

37
2 g.



Universidad Nacional Autónoma de México
EN EP ZARAGOZA

**PREPARACION DE UN ESTANDAR
INTERNO DEL TOXOIDE TETANICO
PARA LA PRUEBA DE POTENCIA
EN COBAYOS.**



T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

Martha Alicia Pacheco Avila

**Asesores de Tesis: Q.F.B. Luz Margarita Chávez Martínez
Q.B.P. Jaime Jiménez Paredes**



México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ABREVIATURAS

- UI : Unidad Internacional, actividad específica de una cantidad establecida o un patrón internacional, definida por el Comité de Expertos en Estandarización Biológica de la OMS.
- LF : Límites de flocculación. Cantidad de toxina o toxoide tetánico ó diftérico que mezclado con una unidad internacional de la antitoxina correspondiente, floccula en el tiempo más corto.
- DE₅₀ : Dosis efectiva para 50%. Dosis de una preparación farmacológica activa que evocara una respuesta en el 50% de las unidades de prueba de un grupo. A la DE₅₀ se le dan nombres diferentes dependiendo del tipo de respuesta: DL₅₀ o dosis letal al 50%, si la respuesta es muerte; DI₅₀, si la respuesta es efecto citopático de un virus u otro agente sobre un sistema celular.
- L+/10/50 : Unidad de combinación que consiste en la cantidad mínima de toxina tetánica que al ser mezclada con 0.1 UI de antitoxina tetánica, es neutralizada parcialmente, quedando suficiente toxina libre para matar al 50% de un grupo de ratones de 15 a 17 gr de peso inyectados por vía subcutánea, en un periodo de 4 a 5 días.
- L+/400/50 : Unidad de combinación que consiste en la cantidad mínima de toxina tetánica que al ser mezclada con 0.0025 (1/400 de UI) es neutralizada parcialmente, quedando suficiente toxina libre para matar al 50% de un grupo de ratones de 15 a 18 gr de peso inyectados por vía subcutánea, en un periodo de 4 a 5 días.
- OMS : Organización Mundial de la Salud.
- S.S.F. : Solución salina fisiológica.
- St. : Estándar.
- T.T. : Toxoide tetánico.

I N D I C E

	PÁG.
Resumen	1
Introducción	2
a) Características del <u>Clostridium tetani</u> ...	2
b) Morfología y tinción	2
c) Cultivo	3
d) Resistencia	3
e) Variabilidad	3
f) Estructuras Antigénicas	3
g) Exotoxinas	4
h) Las toxinas	5
i) Exotoxinas	5
j) Endotoxinas	6
k) Toxoides	7
l) Toxoide Tetánico	7
m) La Estandarización Biológica	8
n) Titulación de Antitoxina en Sueros Débiles [IPSEN, 1942]	13
Hipótesis	19
Objetivos	20
Material	21
Reactivos	22
Métodos:	23
a) Adsorción del Toxoide Tetánico	23
b) Prueba de Potencia	23
c) Titulación de la Toxina en DL ₅₀	24
d) Diagrama de Flujo del Método seguido	26
e) Preparación y Esterilización del Estándar Secundario de T.T.	25
f) Llenado del Estándar	27
g) Engargolado de los frascos	27
h) Prueba de Potencia " 6 Puntos "	27
i) Prueba de " 3 Puntos "	30
Resultados	32
a) Apéndice de Gráficas	40
b) Tratamiento Estadístico	47

Discusión de Resultados	51
Conclusiones	55
Apendice	56
Bibliografía	57

RESUMEN

La elaboración de estándares y su uso permite homogenizar las pruebas biológicas entre laboratorios en el mundo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), proporciona a los laboratorios productores un número determinado de estándares para evaluar la eficacia de sus lotes de producción y propone la elaboración de estándares nacionales ó internos de trabajo.

En el Instituto Nacional de Higiene los niveles de producción de Toxoide Tetánico hacen necesaria la preparación y la valoración de un estándar interno de referencia siguiendo las guías que establece la OMS.

Con el objeto de mejorar los métodos utilizados en la valoración de biológicos se están proponiendo nuevas técnicas que mejoren dichas evaluaciones. En algunos países lo hacen midiendo la antigenicidad del producto. Para realizar este tipo de pruebas es necesario contar con estándares de referencia adecuados para ellos.

El propósito de este trabajo es la elaboración de un estándar de referencia interno del Toxoide Tetánico para ser utilizado en una prueba de valoración activa "La Prueba de Protección Activa en Cobayos".

Esta prueba se realiza de manera rutinaria por el método llamado ¹⁸IPSEN en el cual se involucra el manejo de dos especies animales cobayo y ratón. Este trabajo pretende lograr el establecimiento de un método de protección activa donde la respuesta sea medida en la misma especie animal; el cobayo, favoreciendo así una mayor variabilidad biológica, un menor tiempo y mayor confiabilidad en los resultados.

El método propuesto se puede utilizar de igual forma que el método rutinario llamado IPSEN porque la respuesta se logra medir adecuadamente, con un análisis de variancia realizada a los datos obtenidos se observa que ambos métodos mantienen una correlación, lo que nos da la confianza de utilizar un método o el otro.

INTRODUCCION

1. Características del Clostridium tetani.

A través del tiempo se ha reconocido a Clostridium tetani como una bacteria relacionada con el suelo rico en materia orgánica, el cual puede pasar a los humanos que están en contacto con el suelo, a través de heridas o cualquier otro accidente que permita la penetración de esporas del microorganismo a los tejidos.

a) Morfología y tinción.

El Clostridium tetani es un bacilo Gram positivo, esporulado semejante a un palillo de tambor por su espora terminal; es móvil está dotado de 30 - 50 flagelos periféricos. Es un anaerobio estricto y en condiciones ambientales adversas forma esporas, lo cual le confiere una resistencia excepcional. Cuando las condiciones son propicias, la espora germina y da lugar a la forma vegetativa que es capaz de producir dos toxinas, una de las cuales es la tetanospasmina, altamente neurotrópica, cuya potencia sólo es superada por la toxina botulínica.

El bacilo del tetanos se tiñe fácilmente por los colorantes de anilina. La tinción de los flagelos sólo se logra cuando se utilizan cultivos jóvenes.

b) Cultivo.

El efecto del oxígeno (O_2) se puede neutralizar y se obtiene desarrollo en presencia de aire si se establece en el medio un bajo potencial de oxidorreducción. Así por ejemplo se obtiene un desarrollo excelente en medios que contienen ácidos tioglicólicos. El valor de la carne cocida depende de su contenido en ácidos grasos no saturados que toman oxígeno y de "glutation" a un Eh de alrededor de - 0.2 voltios. El requerimiento del organismo para anaerobiosis mecánica es menor cuando se desarrolla en simbiosis con bacterias aerobias o en presencia del tejido fresco estéril.

Los bacilos desarrollan mejor a 37°C en pH=7.0 - 7.5 y cesan el desarrollo a un pH menor a 6.4 ó mayor de 9.2. La adición de glucosa al medio estimula el desarrollo de los cultivos puros, aunque no hay señal alguna perceptible de fermentación de ésta o de otros carbohidratos. Clostridium tetani se puede cultivar en un medio sintético, pero requiere vitaminas (tiamina, ácido nicotínico, riboflavina, piridoxina, ácido

pentoténico, biotina y ácido fólico), aminoácidos (arginina y triptofano), purinas y pirimidinas (adeninas y uracilo) así como ácido oléico.

El desarrollo en gelatina o en medios con agar acompañada de la producción de anhídrido carbónico y metilmercaptano, este último produce el característico olor desagradable a materia orgánica putrefacta. Los aminoácidos e hidratos de carbono son deshidratados y los requerimientos de energía se satisfacen por la reducción directa de aminoácidos, como los ácidos glutámico y aspártico, el anhídrido carbónico,amoníaco y ácido acético y butírico.

c) Resistencia.

Las formas vegetativas del Clostridium tetani no tienen mayor resistencia al calor o a los agentes químicos que las formas vegetativas de otros microorganismos. Sin embargo las esporas resisten al calor seco a 80°C alrededor de una hora y el vapor fluyente por unos cinco minutos. El ácido fénico al 5% (P/V) las mata en doce a quince horas, el bicloruro de mercurio al 1% (P/V) en dos a tres horas. La luz solar directa disminuye su virulencia y acaba por destruirlas. Protegidas de la luz solar directa y de otras influencias deletéreas, las esporas del tétanos pueden permanecer viables y virulentas durante muchos años.

La penicilina tiene alguna acción inhibitoria sobre el desarrollo del microorganismo; en grandes dosis reduce la mortalidad en los animales de experimentación.

d) Variabilidad.

Se han observado colonias lisas y rugosas y variantes móviles e inmóviles. Se pueden obtener colonias aisladas de la forma móvil del organismo añadiendo al medio sustancias químicas inhibitorias o aumentando el agar al 6%.

e) Estructuras Antigénicas.

De los diez tipos antigénicos, nueve se pueden reconocer por sus antígenos flagelares específicos. El tipo VI no tiene flagelos, todas las cepas tienen un antígeno O común y un segundo antígeno O compartido por los tipos II, IV, V ó IX. Afortunadamente, todas las cepas producen el mismo tipo antigénico de toxina que puede ser neutralizado por una sola antitoxina.

F) Exotoxinas.

El Clostridium tetani produce una fibrolisina y una hemolisina. Esta hemolisina, descubierta y denominada tetanolisina por Erlich, se destruye rápidamente por oxidación al quedar expuesta al aire y puede ser adsorbida por una suspensión de globulos rojos. La hemolisina es antigénica y da lugar a la producción de una antihemolisina específica cuando se inyecta a los animales. Sin embargo, ninguno de estos metabolitos tiene potencia suficiente para hacer que este bacilo sea patógeno.

Las cepas virulentas de el Clostridium tetani produce una poderosa neurotoxina que es liberada en el medio en parte por difusión y en parte por autólisis. Hay variación marcada entre las cepas en su capacidad para producir esta toxina. La producción máxima ocurre a temperatura de 35°C. La cantidad de toxina producida varía según la cepa y con el medio empleado.

La inoculación de un animal con toxina tetánica va siempre seguida de un periodo definido de incubación de ocho a veinticuatro horas, antes de que aparezcan los espasmos tónicos. El sitio de inyección, la especie de animal y la cantidad de toxina inyectada influyen en la duración del periodo de incubación. Aumentando la dosis, este periodo se puede acortar pero nunca eliminar por completo. Cuando la toxina se inyecta por vía subcutánea los espasmos empiezan primero en los músculos más próximos al punto de inoculación y gradualmente se extiende hasta alcanzar todos los músculos. La inoculación intravenosa puede producir tétanos generalizado. Como la toxina se destruye por la acidez del jugo gástrico y por las enzimas proteolíticas del aparato digestivo, la ingestión de toxina no produce enfermedad.

La toxina tetánica es una neurotoxina selectiva que actúa sobre células nerviosas del eje cerebro-espinal, aunque como la toxina botulínica, paraliza también las fibras motoras colinérgicas que van al iris del ojo. Los nervios del bulbo raquídeo son más susceptibles a la toxina, lo cual probablemente explica las convulsiones generalizadas que se observan en la enfermedad.

Los estudios realizados por numerosos autores⁽³⁰⁾ muestra claramente que la mayoría de las toxinas de los Clostridia sintetizadas por las bacterias en crecimiento, se acumulan en cantidades variables en la célula bacteriana durante la fase logarítmica de crecimiento, y la concentración máxima de la toxina intracelular se presenta en la mayoría de los casos un poco antes del final de la fase logarítmica. Además duran-

- Polipeptidos de peso molecular de 10 000 a 900 000 UMA.
- Inestable relativamente, destruida a menudo por calor mayores - 60°C.

- Altamente antigénicas; estimulan la formación de antitoxinas de título elevado. La antitoxina neutraliza a la toxina. La dosis letal de la toxina tetánica es menor que la dosis inmunizante en el humano.

- Se transforman a toxoides atóxicos antigénicos con laformalina, ácido, calor, etc.

