



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**"ESTERILIZACION Y CONSERVACION DE GAMMAGLOBULINAS  
PORCINAS MEDIANTE IRRADIACION GAMMA Co<sup>60</sup>"**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**BIBLIOTECA : UNAM**

## TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a

**RENE AVILA BEDOLLA**

**ASESORES:**

**M.V.Z. FERNANDO OLGUIN ROMERO**

**Q.B.P. BEATRIZ BENAVIDES DE UNZUETA**

**Q.F.B. MARIA VICTORIA GUSTI DE FERNANDEZ**

**MEXICO, D. F.**

**ENERO 1983**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

UNAM  
1983  
A527  
ej. b  
P-t-83-11b

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# TESTES PROFESIONALES

DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
EXACTAS Y INGENIERÍA

EXAMEN DE INGENIERÍA  
EN ELECTRICIDAD

SECCION DE INGENIERIA EN ELECTRICIDAD  
EXAMEN DE INGENIERIA EN ELECTRICIDAD  
MATERIA DE ELECTRICIDAD

Este trabajo fué realizado en el Departamento de Virología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., y en el Centro de Estudios Nucleares (C.E.N.) - de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## INDICE

|                         | Pág. |
|-------------------------|------|
| I. RESUMEN              | 1    |
| II. INTRODUCCION        | 3    |
| III. MATERIAL Y METODOS | 6    |
| IV. RESULTADOS          | 12   |
| V. DISCUSION            | 18   |
| VI. CONCLUSIONES        | 23   |
| VII. BIBLIOGRAFIA       | 24   |

R E S U M E N

## I. RESUMEN

Se utilizaron 3 cerdos de 70 kg. que fueron inmunizados contra cólera porcino para la obtención de suero hiperinmune completo contra cólera porcino (S.H.C.C.P.), una parte del SHCCP se esterilizó a presión positiva con un filtro Zeitz de 450 A° y se conservó como SHCCP congelado a -20°C, el resto se fraccionó por precipitación con sulfato de amonio para la obtención de gammaglobulinas para después ser envasadas en recipientes de 50 ml., la mitad de estas se conservaron en congelación a -20°C como gammaglobulinas sin irradiar, el resto de estas fueron irradiadas en congelación y mantenidas en un baño con hielo recibiendo dosis de 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 y 2.50 megarad (Mrad.).

El SHCCP, las gammaglobulinas irradiadas y sin irradiar fueron sometidas a las siguientes pruebas:

- a) Determinación de proteínas (mg/100 ml.) por la prueba de Biuret
- b) Análisis electroforético antes y después de la irradiación para evaluar su comportamiento.
- c) Examen microbiológico, para crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios, hongos y levaduras, se sembró en los medios de cultivo tradicionales de caldo triptosa, agar triptosa, tioglicolato y saboureaud determinado así, la dosis mínima adecuada de radiación esterilizante.

- d) Prueba biológica para evaluar los cambios en sus propiedades biológicas y de potencia en cada una de las muestras, fueron inoculados 16 lechones susceptibles a cólera porcino y 160 botellas de cultivo primario monoestratificado de células renales porcinas, como sistemas indicadores.
- e) Detección del virus neutralizado de cólera porcino en cultivos celulares mediante la prueba de hemoadsorción pasiva, como sistema indicador.

La radiación gamma Co.<sup>60</sup> no alteró sus características físicas y biológicas de las gammaglobulinas porcinas, resultando un valioso auxiliar para la esterilización de suspensiones de proteínas que pueden ser alteradas fácilmente por los métodos tradicionales en uso de esterilización.

## II. INTRODUCCION

Los animales domésticos, al contacto con el medio ambiente, comienzan a ser invadidos por gérmenes que llegan a vivir en ellos sin causar problemas, constituyendo la flora normal (10). Sin embargo, en muchas ocasiones los microorganismos pueden ser patógenos; es cuando los animales reaccionan estableciendo un mecanismo que tratará de equilibrar las propiedades del agente invasor para que no ocasione daño al hospedador (14,22).

En los vertebrados se ha observado que un complejo de proteínas al que se le conoce como inmunoglobulinas, confiere inmunidad contra ciertos microorganismos patógenos (29,30).

Las inmunoglobulinas pueden obtenerse del suero sanguíneo de animales inmunes y aplicarse a otros animales como un medio de prevención de enfermedades infecciosas. A este mecanismo se le conoce como seroterapia (2,22,23,31,36,37) pero requiere de la obtención de las inmunoglobulinas en grandes cantidades en forma estéril y que se conserven inalteradas durante el mayor tiempo posible (5).

La producción de sueros para uso terapéutico requiere de un estricto control de calidad para evitar la contaminación en el laboratorio por bacterias, hongos o virus (5,41,42) y a veces la eliminación de posibles contaminantes microbianos que pudieran estar presentes en el animal donador de las inmunoglobulinas (20).

