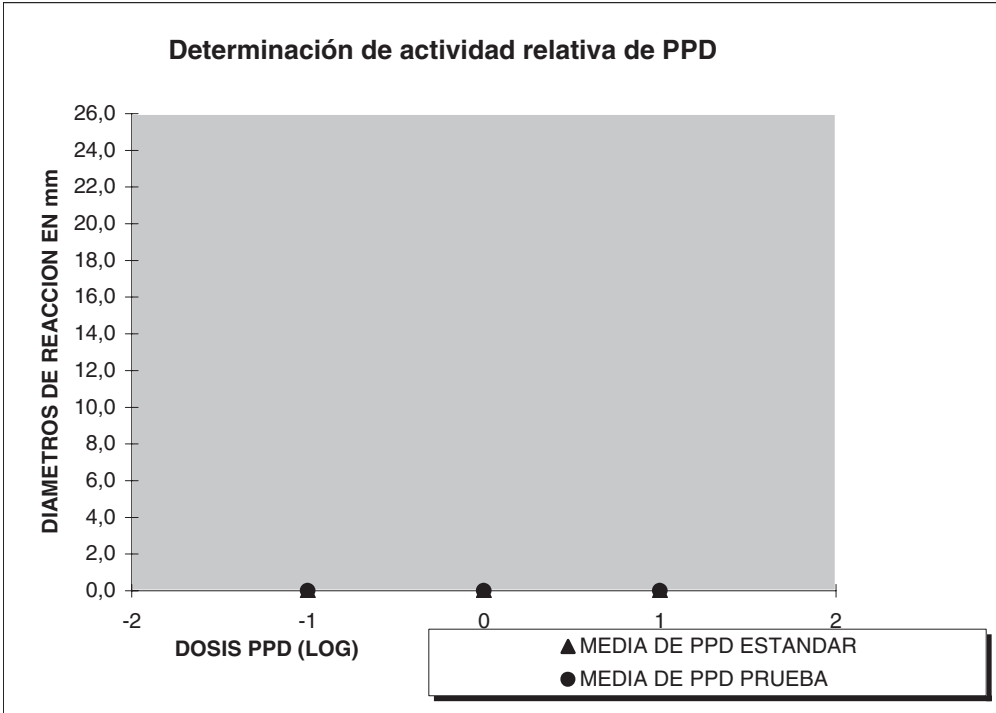
ACT.RELAT.(EST/PRU)	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
---------------------	----------	----------

Cálculo por análisis de varianza:

NAT. DE VARIACION	° DE LIB.	Σ	MED.	F
PREPARACIONES	1	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
REGRESION	1	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
PARALELISMO	1	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
LINEALIDAD	2	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
ENTRE DOSIS	5	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	
ERR (DENT DOSIS)	-6	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	
TOTAL	-1	#¡DIV/0!		

A. REL. (E/P)	
#¡DIV/0!	#¡DIV/0!

LIM. CONFIANZA	
SUP.	#¡DIV/0!
INF.	#¡DIV/0!



2. Esterilidad

El producto debe estar libre de toda contaminación, para ello es controlado para aero-anaerobios y el desarrollo de hongos.

Medios de cultivo: Tioglicolato sin tween, Agar Sabouraud con 4% de glucosa y Agar Casoy.

Temperatura de incubación: 35°C y 25°C

Ref.: Code of Federal Regulations – 9-Revised as of January 1, 2002- Animal and Animal Products # 113.26, page 595 -U.S.A.

3. Ausencia de gérmenes

Se centrifuga una muestra de 5 mL de la tuberculina D.P.P. en control, con el sedimento se preparan dos frotis: uno para coloración de ácido – alcohol resistencia de Ziehl-Neelsen y otro para coloración de Gram.

No se debe observar la presencia de gérmenes en ninguno de los preparados.

4. Control de toxicidad

Se inoculan 0,5 mL de la tuberculina en control, por vía subcutánea, a cuatro cobayos que no han sido tratados previamente con material antigénico. Al cabo de siete días los animales no deben presentar alteración alguna.

5. pH

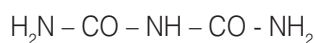
Debe estar comprendido en el rango de 7,0 (siete) más ó menos tres décimas ($7,0 \pm 0,3$).

6. Control químico

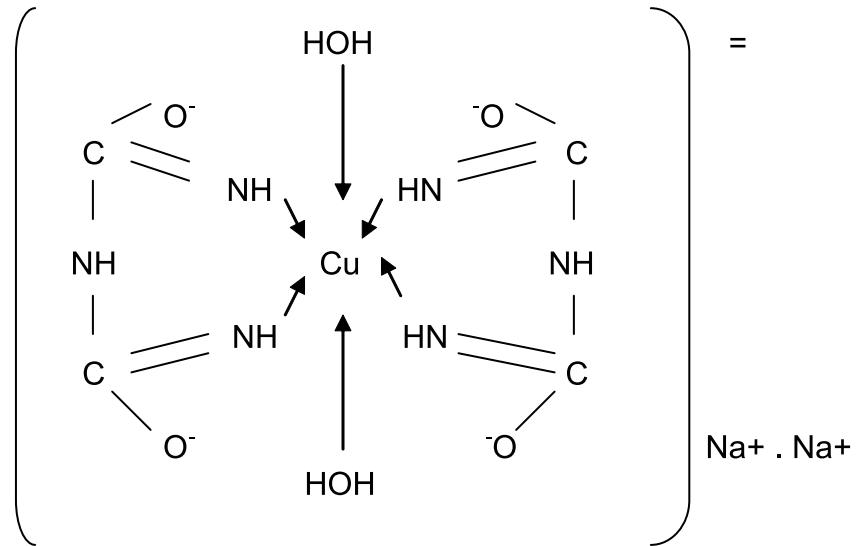
La concentración proteica será determinada por métodos químicos, tales como Biuret, Kjeldhal, que permitan establecer el nitrógeno proteico.

Reacción del biuret: Es positiva para las proteínas y sus productos de hidrólisis parcial, siendo propia aunque **no específica** de la unión peptídica y es presentada por moléculas que contienen dos grupos –CO-NH (carbamilo) unidos directamente por un átomo de carbono ó de nitrógeno.

El biuret es la ureída (amida de la urea) del ácido carbónico:



Las proteínas con largas cadenas peptídicas dan coloración **azul violeta**, a medida que la cadena se acorta, la coloración tiende hacia el rojo. Es probable que el desarrollo de color, se deba a la formación de complejos de coordinación con el cobre del tipo de:



Los péptidos y las proteínas originan una coloración **azul** debida a los grupos NH_2 libres y amarilla ó roja por los grupos: $\text{NH} - \text{CO} - \text{NH}$, la resultante es una coloración violeta.

Método del biuret (modificado):

De acuerdo a la concentración estimada entre 0,5 mg/mL a 4 mg/mL; realizar la siguiente distribución:

Concentración aproximada:	2 mg/mL	0,5 mg/mL
- Volumen de la muestra:	2 mL	5 mL
- Volumen de la tuberculina de referencia:	2 mL	5 mL
- Volumen de agua destilada:	3 mL	0 mL
- Volumen de reactivo del biuret:	5 mL	5 mL
- Blanco de reactivos: 5 mL de agua destilada + 5 mL de reactivo de biuret.		

Mezclar los componentes y dejar a temperatura ambiente durante diez minutos para el desarrollo de color.

Leer en un espectrofotómetro a 625 nm.

La concentración proteica de la muestra será:

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia de la tuberculina de referencia}} \times \text{concentración de la tuberculina de referencia en mg/mL y el factor de dilución} =$$

O bien:

$$\frac{\text{T\% de la muestra}}{\text{T\% de la tuberculina de referencia}} \times \text{concentración de la tuberculina de referencia en mg/mL y el factor de dilución} =$$

Método semi-micro de Kjeldahl

Por la digestión en ácido sulfúrico, el nitrógeno en la Tuberculina es convertido en Sulfato de amonio. En la alcalinización y destilación al vapor, el amoníaco es llevado a una solución de ácido bórico. El nitrógeno es determinado por titulación con solución estándar de SO_4H_2 . La multiplicación del valor nitrógeno por un factor 7 expresa la cantidad de proteína en la muestra.

Todas las determinaciones son de D.P.P. de Tuberculina precipitable.

Las muestras se realizan por cuadruplicado y se incluyen 2 (dos) controles.

No se deberá conservar ó usar amoníaco en ningún lugar cercano al área donde se efectúa esta determinación.

Método:

Colocar cada muestra y cada control en un tubo cónico de centrifuga de 10 mL, numerándose cada tubo para su identificación:

	Tuberculina aviar 0,5 mg / mL		Tuberculina bovina 1,0 mg / mL	
	Muestra	Control	Muestra	Control
Tuberculina	5,0 mL	-	2,0 mL	-
Líquido diluyente de tuberculina (*)	5,0 mL	5,0 mL	-	2,0 mL
Agua destilada	2,5 mL	2,5 mL	5,5 mL	5,5 mL
Solución de ácido tricloroacético al 40%	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL

(*) Se puede utilizar en su lugar agua destilada.

Colocar en el tubo de centrifuga, según el orden indicado. Después del mezclado del contenido dejar los tubos en reposo (cubiertos) a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 15 minutos.

Decantar cuidadosamente y separar el sobrenadante.

Disolver la proteína precipitada de cada tubo en 0,5 mL de Solución 5N, de OHNa, lavando los costados del tubo por rotación en posición casi horizontal. Una pequeña cantidad de proteína se adhiere en el lateral del tubo formando un anillo sobre el mismo en la superficie del líquido.

Cuando está completamente disuelto, lavar la solución de tuberculina de cada tubo en un matraz de Kjeldahl ; transferir cada muestra con 1 mL de agua destilada.

A la solución de cada Kjeldahl, añadir:

- H_2SO_4 concentrado: 1 mL (aprox.).
- 3 esferitas de vidrio.

Digerir sobre un mechero de gas. Después que se ha hervido el agua, continúe calentando hasta la aparición de un depósito marrón.