- Muy tóxicas; mortales para animales de laboratorio en dosis de - microgramos o menores.

- No producen fiebre en el huésped.

b) Endotoxinas.

Las endotoxinas bacterianas, componentes de la pared celular de - bacterias Gram negativas (por ejemplo, E. coli, Shigella, Salmonella) han sido conocidas desde hace tiempo como productoras de toda una gama de efectos sobre la respuesta inmunitaria y las células inmunocompetentes. Por ejemplo, de manera inespecífica estimulan la proliferación de células B, lo mismo inducen la aparición inespecífica de anticuerpos en tieritrocitarios (en particular de anticuerpos antieritrocitos de oveja). Además, estos compuestos son adyuvantes potentes de la respuesta inmunitaria. Su principal limitación es que ellas mismas son inmunogénicas. Esto en particular, no es deseable en un agente de uso terapéutico potencial. Además estos compuestos son perogénicos. Su utilidad principal ha radicado en la elucidación del mecanismo de desarrollo de la respuesta inmunitaria y el método de control.

Las características de las endotoxinas son las siguientes: [20]

- Parte integral de la pared celular microbiana de los organismos Gram negativos, liberadas al ser desintegrada dicha pared.

- Complejos polisacáridos. Porción de lípidos A, quizá sea la responsable de la toxicidad.

- Relativamente estables, soportan calor mayor de 60°C durante horas sin pérdida de la toxicidad.

- No estimulan la formación de anticuerpos al residuo de polisacárido.

- No son convertidas a toxoides.

- Poco tóxicas; mortales para animales de laboratorio en dosis de

cientos de microorganismos [ejemplo, 50 millones de dosis mortales para el ratón por miligramo].

- No producen fiebre en el huésped.

Las antitoxinas son anticuerpos que neutralizan o flocculan un antígeno. Estos anticuerpos antitóxicos que circulan en el plasma y en los líquidos corporales, pueden producirse como consecuencia de que las células B del sistema linfóide hayan sido estimuladas por el contacto con la toxina antigénica. Los anticuerpos así producidos son específicos para la toxina que ha provocado su síntesis.

Cuando se estimula a un individuo para que produzca sus propios anticuerpos (por inyección de toxoides o por padecer la enfermedad del tétanos), se dice que está inmunizado activamente. La inmunidad activa es casi siempre de larga duración, según hemos hecho notar.

Por el contrario cuando se inyectan antisueros a un individuo (los cuales contienen anticuerpos preformados), se dice que el paciente está inmunizado pasivamente. La inmunidad pasiva es transitoria, pero también es útil clínicamente, siempre que una persona necesita protección a causa de una sola exposición a alguna enfermedad infecciosa, como la Difteria.

3. Toxoides.

Los toxoides son derivados antigénicos, no tóxicos de las toxinas.

En muchas de las enfermedades resultantes de la producción de exotoxinas, la inmunización activa frente a exotoxinas es llevada a cabo preparando toxoides, mediante la introducción a la toxina de grupos sustituyentes como el formaldehído.

a) Toxide Tetánico.

El formol transforma la toxina tetánica en toxide tetánico, mediante dos tipos de reacciones químicas: 1) bloqueo de los grupos amino de las lisinas y 2) por la formación de puentes metilénicos entre las lisinas y la tirosina o la histidina. Estos cambios afectan sitios críticos para la acción tóxica de la tetanoespasmina.

b) Preparación de Toxide Tetánico.

Una cepa toxigénica de Clostridium tetani se cultiva en medios especiales, sin peptones, para promover la producción de neurotoxinas tetánicas. La toxina se transforma en toxide mediante formol por incubación a 32 - 37°C durante varios días, el toxide resultante se purifica

por el paso a través del filtro Zeitz y se deja "madurar". Finalmente se refina poco por precipitación con sulfato de amonio.

El toxoide tetánico se distribuye como toxoide fluido o como toxoide adsorbido; el producto de adsorción en hidróxido de aluminio o alumbre [sulfato doble de aluminio y potasio] aumenta la inmunogenicidad, reduce la magnitud de la interferencia por la administración simultánea del toxoide y antitoxina [heteróloga u homóloga], y produce niveles de antitoxina más duraderos. La ventaja del toxoide fluido es por ejemplo la mayor rapidez con que se provoca una respuesta secundaria en personas que han sido previamente vacunadas con toxoide, no es muy definida ni llega a ser de proporciones que justifiquen su empleo. En las condiciones actuales, no hay razón para continuar el uso de toxoides fluidos bajo ninguna circunstancia de la práctica clínica [14].

El material adsorbente, se acepta hasta una dosis de 15 mg como sulfato de aluminio y potasio $KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ y equivalente a 0.65 mg de aluminio. El efecto de las sales de aluminio se ha considerado debido a la formación de un depósito que libera por tiempo más prolongado el antígeno y de esa forma se sostiene un nivel de estimulación antigénica sostenida [13].

c) Actividad del Toxoide Tetánico en la Respuesta Inmune.

Los toxoides tetánicos actúan principalmente en tres formas [9].

Una consiste en inducir un estado en el sistema inmunitario que le permite responder a estímulos subsiguientes del toxoide. Por la acción del toxoide se logra tener individuos con inmunidad básica y capacidad de respuesta rápida frente al toxoide de cualquier tipo. Otra acción del toxoide consiste en estimular un nivel de antitoxina circulante homóloga suficiente para mantener una defensa inmediata en la circulación sanguínea durante muchos años; ésta es superior desde luego a la capacidad de las antitoxinas heterólogas, las cuales aparentemente sólo actúan contra la toxina cuando la encuentran en la corriente sanguínea y ahora sabemos que la toxina sólo excepcionalmente se haya en la circulación.

Una tercera acción es el efecto protector en los individuos ya inmunizados con dos dosis de toxoide; cuando se les inyecta una dosis de refuerzo, con lo que se provoca una acción protectora acelerada, posiblemente por la acción directa del toxoide sobre la célula nerviosa, im

pidiendo la fijación de la toxina a estas células por un mecanismo competitivo. Esta protección aparece de 6 a 8 horas después de la inoculación del toxoide antes de que aparezcan las antitoxinas en niveles detectables en la sangre circulante.

4. La Estandarización Biológica.

Conviene hacer notar que el proceso de estandarización es extraordinariamente complejo pues involucra cuestiones técnicas, económicas, políticas y sociales.

En un sentido técnico, estandarizar consiste en establecer un sistema de unidades y normas de referencia que permitan unificar la valoración cuantitativa de materiales y sus características en todos los laboratorios de un país y a nivel internacional. Esto lleva varias ideas asociadas como son, en primer lugar, la valoración cuantitativa, la adopción de un sistema de unidades, el desarrollo de normas y de preparaciones o materiales de referencia. Este término es un proceso que refleja la necesidad de establecer acuerdo entre profesionales o instituciones para controlar y uniformar la calidad de preparados o productos y que lleva a la realización de un conjunto de actividades tecnológicas para su implementación.

Un estándar es el resultado de un esfuerzo de estandarización, aprobado por una autoridad reconocida y consiste ya sea de un documento que contenga un conjunto de condiciones que deben llenarse o cumplirse ó una unidad fundamental o constante física. El establecimiento de una norma y de una unidad, especialmente de esta última, lleva aparejado el desarrollo de una preparación o material de referencia, llamado estándar.

Los patrones de comparación o materiales de referencia son objetos materiales usados para calibrar sistemas de medida. Existe alguna confusión en la terminología empleada para la designación de estos patrones, por lo que se debe procurar definirlos cuidadosamente y evitar el empleo indiscriminado de términos.

Es importante para los fines de este trabajo incluir aunque sea brevemente, los conceptos de unidades y preparaciones de referencia y patrones, en relación con la estandarización biológica.

Hay muchas sustancias con propiedades terapéuticas o profilácticas las cuales no pueden ser valoradas adecuadamente utilizando solamente

pruebas químicas o físicas. Por ejemplo, para algunas sustancias de uso frecuente en biología y medicina, no es posible establecer una relación simple entre peso y potencia a causa de la estructura complicada de los constituyentes activos. El material en cuestión puede estar constituido por organismos vivos e incluir gran número de componentes, no distinguibles por métodos físico-químicos simples, pero poseer grados variables de actividad cuando se administra a un organismo vivo. Más aún los componentes activos pueden estar presentes en proporciones variables de una muestra a otra.

Este es precisamente el caso de los sistemas toxina-antitoxina, en parte, a causa de la complejidad de ambas sustancias, la toxina y la antitoxina, su forma especial de reaccionar in vitro ó en vivo y el hecho de que tanto las toxinas como las antitoxinas, pero especialmente las primeras, son lábiles a altas temperaturas y al cambio de pH, y con asisten generalmente de mezclas de moléculas con diferentes grados de actividad parcial o completa (mezclas toxina-toxoides), lo que condiciona su valor cuantitativo al tipo de método utilizado.

La potencia de preparaciones de estas sustancias puede valorarse sólo mediante pruebas en animales o en microorganismos. Tomando en cuenta que la potencia de tales sustancias solo puede determinarse con un sistema biológico de prueba, éstas se conocen como sustancias biológicas.

Cuando el médico administra una preparación de una sustancia biológica (p.ej. una antitoxina) a un paciente, en el producto que emplea se deberá haber comprobado que es eficaz e inocuo. La eficacia o potencia en este caso, consiste en el número de partículas activas (moléculas de anticuerpo) contenidas en la dosis administrada y disponible para reaccionar con el agente infeccioso. No es tarea fácil, aunque fuera posible, definir la potencia de la antitoxina en estos términos. La única forma razonable en que se pueden especificar las potencias de diferentes preparaciones de antitoxina, es expresar sus actividades en términos de una determinada muestra de la antitoxina, mantenida en condiciones especiales para propósitos de referencia, a la que antes hemos llamado estándar. Así una muestra puede ser igual en potencia al estándar (relación de potencia = 1.0) en tanto que otra muestra puede tener alrededor de 25 por ciento más actividad (relación de potencia = 1.25). Para mayor conveniencia puede decidirse relacionar una cantidad arbitra

ria del patrón y designar esta cantidad como la unidad de esa antitoxina. Entonces, si por ejemplo el patrón tiene por definición 10 unidades por ml, las potencias de las dos muestras con relación de potencia de 1.0 y 1.25 deberán contener 10 unidades por ml y 12.5 unidades por ml respectivamente. El mismo principio de determinación de potencia relativa a un estándar y expresar tal potencia en unidades se aplica a todos los tipos de sustancias biológicas.

La Unidad Internacional de Antitoxina Tetónica se definió en 1928 al establecer una equivalencia de 2 UI a 1 Unidad Americana⁽⁹⁾. La distribución de este patrón por el Statens Serum Institut de Copenhague se inició en 1935 con una equivalencia en peso de 1 UI igual a 0.1547 mg. En 1949 la Unidad Internacional se igualó a la Unidad de los Estados Unidos y desde entonces 1 UI es igual a 0.3094 mg del patrón internacional. En 1968 este primer patrón fue reemplazado por el segundo, actualmente en uso, como 1 UI igual a 0.0338 mg.

Se desprende de lo anterior que resulta ventajoso expresar la potencia de una sustancia biológica en las mismas unidades en todo el mundo. Tal procedimiento permite al médico y a los investigadores en el campo de la biología experimental para decidir con exactitud las dosis requeridas de las sustancias biológicas cuando hay varias preparaciones disponibles, no solo dentro de un país, sino también cuando las diversas preparaciones se elaboran en varios países. Esto se aceptó desde hace un poco más de 50 años y en consecuencia, se demostró que se podría obtener un gran beneficio si se daba un carácter internacional al establecimiento de estándares para sustancias biológicas, es decir, la estandarización biológica y la definición de unidades de actividad.

Los estándares internacionales son preparaciones establecidas para ser utilizadas como material de referencia en el ensayo biológico de sustancias de tal manera que se puede expresar su potencia o actividad en términos del estándar, por medio de esto, se asegura la uniformidad en todo el mundo en la designación de potencia de preparaciones que se van a usar en la profilaxis, terapia o diagnóstico de enfermedades, en los casos en que dichas sustancias se tratan de productos biológicos y no pueden ser caracterizadas adecuadamente por medios químicos y físicos.