Las técnicas utilizadas para lograr la esterilización de los sueros hiperinmunes son difíciles y costosas y frecuentemente, durante el proceso de preparación, presentan puntos débiles en donde es posible que haya contaminación (21).

El método moderno, de mayor impacto y con más ventajas en la eliminación de contaminantes es la irradiación (1,11).

El uso de las radiaciones electromagnéticas para la destrucción de microorganismos se empezó a estudiar un poco después de descubrir los rayos X por Roentgen en 1895 y la radioactividad por Bequerel en 1896 (7).

La resistencia de un microorganismo a la radiación muestra un paralelismo con la resistencia al calor, así las esporas bacterianas son más resistentes; las bacterias gram negativas son las más sensibles, las levaduras y los hongos tienen una resistencia intermedia (27).

Dentro de las radiaciones se sabe que los rayos Gamma tienen mayor poder penetrante y por lo tanto son los más efectivos para inactivar a los microorganismos (1,19).

Las ventajas más importantes de la radiación son:

- a) Que se pueden aplicar a través de cualquier tipo de material y tamaño de contenedor (1,14).
- b) Que a la dosis mínima adecuada no hay desnaturalización ni coagulación de proteínas en comparación con los otros procesos de -

conservación y esterilización, como la ebullición y tindaliza--  
ción, calor seco, calor a presión, etc. (14).

- e) Que es económico comparándolo con los métodos tradicionales an--  
tes mencionados (1,38).

Las suspensiones de globulinas inmunes se han utilizado con gran frecuen--  
cia en el área médica, en la seroterapia de las enfermedades causadas por  
venenos o toxinas, disgamaglobulinemia y en algunos casos específicos -  
para prevenir sensibilizaciones (16,17,18).

En su uso como reactivo biológico, han sido utilizados para -  
montar un sin número de pruebas inmunodiagnósticas (43), dada su capaci--  
dad de combinarse específicamente con su determinante antigénico, se le -  
ha utilizado en la purificación de numerosas moléculas (8).

Estos sueros "diagnósticos" deben también prepararse con gran  
cuidado y estar libres de contaminación microbiana (41,42).

El propósito de este trabajo fué esterilizar inmunoglobulinas  
porcinas para uso terapéutico y de diagnóstico mediante la técnica de --  
irradiación Gamma Co.<sup>60</sup>, y determinar si las inmunoglobulinas no pierden  
sus propiedades físicas y biológicas después de haber sido sometidas a --  
dicho procedimiento.

MATERIAL Y METODOS

### III. MATERIAL Y METODOS

#### Material Biológico

- 16 lechones sanos de 6 a 8 semanas de edad, susceptibles a cólera porcino.
- 3 cerdos machos castrados, de 70 Kg. de peso.
- 160 botellas de 100 ml conteniendo cultivo primario monoestratificado de células renales porcinas.
- Vacuna comercial contra el cólera porcino cepa PAV 250 virus vivo modificado (VVM) en cultivo de tejidos de Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE) de la SARH.
- Virus virulento de cólera porcino cepa AMES (cepa de exposición).
- 1 riñón obtenido asépticamente de un cerdo sano de 6 semanas de edad.
- Medios de cultivo bacteriológico

#### Métodos:

##### Obtención de gammaglobulinas

Los 3 cerdos de 70 Kg. se mantuvieron en aislamiento durante 34 días, tiempo durante el cual recibieron 4 estímulos antigénicos de la vacuna comercial contra cólera porcino cepa PAV 250 VVM en cultivo de tejidos, la cantidad de inóculo inyectado fué de 2 ml. administrado intramuscularmente (I.M.) en el cuello, los días 0, 5, 8 y 15. El día 24 fueron expuestos al virus virulento de cólera porcino cepa AMES y después -

de este tiempo se mantuvieron en observación durante 14 días eliminándose todo aquel animal que presentó algún signo de la enfermedad. A los 16 días postexposición, se sacrificaron colectándose la sangre asépticamente. Una vez colectada, se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos separándose después los coágulos de las paredes del recipiente. Una vez hecho esto se refrigeraron a 7°C durante 24 horas y posteriormente -- se decantó el suero obtenido y se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 20 minutos.

El suero centrifugado se depositó en frascos color ambar de 250 ml. uno de estos frascos se conservó como Suero Hiperinmune Completo contra cólera porcino (S.H.C.C.P.), manteniéndose en congelación a -20°C.

El resto del suero se fraccionó para separar la fracción -- gammaglobulina, por el método de precipitación con sulfato de amonio al 100 y 90% de concentración, técnica descrita por Kendall (24).