Clarificar por agregado a cada recipiente (incluidos los controles que no muestran depósito marrón) de 0,5 mL de H_2O_2 (100 volúmenes). Continuar calentando. Si aparece un depósito, añadir otros 0,5 mL de H_2O_2 a cada recipiente de manera que cada uno reciba la misma cantidad.

Continuar calentando hasta que el SO_4H_2 comienza a destilar en el cuello del matraz, mantener el calentamiento durante 10 minutos. Se produce una conversión de 98% de nitrógeno a Sulfato de amonio. El color del líquido en los matraces de Kjeldahl deberá ser verde claro antes de retirar la llama de gas. La etapa siguiente es la destilación por calor en el aparato de Markman. El agua del generador de vapor estará ligeramente acidificado con ácido fosfórico. Cargar 10 mL de ácido bórico al 2% conteniendo indicador de Conway en la cámara de destilación y destilar al vapor durante 5 minutos.

Retirar esta carga y reemplazar con una nueva carga y destilar como antes. Si hubiera cualquier cambio en el color en la misma, repetir este procedimiento hasta que el color rojo de la solución de ácido bórico permanezca invariable. Destilar por vapor durante 5 minutos con una carga de agua destilada. El aparato de Markman está ahora listo para ser usado.

Colocar un frasco cónico de 50 mL conteniendo 5 mL de una solución al 2% de ácido bórico e indicador de Conway debajo de la salida del condensador.

Usar cinco veces, 1 mL de agua destilada, lavar los contenidos de un matraz de Kjeldahl, en la cámara de destilación de Markman.

Con cuidado agregar 5 mL de una solución al 50% de OHNa para formar

una capa profunda. Acomodar el tapón de la cámara.

Levantar el frasco cónico colector de modo que la salida del condensador gotee debajo de la superficie de la solución de ácido bórico.

Destilar al vapor la muestra durante 3 minutos. Después de la destilación, inmediatamente bajar el recipiente colector de modo que la superficie del líquido esté apartada de la salida del condensador en el frasco colector usando unos 2 mL de agua destilada.

El proceso de destilación deberá haber triplicado aproximadamente el volumen del líquido en el frasco colector.

El destilado debe estar frío, para ello, hacer pasar gran cantidad de agua fría a través del condensador.

Con una muestra de DPP de tuberculina, el contenido del frasco colector será ahora verde, pero con un testigo el color será generalmente ligeramente rojo.

Titular de inmediato con solución N/112 SO_4H_2 (en una microbureta de 5 mL) hasta que el color original rojo justo reaparezca. Observe el volumen de solución de SO_4H_2 usado.

Cargar la cámara de destilación del aparato de Markman con unos 10 mL de agua destilada y destilar al vapor durante 2 ó 3 minutos antes de introducir la muestra siguiente.

Tratar todas las muestras y controles tal descrito antes.

Observe que después de cada destilación, la condensación del vapor separa al líquido de la cámara de destilación.

Cuando esto ha sucedido, la llave de remoción del vapor debe abrirse antes de introducir otra muestra, de otro modo la muestra se perderá.

Colocar el nitrógeno estándar por el pipeteado de 1 mL de solución de sulfato de amonio directamente en la cámara de Markman, lavando con unos 5 mL de agua destilada, añadiendo 5 mL de solución al 50% de OHNa y destilar al vapor tal como para las muestras y controles. Esto debería titularse con 8 mL de una solución N/11.2 de SO_4H_2 .

El ejemplo siguiente muestra el orden en el cual las destilaciones y las titulaciones se efectúan y en la forma en que se obtienen los resultados en términos de mg de D.P.P. de Tuberculina / mL. Se trabajó sobre 2 mL de muestra.

Frasco N°	Contenido	Titulación (mL)
1	Testigo (control)	0,09 (ver nota)
2	1 mg N. Estándar	8,00 (ver nota)
3	Muestra 1	4,62
4	Muestra 2	4,75
5	Muestra 3	4,78
6	Muestra 4	4,80
7	Testigo (control)	0,10 (ver nota)

Nota: Estas titulaciones del control son valores altos. Normalmente no deberían exceder de 0,1 mL. En los casos como el descrito, el color del ácido bórico será definitivamente verde.

Muy a menudo los controles son tan bajos como 0,01 mL ; 0,05 mL ó aún cero y entonces, por supuesto el color del ácido bórico permanece rojo.

Aunque el Nitrógeno estándar está indicado en el frasco 2, es aconsejable destilar este al finalizar, evitando con ello pasar posible Nitrógeno a muestras subsiguientes.

Con este método los resultados son exactos $\pm 5\%$.

Cálculos:

Título promedio:	4,74 mL
Promedio control:	0,095 mL
Titulación corregida:	4,645 mL

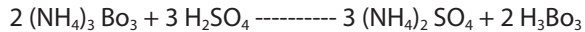
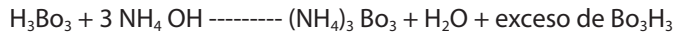
Dividir por la cantidad de mililitros de SO₄H₂ estándar equivalente
mg de Nitrógeno = 0,580

Multiplicar por el factor de conversión 7 = 4,060

Dividir por la cantidad de mililitros empleados en cada muestra = 2

Por lo tanto, contenido de DPP = 2,03 mg / mL

Reacción:



1 mL N/11.2 H₂SO₄ = 0.125 mg Nitrógeno

Por lo tanto, 1 mg Nitrógeno = 8.0 mL N/11.2 H₂SO₄

Multiplicar el valor del Nitrógeno por factor DPP 7

Expresar el resultado en mg DPP / mL de solución

7. Contenido de fenol y de otros agentes conservadores

Si se ha utilizado fenol, la concentración no deberá exceder de 500 mg%.

El método usado para su determinación es mediante el reactivo de Folin-Ciocalteus.

El complejo de ácido fosfotúngstico, en medio alcalino, es reducido a un coloide de color azul.

Técnica

En matraz aforado de 100 mL, colocar 2 mL de la Tuberculina D.P.P., en control y de la utilizada como referencia, con el fin de que la concentración

inicial de 0,5% se reduzca a 0,01%, para que la coloración posterior que se produzca, pueda ser determinada en la escala habitual de los espectrofotómetros.

Colocar en dos matraces aforados de 50 mL, lo siguiente:

	Muestra en control	Estándar
Muestra diluida 1:50	2 mL	2 mL
Reactivo de Folin-Ciocalteus.	5 mL	5 mL
Solución de carbonato de sodio al 20%.	12,5 mL	12,5 mL

Llevar a volumen con agua destilada mezclar e incubar a 37°C durante una hora.

Leer en espectrofotómetro a 608 nm.

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia de la tuberculina de referencia}} \times 0,5\% =$$

O bien:

$$\frac{\text{T\% de la muestra}}{\text{T\% de la tuberculina de referencia}} \times 0,5\% =$$

8. Coloración de las tuberculinas

A los efectos de diferenciar visualmente la tuberculina aviar de la bovina, se colorea a la primera con Rojo Ponceau 2R.

9. Conservación

Las tuberculinas D.P.P. deberán conservarse constantemente a una temperatura de 2°C a 8°C.

10. Plazo de validez

Las tuberculinas PPD serán consideradas aptas por un plazo de 2 (dos) años. Cumplidos estos requisitos se otorgará a los laboratorios productores el respectivo certificado de uso y comercialización (*ver Protocolo de Control en la página siguiente*).



Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

Departamento de micobacterias

Tuberculina PPD bovina y aviar (Derivado Proteico Purificado)

Controles de Calidad

Orden de
análisis
Nro.: CUIB

Laboratorio Productor:

Serie Nro.: Vto:

Dosis Totales:

1. Determinación de potencia biológica:
En cobayos previamente sensibilizados. Diseño de inoculación de cuadrado latino.
2. Esterilidad:
Para la determinación de aero-anaerobios y hongos.
3. Ausencia de gérmenes:
Coloración de Gram:
Coloración de Ziehl-Neelsen:
4. Toxicidad:
Inoculación en cobayos de material antigénico
5. pH:
6. Control químico:
Determinación de la concentración proteica:
Método de Biuret
7. Contenido de fenol:
Determinación del conservante.
8. Fecha de realización:

Observaciones:
.....
.....
.....
.....
.....

.....
Firma

.....
Fecha

Folleto de tuberculina DPP bovina

REPUBLICA ARGENTINA
SECRETARIA DE AGRICULTURA , GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA
TUBERCULINA DPP BOVINA

(Derivado Proteico Purificado de Tuberculina Bovina)

PARA USO PROFESIONAL EN MEDICINA VETERINARIA

Elaborada con *Mycobacterium bovis*, cepa AN₅

Dirección de Laboratorios y Control Técnico (DILAB) del SENASA

Av. Sir Alexander Fleming 1653 – (1640) Martínez – Pcia. de Bs. As.

Concentración: 1 mg / 1 mL , 32500 U.I. / mg / mL

Presentación: Frascos conteniendo 5 mL

La Tuberculosis bovina es una zoonosis que produce serias consecuencias económicas, pérdida por decomiso de reses, pérdidas en la producción de carne, leche y problemas en la salud pública, por ello se hace necesario la erradicación de la tuberculosis en el ganado y el método estándar de aplicación diagnóstica, es la reacción intradérmica de tuberculina.

Para tener un conocimiento adecuado de la frecuencia de la enfermedad y la distribución de las áreas de infección dentro del país, hay que utilizar métodos uniformes de control. Ello se conseguirá normalizando las tuberculinas a inyectar y el método de lectura de las reacciones producidas en la piel.

El "Derivado Proteico Purificado" de tuberculina tiene la ventaja sobre otras tuberculinas que es MAS ESPECIFICO, MAS SENSIBLE y puede ser controlado con mayor precisión.

Prueba comparativa

Para establecer si el ganado bovino está infectado con *Mycobacterium bovis* ó con otras cepas de micobacterias distintas a las del tipo bovino se realiza la prueba comparativa; inoculando simultáneamente, en la tabla del cuello, D.P.P. Bovina y aproximadamente a los 12 cm-15 cm., el D.P.P. Aviar.

Antes de la inoculación se mide el espesor y la diferencia entre ambas lecturas, nos indica el diámetro en milímetros de la reacción.