A través de los años, los patrones internacionales se han estable

cido solamente sobre la base de estudios en colaboración internacional, con participación de un cierto número de laboratorios, para demostrar que la preparación es adecuada para servir como estándar en los diversos tipos de bioensayo de que se dispone para la sustancia o material en cuestión.

Dichos estándares internacionales no están disponibles en cantidades suficientes para su distribución a los países en cantidad ilimitada de tal manera que pudieran ser utilizados en comparaciones analíticas rutinarias de la producción. Por lo tanto, estos materiales se distribuyen solamente con el propósito de ayudar a los laboratorios nacionales de control en la elaboración de sus propios estándares. Estas preparaciones nacionales son las que deberían ser analizadas en forma rutinaria en los laboratorios analíticos dedicados al bioensayo.

La estandarización es el resultado de un esfuerzo de conjunto desarrollado por acuerdos entre personas o instituciones con capacidad científica y autoridad legal dentro del campo de producción, el cual es coordinado y aprobado por una autoridad oficial (OMS). Este trabajo sólo adquiere validez cuando dicha autoridad evalúa su trabajo. El desarrollo de esfuerzos sobre estandarización, es muy importante contar con la participación de las instituciones oficiales y privadas que trabajan en el campo dentro del país.

En América Latina, especialmente en México^[9], hay que recordar que tenemos industrias farmacéuticas y de productos biológicos con características especiales de desarrollo diferentes en cada país que determinan la necesidad de establecer sistemas de estandarización nacional apoyándonos en principios internacionales y regionales. La producción de productos biológicos para inmunoprofilaxis bajo condiciones más o menos diversas prevalecen en cada país y originan la necesidad de llevar a cabo este trabajo bajo condiciones especiales en cada caso. No obstante, en todos los casos se considera que a medida que se desarrollen actividades de estandarización y se establezcan preparaciones nacionales de referencia, se lograrán algunos avances tales como los siguientes:

e) Control de calidad mucho más efectivo de los productos biológicos y farmacéuticos, ya que la utilización de materiales de referencia es un mecanismo que contribuye a determinar la eficacia del control analítico a través del grado de tecnificación con que se realiza dicho tra

bajo.

b) Consiguientemente, al intensificar el control de los productos biológicos, especialmente con relación a su actividad específica, tendremos un conocimiento más completo de las características de calidad de las materias primas fabricadas en el país, de la bondad de los procesos de fabricación y también de las preparaciones biológicas y farmacéuticas que se estén aplicando a la población.

c) Estímulo al desarrollo de estudios en colaboración entre diversas instituciones, que redunde en beneficio de la superación científica de los laboratorios del país.

d) Reducción de los costos de adquisición de estas preparaciones - para trabajo analítico, pues los elaborados en el país serán de precio más reducido que los importados.

Actualmente se cuenta con la Farmacopea Nacional que establece normas o requisitos para que los productos elaborados se ajusten a los niveles de calidad asignados. En la elaboración de este documento colaboraron diversos especialistas de la Secretaría de Salud y Laboratorios - Farmacéuticos privados. Se ha observado que a medida que se desarrollan actividades sobre estandarización biológica y preparaciones de referencia se logran avances en el control y una calidad constante de productos elaborados a nivel nacional.

5. Potencia del Toxide Tetánico.

La prueba de actividad inmunogénica del toxide tetánico se lleva a cabo por inoculación de cobayos, cuya respuesta inmune se determina valorando el nivel de anticuerpos protectores en su suero, expresados en unidades internacionales de antitoxina tetánica.

La titulación de antitoxina circulante puede hacerse por algún método que permita una valoración cuantitativa en términos de unidades internacionales y que sea sensible ante sueros con una potencia en el orden de 2.0 UI.

El método IPSEN (1942) es satisfactorio para este propósito. Este método determina el poder neutralizante de un suero antitetánico frente a una dosis conocida de toxina tetánica.

a) Titulación de Antitoxina en Sueros Débiles (IPSEN, 1942).

Preparación del suero de referencia:

a) Diluir 1:100 el patrón internacional de Antitoxina Tetánica o - el estándar interno de laboratorio (basado en el patrón internacional) con solución salina hasta 0.05 UI/ml. Agregar a esta dilución tiomersal de manera que alcance una concentración final de 0.01%.

b) Utilizar una toxina estable de la que se conozca el valor de - $L^+/400/50$ ml. Si se tiene desecada preparar una solución base que contenga 1 mg/ml en solución reguladora de peptona (al 1%) estéril, conteniendo tiomersal para ajustar a una concentración final de 0.01%, utilizando 3 ó 4 mg de material tóxico.

c) Inmediatamente antes de iniciar la prueba diluir la toxina a partir de la solución base con la solución reguladora de peptona hasta una concentración de 4 $L^+/400/50$ ml.

d) Se lleva a cabo las mezclas toxina-antitoxina de acuerdo con el protocolo de las tablas adjuntas para el control y el problema.

e) Incubar todas las mezclas toxina-antitoxina durante una hora a temperatura ambiente.

Con el objeto de que se puedan tomar cuantitativamente las dosis - de cada tubo de ensayo, es necesario preparar un volumen de 2.0 ml que contienen así 4 dosis.

Inoculación de Ratones:

1. Usar tres ratones por cada dilución de la serie patrón y un ratón por cada dilución de la serie problema, empezando la inoculación - por las mezclas menos tóxicas.

2. Cada ratón recibirá 0.5 ml de la mezcla toxina-antitoxina por vía subcutánea en el lomo.

Observación de los animales:

1. Después de inyectar a los animales pasarlos a las jaulas debidamente etiquetadas indicando serie, fecha y número de prueba.

2. Observar los animales durante 5 días a las horas señaladas, la presencia y muerte por tetanización.

Cálculos:

Con los datos de muertos y síntomas de tétanos se procede a realizar el cálculo, utilizando para ello las dos tablas que se adjuntan. - Una tabla se aplica para la serie control y la otra para el problema.

Para la utilización de un producto biológico elaborado en el Insti

tuto Nacional de Higiene se se efectúan en forma rutinaria varias pruebas que garantizan su calidad y eficiencia. Estas pruebas involucran además de un control químico y físico un ensayo biológico donde se utilizan organismos vivos como instrumentos de medición. Las pruebas de ensayo biológico son toxicidad, seguridad y potencia, que se llevan a cabo en cobayos y ratones.

En este trabajo se pretende probar la prueba de potencia de Toxide Tetánico requerida en las normas de la OMS. Esta prueba es más confiable ya que se utiliza sólo una especie animal. La forma rutinaria se realiza por el método de IPSEN (explicado anteriormente) que es un método de inmunización en cobayo y titulación del suero.

Como se observa, el método involucra el uso de dos especies animales; cobayo y raton aumentando así los factores que intervienen en la respuesta inmunitaria frente al toxoide.

Por inconveniencias citadas se pretende establecer la metodología para la prueba de potencia del toxoide tetánico donde la respuesta se mida en una sola especie animal.

Para poder llevar a cabo esta "Prueba de protección Activa" es necesario la elaboración de un estándar interno de referencia que permita controlar el número de variables que pueda influir en la prueba de potencia. Por lo tanto, tener datos más reales de la calidad del producto y una producción más constante. La potencia de estos productos debe conocerse y por tal motivo se realiza este trabajo.

**POTENCIA DE TOXOIDE TETANICO
TITULACION DE ANTITOXINA-PATRON**

METODO DE IPSEN (1942)

Potencia de Sueros de título bajo-Método de Ipsen.

Control de la (s) muestras _____ Fecha _____

Ratones por dosis _____ Peso _____ Dosis _____ Vía _____

Antitoxina de referencia _____ Toxina L+/400 _____

ESQUEMA DE OPERACION-SERIE PATRON

Jaula No.	Suero estándar 0.05 UA / ml.	Buffer de Peptona	Toxina 4L +/400/50 por ml.	L+/400/50/ toxina por dosis	Suero estándar por dosis
	0.28	0.72	1.0	1	0.0035
	0.20	0.80	1.0	1	0.0025
	0.14	0.86	1.0	1	0.00175
	0.10	0.90	1.0	1	0.00125
	0.072	0.93	1.0	1	0.0009

REGISTRO DE RESULTADOS

Jaula No.	Primer día				2º día		3ºr. día		4º	5º	Lecturas
	9 h.	12 h.	16 h.	23 h.	9 h.	16 h.	9 h.	16 h.	12 h.	12 h.	

Analizó _____

Total _____

Promedio _____

F. de corrección _____

**POTENCIA DE TOXOIDE TETANICO
TITULACION DE ANTITOXINA TETANICA EN SUEROS DE COBAYO
METODO DE IPSEN (1942)
SERIE PROBLEMA**

Muestra _____ Lote _____ No. _____
 No. de cuyes inmunizados _____ Peso _____ Dosis _____ Vía _____
 Fecha de inmunización _____ Fecha de sangrado _____
 Fecha de prueba _____ Toxina empleada _____ L+ / 400/50 ml. _____
 Peso de los ratones _____ Dosis _____ Vía _____

No. de ratón	Diluciones del suero	ml. de las dil.	Buffer de Peptona ml.	Toxina 4L+400/50 por ml.	L+400 de Toxina por dosis	Suero por dosis
	Sin diluir	0.60	0.0	0.60		0.25
	Sin diluir	0.096	0.50	0.60		0.04
	A-0.05+1.95+1:40	0.60	0.0	0.60		0.0062
	L:40	0.096	0.50	0.60		0.001
	0.05 de A+1.95+1:1600	0.60	0.0	0.60		0.000156
	1:1600	0.096	0.50	0.60		0.000025

Incubar 1 h. a temperatura ambiente

No. de ratón	Primer día				2º día		3º día		4º	5º	Lectura
	9 h.	12 h.	16 h.	23 h.	9 h.	16 h.	9 h.	16 h.	12 h.	12 h.	

Análisis _____

Suma _____

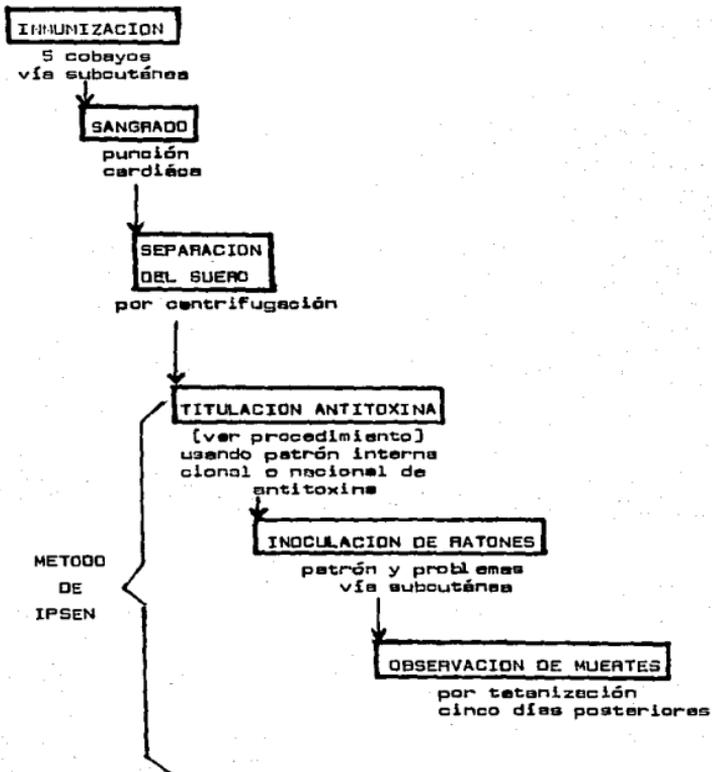
Promedio _____

Corrección _____

Log UIA / ml. _____

DIAGRAMA 1

Determinación de la Potencia de Toxoide Tetánico. Titulación del Suero por el Método de IPSEN.