Después se procedió a la eliminación del exceso de sulfato de amonio por diálisis con solución salina al 0.85%. Finalmente, se comprobó la total eliminación del sulfato de amonio agregando a un volumen del agua utilizada para la diálisis un volumen igual de una solución saturada de cloruro de bario.

Para determinar la concentración de proteínas en cada muestra expresada en miligramos por mililitro, se le practicó la prueba de Biuret a las muestras de suero completo hiperinmune y gammaglobulinas contra -- cólera porcino (4).

### Irradiación

La mitad de las globulinas se sometieron a irradiación gamma para su esterilización en un "Gammabeam" 650 tipo IR-31, con una razón - de dosis de 1.2 Megarad por hora (Mrad/h.).

Alícuotas de ellas contenidas en frascos ámbar de 50 ml. con volumen de 10 ml., fueron sometidas a irradiación a dosis de 1, 1.25, - 1.50, 1.75 y 2.0 Mrad., para determinar la dosis mínima adecuada de radiación esterilizante. Después de irradiada cada muestra, se sembró - para determinación de aerobios, anaerobios, hongos y levaduras en los -- medios de cultivo tradicionales: caldo triptosa, agar triptosa, tioglicolato y saboureaud (28,30); la segunda mitad de la suspensión de gammaglobulinas se conservó en congelación a -20°C hasta su uso posterior.

### Electroforesis

Una vez que las 3 muestras quedaron listas (S.H.C.C.P., gamma globulinas sin irradiar y gammaglobulinas irradiadas) se llevó a cabo una electroforesis con acetato de celulosa siguiendo la técnica de Gellman -- (3,20,29,34), para determinar sus propiedades como componentes del suero sanguíneo porcino y comparar su comportamiento electroforético con las -- mismas fracciones antes de la irradiación.

### Pruebas Biológicas

El suero completo se esterilizó por filtración con presión -- positiva con un filtro ZEITS de 450 A' y se conservó congelado a -20°C --

hasta su uso posterior, el suero hiperinmune completo y las fracciones gammaglobulinas irradiadas y sin irradiar se utilizaron en las pruebas de seroneutralización con lechones y con células renales porcinas en -- cultivo primario como indicadores.

a) Seroneutralización con lechones

La prueba fué descrita por Torrey et al. (35,40), y consiste en mezclar 2 ml. de virus virulento de cólera porcino (Cepa AMES contenida en sangre completa de cerdo enfermo, colectada entre el sexto y octavo día de la enfermedad), con suero hiperinmune o gammaglobulinas -- sin diluir.

La mezcla después de media hora de incubación a 37°C se inoculó a cerdos susceptibles que se observaron durante 14 días.

En este trabajo se mezclaron 2 ml. de virus virulento de -- cólera porcino con 10 a 12 ml. de suero hiperinmune o suspensión gamma-- globulinica irradiada y sin irradiar; la cantidad de suero o gammaglobulina variaba a la dosis de 1 ml. por kg. de peso del lechón. Se inocu-- laron dos lechones con la mezcla de virus más S.H.C.C.P., 2 animales con la mezcla gammaglobulina sin irradiar más virus, 2 animales con cada una de las suspensiones de gammaglobulinas irradiadas a 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 y 2.00 Mrad. y 2 con la mezcla virus más sol. de balanceada Hanks, que -- sirvió como testigo.

Los animales se mantuvieron en aislamientos y se observaron durante 14 días posteriores a la inoculación aplicándoseles el siguiente

sistema de puntuación para las observaciones clínicas:

0 puntos sí el animal permanecía normal y comía su ración completa.

1 punto sí el animal estaba deprimido y con ligera anorexia.

2 puntos sí el animal no comía, permanecía echado e indiferente.

3 puntos sí había diarrea, convulsiones y caminar vacilante, depresión profunda y completa anorexia.

M muerte

El criterio de interpretación de la prueba fué el mismo que el señalado por Terry col. (35,40).

b) Prueba de seroneutralización en cultivo celular

Se procedió a la implantación de un monoestrato primario de células renales porcinas según la técnica descrita por Cuningham (9). - Una vez que los cultivos celulares estuvieron listos en 5 a 7 días, se procedió a la dilución cuádruple del S.H.C.C.P., la fracción gammaglobulina sin irradiar y las fracciones gammaglobulínicas irradiadas a las dosis de 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 y 2.00 Mrd.

Las diluciones fueron de 1:4 a 1:1024 en solución balanceada de Hanks, en un volumen de 1 ml.. A cada una de las diluciones se le añadió un volumen igual (1 ml.) de virus de cólera porcino titulado a 100 Unidades Infectantes cultivo de tejido/ml.\*

---

\*Proporcionado por el Laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Virología e Inmunología de la F.M.V.Z.