Se deben utilizar distintas jeringas para D.P.P. Bovina y D.P.P. Aviar. Se eligió D.P.P. Aviar como término de comparación, en principio, para descartar una infección a *Mycobacterium avium* y además porque esta bacteria tiene relaciones antigénicas comunes con la especie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Paratuberculosis) y con otras responsables de las reacciones cruzadas a la Tuberculina Bovina.

Al realizar las lecturas de las pruebas tuberculínicas, para el caso particular de la prueba comparativa, se siguen los siguientes criterios:

- 1- Respuestas mayores a D.P.P. Bovina que para D.P.P. Aviar, indican infección a

Mycobacterium bovis, se clasifican a los animales como reactivos y el rebaño como **POSITIVO**.

- 2- Si las respuestas son mayores a D.P.P. Aviar o iguales a la D.P.P. Bovina, se concluye que se tratan de reacciones para-específicas y se clasifica al rebaño como **NEGATIVO**.
- 3- Si se presentan respuestas variadas se clasifican a los animales con respuestas mayores a D.P.P. Bovina como reactivos y solamente el examen *post-mortem*, podrá indicar si el rodeo está infectado o no.

Instrucciones:

Equipos: Jeringas intradérmicas de tuberculina, graduadas a la centésima de mL y provistas de agujas 26 de 9,5 mm de largo.

Se debe limpiar la aguja con alcohol y secarla antes de cada aplicación.

Si la piel está limpia no es necesario desinfectarla. Si está sucia debe limpiarse con algodón seco ó humedecido en alcohol al 70%.

No deben aplicarse desinfectantes cerca del lugar de la inoculación. Hay que tener cuidado de eliminar todo vestigio de alcohol de la zona de inyección y de la aguja, antes de cada inyección. Esto es necesario para evitar toda inflamación debida al desinfectante que pueda confundirse con una reacción.

VIA DE ADMINISTRACION: Intradérmica.

Advertencias:

- Cuando se ha realizado una prueba tuberculínica se deben dejar transcurrir **60 días** antes de repetir la misma.
- La Tuberculina D.P.P. Bovina debe conservarse en lugar seco, fresco y oscuro, a una temperatura entre 2° a 8°C.
- Al utilizarla en el campo, debe tenerse la precaución de no someterla a temperaturas extremas ni de exponerla a la luz solar directa.
- El envase individual que haya sido abierto, debe utilizarse en el mismo día y desecharse el resto, si no ha sido utilizado en su totalidad.
- La Tuberculina D.P.P. Bovina se puede utilizar hasta 2 años después de la fecha del último control.

Producción y control de tuberculina bovina y aviar

CUADRO N° 1: Pruebas tuberculínicas en ganado bovino.

PRUEBA	CAUDAL	CERVICAL SIMPLE	CERVICAL COMPARATIVA
USO PPD Bovina: 1 mg/ml (32.500 UI/ml)* Aviar: 0.5mg/ml (25.000 UI/ml)*	General Bovino	Limpieza de rodeos infectados Bovino	Casos especiales* Bovino (B) Aviar (A)
DOSIS	0.1 ml eq. (3.250 UI)	0.1 ml eq. (3.250 UI)	B: 0.1 ml eq 3.250 U A: 0.1 ml eq 2.500 U
LUGAR INOCULACION	Pliegue Caudal	Cuello Zona media	Cuello, separ. 12,5 cm entre A y B
LECTURA DE LA PRUEBA	72 hs.	72 hs.	72 hs.
INTERVALO ENTRE PRUEBAS	No menos de 60 días	No menos de 60 días	No menos de 60 días
CLASIFICACION Medición de respuestas (dif. mm)	> 5 mm (+) (screening)	> 3 mm (+) (limpieza)	Diferencia B > A Positivo (área infect.)

* No debe emplearse en rodeos con infección comprobada. Programa Control TBC, SENASA, ARGENTINA, 1996.

* Equivalencia determinada por control de potencia biológica.

CUADRO N° 2: Pruebas tuberculínicas en otras especies animales.

ESPECIES ANIMALES	PPD	DOSIS	PRUEBA DIAGNOSTICA	LECTURA
CABRAS	PPD	Bov 0.1 ml	P.CAUDAL	LECTURA 72 hs.
OVINOS	PPD	Bov 0.1 ml	P.AXILAR	LECTURA 72 hs.
CAMELIDOS	PPD	Bov 0.1 ml	P.C. SIMPLE P. AXILAR	LECTURA 72 hs.
CERDOS	PPD	Bov 0.1 ml Av 0.1 ml	BASE OREJA	LECTURA 48 hs.
PRIMATES	PPD	Bov 0.1 ml	PARPADO O ABDOMEN	LECTURA 72 hs.
AVES	PPD	Av 0.05 ml	BARBILLA	LECTURA 48 hs.
PERROS	No se emplea	-	-	-
GATOS	No se emplea	-	-	-
EQUINOS	No se emplea	-	-	-

Fuente: Programa Control de TBC, SENASA, República Argentina, 1996

CUADRO N° 3: Resultados de la sensibilidad y especificidad de los test diagnósticos para tuberculosis en bovinos, de acuerdo a diferentes estudios.

TEST	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
CAUDAL	0.75-0.82	0.96-0.99
CERVICAL SIMPLE	0.86-0.96	0.70-0.85
CERVICAL COMPARATIVA	0.72-0.78	0.92-0.99
GAMMA INTERFERON *	0.77-0.94	0.96-0.98

* Wood PR et al., Austr Vet J., 68: 286, 1991 / The Veterinary Record, november 4, 1978.

CUADRO N° 4: Guía para el saneamiento de la tuberculosis bovina en un rodeo

Situación sanitaria del rodeo respecto de la tuberculosis.	Prueba tuberculínica a utilizar. Lugar de inoculación, dosis y tiempo de lectura.	Interpretación por formación de pápula, aumento espesor de la piel en mm.
1. DESCONOCIDA: No existen registros ni estudios previos.	Prueba de rutina ano-caudal. 0,1 mL intradérmica en el tercio medio del pliegue. Lectura: 72 horas ± 6 horas.	POSITIVO: Engrosamiento de 5 mm o más. SOSPECHOSO: Engrosamiento de 3 mm o menos de 5 mm. NEGATIVO: Engrosamiento de menos de 3 mm.
2. INFECTADO: Con tuberculosis comprobada por pruebas de rutina positivas, lesiones a necropsia o por la historia sanitaria del rodeo.	ALTERNATIVA A: Repetir prueba de rutina ano-caudal a todo animal mayor de 6 meses, entre 60 y 90 días, 0,1 mL intradérmica en el tercio medio del pliegue. Lectura: 72 horas ± 6 horas.	POSITIVO: Engrosamiento de 3 mm o más. NEGATIVO: Engrosamiento de menos de 3 mm.
	ALTERNATIVA B: Para acelerar saneamiento: prueba cervical simple, tercio medio de la tabla del cuello. Aprox. a 15 cm por debajo del borde superior. 0,1 mL intradérmica, en el tercio medio del pliegue. Lectura: 72 horas ± 6 horas.	POSITIVO: Engrosamiento de 3 mm o más. NEGATIVO: Engrosamiento de menos de 3 mm.
3. SOSPECHOSO: Sólo se encontraron reactivos sospechosos a una prueba ano-caudal de rutina, no existiendo reacciones de 5 mm o más.	ALTERNATIVA A: Sacrificar los animales sospechosos para comprobar si existen lesiones tuberculosas o se aísla la micobacteria por cultivo.	NEGATIVO: Si no se encuentran lesiones tuberculosas al sacrificio, ni se encuentra al agente en el examen de laboratorio. INFECTADO: Si se encuentran lesiones y se aísla <i>M. bovis</i> por cultivo en laboratorio.
	ALTERNATIVA B: Repetir prueba de rutina ano-caudal a todo sospechoso a los 60/90 días. 0,1 mL intradérmica, en el tercio medio del pliegue. Lectura: 72 horas ± 6 horas.	NEGATIVO: Si disminuye sensiblemente el tamaño de las reacciones. SOSPECHOSO: Si persiste el tamaño de las reacciones. INFECTADO: Si aumenta el tamaño de las reacciones.
	ALTERNATIVA C: Repetir la prueba ano-caudal 60 a 90 días después. 0,1 mL intradérmica tercio medio del pliegue. Lectura: 72 horas ± 6 horas.	NEGATIVO: Si disminuye sensiblemente el tamaño de las reacciones. INFECTADO: Si persiste el tamaño de las reacciones.
4. NEGATIVO: Sólo se comprobaron reacciones menores de 3 mm a las pruebas ano-caudal o cervical.	Repetir pruebas entre 60 a 90 días. 0,1 mL intradérmico. Lectura: 72 horas ± 6 horas.	RODEO OFICIALMENTE LIBRE DE TUBERCULOSIS. Dos pruebas consecutivas con 60/90 días de intervalo como mínimo.

Fuente de los cuadros pág. 40 y 41: Tuberculosis bovina. Pruebas tuberculínicas (inoculación, lectura e interpretación). Preguntas y respuestas. Dr. Pedro Torres, Senasa, Buenos Aires, año 2000.