H I P T E S I S

Con el método rutinario para medir la potencia del Toxoide Tetánico se involucra el uso de dos especies animales (cobayo y ratón). Si la respuesta medida se logra obtener utilizando sólo el cobayo y el estándar interno de toxoide tetánico preparado la prueba de "Protección Activa" propuesta será igualmente utilizable y ofrecerá una mayor confiabilidad que el método rutinario. (Ipsen).

7. OBJETIVOS.

a) Establecer las bases para la prueba de potencia de tres y seis puntos del toxoide tetánico en cobayo.

b) Elaborar y evaluar la preparación del toxoide tetánico para ser propuestos a futuro como un estándar de referencia interna.

c) Probar el método propuesto como rutina para la medición de la potencia del toxoide tetánico establecido en la normas de la OMS.

d) Realizar un estudio estadístico con los datos obtenidos por el método de protección activa en cobayos.

MATERIAL Y REACTIVOS

Material.

Matraces Erlenmeyer de 250 ml	Pyrex
Barras magnéticas	
Bases magnéticas	
Pipetas volumétricas 1 ml	Pyrex
Pipetas volumétricas 2 ml	"
Pipetas volumétricas 5 ml	"
Pipetas volumétricas 10 ml	"
Probetas graduadas 50 ml	"
Frascos de vidrio 20 ml	
Frascos de vidrio 30 ml	
Tela adhesiva	
Masking tape	
Jeringa 10 ml	Plastipak
Jeringa 5 ml	
Agujas de número 23 ó 25	
Charola de aluminio	
Frascos de vidrio 5 ml	
Tapones de plástico	
Matraces volumétricos 1 lt	Pyrex
Algodón	
Gasa	
Etiquetas	
Papel aluminio	
Mochero	
Máquina llenadora de líquidos	Marcos Mapisa Modelo DC-1
Jeringa llenadora de 5 ml	
Charolas de plástico	
Sobretapas	
Campana de flujo laminar	VECO S,A
Engargoladora manual	Mapisa

a) Material Biológico.

1 000 Cobayos ambos sexos	400 - 450 gr	
2 500 Cobayos ambos sexos	250 - 350 gr	
Toxina Tetánica (sustancia de trabajo: 70 LF)		INH*
Toxide tetánico 900 LF		"
Toxide tetánico 1 000 LF		"

Reactivos.

Hidroxido de aluminio al 0.3 %	Merck
Agua peptonada	"
Solución salina fisiológica	"
Alcohol etílico	"
Fenol al 10 %	"

*Sustancia producida en el Instituto Nacional de Higiene.

M E T O D O S

Los procedimientos generales usados en este trabajo se indican en el diagrama 2 y se describen a continuación:

ADSORCION DEL TOXOIDE TETANICO.

Para establecer la concentración del toxoide [en LF], donde se observe una respuesta más adecuada se prepararon a 30, 40 y 50 LF.

Se colocan en tres matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de gase/algodón las cantidades especificadas de hidróxido de aluminio al 0.3 por ciento (P/V) y toxoide tetánico para ser adsorbidos por agitación, empleando una base con agitación magnética durante 2 horas. Se obtiene el toxoide tetánico adsorbido a una concentración de 30, 40 y 50 LF/ml, a partir de un toxoide concentrado cuya concentración inicial es de 900 LF/ml.

Elaboración de las diluciones :

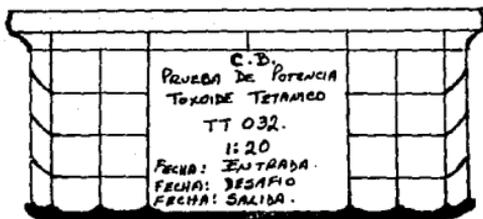
1 ml toxoide tetánico	+	29 ml de Al(OH ₃)	=	30 LF
1 ml "	"	+ 21 " "	"	= 40 LF
1 ml "	"	+ 17 " "	"	= 50 LF

PRUEBA DE POTENCIA.

Inmunización.- Se inoculan por vía subcutánea 1 ml del toxoide tetánico a 16 cobayos para cada dilución propuesta. Las diluciones fueron las siguientes, aplicados a toxoides conteniendo 30, 40 y 50 LF/ml :

1	:	11.25
1	:	16.87
1	:	25.31
1	:	37.9
1	:	56.95

Se colocan 8 cobayos en cada caja perfectamente identificadas, con el nombre de la prueba; departamento; dilución utilizada; fecha; etc. Para inocular a los cobayos se quita una porción del pelo del costado derecho del cobayo y se inyecta por vía subcutánea. En seguida se muestra un ejemplo de la identificación de las cajas. Se dejan un período de inmunización de veintiocho días.



Desafío.- Al cabo de los 28 días de inmunización los cobayos se inyectan ("retan") con 1 ml de la toxina tetánica a 50 DL₅₀/ml por vía subcutánea. Para inocularlos se abre el costado izquierdo del lomo del cobayo y se inyecta. Se observa la prueba durante 5 días posteriores al "reto", anotando el número de muertes por tenezación.

Se determina la DE₅₀ por el método de Sperman and Karber [ver: apéndice].

TITULACION DE LA TOXINA TETANICA EN DL₅₀.

La toxina tetónica utilizada es llamada de trabajo. Para realizar esta prueba se partió de un título teórico de 1 000 000 DL₅₀, utilizando un factor de 1.5 para proponer las demás diluciones, que son las siguientes:

Diluciones necesarias para obtener la dilución 1 : 100 000

- | | |
|-----|--|
| 1.: | 100 = 0.1 ml de toxina + 9.9 ml agua peptonada = A |
| 1 : | 10 000 = 0.1 ml de A + 9.9 ml " " = B |
| 1 : | 100 000 = 1.0 ml de B + 9.0 ml " " = C |

Diluciones de Trabajo

- | | |
|-----|--|
| 1 : | 296 296 = 3.44 ml de C + 6.55 ml de agua peptonada |
| 1 : | 444 444 = 2.27 ml de C + 7.72 ml de " " |
| 1 : | 666 666 = 1.50 ml de C + 8.50 ml de " " |
| 1 : | 1 000 000 = 1.00 ml de C + 9.00 ml de " " |
| 1 : | 1 500 00 = 1.00 ml de C + 14.0 ml de " " |

1 : 2 250 000 = 0.50 ml de C + 10.75 ml de agua peptonada
1 : 3 375 000 = 0.50 ml de C + 16.37 ml de " "

Se inocularon 10 cobayos con 1 ml de cada dilución por vía subcutánea. Se observa el número de muertes por tetanización y se registran. La DL₅₀ es la dilución en la cual al cabo de los cinco días es capaz de producir la muerte por tetanización a la mitad de los cobayos inoculados.

En base a los resultados obtenidos se proponen las diluciones en donde se obtiene el 50% de los animales muertos:

1 : 131 687 = 7.59 ml de C + 2.41 ml agua peptonada
1 : 197 530 = 5.10 ml de C + 4.50 ml " "
1 : 296 296 = 3.44 ml de C + 6.55 ml " "
1 : 444 444 = 2.27 ml de C + 7.72 ml " "

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3 y 4.

PREPARACION Y ESTERILIZACION DEL ESTANDAR SECUNDARIO DEL TOXOIDE TETANICO

PREPARACION DEL ESTANDAR:

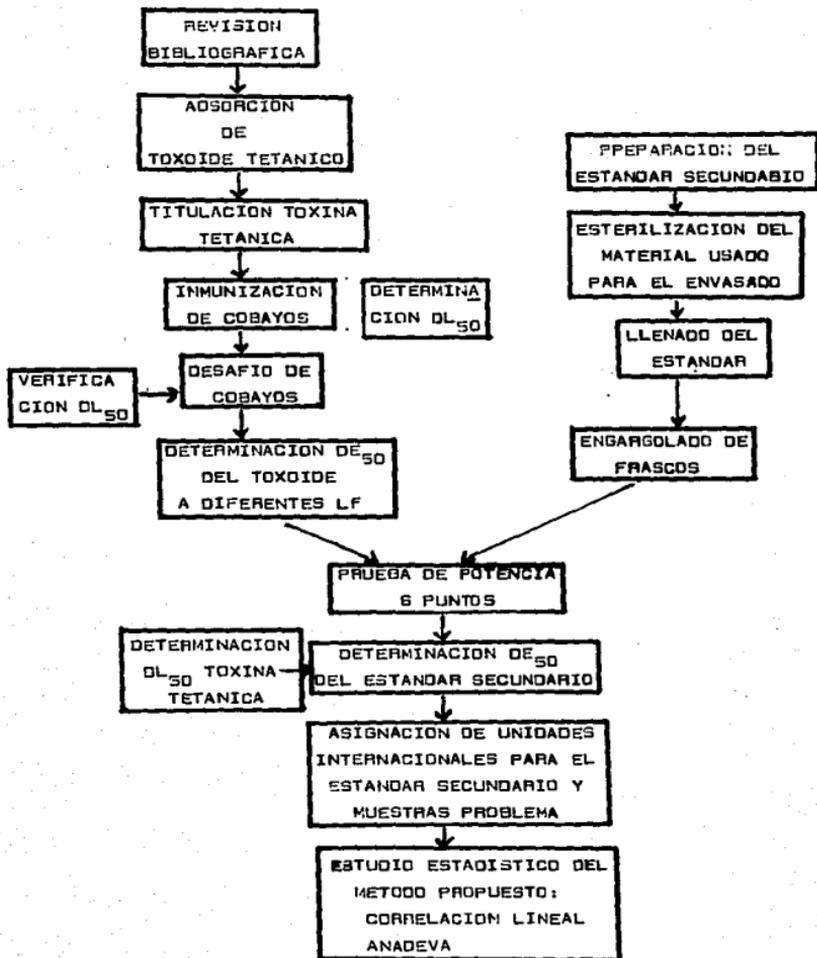
De las concentraciones preparadas inicialmente de 30, 40 y 50 Lf, se elige la de 40 Lf, para preparar un litro.

En un matr. Erlenmeyer de 2 lt se colocan 958.34 ml de toxoide tetánico concentrado de 900 Lf y 44.66 de Hidróxido de aluminio 0.3% (P/V) durante 2 horas por agitación, en base magnética.

ESTERILIZACION DEL MATERIAL USADO:

Los 200 frascos viales de 10 ml que se van a usar se lavan con agua destilada y posteriormente con extren, al final se enjuegan nuevamente con agua destilada, se secan, se colocan en un charola sin tapón, se cubren perfectamente con papel aluminio y se mandan a esterilizar en horno a 200°C por media hora. Los tapones de plástico se esterilizan en autoclave a 121°C por 15 min. Para el control de la esterilización se utiliza cinta testigo.

DIAGRAMA 2
 DIAGRAMA DE FLUJO DEL METODO SEGUIDO



El llenado de los frascos se lleva a cabo en una llenadora semiautomática para lo cual se esteriliza la manguera y jeringa llenadoras por calor húmedo a 121°C por 30 min.

LLENADO DEL ESTANDAR.

Se lleva a cabo en el área estéril dentro de la campana de flujo laminar.

Se colocan todos los materiales estériles dentro de la campana de flujo laminar.

Toda el área usada y la llenadora se limpian con fenol (10% P/V), se pone a funcionar la campana de flujo laminar. Se equipa la llenadora con la manguera y la jeringa inyectora de 5 ml, se realiza el llenado semiautomático de los frascos viales en condiciones estériles. Los frascos llenos se tapan, con el tapón de hula estéril y con un anillo de aluminio. El llenado se efectúa siguiendo las indicaciones pre vestido y manejo en áreas estériles.

ENGARGOLADO DE LOS FRASCOS.

Se lleva a cabo en una engargoladora manual.

Los frascos con su anillo de aluminio se llevan engargolar manualmente. Se almacena el material listo y membretado en la cámara fría (2 a 8 °C).