Las mezclas se incubaron durante 30 minutos a 37°C en la obs  
curidad y posteriormente se inocularon 4 botellas de Monoestrato de célu  
las renales por dilución de suero o de fracción globulínica.

Una serie de botellas fueron inoculadas con la mezcla solu--  
ción balanceada de Hanks y virus, y sirvió como testigo.

La neutralización del virus se detectó por la prueba de Hemo--  
adsorción pasiva en cultivos celulares (32)\*\*.

c) Detección del virus neutralizado de cólera porcino en cultivos celu--  
lares mediante la prueba de hemoadsorción pasiva

Antisueros conocidos contra cólera porcino se adhirieron a --  
glóbulos rojos tanizados de bovino y posteriormente, después de 5 días de  
incubación, se añadieron a los cultivos celulares inoculados con las mez-  
clas de virus más S.H.C.C.P., o gammaglobulinas irradiadas y sin irradiar.

En los lugares del cultivo donde se multiplicó el virus de --  
cólera debería haber hemoadsorción, si el virus se neutralizara no crece--  
ría en el cultivo celular y no habría hemoadsorción.

---

\*\* Prueba para Diagnóstico de Cólera porcino diseñada por el Laborato--  
rio de Virología e Inmunología de la F.M.V.Z.

RESULTADOS

#### IV. RESULTADOS

Los cerdos inmunizados contra cólera porcino resistieron la exposición del virus virulento después de 16 días de observación y fueron sacrificados por electroshock con sangría total y la mitad de su suero sanguíneo se fraccionó con sulfato de amonio para obtener la fracción --gamaglobulinica.

La prueba de Biuret reveló que el S.H.C.C.P. tuvo 7.75 mg./100 ml. de proteína y la fracción globulinica 1.82 mg./100 ml. de proteína respectivamente (Ver cuadro # 1).

La prueba de irradiación se hizo en dos ocasiones, la primera vez las muestras de gamaglobulinas se encontraban a temperatura ambiente (21°C) y recibieron irradiación durante 98.04 minutos, permanecieron dentro del local de una temperatura mayor de 6-°C, lo que provocó la coagulación de las proteínas.

En la segunda ocasión las muestras estaban a 0°C cuando se sometieron a diferentes dosis de irradiación durante diferentes tiempos (39.21 a 98.04 minutos) Cuadro # 2.

Los resultados para probar si habían eliminado todos los microorganismos se muestran en el Cuadro # 2.

En un primer ensayo se irradiaron dos muestras, una a 2 Mrad. y la segunda a 1 Mrd., esta última no quedó estéril ya que hubo crecimiento microbiológico.

CUADRO # 1

PRUEBA DE BIURET PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE PROTEINA

| S.H.C.C.P.                  | 7.75 | mg/100 | ml. de<br>proteína |
|-----------------------------|------|--------|--------------------|
| Gammaglobulina sin irradiar | 1.82 | "      | "                  |
| Gammaglobulina 1.00 Mrad.   | 1.63 | "      | "                  |
| Gammaglobulina 1.25 Mrad.   | 1.65 | "      | "                  |
| Gammaglobulina 1.50 Mrad.   | 1.56 | "      | "                  |
| Gammaglobulina 1.75 Mrad.   | 1.53 | "      | "                  |
| Gammaglobulina 2.00 Mrad.   | 1.50 | "      | "                  |
| Gammaglobulina 2.50 Mrad.   | 1.47 | "      | "                  |
| Control                     | 7.0  | mg/100 | "                  |

CUADRO # 2

PRUEBAS DE IRRADIACION DE SUSPENSIONES DE GAMMAGLOBULINAS

| Presentación   | Dosis de irradiación<br>Megarad (Mrad) | Tiempo de exposición<br>(minutos)* | Resultados  |               |                       |            |                       |
|--|--|------------------------------------|---|---------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|  |  |                                    | Aspecto físico después<br>de irradiación a  |               | Ensayo microbiológico |            | Hongos y<br>levaduras |
|  |  |                                    | 21 C  | 0 C           | Aerobios              | Anaerobios |                       |
| -<br>14<br>Fracos ambar<br>de 50 ml con<br>10 ml. de la<br>suspensión de<br>gammaglobulina | 1.00                                   | 39.21                              | Las suspensio-<br>nes se coagu-<br>laron ya que<br>la temperatu-<br>ra subió has-<br>ta 60 C. | Todas las --  | + +                   | + +        | + +                   |
|  | 1.25                                   | 49.02                              |   | suspensiones  | --                    | --         | --                    |
|  | 1.50                                   | 58.82                              |   | permanecieron | --                    | --         | --                    |
|  | 1.75                                   | 68.63                              |   | sin altera--  | --                    | --         | --                    |
|  | 2.00                                   | 78.43                              |   | ción física   | --                    | --         | --                    |
|  | 2.50                                   | 98.04                              |   | aparente.     | --                    | --         | --                    |

En el segundo ensayo se trató de establecer la dosis mínima de irradiación entre 1 y 2 Mrd que produjera esterilidad completa irradiándose muestras a 1.25, 1.50 y 1.75 Mrad., en donde con la primera dosis de irradiación las gammaglobulins quedaron estériles microbiológicamente.