Protocolos de Producción



DILAB - SENASA
Coordinación BPPZ
Departamento de Micobacterias



PROTOCOLO DE PRODUCCION Y CONTROL DEL DERIVADO PROTEICO PURIFICADO (DPP) DE TUBERCULINAS

LUGAR Y FECHA _____

NOMBRE Y DIRECCION DEL ESTABLEC. PRODUCTOR _____

NUMERO DEL LOTE Y TIPO DE TUBERCULINA _____

FECHA DE FABRICACION DEL LOTE FINAL _____

FECHA DE VENCIMIENTO _____

INFORMACION SOBRE EL LOTE DE SIEMBRA

Especie y cepa de las micobacterias _____

Nº de referencia y fecha de preparación de la siembra _____

Prueba de pureza del cultivo _____

Identif. de la especie de micobacteria _____

Lote de siembra aprobado por el Servicio Nacional de Inspección _____

Fecha de aprobación _____

INFORMACION SOBRE LA PRODUCCION

1. FRASCOS DE CULTIVO

Fecha de reconstitución y de inoculación de la ampolla del lote de siembra _____

Número de repiques a partir de la siembra _____

Medio de cultivo empleado _____

Tiempo de incubación de los cultiv. comerc. _____

Fecha y método de esteriliz. de los cultivos _____

Fecha de filtración _____



**PROTOCOLO DE PRODUCCION Y CONTROL DEL DERIVADO
PROTEICO PURIFICADO (DPP) DE TUBERCULINAS**

INFORMACION SOBRE LA PRODUCCION

2. MEZCLA DE FILTRADOS DE CULTIVOS

Fecha en que se mezclaron los filtrados de cultivo _____

Fecha y método de purificación o concentración de los filtrados de cultivo _____

3. PRODUCTO CONCENTRADO A GRANEL

Fecha en que se terminó la preparación _____

Método empleado para la precipitación de la tuberculina _____

Peso _____
Pruebas realizadas _____

3.1. PRUEBAS PARA DETERMINAR LA AUSENCIA DE CONTAMINACION

Fecha de inoculación _____
Primera prueba _____
Repetición (si es necesario) _____

Medios de cultivo _____
Primera prueba _____
Repetición (si es necesario) _____

Número de tubos inoculados _____
Primera prueba _____
Repetición (si es necesario) _____

Duración de la prueba _____
Primera prueba _____
Repetición (si es necesario) _____

Resultados (positivos/negativos) _____
Primera prueba _____
Repetición (si es necesario) _____



DILAB - SENASA
Coordinación BPPZ
Departamento de Micobacterias



**PROTOCOLO DE PRODUCCION Y CONTROL DEL DERIVADO
PROTEICO PURIFICADO (DPP) DE TUBERCULINAS**

INFORMACION SOBRE LA PRODUCCION

4. LOTE DE ENVASADO (Lote final)

Fecha de envasado _____

Tipo y tamaño de los envases
(ampollas o viales sellados) _____

Número de envases _____

Nº declarado de unidades internacionales
en una sola dosis animal y vol. en el que
está contenida (después de la
reconstrucción, si se ha liofilizado) _____

Número de dosis por envases _____

Líquido de reconstruc., recomendado para
las tuberculinas liofilizadas únicamente _____

4.1. PRUEBA DE IDENTIFICACION

Métodos _____

Resultados _____

4.2. PRUEBA PARA DETERMINAR LA AUSENCIA DE CONTAMINACION

Nº de envases contaminados _____
Primera prueba

Repetición (si es necesario) _____

Medios de cultivo _____
Primera prueba

Repetición (si es necesario) _____

Duración de la prueba _____
Primera prueba

Repetición (si es necesario) _____

Resultados (positivos/negativos) _____
Primera prueba

Repetición (si es necesario) _____



**PROTOCOLO DE PRODUCCION Y CONTROL DEL DERIVADO
PROTEICO PURIFICADO (DPP) DE TUBERCULINAS**

INFORMACION SOBRE LA PRODUCCION

4.3. PRUEBA DE INOCUIDAD

Especie _____
Número de animales _____
Resultados
(positivos/negativos) _____

4.4. CONTENIDO DE AGENTE CONSERVADOR

Tipo de agente conservador _____
Contenido _____

4.5. PRUEBA DE ACTIVIDAD.

4.5.1. Prueba:

Método de sensibilización _____
Fecha de lectura de las reacciones _____
Resultado _____

4.5.2. Actividad relativa (presentar todos los cálculos en otra hoja por separado) información sobre el certificado de circulación.

¿Es satisfactorio el lote de tuberculina? SI NO

¿Ha sido autorizada la circulación del lote por el Servicio Nacional de Inspección? SI NO

En caso afirmativo, indique fecha _____

¿Ha expedido un certificado el laboratorio de control? SI NO

En caso afirmativo, indique el n° de certif. _____

Prueba de actividad (optativa): Si la prueba de actividad se practicó acabado a granel, suminístrese los detalles correspondientes en una hoja por separado, según las instrucciones que figuran en la Res. SENASA N° 1540/200 del 25-9-00.

jefe del laboratorio productor

Nombre y apellido

Firma



DILAB - SENASA
 Coordinación BPPZ
 Departamento de Micobacterias



ESTIMACION DE LA ACTIVIDAD RELATIVA

(preséntese una hoja por separado con todos los detalles)

PRUEBA DE POTENCIA

Cuadro para indicar los sitios inoculados de las diluciones en cobayos, y los diámetros medios de las reacciones intradérmicas.

Jaula	Flanco izquierdo				Flanco derecho				Fecha
	a	b	c	d	e	f	g	h	
	1	2	3		4	5	6		Estándar
	2	3	6		1	4	5		
	3	6	2		5	1	4		
	4	5	1		2	6	3		En análisis
	5	1	4		6	3	2		
	6	4	5		3	2	1		
	4	5	6		1	2	3		Sensibiliz. de cobayos
	5	1	4		2	3	6		
	1	4	5		3	6	2		

1. Actividad relativa del patrón Serie N°

2. Actividad relativa de la Serie N°

La especie en que se efectuó la determinación debe ser la misma que la que ha de recibir los demás lotes de tuberculinas.

Nombre y apellido del responsable

Firma y sello



DILAB - SENASA
Coordinación BPPZ
Departamento de Micobacterias



CERTIFICADO DE INSPECCION DE TUBERCULINA

DE LA PERSONA QUE ASUME LA RESPONSABILIDAD GENERAL

LUGAR Y FECHA _____

CERTIFICO QUE EL LOTE N° DE TUBERCULINA,
tipo SATISFACE LAS CONDICIONES
ESTABLECIDAS EN EL SENASA.

_____ Nombre y apellido	_____ Firma y sello
----------------------------	------------------------

EL PROTOCOLO DEBE IR ACOMPAÑADO DE UN EJEMPLAR DE RÓTULO Y UNO DE FOLLETO, Y DE UNA COPIA DEL CERTIFICADO DE CIRCULACIÓN EXPEDIDO POR EL *SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA*, SI EL SERVICIO BIOLÓGICO SE DESTINA A LA EXPORTACIÓN.

Rótulo



Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

Dirección de Laboratorios y Control Técnico (DILAB)

Tuberculina DPP bovina

Concentración: 1 mg / mL

32500 UI / mL

Contenido: 5 mL

Conservación: 2 °C a 8 °C

Serie:

Fecha de Vto.:

Av. Alexander Fleming 1653 (1640) Martínez, Pcia. de Buenos Aires, República Argentina

IV. Bioseguridad en laboratorios microbiológicos

Estas áreas son un medio ambiente de trabajo que pueden significar riesgos de enfermedades infecciosas para las personas que se encuentran en ó cerca de los mismos.

La clasificación de Agentes etiológicos en base a riesgo, sirvió como referencia general para algunas actividades de laboratorio que implican el uso de agentes infecciosos.

El concepto de categorización de las bacterias que se manipulan y las actividades de laboratorio en cuatro clases ó niveles, permiten realizar recomendaciones sobre niveles de bioseguridad para agentes específicos en base al riesgo potencial del mismo y a la función del laboratorio ó actividad.

Estos principios son aplicables al control del *Mycobacterium bovis* transmitido principalmente por vía aerógena.

El término “contención” se usa para describir métodos seguros para el manejo de agentes infecciosos en el medio ambiente de laboratorio, donde están mantenidos.

El propósito de la “contención” es reducir ó eliminar la exposición de los trabajadores de laboratorio, otras personas y el medio ambiente exterior a agentes potencialmente riesgosos.

El elemento más importante de “contención” es la adherencia estricta a prácticas microbiológicas estándar.

Las personas que trabajan con agentes infecciosos ó materiales potencialmente infectantes deben estar en conocimiento de los riesgos potenciales y deben estar entrenados en las prácticas y técnicas requeridas para el manejo seguro de dicho material. La persona a cargo del laboratorio es responsable de proveer que el personal sea adecuadamente preparado.

Cada laboratorio debe desarrollar ó adoptar un manual de bioseguridad ú operativo que identifique los riesgos que serán ó podrán ser encontrados y que especifique prácticas y procedimientos designados para minimizar ó eliminar riesgos.

El personal debe ser advertido de riesgos especiales y se debe requerir del mismo que lea y siga las prácticas requeridas y procedimientos.

Un profesional entrenado y con conocimiento sobre técnicas de laboratorio apropiadas, procedimientos de seguridad y riesgos asociados con el manejo de agentes infecciosos debe dirigir las actividades del laboratorio.

Cuando las prácticas de laboratorio estándar no sean suficientes para controlar el riesgo asociado con un agente particular ó procedimiento de laboratorio, pueden ser necesarias medidas adicionales. El director del laboratorio es responsable de la selección de prácticas de seguridad adicionales

para el riesgo asociado con el agente ó procedimiento.

El personal de laboratorio, prácticas de seguridad y técnicas deben ser suplementadas con diseño apropiado de la instalación y características de arquitectura, equipo de seguridad y prácticas de manejo.

De acuerdo con lo señalado en la publicación: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (U.S. Department of Health and Human Services – Public Health Service – Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health – 3^{ra}. Edition – May 1993); las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* son un riesgo probado para el personal de laboratorio, así como para otros que puedan estar expuestos a aerosoles infecciosos en el laboratorio.

Los bacilos tuberculosos pueden sobrevivir en extendidos calentados-fijados y pueden estar presentes en aerosoles durante la preparación de secciones congeladas y la manipulación de cultivos líquidos, como es la producción de Tuberculinas D.P.P.

Precauciones recomendadas:

Las prácticas, equipo de contención e instalaciones del **Nivel de Bioseguridad 3** se requieren para las actividades de laboratorio que impliquen la propagación y manipulación de cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*.

El test cutáneo utilizando: Derivado Proteico Purificado (D.P.P.) de personal de laboratorio que dió anteriormente negativo a dicho test puede ser usado como un procedimiento de vigilancia.

El **Nivel de Bioseguridad 3** es aplicable a instalaciones clínicas, diagnósticas, de enseñanza, investigación ó producción en las cuales se trabaja con agentes locales ó exóticos que pueden causar enfermedad seria ó potencialmente letal como resultado de la exposición por inhalación.