PRUEBA DE POTENCIA " 6 PUNTOS "

a) Preparación de las Diluciones:

Toxoide Tetánico de Referencia				
1	: 11.85	= 2.0 ml	toxoide tetánico	+ 21.70 ml S.S.F.
1	: 17.77	= 1.0 ml	"	" + 16.77 ml "
1	: 26.66	= 1.0 ml	"	" + 25.66 ml "
1	: 40	= 0.5 ml	"	" + 19.5 ml "
1	: 60	= 0.34 ml	"	" + 19.66 ml "
1	: 90	= 0.25 ml	"	" + 22.25 ml "

Las diluciones utilizadas para los lotes de toxoide tetánico a -

prueba son:

1 : 20 = 1.0 ml toxoide tetánico + 19.0 ml 3.S.F.
1 : 30 = 0.7 ml " " + 19.30 ml "
1 : 45 = 0.5 ml " " + 22.00 ml "

b) Inmunización.

Se inmunizan 16 cobayos, las diluciones del estandar preparado y las tres diluciones de cada lote a prueba. Se inocula 1 ml de cada dilución por vía subcutánea a cobayos que pesan de 250 a 350 gr.

Referencia Intera	Muestras Toxoide Tetánico
1 : 11.85	1 : 20
1 : 17.77	1 : 30
1 : 26.56	1 : 45
1 : 40	
1 : 60	
1 : 90	

Se colocan en 4 cajas (10 cobayos en cada una) para usarlos en la determinación de la DL₅₀.

Se dejan por un periodo de 28 días.

c) Prueba de Desafío.

Se desafían los cobayos transcurridos los 28 días de inmunización, con 50 DL₅₀/ml de toxina tetánica, inyectando por vía subcutánea.

Se preparan 250 ml de la solución de desafío en condiciones estériles [junto a un mechero con todo el material estéril, matraz, pipetas, frascos, etc.], de la siguiente manera:

0.1 ml de toxina tetánica + 9.9 ml agua peptonada = A
50 DL₅₀ 9.62 ml " " + 240.38 ml agua peptonada = B

Se observa y registra el número de muertes en todas diluciones durante 5 días que hayan presentado síntomas de tetanización.

- Verificación de la DL₅₀.

A la par del proceso de inmunización se colocan 40 cobayos, 10 en cada caja, para que en el momento de la prueba de desafío se verifique la DL₅₀. Se inoculan por vía subcutánea, con 1 ml de cada dilución, las diluciones fueron:

1 : 2 600
1 : 86 666
1 : 130 000
1 : 145 000

d) Cálculos.

La determinación de la DE_{50} se realiza con el % de sobrevivencia, por el método de Sperman and Karber.

Los lotes del toxoide tetánico elaborados en el INH cuya potencia fué evaluada por este método y que se titularon son: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, Ñ, O (asi fueron denominados).

DETERMINACION DE LAS UNIDADES INTERNACIONALES DEL
ESTANDAR INTERNO Y LAS MUESTRAS PROBLEMA

El estandar internacional liofilizado resuspendido con 10 ml de solución salina fisiológica, tiene 340 UI, se realizan las diluciones necesarias para tener concentraciones de 3.5 UI, 1.4 UI y 0.56 de la forma siguiente:

A = 3.5 UIA = 1 : 9.7 3.35 ml St. Internacional + 29.14 ml S.S.F.
B = 1.4 UIA = 1 : 24.2 13.0 ml de A + 19.5 ml de S.S.F.
0.56UIA = 1 : 60.7 13.0 ml de B + 19.5 ml de S.S.F.

Se inoculan 16 cobayos para cada dilución, por vía subcutánea con 1 ml cada uno.

Al mismo tiempo se inoculan 16 cobayos de cada dilución propuesta para el estándar interno preparado, las diluciones son:

1 : 5.2
1 : 13.0
1 : 32.5
1 : 81.25

Se les da un periodo de inmunización de 28 días, al cabo de este tiempo, se desafían los cobayos con 50 DL_{50} de manera similar como se realiza la prueba de potencia de toxoides tetánicos.

También, a la par de estas pruebas se colocan 4 cajas con 10 cobayos cada una, que servirán para la verificación de la DL_{50} de la toxina tetánica utilizada.

Las diluciones propuestas para las muestras problema son:

1 : 3.75
1 : 9.4
1 : 23.5
1 : 58.75

Después del desafío se registra el número de muertes por teta~~n~~ización durante 5 días posteriores.

Con los datos recabados se determina la DE_{50} del estándar interno, estándar internacional y los lotes problem. por el método de Spearman - and Karber. Las unidades internacionales antitóxicas (UIA) se determinan por la fórmula siguiente:

$$\frac{DE_{50} \text{ estándar internacional}}{DE_{50} \text{ Problema}} \times 34 \text{ UIA/ml estándar} = \text{UIA Problema}$$

" PRUEBA DE 3 PUNTOS "

Después de haber hecho un estudio preliminar, se determinan las diluciones que son usadas en esta prueba. Se utilizan 2 diluciones del estándar interno, una que es la concentración donde se obtiene más del 50% de sobrevivencia y otra donde la sobrevivencia es menor del 50%. Y una dilución de la muestra problema, que igualmente ha sido estudiada y un promedio de las DE_{50} encontradas.

a) Inmunización.

Se inyectan por vía subcutánea con 1 ml del Toxide Tetánico 16 cc bayos para cada dilución por vía subcutánea. Las diluciones son:

Estandar Secundario	Lote de Toxide Tetánico
1 : 5.2 = 4.8 ml St. Sec. + 15.20 S.S.F.	1 : 25.58 o sea
1 : 32.5 = 0.63 " " " + 19.36 "	1 ml T.T. + 24.6 S.S.F.

Se deja un periodo de inmunización de 28 días.

Como en cada una de las pruebas se colocan 40 cobayos (10 cobayos en cada caja) para el control de la DL_{50} .

b) Desafío.

Al cabo de los 28 días no desas se desafían los cobayos con 1 ml + de 50 DL₅₀ de la toxina tetánica, de igual manera por vía subcutánea. En la inmunización utilizamos el lado derecho del lomo del cobayo y en esta ocasión el lado izquierdo.

Se observa la respuesta de los cobayos en los 7 días subsiguientes y se anota el número de muertes con características de tetanización.

- Control de la ODL₅₀ de la Toxina Tetánica.

Los 40 cobayos que se colocan de 10 por caja, se utilizan para verificar la potencia de la Toxina Tetánica (DL₅₀). Las diluciones que se utilizan en cada caso, se realizan en base a la potencia anterior, utilizando 4 diluciones, se inyectan 16 cobayos para cada una con 1 ml por vía subcutánea.

El cálculo de la DE₅₀ del toxoide y la DL₅₀ de la toxina se realiza por el método de Sperman and Karber.

RESULTADOS

Los datos obtenidos en cada un de los métodos realizados se resumen en una serie de tablas que se presentan a continuación.

TABLA 1

ESTUDIO PRELIMINAR DE DILUCIONES PARA LA
DETERMINACION DE LA DL₅₀ DE LA TOXINA TETANICA

DILUCION	M	S	%M
1 : 296 296	1	7	12.5
1 : 444 444	0	8	0.0
1 : 666 666	0	8	0.0
1 : 1 000 000	0	8	0.0
1 : 2 250	0	8	0.0

TABLA 2

SISTEMA DE DILUCIONES PROPUESTO PARA DETERMINAR
LA DL₅₀ DE LA TOXINA TETANICA

DILUCION	M	S	%M
1 : 2 600	8	0	100
1 : 86 666	8	0	100
1 : 130 000	4	4	50
1 : 193 000	0	8	0

S = Animales Sobrevivientes.

M = Animales Muertos.

%M = Porcentaje de Muertos.

TABLA 3

PROTECCION ACTIVA DE COBAYOS INYECTADOS
CON TOXIDE TETANICO A DIFERENTES LF

CONCENTRACION (LF)	DILUCION	S	M	%
30	1 : 11.25	16	0	100
	1 : 16.87	16	0	100
	1 : 25.31	11	5	68.75
	1 : 37.90	4	12	25.0
	1 : 56.95	2	14	12.5
40	1 : 11.25	16	0	100
	1 : 16.87	15	1	93.75
	1 : 25.31	10	6	62.5
	1 : 37.90	9	7	56.25
	1 : 56.95	8	8	50.0
50	1 : 11.25	16	0	100
	1 : 16.87	15	1	93.75
	1 : 25.31	15	1	93.75
	1 : 37.90	14	2	87.5

S = Animales Sobrevivientes.

M = Animales Muertos.

% = Por ciento de animales sobrevivientes.

TABLA 4

PROTECCION ACTIVA EN COBAYOS INYECTADOS
CON TOXOIDE TETANICO EVALUADA EN DE₅₀.

CONCENTRACION [LF]	DILUCION	S	M	DE ₅₀
30	1 : 16.87	16	0	31.78
	1 : 25.31	11	5	
	1 : 37.90	4	11	
40	1 : 37.90	12	4	40.00
	1 : 56.95	3	13	
	1 : 85.42	0	16	
50	1 : 37.90	14	2	54.00
	1 : 56.95	10	6	
	1 : 85.42	3	13	
	1 : 128.23	0	16	

S = Animales sobrevivientes.

M = Animales Muertos.

DE₅₀ = Dosis efectiva al 50 %.

TABLA 5

ESTUDIO PRELIMINAR PARA DETERMINAR LA DOSIS-RESPUESTA
EN LA INYECCION DE VARIOS LOTES DE TOXOIDE TETA
NICID EN COBAYO:

LOTE	DILUCION	S	M	%S	DE ₅₀
A	1 : 20	16	0	100	33.99
	1 : 30	11	5	66.75	
	1 : 45	2	14	12.5	
B	1 : 20	12	4	75.0	23.87
	1 : 30	2	14	12.5	
	1 : 45	1	15	6.25	
C	1 : 20	12	4	75.0	26.87
	1 : 30	6	10	37.5	
	1 : 45	2	14	12.5	
D	1 : 20	12	4	75.0	26.42
	1 : 30	6	10	37.5	
	1 : 45	1	15	6.25	
E	1 : 20	13	3	81.25	--
	1 : 30	4	12	25.0	
	1 : 45	8	8	50.0	

S = Animales vivos.

M = Animales muertos.

%S = Porcentaje de animales vivos.

DE₅₀ = Dosis efectiva que mata el 50% de animales.

TABLA 6

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE 16 LOTES DE TOXOIDE
TETANICO EN UNIDADES INTERNACIONALES
(Prueba de 6 Puntos)

MUESTRA	DE ₅₀	UIA/ml	IPSEN [UIA/ml]
A	50.99	85.55	5.42
B	15.20	41.18	12.72
C	15.20	41.18	12.72
D	13.74	46.27	2.80
E	23.87	60.9	3.47
F	26.42	55.07	3.47
G	14.02	69.79	3.98
H	6.05	71.77	3.47
I	23.87	60.9	3.8
J	19.52	66.74	2.5
K	9.84	81.16	6.2
L	13.94	73.90	2.89
M	11.16	71.56	4.3
N	12.75	76.74	2.57
O	4.08	89.11	2.84
P	9.30	85.83	4.30

UIA = Unidades Internacionales Antitóxicas.

DE₅₀ = Dosis efectiva al 50%.

TABLA 7

POTENCIA DEL TOXOIDE TETANICO EVALUADO CON LA PRUEBA DE "3 PUNTOS"

SUSTENCIA	DILUCION	S	M	%S
Estandar	1 : 5.2	8	4	66.67
Interno	1 : 32.5	2	10	16.67
Lote A	1 : 25.58	1	9	10.0
B	"	0	40	0.0
G	"	6	4	60.0
H	"	1	9	90.0
I	"	5	5	50.0
K	"	3	7	30.0
N	"	2	8	20.0

S = Animales sobrevivientes.

M = Animales muertos.

%S = Porcentaje de sobrevivientes.

TABLA 8

ACTIVIDAD DEL TOXOIDE TETANICO EVALUADO EN UNIDADES INTERNACIONALES CON LA PRUEBA DE " 3 PUNTOS "

LOTE	UIA/ml
B	13.2
D	15.25
G	3.25
H	--
I	5.2
K	5.2
N	11.2

Estos valores fueron obtenidos al interpolar en la curva de dosis-respuesta (Gráfico 5).