En las pruebas de electroforesis, se observó que las fracciones gammaglobulínicas sin irradiar e irradiadas e incluyendo aquellas -- que recibieron las dosis más altas (2.5 Mrd.) mostraron un patrón electroforético semejante.

Los resultados de las pruebas biológicas de seroneutralización en lechones y cultivo celular se resumen en los cuadros 3 y 4. En ellos se puede observar que el comportamiento del suero hiperinmune, las fracciones gammaglobulínicas irradiadas y sin irradiar fueron semejantes.

CUADRO # 3

Prueba biológica

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION DEL VIRUS VIRULENTO DE COLERA PORCINO CON S.H.C.C.P. Y FRACCION GAMMAGLOBULINICA IRRADIADA Y SIN IRRADIAR UTILIZANDO LECHONES COMO SISTEMA INDICADOR

(Se utilizaron 2 lechones por muestra)

| Inóculo: mezcla de virus* más:        | Puntos acumulados por cada animal durante los días post-inoculación** |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |
|---------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|
|                                       | Días 1  | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| S.H.C.C.P.                            | 0   | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | M |    |    |    |    |    |
|                                       | 0   | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | M  |    |    |    |    |
| Gammaglobulina sin irradiar           | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | M  |    |    |    |    |
|                                       | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 3 | M  |    |    |    |    |
| Gammaglobulina irradiada a 1.00 Mrad. | 0   | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | M  |    |    |    |    |
|                                       | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | M |    |    |    |    |    |
| Gammaglobulina irradiada a 1.25 Mrad. | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 2 | 3 | M  |    |    |    |    |
|                                       | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3  | M  |    |    |    |
| Gammaglobulina irradiada a 1.50 Mrad. | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3  | M  |    |    |    |
|                                       | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 3 | M  |    |    |    |    |
| Gammaglobulina irradiada a 1.75 Mrad. | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3  | M  |    |    |    |
|                                       | 0   | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3  | M  |    |    |    |
| Gammaglobulina irradiada a 2.00 Mrad. | 0   | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | M  |    |    |    |    |
|                                       | 0   | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | M |    |    |    |    |    |
| Solución de Hanks                     | 0   | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | M  |    |    |    |    |
|                                       | 0   | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | M |    |    |    |    |    |

\* 2 ml de virus virulento cepa Ames más 10 a 12 ml de suero o fracción gammaglobulinica.

\*\* Los puntos asignados durante la observación corresponden a la prueba del departamento de agricultura de los E.U.A. Torrey 1958.

CUADRO # 4

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE NEUTRALIZACION DEL VIRUS DE COLERA PORCINO CON S.H.C.C.P. Y FRACCION GAMMAGLOBULINICA IRRADIADA Y SIN IRRADIAR UTILIZANDO CULTIVO CELULAR COMO SISTEMA INDICADOR (Cultivo primario monoestratificado de células renales porcinas)

| Mezcla de virus* más:                 | Presencia de hemoadsorción pasiva a las diluciones* |      |      |       |        |
|---------------------------------------|---|------|------|-------|--------|
|                                       | 1:4   | 1:16 | 1:64 | 1:256 | 1:1024 |
| S.H.C.C.P.                            | 0/4   | 0/4  | 0/4  | 0/4   | 0/4    |
| Gammaglobulina s/irradiar             | 0/4   | 0/4  | 0/4  | 0/4   | 0/4    |
| Gammaglobulina irradiada a 1.00 Mrad. | 0/4   | 0/4  | 0/4  | 0/4   | 0/4    |
| Gammaglobulina irradiada a 1.25 Mrad. | 0/4   | 0/4  | 0/4  | 0/4   | 0/4    |
| Gammaglobulina irradiada a 1.50 Mrad. | 0/4   | 0/4  | 0/4  | 0/4   | 0/4    |
| Gammaglobulina irradiada a 1.75 Mrad. | 0/4   | 0/4  | 0/4  | 0/4   | 0/4    |
| Gammaglobulina irradiada a 2.00 Mrad. | 0/4   | 0/4  | 0/4  | 0/4   | 0/4    |
| Solución de Hanks                     | 0/4   | 0/4  | 0/4  | 0/4   | 0/4    |

\* 100 Unidades infectantes en cultivo de tejido en 1 ml. mezclado

\*\* El denominador indica el número de botellas con cultivo celular inoculadas y el

DISCUSSION

## V. DISCUSION

Los resultados de este trabajo confirman los hallazgos de -- otros investigadores en el sentido de que la aplicación de radiaciones -- gamma con fines de esterilización, sobre suspensiones de proteínas, produce la esterilización microbiológica de la suspensión sin alteración -- física y biológica de las proteínas (5,21).