El personal de laboratorio debe tener entrenamiento específico en manejo de agentes patogénicos ó potencialmente letales, y está supervisado por profesionales competentes que están experimentados en el trabajo con éstos agentes.

Todos los procedimientos que involucren la manipulación de materiales infecciosos son conducidos dentro de gabinetes de seguridad biológica ú otros elementos de contención física ó por personal que lleve ropa protectora y equipamiento adecuado.El laboratorio tendrá características especiales de ingeniería y diseño.

Las siguientes prácticas estándar y especiales de seguridad, equipo e instalaciones se aplican a agentes asignados al **Nivel de Bioseguridad 3**:

A. Prácticas Microbiológicas Estándar

- 1- El acceso al laboratorio es limitado ó restringido a discreción del director del laboratorio cuando estén realizando experimentos.
- 2- Las personas se lavan las manos luego de manejar materiales infecciosos y animales, luego de sacarse los guantes, y cuando dejan el laboratorio.
- 3- Comer, beber, fumar, manejar lentes de contacto, y aplicarse cosméticos no está permitido en el laboratorio. Las personas que usan lentes de contacto en laboratorios deben usar también protectores ó protección para la cara. La comida se conserva fuera del área de trabajo en gabinetes ó refrigeradores designados para ese propósito solamente.
- 4- El pipeteo con la boca está prohibido, se usan dispositivos mecánicos para pipetear.
- 5- Todos los procedimientos se realizan cuidadosamente para minimizar la creación de aerosoles.
- 6- Las superficies de trabajo son decontaminadas por lo menos una vez al día y luego de cualquier derrame de material viable.
- 7- Todos los cultivos, stocks, y otros desechos regulados son decontaminados antes de su eliminación por un método de decontaminación aprobado, como el autoclavado. Los materiales a ser decontaminados fuera de las inmediaciones del laboratorio son colocados en recipientes durables, a prueba de filtraciones y cerrados para su transporte desde el laboratorio.
- 8- Está en funcionamiento un programa de control de insectos y roedores.

B. Prácticas Especiales

- 1- Las puertas del laboratorio se mantienen cerradas cuando se están realizando actividades.
- 2- El director del laboratorio controla el acceso al mismo y restringe el acceso sólo a personas cuya presencia es requerida para programas de apoyo. Por ejemplo, las personas que están inmunocomprometidas ó inmunosuprimidas pueden estar en riesgo de adquirir infecciones. Las personas que están con mayor riesgo de adquirir infecciones ó para las cuales una infección puede ser inusualmente peligrosa no pueden estar en el laboratorio ó salas de animales. El director tiene la responsabilidad final para analizar cada circunstancia y determinar quien puede ingresar ó trabajar en el laboratorio.
- 3- El director del laboratorio establece las políticas y procedimientos por los cuales , sólo personas que han sido advertidas del potencial riesgo

biológico, que cumplimentan con cualquier requerimiento específico de ingreso (ej.: inmunización), y que cumplimentan con todos los procedimientos de ingreso y salida, pueden entrar al laboratorio ó salas de animales.

- 4- Cuando están presentes en el laboratorio ó módulo de contención materiales infecciosos ó animales infectados, se coloca en todas las puertas de acceso al laboratorio ó salas de los animales, un cartel de advertencia de riesgo por medio del símbolo universal de riesgo biológico. El mismo identifica al agente, y además el nombre y número telefónico del director del laboratorio ú otras personas responsables, así como cualquier requerimiento especial para el ingreso al laboratorio, como la necesidad de inmunizaciones, respiradores, y otras medidas de protección personal.
- 5- El personal del laboratorio recibe las inmunizaciones necesarias ó tests para los agentes manejados ó potencialmente presentes en el laboratorio (ej.: Vacuna para hepatitis B, test cutáneo de TBC).
- 6- Muestras de suero base de todo el personal del laboratorio y otros en riesgo son obtenidas y conservadas. Se pueden obtener muestras adicionales de suero periódicamente, dependiendo de los agentes manejados ó de la función del laboratorio.
- 7- Se prepara ó adopta un manual de Bioseguridad. El personal es advertido de la presencia de riesgos especiales y se requiere del mismo que lea y siga las instrucciones sobre prácticas y procedimientos.
- 8- El personal de laboratorio recibe entrenamiento apropiado sobre los peligros potenciales asociados con el trabajo involucrado. Las precauciones necesarias para prevenir exposiciones, y los procedimientos de evaluación de exposición. El personal recibe actualizaciones anuales ó entrenamiento adicional según sea necesario para cambios en procedimientos.
- 9- El director del laboratorio es responsable de asegurar que, antes de trabajar con organismos de **Nivel de Bioseguridad 3**, todo el personal demuestre proficiencia en prácticas microbiológicas estándar y técnicas, y en las prácticas y operaciones específicas a las instalaciones del laboratorio. Esto puede incluir experiencia previa en el manejo de patógenos humanos ó cultivos celulares, ó un programa de entrenamiento específico provisto por el director del laboratorio ú otro profesional competente en prácticas de laboratorio y técnicas microbiológicas seguras.
- 10- Se debe tener siempre un alto grado de precaución con cualquier elemento agudo contaminado, incluyendo agujas y jeringas, portaobjetos, pipetas, tubos capilares y bisturíes. Las agujas y jeringas ú otros instrumentos filosos deben estar restringidos en el laboratorio para ser

usados sólo cuando no hay alternativa, como en la inyección parenteral, flebotomía ó aspiración de fluidos de animales de laboratorio y botellas de cuello estrecho. El material de plástico debe ser sustituido por material de vidrio, siempre que sea posible.

a) Sólo se usan jeringas con agujas con cubierta ó unidades de aguja jeringa descartables (ej.: la aguja es parte integral de la jeringa) para inyección ó aspiración de materiales infecciosos.

Las agujas descartables no deben ser dobladas, cortadas, rotas, cubiertas nuevamente, extraídas de jeringas descartables ó manipuladas manualmente de cualquier otra forma antes de su eliminación, sino que, deben ser colocadas cuidadosamente en recipientes resistentes a los pinchazos ubicados en lugares apropiados para la eliminación de los elementos cortantes. Los elementos filosos no descartables deben colocarse en un recipiente de paredes duras, para transporte a un área de procesamiento, para su decontaminación, preferentemente por autoclave.

b) Deben usarse cuando sea conveniente jeringas provistas con aguja protegida, sistemas sin aguja ú otros dispositivos de seguridad.

c) El material de vidrio roto no debe ser manejado directamente con la mano, sino removido por elementos mecánicos como: cepillo, pinzas ó fórceps.

Los recipientes con agujas contaminadas, equipo filoso y vidrio roto deben ser decontaminados antes de su eliminación, de acuerdo a cualquier legislación local, estatal ó federal.

- 11- Todas las manipulaciones que involucren material infeccioso son realizadas en gabinetes de seguridad biológica ú otros dispositivos de contención física, dentro del módulo. No se realiza ningún trabajo con tubos, frascos abiertos, sin contención.
- 12- El equipo de laboratorio y las superficies de trabajo deben ser decontaminadas con el desinfectante apropiado en forma rutinaria, luego de trabajar con materiales infecciosos y especialmente luego de derrames evidentes, salpicaduras ú otra contaminación con materiales infecciosos. El equipo contaminado debe ser decontaminado antes de enviarlo a reparación ó mantenimiento ó embalado para transporte, de acuerdo con las legislaciones aplicables locales, estatales ó federales, antes de su remoción de las instalaciones. El uso de toallas de papel, con base plástica sobre superficies de trabajo no perforadas, dentro de los gabinetes de seguridad biológica, facilita la limpieza.
- 13- Los cultivos, tejidos ó muestras de fluidos corporales son colocados en un recipiente que prevenga la filtración durante la recolección, manejo, procesamiento, conservación, transporte ó envío.
- 14- Todos los materiales de desecho potencialmente contaminados (ej.:

- guantes, delantales, etc.) de los laboratorios ó salas de los animales son decontaminados antes de su eliminación ó de ser reusados.
- 15- Los derrames de materiales infecciosos son decontaminados, contenidos y limpiados por el personal profesional correspondiente ú otros adecuadamente entrenados y equipados para trabajar con material infeccioso concentrado.
 - 16- Los derrames y accidentes que resulten de exposiciones evidentes ó potenciales a materiales infecciosos son informados en forma inmediata al director del laboratorio. Se provee de evaluación médica apropiada, vigilancia y tratamiento y se mantienen registros por escrito.
 - 17- Los animales y plantas no relacionados con el trabajo que se está desarrollando no están permitidos en el laboratorio.

C. Equipo de Seguridad (Barreras Primarias)

- 1- Se usan gabinetes de seguridad biológica adecuadamente mantenidos (Clase II ó III) para toda manipulación de materiales infecciosos.
- 2- Fuera de un Gabinete de Seguridad Biológica, se usan combinaciones apropiadas de equipo de protección personal (ej.: ropa de protección especial, máscaras, guantes, protección para la cara ó respiradores), en combinación con elementos de contención física (ej.: vasos de seguridad para centrífugas, rotores para centrifuga sellados ó jaulas de contención para animales).
- 3- Este equipo debe ser usado para manipulaciones de cultivos y de aquellos materiales clínicos ó del medio ambiente que puedan ser una fuente de de aerosoles infecciosos, la descarga por aerosoles de animales experimentales, la cosecha de tejidos ó fluídos de animales infectados y huevos embrionados y la necropsia de animales infectados.
- 4- La protección facial (lentes protectores y máscaras ó protector facial) es usada para manipulaciones de materiales infecciosos fuera de un gabinete de seguridad biológico.
- 5- La protección respiratoria se usa cuando los aerosoles no pueden ser contenidos en forma segura y en habitaciones que contengan animales infecciosos.
- 6- La ropa protectora de laboratorio como camisolines con un frente sólido ó que se atan por atrás, ropa de cirugía ó mameluco deben ser usados en, y no fuera del laboratorio. La ropa de laboratorio reusable debe decontaminarse antes de enviarse a la lavandería.
- 7- Los guantes deben usarse cuando se manipulan animales infecciosos y cuando las manos puedan tocar materiales infecciosos y superficies ó equipo contaminado. Los guantes descartables deben eliminarse cuando se contaminan y nunca lavarlos ó reusarlos.