TABLA 9

DETERMINACION DE LAS UNIDADES INTERNACIONALES DE ANTITOXINA
 PARA EL TOXOIDE TETANICO PROPUESTO COMO ESTANDAR INTERNO

MUESTRA	DE ₅₀	UIA / ml
Estándar internacional ₁ Estándar interna ₁	18.70 13.96	45.54
Estándar internacional ₂ Estándar interno ₂	38.32 26.95	48.34
Estándar internacional ₃ Estándar interno ₃	46.13 35.64	44.00
Valor Promedio de Estandar Secundario: 45.96 UIA/ml		

1, 2, 3 : Son los valores obtenidos de 3
 determinaciones diferentes.

UIA : Unidades Internacionales Antitoxicas.

APENDICE DE GRAFICAS.

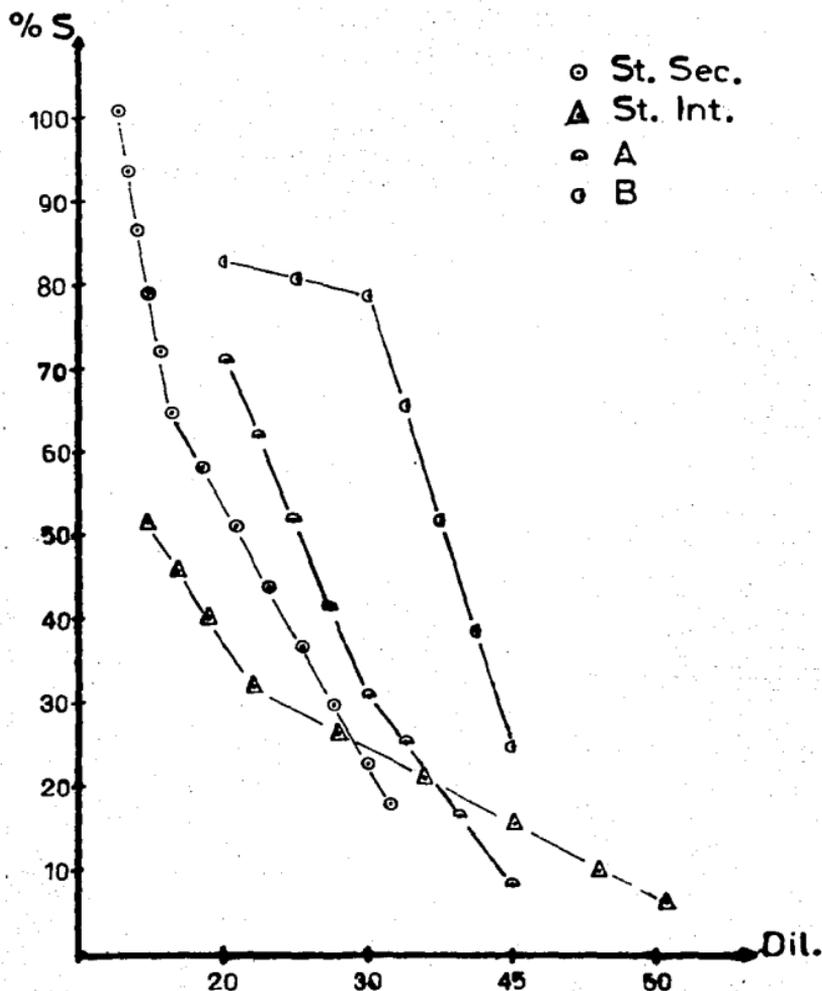
De la gráfica 1 a la 4 se ilustra la curva Dosis-Respuesta de la potencia de toxoide tetánico de cada uno de los lotes estudiados, el estándar interno y el estándar internacional, llamada prueba de 6 puntos.

En la gráfica 5 se muestra la actividad de 7 lotes de toxoide tetánico por la prueba de 3 puntos, se obtiene dicho valor interpolando sobre la recta trazada del valor del estándar interno.

A continuación se enlistan los datos mostrados en cada una de las gráficas:

MUESTRA	DILUCION	% SOBREVIVIENTES
Estándar Internacional	1 : 9.7	52.00
	1 : 24.2	32.40
	1 : 60.7	6.3
Estándar Secundario	1 : 5.2	96.60
	1 : 13.0	65.0
	1 : 32.5	13.5
Lote A	1 : 20.0	70.9
	1 : 30.0	30.8
	1 : 45.0	8.9
Lote B	1 : 20	82.8
	1 : 30	74.9
	1 : 45	25.0
Lote C	1 : 20	69.0
	1 : 30	38.8
	1 : 45	20.0
Lote D	1 : 20	25.00
	1 : 30	0.0
	1 : 45	0.0
Lote G	1 : 20	51.6
	1 : 30	46.0
	1 : 45	13.9
Lote H	1 : 20	45.0
	1 : 30	13.8
	1 : 45	4.9

MUESTRA	DILUCION	% SOBREVIVIENTES
Lote I	1 : 20	65.3
	1 : 30	26.0
	1 : 45	2.8
Lote J	1 : 20	53.9
	1 : 30	34.5
	1 : 45	5.6
Lote L	1 : 20	80.0
	1 : 30	71.5
	1 : 45	5.3
Lote M	1 : 20	54.6
	1 : 30	20.0
	1 : 45	5.3
Lote N	1 : 20	16.7
	1 : 30	6.7
	1 : 45	2.2
Lote O	1 : 20	26.4
	1 : 30	10.0
	1 : 45	0.0



GRAFICA 1. Dosis-respuesta de Toxide Tetánico evaluado contra el estándar internacional en la "Prueba de 6 Puntos" (incluye los lotes A y B)

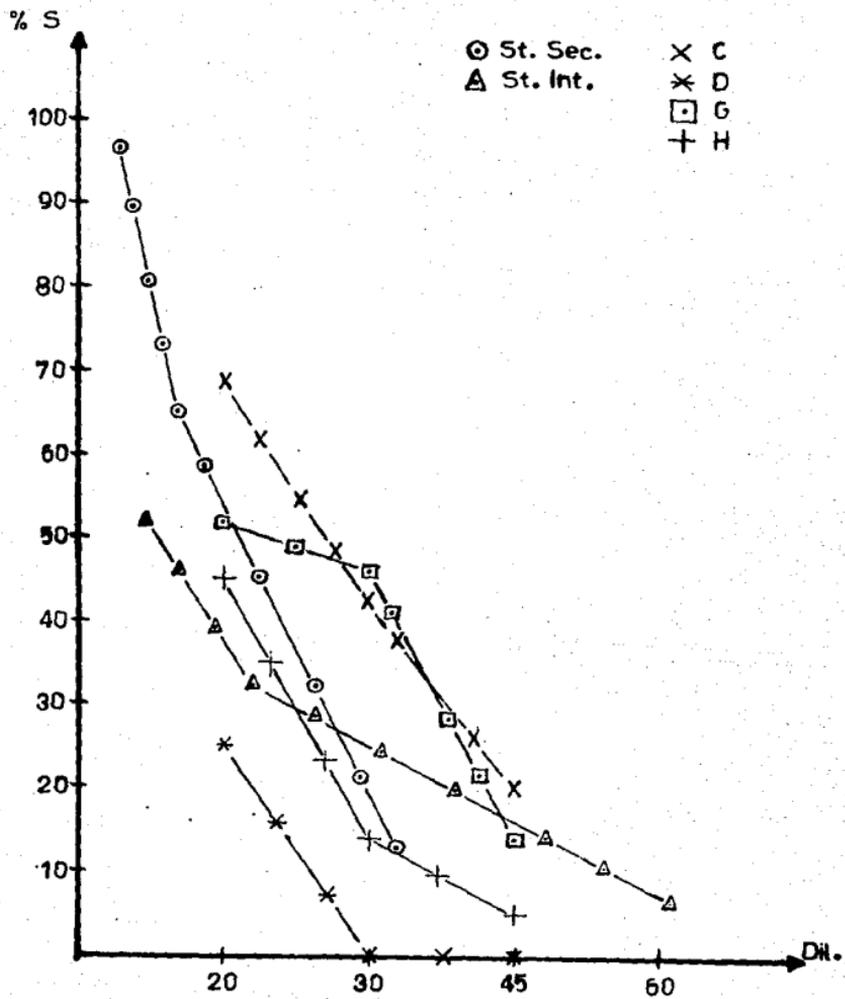
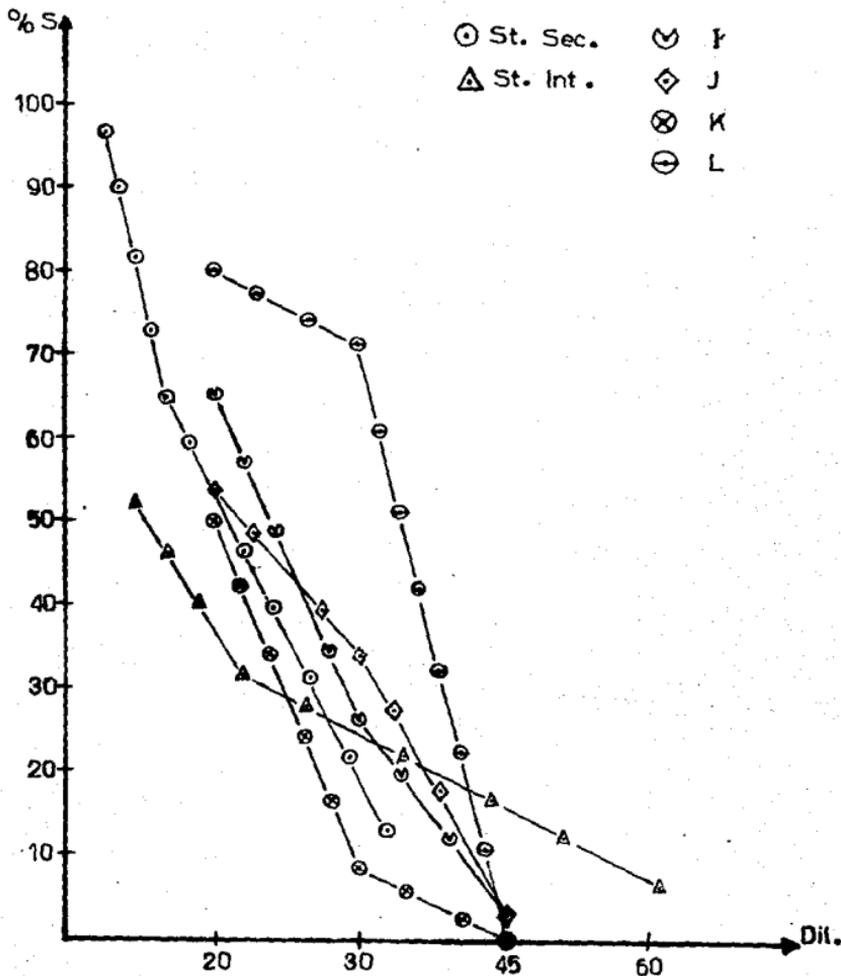
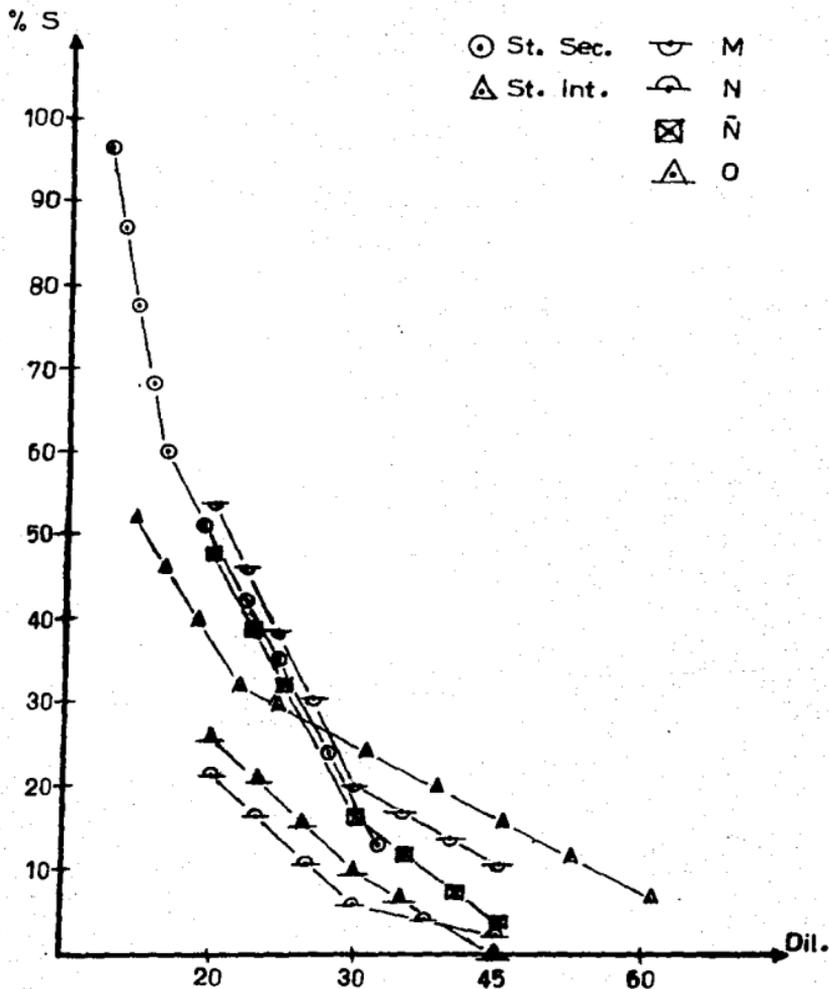