No fue posible obtener crecimiento microbiológico en los medios utilizados con las suspensiones de gammaglobulinas irradiadas a -- 1.25 hasta 2.00 Mrad. sin embargo si se obtuvo crecimiento de levaduras cuando las suspensiones fueron irradiadas con 1.0 Mrad.

La dosis mínima de irradiación para obtener esterilidad en -- este caso fue de 1.25 Mrad.

El patrón de migración electroforética de las muestras de -- gammaglobulinas demostró que la irradiación aún a la dosis de 2.5 Mrad. durante 98.04 minutos no alteró la estructura molecular ni la carga iso-eléctrica de la misma (20,24).

Ya se señaló que en un primer ensayo las muestras que se sometieron a irradiación en el Gammabeam 650 tipo IR-31 se coagularon posiblemente por la exposición a un calor excesivo. ( de 60°C) durante un tiempo prolongado.

En los ensayos siguientes las muestras de gammaglobulinas se irradiaron congeladas y en un recipiente con hielo y después del tiempo

de exposición las muestras estaban descongeladas a una temperatura aproximada de 4°C y su estructura molecular no se alteró según se demostró - por el patrón de migración electroforético (20,24).

Las pruebas de seroneutralización con cerdos susceptibles y - cultivo celular como sistemas indicadores, se escogieron para demostrar cambios en las propiedades biológicas de las gammaglobulinas.

La prueba de Torrey (40) que utiliza lechones es de las más objetivas que se han diseñado para probar la efectividad de los sueros - hiperinmunes contra el cólera porcino. La diferencia fundamental con - otras pruebas es que en estas últimas únicamente se toma en considera--- ción la sobrevivencia de los animales después de 14 días de observación y la prueba de Torrey (40) toma en consideración la reacción de los animales al virus no neutralizado por el suero y el estado general en que - quedan los sujetos experimentales después del tiempo de observación.

Las pruebas convencionales consideran aceptables a un suero hiperinmune contra el cólera porcino cuando logra la sobrevivencia del - 80% de los animales probados durante 14 días de observación (5,12), sin tomar en consideración el estado de salud en que quedan después de la ex posición.

La prueba utilizada en este trabajo considera que un buen -- suero hiperinmune contra cólera porcino no solo debe de lograr la sobrevivencia del 80% de los sujetos experimentales sino que, el 80% de estos sobrevivientes deben demostrar reacciones ligeras, ya que los animales -

que muestran reacciones graves (acumulación hasta de 20 puntos durante la observación) pueden morir posteriormente y/o convertirse en diseminadores del virus durante un tiempo que a veces se ha comprobado hasta de 120 días (15).

Además, los animales con reacción grave y que sobrevivan -- tardan siempre más de un mes en empezar a ganar peso normalmente (15). - La prueba de neutralización del virus con cultivo celular, sistema indicador es muy reciente y fue diseñado en el Departamento de Virología e - Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia y su discusión se presenta ampliamente en la tesis profesional de Monrroy Ybarra (32).

Sus ventajas son obvias ya que resultará mucho más económico y sensible que la prueba con animales. En este trabajo se puede constatar lo que otros investigadores han señalado a acerca de los sueros hiperinmunes contra cólera porcino que requieren de títulos muy altos para poder neutralizar la dosis mínima de virus virulento contenido en 2 ml. de sangre de cerdo en estado de viremia (5,12,15).

El suero que se preparó no alcanzó el título suficiente para neutralizar dicha cantidad de virus y todos los animales inoculados con la mezcla virus más suero hiperinmune completo y las fracciones gammaglobulínicas irradiadas, murieron entre 9 y 11 días postinoculación.

El uso de la radiación gamma para la esterilización y conservación de suspensiones de anticuerpos cuando estos son expuestos a las -

emisiones radioactivas durante el tiempo y la dosis adecuada presentan grandes ventajas en relación a otros medios físicos de esterilización, ya que, como se demostró en este trabajo, la destrucción de los microorganismos probablemente por destrucción de los ácidos nucleicos tiene lugar antes de que se alteren las estructuras de las proteínas.

La irradiación se puede aplicar a través de cualquier tipo de material que contengan la suspensión protéica y permanecerá estéril mientras el contenedor se conserve cerrado herméticamente (1). Los materiales irradiados con irradiación gamma no se tornan radioactivos (1).