D. Instalaciones de Laboratorio (Barreras Secundarias)

- 1- El laboratorio está separado de áreas que estén abiertas a circulación irrestricta dentro del edificio. El requisito básico es el pasaje a través de dos puertas que cierren solas para ingresar al laboratorio a partir de los corredores de acceso ú otras áreas contiguas. Se puede incluir una habitación para cambio de ropas (ducha opcional) en la vía de pasaje.
- 2- Cada laboratorio contiene una pileta para lavado de manos. La misma se opera con el pie, codo ó automáticamente y está localizada cerca de la puerta de salida.
- 3- Las superficies interiores de paredes, pisos y cielorrasos son resistentes al agua de modo que puedan ser fácilmente higienizadas. Las penetraciones en éstas superficies están selladas ó se pueden sellar para facilitar la decontaminación.
- 4- Las mesadas son impermeables al agua y resistentes a ácidos, álcalis, solventes orgánicos ó calor moderado.
- 5- El mobiliario del laboratorio es sólido y los espacios entre mesadas, gabinetes y equipos son accesibles para la limpieza.
- 6- Las ventanas del laboratorio están cerradas y selladas.
- 7- Se dispone de un método para decontaminar todos los desechos del laboratorio, preferentemente dentro del laboratorio (ej.: autoclave, desinfección química, incineración ú otro método de decontaminación aprobado).
- 8- Se provee de un sistema de extracción de aire por cañerías. Este sistema crea un flujo de aire direccional desde las área "limpias" del laboratorio hacia las áreas "contaminadas". El aire extraído no es recirculado a ninguna otra área del edificio, y es eliminado hacia el exterior con filtración y otro tratamiento opcional. Lo extraído debe ser dispensado lejos de áreas ocupadas y tomas de aire. El personal del laboratorio debe verificar la dirección del flujo de aire (hacia el laboratorio) es la adecuada.
- 9- El sistema de extracción por filtros de Alta Eficiencia para filtración de partículas aéreas (HEPA) de los gabinetes de seguridad biológica Clase II ó III es descargado directamente al exterior ó a través del sistema de extracción de aire del edificio. Si el aire extraído a través de filtros HEPA de los gabinetes Clase II ó III será descargado al exterior a través del sistema de extracción de aire del edificio, está conectado a éste sistema de modo que evite cualquier interferencia con el balance de aire de los gabinetes ó del sistema de extracción del edificio (ej.: por unidad de conexión tipo dedal). El aire extraído de los gabinetes de seguridad biológica Clase II, puede ser recirculado dentro del la-

laboratorio si el gabinete es controlado y certificado por lo menos cada doce meses.

- 10- Centrífugas de flujo continuo ú otros equipos que puedan producir aerosoles son colocados en instalaciones que extraen el aire a través de filtros HEPA antes de que ingrese al laboratorio.
- 11- Las líneas de vacío están protegidas con trampas de desinfectante líquido y filtros HEPA ó su equivalente, los cuales son mantenidos en forma rutinaria y reemplazados en caso de ser necesario.
- 12- Se dispone del lavador de ojos, al alcance.

Información requerida para acceder a la seguridad de los biológicos veterinarios

1. Información básica del producto:

- a) Cepa (s) presentes en el producto
- b) Historia de la cepa (s)
- c) Manipulación de la cepa (s) (número de pasajes)
- d) Composición final del producto

2. Manufactura:

- a) Reseña de la producción:
- b) Materiales iniciales (referencia ó con certificación de calidad)
 - Materiales listados de la farmacopea
 - Origen del material biológico
 - Materiales de origen no biológico, no listado en la farmacopea
 - Preparación de medios artesanales

3. Aseguramiento de la calidad durante la producción

(Procedimiento del control de la calidad)

4. Control de los tests del producto terminado

- a) Descripción de los tests
- b) Resultados de los tests correspondientes a 3 series consecutivas.

5. Estabilidad/Plazos de vencimiento

- a) Condiciones de conservación
- b) Propuesta de plazos de vencimiento
- c) Justificación de las propuestas de los plazos de vencimiento en el producto terminado y en el producto reconstituido (si es aplicable).

V. Bibliografía

- Andersen, P.; Munk, M. E.; Pollock, J. M.; Doherty, T. M. Specific immune - based diagnosis of tuberculosis - The Lancet. Vol 356, September 23, 2000.
- Angus, R. D. (1978). Production of reference PPD tuberculins for veterinary use in the United States. J. Biol. Stand 6: 221.
- Bakker, D.; Egar, A.; Mcnair, J.; Riepema, K.; Willemsen, P. T. J.; Haagsma, J. van Zijderveld, F. G. and J. M. Pollock. Comparison of commercially available PPD's: practical considerations for diagnosis and control bovine tuberculosis – CIDC – Lelystad - Wageningen UR.
- Biosafety in Microbiological and Biochemical Laboratories. U.S. Department of Health and Human Services – Public Health and Human Services Center for Diseases Control and Prevention and National Institutes of Health. 3rd Edition. May 1993.
- Centro Panamericano de Zoonosis, Preparación y estandarización del Derivado Proteico Purificado (PPD) de la tuberculina, Nota Técnica N° 17, 1972.
- Code of Federal regulations. Animal and Animal Products. Parts 1 to 99. Revised as of January 1, 1992, pp. 522-523.
- Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos (1987). Anexo 1. Normas para las Tuberculinas (Normas para Sustancias Biológicas, N° 16). (Revisión de 1985). 36° Informe. Serie de Informes Técnicos 745 – pág. 33-63.
- Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos. 37° Informe. Serie de Informes Técnicos 760, pág. 20-21, Organización Mundial de la Salud, Ginebra 1987.
- Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos. 38° Informe. Serie de Informes Técnicos 771, pág. 21-22, Organización Mundial de la Salud, Ginebra 1988.
- Dobbelaer, R.; O'Reilly, L. M.; Genicot, A.; and Haagsma, J. (1983). The potency of bovine PPD tuberculins in guinea-pigs and tuberculous cattle. J. Biol. Stand. 11:213.
- Edwards, L. B.; Palmer, C. E. Epidemiologic Studies of Tuberculin Sensitivity. Am. H. Hyg. 68: 213-231, 1958.
- European Union. Directive 80/219, amending Directive 64/432, Annex B.
- Errico, F.; Kantor, I. N. de; Baltar, J.; Silva, M. and Millán, A. Comparison of the specificity of cervical and caudal fold tuberculin tests applied to bovines in Uruguay. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 8 (4), 1031-1038, 1989.
- Finney, D. J. (1964). Statistical Methods in Biological Assay, 2nd Ed. London: Charles Griffin. London, UK.
- Fisher, R.A.; Yates, F. Tablas Estadísticas. Ed. Española, Aguilar SA, Madrid, Año 1949.

- Francis, J.; Seiler, R. J.; Wilkie, I. W.; Boyle, D. O.; Lumsden, M. J.; Frost, A. J. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet. Rec.* 103: 420-435 (1978).
- Haagsma, J.; O'Reilly, L. M.; Dobbelaer, R.; and Murphy, T. M. (1984). A comparison of the relative potencies of various bovine PPD tuberculins in naturally infected tuberculous cattle. *J. Biol. Stand.* 10:273.
- Haagsma, J. (1993). Working paper on: Recent advances in the field of tuberculosis control and research. WHO Meeting on Zoonotic Tuberculosis with Particular Reference to *Mycobacterium bovis*. 15 November 1993, Geneva, Switzerland.
- Haagsma, J. & Angus, R. D. (1994). Tuberculin production. In *Mycobacterium bovis* infections in Humans and Animals. Steele, J. H. & Thoen, C. O., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Huitema, H. Tuberculosis in animals and man with attention to Reciprocal Transmission of Mycobacterial infections and the Successful Eradication of bovine tuberculosis in cattle in the Netherlands-Royal Netherlands Tuberculosis Association (KNCV).
- Huitema, H.; Haagsma, J. Requirements for tuberculin standards and evaluation of tuberculin. *Selected Papers*, 18: 85-91, 1978.
- IRAM 80059 - Norma Argentina - Clasificación de microorganismos infectantes por grupo de riesgo para humanos y animales y su relación con los niveles de bioseguridad según la actividad desarrollada - Primera edición 2000 -09 -01.
- Inwald, J.; Hinds, J.; Palmer Si; Dale, J.; Butcher, P., D.; Glyn Hewinson, R. and Gordon S., V Genomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains Use for Production of Purified Protein Derivative -*Journal of Clinical Microbiology* -p. 3929 - 3932, Vol. 41, No. 8, August 2003.
- Kantor, I. N. de; Barrera, L.; Nader, A.; Bernardelli, A.; Torrea, G. and Fliess, E. Assessment of the sensitivity and specificity of ELISA detection of mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. *J. Vet. Med.*, B34, 1987.
- Kantor, I. N. de; Odeón, A. C.; Steffan, P. E.; Auza, M. J.; Madrid, C. R. and Marchevsky, N. Sensitivity of the cervical and the caudal fold tuberculin tests with *Mycobacterium bovis* in infected cattle of Argentina. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 3 (1), 137-150, 1984.
- Konyha, L. D.; Himes, E. M. & Thoen, C. O. (1980). Bovine tuberculosis. In *Handbook Series in Zoonoses*. Steele, J. H., Stoenner, H. & Kaplan, W., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Kubica, G. P. (1984). Clinical microbiology. In *The Mycobacteria, a Source Book*, Part A. Kubica, G. P. & Wayne, L.G., eds. Marcel Dekker, New York, USA.
- Lesslie, I.W., Hebert, C. N., Burns, K. J., Mac Clancy, G. N., Donnelly, W. J. C. Comparison of the specificity of human and bovine tuberculin PPD