GRÁFICO 7. Dosis-respuesta de Toxide tónico evaluado contra el estándar internacional en la "prueba de 6 puntos" (incluye lotes C, D, G, H)



GRAFICA 3. Dosis-respuesta de Toxoide Tetánico evaluado contra el estándar internacional en la "Prueba de 5 Puntos" (incluye los lotes I, J, K, L)



GRAFICA 4. Dosis-respuesta de Toxoides Tetánico evaluado contra el estándar internacional en la "Prueba de 6 Puntos" (incluye los lotes E, I, A, D)

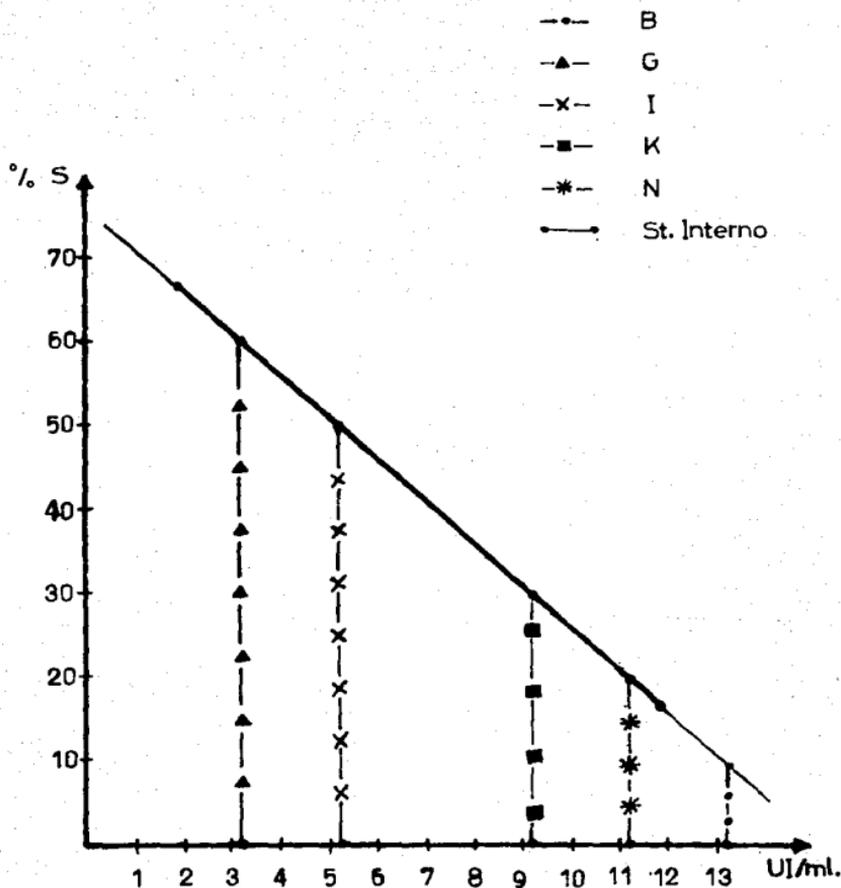


FIGURA 5. Evaluación de la actividad del Toxide Tetánico en Unidades Internacionales por la "Prueba de Puntos".
(Incluye los lotes B, G, I, K, N, St. Interno)

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Al analizar los datos para las diferentes disciplinas, se encuentran con frecuencia que resulta conveniente saber algo acerca de la relación que existe entre dos variables.

El análisis de regresión es útil para averiguar la forma probable de la relación entre las variables y, cuando se utiliza este método de análisis, el objetivo final es por lo general predecir o estimar el valor de una variable que corresponda a un valor determinado de otra variable.

El estudio de regresión lineal efectuado a los datos obtenidos se realizó mediante el uso de la calculadora, los valores obtenidos son:

$$\text{Pendiente} = m = - 0,1095$$

$$\text{Ordenada al origen} = b = 12,43179$$

De tal forma que la ecuación encontrada es:

$$y = - 0,1095 + 12,42179$$

Los datos utilizados fueron:

X	Y
9F.55	5.42
41.18	12.72
41.18	12.72
46.27	2.80
60.9	3.47
55.07	3.47
69.79	3.98
71.77	3.47
60.9	3.8
66.74	2.5
81.16	6.2
73.90	2.89
71.56	4.3
76.74	2.57
89.11	2.84
85.83	4.30

Donde X es el valor de la potencia de los 15 lotes de toxoide tetánico evaluados por el método de protección activa mediante la prueba de 6 puntos, y Y es el valor de la potencia obtenido por el método de IPSEN.

Una vez que se ha obtenido la ecuación de regresión, debe evaluarse para determinar si describe adecuadamente la relación entre las dos variables y si puede utilizarse convenientemente con fines de predicción y estimación.

El coeficiente de correlación de la población mide la intensidad de la relación lineal entre X y Y, es conocido como R^2 . Si $R^2=1$, existe una correlación lineal directa perfecta entre las dos variables, mientras que cuando $R^2=-1$ indica una correlación inversa perfecta. Si $R^2=0$ las dos variables no están correlacionadas.

El valor de R^2 se obtuvo de igual forma mediante el uso de la calculadora, siendo el valor de :

$$R^2 = 0.27208$$

Otra técnica usada es el análisis de la variancia, que tiene su aplicación más amplia en el análisis de los datos obtenidos a partir de experimentos.

Los resultados obtenidos para el análisis de variancia para los anteriores datos de X y Y se resumen en la siguiente tabla:

ANAVEA DE LA "REGRESION"

FV	gl	SC	MC	Fcal
Regresión	1	$SC_r = m\sum xy + b \frac{(\sum y)^2}{n}$ $SC_r = 60.22$	$\frac{SC_r}{gl_r} = 60.22$	$\frac{MC_r}{MC_{er}}$
Error de Regresión	$n-2=$ $16-2=$ 14	$SC_{er} = \sum y^2 - m\sum xy - b\sum y$ $SC_{er} = 96.78$	$\frac{SC_{er}}{gl} = 96.78$ $= 6.912$	$\frac{60.22}{6.912}$ $= 8.71$

$$F_{\text{tab}} = 4.6$$

En esta tabla se usaron los siguientes términos:

FV : Fuente de variación.

gl : Grados de libertad.

SC : Suma de cuadrados.

MC : Media cuadrática.

F_{cal} : F calculada.

F_{tab} : F de tablas, el valor buscado en una tabla de Fisher con 1 y 14 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.05

De este estudio realizado se concluye que:

$$F_{\text{cal}} \geq F_{\text{tab}} \quad \text{osea} \quad 8.71 \geq 4.6$$

Por lo tanto existe asociación entre las variables X y Y.

El anterior estudio estadístico tanto de regresión lineal como de análisis de la varianza se realizó para el método de protección activa por la prueba de 3 puntos, las variables usadas son:

X	Y
13.2	12.72
15.2	2.8
3.25	3.98
5.2	3.8
9.2	6.2
11.2	2.57

Donde X son los valores de la potencia obtenida de 7 lotes de toxoide tetánico por el método de protección activa de "3 puntos" y los valores de Y corresponden a la potencia evaluada por el método de IPSEN.

Los resultados de la regresión lineal efectuada proporcionan la ecuación siguiente:

$$y = 0.21538 + 3.28989x$$

Con un coeficiente de correlación igual a:

$$R^2 = 0.2594$$

[49]

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Y el analisis de varianza se resume en la siguiente tabla:

Fv	gl	SC	MC	F _{cal}
Regresión	1	SC _r = 4.94898	MC _r = 4.94898	0.36070
Error de Regresión	7-2= 5	SC _{er} = 69.60057	MC _{er} = 13.7201	

$$F_{\text{tab}} = 6.61$$

Del estudio realizado se concluye que no hay asociación entre las variables X y Y, ya que:

$$F_{\text{cal}} \leq F_{\text{tab}} \quad \text{o sea} \quad 0.36070 \leq 6.61$$

Los términos usados ya se desglosaron en la tabla de ANADEVa anterior.

D I S C U S I O N

1. Determinación de la DL_{50} de toxina tetánica.

Para la prueba se requiere realizar el desafío con la toxina titulada DL_{50} . Para ello se realizó el estudio preliminar que se indica en la tabla 1, en donde no se obtuvo la dosis-respuesta adecuada para calcular la DL_{50} con tal motivo se cambiaron las diluciones (tabla 2), pero para llegar a éstas hubo otros estudios intermedios que ayudaron a llegar a las diluciones más adecuadas. Así se logró la dosis-respuesta adecuada obteniendo un valor de DL_{50} para la toxina tetánica de 131 000 por ml.

Es importante conocer y manejar este dato durante todo el trabajo para tener la certeza de que la potencia de la toxina que se maneja es la real para ser utilizada en la prueba de desafío, durante cada prueba se verificará el valor de la misma.

2. Prueba preliminar para la determinación de la dosis-respuesta en la preparación interna.

Debido a que en el bioensayo es necesario determinar la DE_{50} , se realizó esta prueba preliminar para conocer los límites que nos permitan tener un valor intermedio de 50% de protección del toxoide contra el reto de los animales con la toxina tetánica.

En la tabla 3 se muestran los resultados, observándose que el toxoide tetánico con 30 y 40 Lf la respuesta es la esperada ya que se puede observar una sobrevivencia del 50% que es un dato muy útil en la prueba. Con 50 Lf la protección del toxoide no permite observar el valor de 50% de protección ya que sería necesario diluir más el producto. Esta tabla nos permite observar que al incrementar la concentración de Lf se obtiene gradualmente más protección.

3. Determinación de la DE_{50} de la preparación interna de Toxoide Tetánico con diferentes Lf.

En base a los resultados del punto 1, se ajustaron las diluciones para determinar la DE_{50} de los toxoides a 30, 40, 50 Lf/ml confirmandose que al incrementar la concentración (en Lf) se obtiene mayor protección expresada como dilución (tabla 4).

Tales resultados nos ayudaron a seleccionar la concentración del toxoide para preparar un estándar interno que fué el de 40 Lf, ya que con

Tres diluciones nos permite observar resultados mayores y menores del 50% de sobrevivientes y con una dilución de 1 : 40 se obtiene su DE_{50} .

El valor en unidades internacionales del estándar interno determinadas en relación con un estándar nacional de los Estados Unidos de Norteamérica se muestra en la tabla 9, en donde podemos observar que el valor promedio de tres pruebas es de 45.96 UIA/ml, con un valor mínimo de 44.00 UIA/ml y un máximo de 48.34 UIA/ml.