Se observó que muestras de gammaglobulinas sometidas a irradiación a temperatura de 0°C, se esterilizaron microbiológicamente sin alterarse sus propiedades electroforéticas. La migración de las moléculas protéicas en un campo eléctrico, depende de su estructura y de su carga eléctrica, por tal razón la técnica de electroforesis se utiliza rutinariamente para analizar mezclas de proteínas como es el caso de sueros y plasmas (35,39).

En este trabajo las suspensiones del suero hiperinmune completo y sus fracciones gammaglobulínicas tuvieron un comportamiento semejante, antes y después de la irradiación gamma, cuando se sometieron a la electroforesis lo que indica que su estructura permaneció, sin alteración como consecuencia de la irradiación. Por otra parte no se observaron reacciones adversas en los indicadores biológicos (lechones y células renales de cerdo) que pudieran atribuirse al contacto con gammaglobulinas irradiadas lo que indica que el procedimiento de esterilidad me-

diante irradiación es inocuo.

La técnica de esterilidad mediante irradiación gamma es sencilla y resulta económica si se acude a los centros especializados que cuentan con cámaras de irradiación. En México existen por lo menos 5 -- instituciones para irradiar grandes volúmenes de material biológico delicado que resulta inconveniente o difícil esterilizar por los métodos convencionales.

La aplicación industrial de la técnica de esterilización mediante irradiación gamma se usa rutinariamente en varios países (1,38) -- sería muy recomendable la ampliación de su uso en México.

Las suspensiones de globulinas inmunes se han utilizado y se utilizarán en el futuro con gran frecuencia en el área médica, en la seroterapia de las enfermedades causadas por venenos o toxinas, disgamma-- globulinemias y algunos casos específicos para prevenir sensibilizaciones (16,17,18).

Como se ha podido comprobar en el presente trabajo la aplicación de la irradiación gamma en la esterilización y conservación de productos biológicos tiene un campo de acción amplio y el futuro es maravilloso pudiendo incorporarse en la producción comercial de la industria química farmacéutica y productora de biológicos como una alternativa más en la conservación y esterilización de sus productos.

CONCLUSIONES

## VI. CONCLUSIONES

Una suspensión en agua bidestilada de gammaglobulinas porcinas después de haberse sometido a irradiaciones gamma  $\text{Co}^{60}$  a una dosis - de 1.25, 1.50, 1.75 y 2.0 Mrad., resulta con esterilidad microbiológica sin alteración de sus propiedades físicas y biológicas siempre y cuando el proceso se lleve a cabo con las muestras congeladas y mantenidas en - un baño con hielo.

B I B L I O G R A F I A

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Beuthling Roy A. Irradiación extendedor de mercados Industria Avícola Vol. 29 No.5 p.p 8-16 1982.
2. Brandenburg A.C. y Wilson M.R. Immunity to Escherichia coli in pigs. IgG and blood clearance. Res. Vet. Sci. 16: 171-175, 1974.
3. Briere, R.O.J.D. Mull: Electrophoresis of serum protein with cellulose acetate. Am. J. Clin. pathol. 42: 547-551, 1964.
4. Chaykin, S. Biochemistry Laboratory Techniques. John Wiley y Sons. Inc., N. York p. 17, 1966.
5. Code of Federal Regulations Animal Products part 200 to the end U.S. government printing office Washington. Revised as of January 1, 1980.
6. Cele, C.G. Torrey, J.P. and Zinober, M. R.: Twelve Years Success full Vaccination of Farm Herds with Crystal Violet-Glycerol Hog Cholera Vaccine. Proc. United States Livestock Sanitary Association. 263-269 (1956).
7. Comar, L.C. Atomic Energy and Agriculture American Association for the advancement of science. Washington, D.C., 1957.
8. Cuatrecasas P.: Protein purification by affinity chromatography. Journal of Biological Chemistry. Vol. 245 No. 12 pp. 3059-3065, 1970.
9. Cunningham, C.H.: Virología Práctica 6a. Edición Editorial Acribia 93-111 (1971).
10. Dickman, M.O. Chappelka, A.R. Schaedler, R.W.: The microbial ecology of the upper-small bowell, Am. J. Gastroent. 65: 56-62, 1976.
11. Diehl, J.F.: Irradiated Food, Science 80: 214-215, 1973.