- for testing cattle. Vet. Rec. 96: 332-334 (1975).
- Long, D. A.; Miles, A. A.; Perry, W. L. M. The assay of tuberculin. Bull. Wld. Hlth. Org. 10: 989-1002, 1954.
 - Nader, A.; Kantor, I. N. de; Ritacco, V.; Augier, J. and Romain, F. Assessment of a PPD tuberculin produced from de BCG strain of *Mycobacterium bovis* for use in cattle. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 7 ("), 301-309, 1988.
 - Magnusson, M.; Guld, J.; Magnus, H.; Waaler, H. Diluents for stabilization of tuberculin. Bull. Wld. Hlth. Org. 19: 799-828, 1958.
 - Maxild, J.; Bentzon, M. W.; Moller, S.; and Zachariassen, P. (1976). Assay of different tuberculin products performed in guinea-pigs. J. Biol. Stand 4: 171.
 - OIE. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Chapter 3.2.3 Bovine Tuberculosis, pp. 267-275, 1996.
 - OIE. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (mamíferos, aves y abejas), capítulo 2.3.3. Tuberculosis bovina, pág. 489-502. Quinta Edición, 2004.
 - Organización Mundial de la Salud. Serie Inf. Téc. N° 384. Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos, 20 Informes 1968, pp. 23-42.
 - Roswurm, J. D.; Konyha, L. D. The comparative cervical tuberculin test as an aid to diagnosing bovine tuberculosis, presented at the Seventy-Seventh Annual Meeting, United States Health Association, Saint Louis, Miss., Oct. 17, 1973.
 - Roswurm, J. D.; de Kantor, I. N.; Marchevsky, N.; Spinelli, R., Spath, E. Sensibilidad de las pruebas tuberculínicas en ganado bovino con *Mycobacterium bovis*, en Argentina. Bol. Of. San. Pan. 86: 420-434 (1979).
 - Schneider, W.; Dobbelaer, R.; Daw, A. J.; Rees, W. H. G.; Lesslie, I. W. and Hebert, C. N. (1979). Collaboration assay of EEC standards for bovine tuberculins. J. Biol. Stand., 7, 53.
 - Seibert, F. B.; Glenn, G.T. Tuberculin purified derivative. Preparation and analysis of a large quantity for Standard. Amer. Rev. Tuberc. 44: 9-25, 1941.
 - Tameni, S.; Amadori, M.; Scaccaglia, P.; Quondam Giandomenico, R.; Tagliabue, S. Archetti, I. L.; Adone, R. and Franco Ciuchini. Quality Controls and *in vitro* Diagnostic Efficiency of Bovine PPD Tuberculin Article N° bg 980147- Biologicals 26, 225-235 (1998).
 - Trudeau Mycobacterial Culture Collection, Trudeau Institute Saranac Lake, New York, Mycobacterial Culture Collection, 1972.
 - WHO Expert Committee on Biological Standardization Requirements for Tuberculins (1968). Technical Report Series N° 384. Geneva, Switz.: World Health Organization.
 - WHO Expert. Comm. on Biol. Stand. 36 Report. WHO Tech. Rep. Ser. 1983, 687.

- WHO Expert. Comm. on Biol. Stand. 37 Report. WHO / BS / 86. 1518. Geneva 1987.
- WHO Expert. Comm. on Biol. Stand. 37 Report. WHO Report. WHO Tech. Rep. Ser. N° 760, Geneva, 1987.
- World Health Organization. Techn. Rep. Ser. N° 200. Requirements for Biological Substances, General Requirements for the Sterility of Biological Substances, 1960, pp. 13-21.
- World Health Organization. Techn. Rep. Ser. N° 323. Requirements for Biological Substances, 1966, pp. 13-22.
- World Health Organization. Techn. Rep. Ser. N° 530. WHO Expert Committee on Biological Standardization, 25th Report, 1973, pp. 49-53.
- Youmans, G. P. Tuberculosis – W. B. Saunders Company (1979), pp. 209 a 224.

VI. ANEXO

- **Medio de Stonebrink**

Solución de sales minerales:

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) p.a.	3,5 g
Fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) p.a.	2,0 g
Piruvato de sodio p.a.	6,25 g
Agua destilada c.s.p.	500 mL

Disolver, esterilizar en autoclave a 110°C, durante 15 minutos.

Suspensión de huevos enteros	1000 mL
------------------------------	---------

Solución acuosa de verde de malaquita al 2% p.a.	20 mL
--	-------

Procedimiento:

Los huevos se lavan con agua, detergente y cepillo uno por uno, se secan y se dejan en alcohol durante una hora.

Trasvasarlos de a uno en un erlenmeyer estéril que contenga perlas de vidrio, agitar enérgicamente al agregar cada huevo. Filtrar a través de un embudo de vidrio preparado con gasa estéril a un frasco Mariotte esterilizado. Agregar la solución de sales esterilizada y 20 ml de solución de verde de malaquita al 2% (esterilizada a 120°C durante 20 minutos). Agitar bien. Distribuir el medio en cantidades de aproximadamente 5 ml en tubos de tapa a rosca.

Dejar coagular en posición inclinada a 80°C durante 30 minutos.

Enfriar, colocar en posición vertical y conservar en cámara fría recubiertos de papel de aluminio.

- **Suspensión para realizar la sensibilización de cobayos destinados a la prueba de potencia biológica:**

Bacilos (cepa <i>Mycobacterium bovis</i> AN ₅ ó <i>Mycobacterium avium</i> D4 ER).	100 mg
Piedra pómez estéril.	100 mg
Vaselina estéril.	25 mL

En un mortero previamente esterilizado colocar los bacilos y la piedra pómez

mezclando y agregando lentamente la vaselina hasta producir la suspensión.

- **Buffer (Prueba de potencia pH isotónico 7,38)**

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) anhidro p.a.	1,45 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_4) anhidro p.a.	6,06 g
Cloruro de sodio (NaCl) p.a.	4,80
Agua destilada	1000 mL

Filtrar por papel y esterilizar a 121°C, durante 30 minutos.

- **Elementos trazas:**

Solución A:

Sulfato de zinc ($\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)p.a	20 g
Sulfato de cobre ($\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) p.a	2 g
Nitrato de cobalto [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]p.a	1 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver las drogas en el agua.

Envasar en frasco color caramelo.

Solución B:

Cloruro de calcio (Cl_2Ca anhidro) analar	50 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver las drogas en el agua.

Envasar. Conservar en heladera

- **Medio de caldo de carne glicerinado para la producción de semilla:**

Extracto de carne	5 g
Cloruro de sodio (NaCl) p.a.	5 g
Peptona Difco ó similar.	1,5 g
Glicerina p.a.	70 mL
Agua destilada	1000 mL

Disolver las drogas en agua caliente.

Agregar por litro de medio; Solución A: 1 ml y Solución B: 1 ml (elementos trazas).

Ajustar el pH con NaOH 1 Normal.

Esterilizar a 125°C – 130°C, durante 20 minutos, dejar enfriar. Filtrar por papel de filtro, envasar en erlenmeyer de 250 ml, colocando aproximadamente 80 ml de medio por cada uno.

Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

Preparar un litro de medio para cada serie de producción.

- **Acido tricloroacético al 40%**

Acido tricloroacético p.a.	2 kg
Agua destilada	5 L

No esterilizar.

- **Acido tricloroacético al 1%**

Volumen de solución de tricloroacético al 40%.	1 mL
Volúmenes de agua destilada	39 mL

Autoclavar a 120°C, 30 minutos.

- **Solución de cloruro de sodio al 5%**

Cloruro de sodio (Cl Na).	50 g
Agua destilada	1000 mL

Autoclavar a 120°C, durante 30 minutos.

- **Solvente alcalino (Huitema)**

Fosfato disódico ($\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.	17,8 g
Hidróxido de sodio (Na OH) p.a. al 45%	2 mL
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Esterilizar 1 hora a 100 °C.

- **Solución reguladora M / 3**

Fosfato disódico (PO_4HNa_2) p.a.	28,9 g
Fosfato monopotásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) p.a.	18,1 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Esterilizar 30 minutos a 120°C.

- **Solución antibacteriana (cinco veces concentrada)**

Cloruro de sodio (Cl Na) p.a.	25 g
Fenol p.a.	25 g
Glicerina p.a.	400 mL
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Calentar las drogas hasta disolución con agua. No autoclavar.

- **Solución diluyente del D.P.P. de Tuberculina**

Fenol p.a.	50 g
Cloruro de sodio (Cl Na) p.a.	50 g
Fosfato monopotásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) p.a.	18,1 g
Fosfato disódico (PO_4HNa_2) p.a.	28,4 g
Glicerina p.a.	800 mL
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Esterilizar 30 minutos a vapor fluente ó mediante placa esterilizante E.K.S. ó similar.

Reactivo del biuret

Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) p.a.	1,5 g
Tartrato de sodio y potasio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \text{KNa} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) p.a.	6,0 g
Solución de OHNa p.a. 1 Normal (OHNa 4%).	400 mL
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Disolver el sulfato de cobre y el tartrato de sodio y potasio en 200 mL de agua destilada.

Agregar lentamente y agitando la solución de hidróxido de sodio.

Trasvasar a un matraz aforado de 1000 mL y llevar a volumen con agua destilada. Conservar en un envase color caramelo y a 15°C.

Reactivo de Folin-Ciocalteus, conservar a 4°C: ver referencias en el frasco.

Solución de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) al 20%, mantener a 37°C para evitar la precipitación de la sal.

Medio de caldo de carne glicerinado

Extracto de carne (CAP-DIFCO)	5 g
Cloruro de sodio (Cl Na) p.a.	5 g
Peptona Difco ó similar.	15 g
Glicerina p.a.	70 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Disolver las drogas en agua caliente.

Agregar por litro de medio; Solución A: 1 mL y Solución B: 1 mL (soluciones de elementos trazas).

Ajustar a pH 7,2 a 7,4 con OHNa (1 Normal).

Esterilizar a 125°C – 130°C, durante 20 minutos, dejar enfriar. Filtrar por papel de filtro, envasar en erlenmeyer de 250 mL, colocando aproximadamente 80 mL de medio por cada uno.

Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

Preparar un litro de medio para cada serie de semilla.