4. Prueba preliminar para determinar DE_{50} de Toxóide Tetánico de producción rutinaria.

Para esta prueba se realizó un ensayo con 5 lotes (A, B, C, D, E) de producción para conocer la dosis-respuesta y se puede observar en la tabla 5 las diluciones seleccionadas, éstas fueron adecuadas ya que en todos los casos se logró calcular la DE_{50} excepto en el lote E. Estas diluciones se usan de base para los siguientes experimentos.

5. Prueba de potencia de "6 puntos" en cobayo para Toxóide Tetánico.

Para esta evaluación se probaron 18 lotes de toxóide tetánico (clave de A a la O) en varios grupos, en cada caso, contra el estándar internacional y el propuesto estándar interno. El valor en unidades internacionales se determinó en base al estándar internacional, considerando la relación de DE_{50} de este estándar con los de toxóide de prueba y la comparación interna, multiplicados por las unidades internacionales del estándar internacional.

Así mismo se incluye el nivel de entotoxina inducidos por cada muestra en cobayo, cuyo suero fué titulado en un sistema toxina-antitoxina [método de IPSEN] como se propone en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos⁽⁴⁾ cabe aclarar que este método no se llevo a cabo, ya existía tal información y se utilizó para conocer las diferencias entre este método y la prueba de "6 puntos".

El resumen de los resultados se muestra en la tabla 6 donde podemos observar que los toxóides de prueba tienen una actividad entre 41.18 y 89.14 UIA/ml. Así mismo se puede observar la gran diferencia que existe entre los dos métodos de evaluación del toxóide. Esto se debe tal vez a que la realización de los métodos es diferente, hay variables biológicas involucradas, el método de Ipsen fué efectuado con anterioridad, pero como se explicará en el tratamiento estadístico ambos métodos guardan una asociación, que es aceptable para usarse uno u otro.

En las gráficas de la 1 a la 4 se muestran las dosis-respuesta obtenidas en el ensayo de los 16 lotes. El comportamiento obtenido de los lotes a prueba es similar al seguido por los estándares, el internacional y el interno, donde se observa que a una mayor dilución existe menor porcentaje de sobrevivencia, porque la inmunidad desarrollada o la entotoxina producida es menor.

6. Prueba de potencia "3 puntos" en cobayo para toxoide tetánico.

En esta prueba se analizaron 7 lotes de toxoide tetánico y el estándar interno. En la tabla 7 se muestran los lotes evaluados con la única dilución usada 1:25.58 que es un promedio de todas las DE_{50} obtenidas. Para el estándar interno se usaron 2 diluciones, una que garantiza más del 50% de sobrevivencia y otra que protege menos del 50%. Con estos dos puntos y el porcentaje de sobrevivencia obtenido en cada caso, se traza una recta (gráfica 5) donde se interpoló el valor de las UIA/ml de cada lote. Estos resultados se ilustran en la tabla 8.

Como se puede observar los valores obtenidos en la prueba de "3 puntos" difieren de los obtenidos en la prueba de "6 puntos", con tal motivo se recomienda la realización de la prueba para mayor número de lotes y hacer varias repeticiones.

7. Tratamiento Estadístico de los datos.

Se realizaron las técnicas estadísticas siguientes:

a) Regresión Lineal Simple, donde el coeficiente de correlación R^2 - obtenido fué para la prueba de "6 puntos" de 0.27208 y para la prueba de "3 puntos" $R^2 = 0.25942$ de donde se desprende que no existe correlación entre el método de IPSEN y cada uno de los métodos de protección activa propuestos "3 y 6 puntos", por lo que se puede utilizar la técnica de ANADEVIA de la regresión.

b) Análisis de Varianza para una regresión, esta técnica es válida porque nos permite interpretar la variación que existe al interior de cada variable (método) y nos la compara entre sí.

Se va a determinar si existe asociación entre las técnicas o métodos usados, sabiendo que la F calculada se obtiene al dividir la suma de cuadrados de la regresión entre sus grados de libertad y comparandose con la suma de cuadrados del error de la regresión entre sus grados de libertad, de donde el cociente generado nos da un valor de 8.71, al compararse con la F de tablas obtenida con un alfa o nivel de significancia

al 0.05 y un nivel de confianza al 95% que para un experimento biológico es más que suficiente, tal valor fué de 4.6. De esto se afirma que hay una asociación entre el método de Ipsen y el método de protección activa por la prueba de "6 puntos" ya que 8.71 es mayor o igual que 4.6 y se cumple con el requerimiento solicitado por el tratamiento de ANADEVA, siempre y cuando sea el mismo modelo biológico y en las mismas condiciones de estudio.

Del análisis de varianza realizado para el método de Ipsen y la prueba de tres puntos se obtienen resultados no satisfactorios puesto que no hay asociación entre dichos métodos, ya que no satisface el requerimiento solicitado por la prueba de ANADEVA, donde F calculada resultó menor o igual al F de tablas o sea $0.36070 \leq 6.61$.

CONCLUSIONES

1. Se establecieron las condiciones de prueba para la realización del ensayo de 3 y 6 puntos para la evaluación del Toxoides Tetánico.

2. Se propone el uso de la Preparación Interna de Referencia para la evaluación de Toxoides Tetánico de Referencia solo o combinado como vacuna DPT por la prueba de protección activa en cobayo (3 y 6 puntos) considerando un valor promedio de 45.96 UIA/ml.

3. La vigencia de la preparación interna de referencia se recomienda que sea por el momento de 2 años que es el tiempo que se ha demostrado anteriormente, en que el toxoide tetánico conserva su actividad.

4. La dosis-respuesta obtenida en la prueba de potencia de 6 puntos para el toxoide tetánico propuesto como preparación interna de referencia es adecuada para la determinación de su UE_{50} .

5. El análisis de varianzas realizado muestra una asociación entre el método rutinario de IPSEN y la prueba de protección activa de 6 puntos, siempre conservarán una relación reproducible, debiendo considerarse el modelo biológico y las condiciones de laboratorio deberán ser idénticas a las del estudio a realizar.

A P E N D I C E

El cálculo de las DE_{50} ó DL_{50} se realiza por el método de Spearman and Karber cuya fórmula es :

$$DE_{50} = -\log \text{dil} \uparrow - \left(\frac{\sum \% S}{100} - 0.5 \right) \log f. \text{dil.}$$

Donde:

$\text{dil.} \uparrow$ = a la dilución de concentración más alta.

$\% S$ = porcentaje de animales sobrevivientes.

$f. \text{dil.}$ = factor de dilución.

Un ejemplo resuelto con los siguientes datos:

Dilución	% S	
1 : 9.4	87.5	
1 : 23.5	25.0	El factor de dilución
1 : 58.75	12.5	es 2.5

$$\begin{aligned} -\log DE_{50} &= -\log 9.4 - \left(\frac{87.5 + 25.0 + 12.5}{100} - 0.5 \right) \log 2.5 \\ &= -0.973 - \left(1.25 - 0.5 \right) (0.397) \\ &= -0.973 - (0.75) (0.397) \\ &= -0.973 - 0.297 \end{aligned}$$

$$-\log DE_{50} = -1.27$$

$$DE_{50} = \text{antilog } 1.27$$

$$DE_{50} = 18.62$$

Para obtener la DE_{50} del toxoide a prueba se necesita hacer una dilución 1 : 18.62.

En el caso de calcular una DL_{50} para una toxina tetánica se utiliza el porcentaje de muertes (%M) siguiendo el mismo procedimiento.

BIBLIOGRAFIA

1. Bellanti, J.A., *Inmunología*. 2a. edición, Editorial Interamericana, 1981.
2. Bentzon, M.W., Moller, S. and Lyng, J. Simplified confirmatory potency tests for toxoid vaccines, Expert committee on biological standardization, WHO, Geneva, 12 - 18 June 1984.
3. Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cramer, N.E. and Suesdorf, D.H., *Methods in Immunology*. 2a. edición, W.A. Benjamin, Inc. N.Y. 1970.
4. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, 5a. edición, Comisión Permanente de la Farmacopea de los E.U.M., México 1988.
5. Fudenberg, H.H., Stites, P.D., *Inmunología Básica y Clínica*. 4a. edición, El Manual Moderno, 1983.
6. Galecka, A., Kardymowicz, B. and Sawicki, J., "The estimation of the potency of adsorbed tetanus toxoids by the scored mouse test" *J. Biol. Stand.* 13, 325-329 (1985)
7. Gupta, R. K., Maheshwarit and Snght, H., "A rapid and sensitive method for the identity testing of adsorbed tetanus toxoid" *J. Biol. Stand.* 13, 325-340 (1979)
8. Gupta, R.K., Maheshwari, S.C. and Singh, H., "The titration of tetanus antitoxin IV. Studies on the sensitivity and reproducibility of the toxin neutralization test" *J. Biol. Stand.* 13, 143-149 (1985)
9. Gonzalez, M.; "Estudio de un Sistema Toxina-Antitoxina con relación a Clostridium tetani" Tesis de Doctorado, C.N.C.B., IPN, México 1980.
10. Informe 30°, Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos, Ginebra 1979.
11. Kabat, A. E., *Inmunoquímica Experimental*. La Prensa Médica Mexicana Médica, 1969.
12. Korner, L., Pletsch, H., "Antigenic potency of adsorbed tetanus vaccine" *J. Biol. Stand.* 1, 221-224 (1973)
13. Kumate, J., Gutierrez, G., *Manual de Infectología*, 11a. edición Francisco Cervantes Editores, México 1988.
14. Kumate, J., *Inmunidad-Inmunización-Vacunas*. 3a. edición, Francisco Cervantes Editores, México 1983.
15. Kreeftenberg, J. G., Maraman, F.R., "An investigation of mouse model to estimate the potency of the diphtheria component in vaccines" *J. Biol. Stand.* 13, 229-234 (1985)

16. Litter, K., Compendio de Farmacología. 3a. edición, Editorial Ate-
nao, Argentina 1969.
17. Lyng, J., "Potency Assay in Mice and in guinea pigs of adsorbed
tetanus toxoid" Expert Comitee on Biological Standardization, OMS,
Geneva. 27 september 3 october 1983.
18. Manual de Laboratorio. II Curso Internacional sobre Producción y
Control de Productos Biológicos, realizado por la Secretaría de Sa-
lud, México 1978.
19. Manual of Detail of Tests Required on Final vaccines used in the
WHO expanded Programme of immunization. September 1985.
20. Eisen, N., Inmunología. Salvat editores, S. A. Barcelona 1979.
21. Ramshorst, J.D. "Adjuvants and Biological Standardization" Internatio-
nal Symposium on Adjuvants of Immunity, 6 , 327-336 [1986]
22. Ramshorst, J.D., Cohen H., "The relation between animal potency test
and the human response to adsorbed tetanus toxoids" J. Biol. Stand.
1 , 215-220 [1972]
23. Ramshorst, J. D., "Collaborative assay of a proposed international
standard form tetanus toxoid [adsorbed]" Bull. Wld. Hlth. Org. 46 ,
53-66 [1972]
24. Rethy, L., Hasek, I., "Potency of aluminium-phosphate-adsorbed and
freeze-dried diphtheria and tetanus toxoids in toxoid-virus-bacterium
combined vaccines", Ann. Immunol. 25 , 41-47 [1985]
25. Rose, R., Friedman, H., Manual of Clinical Immunology. 2a. edition
U.S.A. 1980.
26. Russell, A.D., Pharmaceutical Microbiology. 2a. edition, Blackwell
Scientific Publications, U.S.A. [1980]
27. Smith, D., Norman, F., Conant, P., Bacteriología de Zinser. 2a. edi-
ción, Editorial Hispanoamérica, México 1980.
28. Ramshorst, J. D., "The influence external factors on immune response
in animals", Proc. Symposium on Bacterial Vaccines, by the Yugoslav
Academy of Sciences and Arts Zagreb 313-315 [1971]
29. Wayne, W.D., Bioestadística. 3a. edición, Editorial Limusa, México
1987.
30. Wesley, A.B., Microbiology. 1a. edición, Lippincot Company, U.S.A.
1978.