12. Dirección General de Sanidad Animal. Protocolo de requerimientos mínimos de control de calidad de biológicos para uso veterinario SARH. México, D. F., 1980.
13. Disroiser, N.W. Conservación de alimentos. CECSA, México, 1968.
14. Drachman, R.H. Acute infections gastroenteritis Paediatricclonocs of North América 21, 3 711-737, 1974.
15. Dunne, H.W. & Leman A.D. Diseases of Swine Fourth edition. The Iowa State University Press. 189-237 (1975).
16. Freda, V. J. et al.: Prevention of Rh hemolytic disease ten years clinical experience with Rh immune globulin. N. Engl. Journal Med. Vol. 292 pp. 1014-1038, 1975.
17. Fudenber, H.H. Others primary immunodeficiencies report of a word health. Organization Committee Pediatrics Cap. 47 pp. 927, 1971.
18. Fudenbel, H.H. , Sitites Daniel P.; Caldwell Joseph L., and Wells J. Vivian Basic Clinical Immunology, Second Ed. Cap. 43, 1978.
19. Gammacell 200 Cobalto 60 Irradiation Unit; Edition No. 3 Atomic Energy of Canada Limited Ottawa, Canada, 1964.
20. Gellman Instrument Co. Gelman Procedures Techniques and Apparatus for Electropho-esis Ann. Arbor. Mich., 1968.
21. Herbert, W. J. Inmunología Veterinaria. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1972.
22. Ingram, D.G. & Smith A.A.: Immunological responses of young animals I. Review of the Literature Can. Vet. Jour, 6: 194-204, 1965.
23. Kalich, J.; Kovacs, F. & Maier, E. Relations ships between in vironmental factors, ingestion of calostrum and piglet mortality. Bull. Munch. Tierarstl. Wschr. 80: 250-255, 1967.
24. Kendall, F. C. Studies of Serum Proteins I. Identification of Single Serum Globulin by Immunological Means. Its Distribution in the Sera of Normal Individual and of Patients with Cirrhosis of the Liver and with Chronic Glomerulonephritis. J. Clin. Invest. 16: 921-931, 1937.

25. King & Harkness, J.W. Viral Contamination of Foetal Bovine Serum  
Vet. Rec. 97: 16, 1975.
26. Kurczyn Ruiz, G.; Garza, J.; Olguín, F.; Quintana, F. Efecto de la adición al calostro del suero sanguíneo, albumina y gammaglobulinas en lechones. Vet. Méx. Vol. 7 pp. 124-131, 1976.
27. Ley, Y.L. & Tallentire, A.: Sterilization by irradiation or heat some microbiological considerations and farmaceutical. Journal 192: 59-61, 1964.
28. Medios de cultivo para microbiología. Merck Folleto Ilustrativo, 1972.
29. Methods in Immunology and Immunochemistry ed by Williams, C. and Chase M.W., Academic Press, Inc. Vol. 1, 1968.
30. Metodología y Procedimientos en los Laboratorios. Manual DIFCO de Laboratorios, 1971.
31. Miller, E.R.; Mormon, B.G.; Ullerey, D.F. & Schidt, D.A. Antibody absorption, retention and production by the baby pig. J. Anim. Sci. 21: 309-314, 1962.
32. Monroy, Y.A. Detección del Virus de Cólera Porcino en Cultivos Celulares Mediante la Prueba de Hemoadsorción Pasiva. Tesis Profesional. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M., 1983.
33. Muñoz, M.J. Cultivo del Virus de Cólera Porcino. International Pig Veterinary Society Congress, July 26-31 pp. 131. México, D.F., 1982.
34. Noremborg, S.T. Electrophoresis A. Practical Laboratory Manual F.A. Davis, Co., Phila. 1975.
35. Phelps, R.A. y col. en The Plasma Proteins 1. 143 Representación esquemática de la distribución de las proteínas séricas en electroforesis. Academic Press New York y Londres, 1965.
36. Quiroz Pérez, J.I.M. Relación de la mortalidad e incremento de peso en los lechones con la persistencia de anticuerpos adquiridos pasivamente. Tesis Profesional. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M., 1973.

37. Quiróz Pérez, J.; Olguín, F.; Garza, J. Anticuerpos adquiridos pasivamente en relación con mortalidad e incremento de peso en lechones. Vet. Méx. Vol. 6 pp. 84-91, 1975.
38. Reyes, L.J. Aplicaciones Industriales de la Radiación Ionizante. Memorias 4° Simposio sobre Química Nuclear, Radioquímica y Química de Radiaciones. Ciudad Universitaria, U.N.A.M., Septiembre, 1982.
39. Tizard, I.R. Inmunología Veterinaria. Primera edición. Editorial Interamericana, 1979.
40. Torrey, J.P.; Barney, G. H. and Marmesh, M. Crystal Violet Vaccine Experiment, 1956-1957 Progress Report 11. Proc. U.S. Livestock Sanitary Assoc. 271-277 (1958).
41. USDA title 9 Animals and Animal Products. Chapter I Agricultural Research Service Department of Agriculture (USA) Subchapter E. Part 119 Antihog. Cholera Serum. page 11, 1965.
42. USDA. Standard Requiriments for Anti-hog cholera Serum United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Veterinary Division S - 70, July 1, 1970.
43. Vyas, G.N.; Stites, D.P.; Brechner, G. Laboratory Diagnosis of Immunologic Disorders. Grune Stratton ed., 1975.