- **Medio sintético de Dorset-Henley (modificado)**

1- L-asparagina (natural)	12,0 g
2- Fosfato monopotásico anhidro ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$)p.a.	1,08 g
3- Citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.	0,9 g
4- Sulfato de magnesio ($\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.	1,5 g
5- Citrato férrico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) p.a. escamas	0,3 g
6- Sulfato de zinc ($\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.	0,0267 g
7- Sulfato cúprico ($\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) p.a.	0,0267 g
8- Nitrato de cobalto Ca ($\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0013 g
9- Cloruro de calcio anhidro (Cl_2Ca) p.a.	0,0667 g
10- Glucosa (monohidrato de dextrosa) p.a.	10,0 g
11- Glicerina p.a.	100,0 g
Agua bidestilada c.s.p.	1000 mL

Una partida de 30 litros de medio se prepara de la siguiente forma: se disuelve la asparagina en 1 litro de agua (bidestilada) caliente. Se disuelve la glucosa en agua bidestilada (1 litro),.

Se transfieren ambas soluciones a un recipiente de gran capacidad, donde previamente se colocan 6 litros de agua. Agitar continuamente con una espátula. Los ítems 2, 3, 4 y 5 son disueltos en el orden dado en 500 mL de agua bidestilada caliente. Transferir al recipiente general, luego se agrega 2,400 mL de glicerina (3000 g), en pequeñas cantidades y con agitación continuada. Los ítems 6, 7, 8 y 9 son agregados en la forma de **soluciones de elementos trazas**. Para una cantidad de 30 litros de medio agregar 40 mL de cada solución A y B. Se agregan 28 mL de la solución hidróxido de potasio (OHK) al 50%. Finalmente se adiciona el resto de agua bidestilada y se continúa agitando durante 10 minutos más. La reacción del medio es controlada electrónicamente y si es necesario ajustar el pH a 6,8 se agregan 0,2 mL cada vez de la solución de hidróxido de potasio al 50%.

El medio es envasado en frascos de 2 litros, colocando 1 litro de medio por frasco. Se esteriliza en autoclave a 121°C (15 libras), durante 15 minutos.

Sacar rápidamente del autoclave, cuando la seguridad del mismo lo permite, para enfriar los frascos en poco tiempo, ya que el sobrecalentamiento produce la caramelización de la glucosa.

Nitrógeno estándar

Se preparan 4,716 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para 100 mL de agua destilada. Diluir 10 mL de esta solución stock en 100 mL cuando sea necesario, lo que dará una solución: 1 mL = 1 mg N.

Mezcla catalítica:

Sulfato de potasio (SO_4K_2)	100 g
Sulfato de cobre ($\text{SO}_4\text{Cu}, 5\text{H}_2\text{O}$)	10 g
Oxido de selenio (O_2Se)	5 g

Moler en un mortero.

Indicador de Conway:

Rojo de metilo p.a.	0,066 por ciento
Verde de bromocresol p.a.	0,033 por ciento

Disolver en alcohol etílico.

Puede usarse a las concentraciones de 0,5 a 2,0 por ciento por volumen.

Solución de ácido bórico:

Al 2% en agua destilada, con indicador de Conway incorporado a la concentración de 1% por volumen.

Solución estándar de ácido sulfúrico:

Acido sulfúrico (H_2SO_4) p.a.	25 mL
--	-------

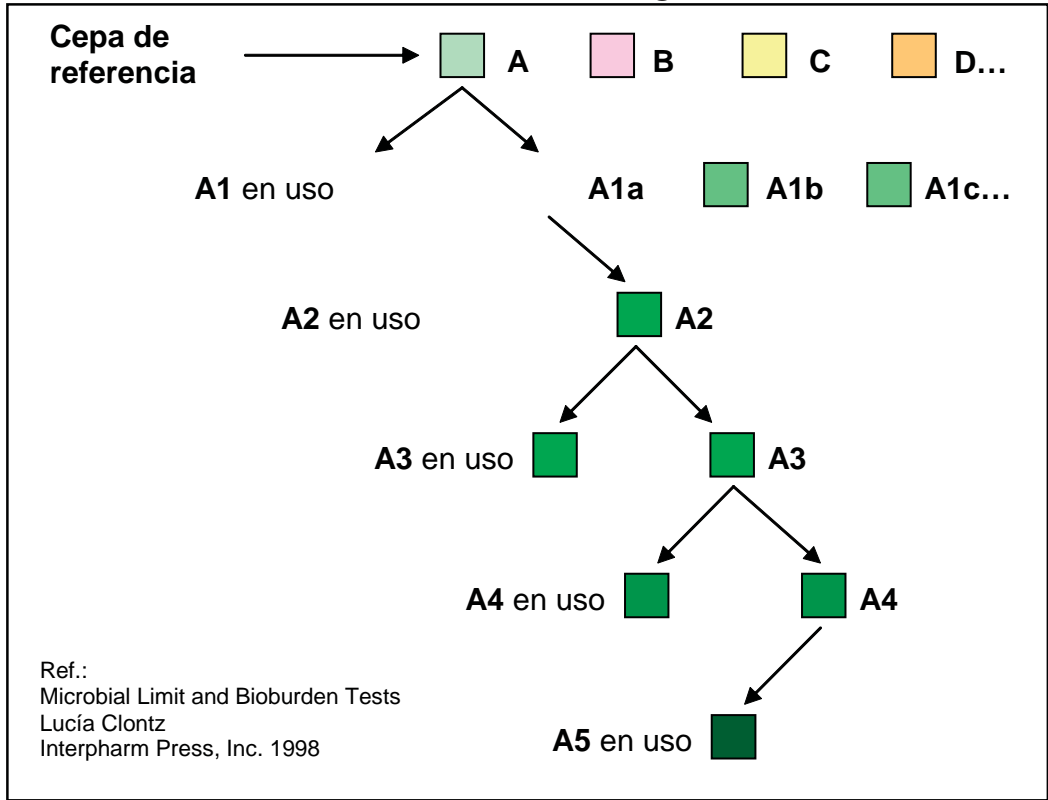
Preparar 10 litros con agua destilada.

Concentración = N / 11.2.

Control estándar BDH de OHNa y, si es necesario, ajuste exactamente a N / 11.2.

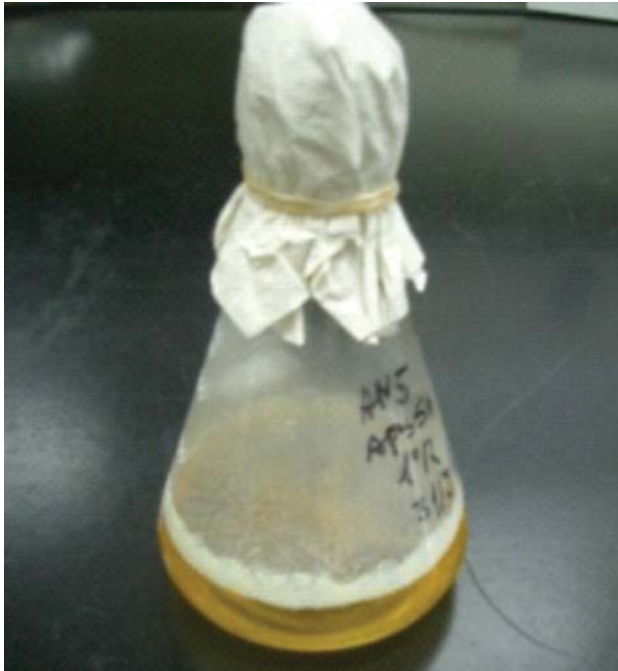
Diluya 10 mL de esta solución stock a 100 mL. cuando se necesite, dando una solución de concentración N / 11.2.

Conservación de microorganismos



Siembra de semilla.

*Cepa Mycobacterium bovis AN5
 Laboratorio de referencia en tuberculosis
 de la OIE-AFSSA-Francia.*



Cultivo de semilla de Mycobacterium bovis AN5.



Medio de cultivo de producción de Dorset-Henley.



Cultivo de producción con Mycobacterium bovis de PPD bovino.



Cultivo de producción de una serie de tuberculina PPD.



Precipitación proteica con ácido tricloroacético.



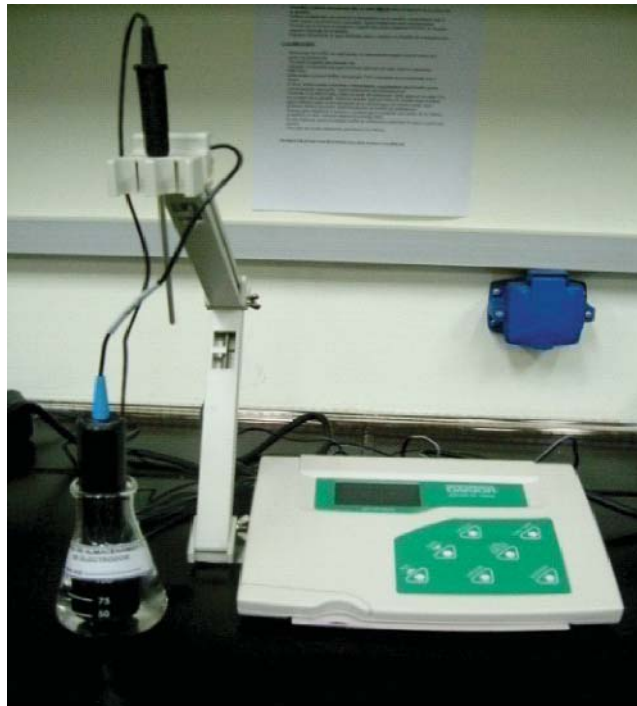
Centrifugación del precipitado proteico.



Ampolla del estándar internacional de tuberculina PPD bovina -NIBSC-UK.

Prueba de potencia en cobayos





*Peachímetro Oakton
Serie 510 - Entech Inst.*



*Microscopio Leica
DMLS.*



*Centrífuga Avanti
J-26XP Beckman
Coulter.*



*Espectrofotómetro
Lambda 25 -
Perkin Elmer.*



*Registro
Computación
DELL Optiplex 745
e impresora Epson
Stylus C87 Plus.*



**Coordinación de Prensa y
Comunicaciones Institucionales**

Av. Paseo Colón 367, Piso 10°,
contrafrente C1063ACD Ciudad de
Buenos Aires - República Argentina
Tel. 054 11 4121-5366/5368/5369
E-mail: cpci@senasa.gov.ar

Ciudad de Buenos Aires, abril de 2007



Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria