

130
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACION DE LA POTENCIA ANTITETANICA DE
INMUNOGLOBULINAS MEDIANTE INMUNODIFUSION RADIAL
Y SU CORRELACION CON EL METODO *IN VIVO***

**TESIS DE LICENCIATURA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A:
BEATRIZ ISABEL MELGOZA PACHECO**

DIRIGIDA POR:

Q. B. P. MA. DEL CARMEN MALDONADO BERNAL

ASESORADA POR:

M. EN C. LUISA ALBA LOIS

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO		PAGINA
I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
III.	Material y Métodos	19
IV.	Resultados	32
V.	Discusión	77
VI.	Conclusiones	82
VII.	Literatura Citada	84

FIGURAS

1	Estructura molecular de las inunoglobulinas según el modelo de Rodney-Porter.	17
2	Características fisicoquímicas de las inunoglobulinas.	18
3	Protocolo de trabajo para la prueba de L+/10/50.	29
4	Protocolo de trabajo para la titulación de inunoglobulina antitetánica.	30
5	Esquemas de placas para IDRS.	31
6-9	Titulación de toxina tetánica en unidades L+/10/50 (experimentos 1-4).	41
10	Determinación de la potencia antitetánica de la inunoglobulina estándar.	45
11-20	Determinación de la potencia antitetánica de la inunoglobulina problema (experimentos 1-10).	46
21	Potencia antitetánica de la inunoglobulina problema.	56
22	Optimización de la prueba de IDRS (tamaño y volumen por pozo).	57
23	Optimización de la prueba de IDRS (temperatura de incubación).	58

24	Optimización de la prueba de IDRS (mezclas toxina-agar).	59
25	Optimización de la prueba de IDRS (curva de la inunoglobulina problema).	60
26	Optimización de la prueba de IDRS (curva de la inunoglobulina estándar).	61
27-32	Potencia de inunoglobulina problema por IDRS (experimentos 1-6).	62
33	Prueba de IDRS inunoglobulina problema.	68
34-35	Potencia de la inunoglobulina estándar por IDRS (experimentos 1-4).	69
36	Prueba de IDRS inunoglobulina estándar.	71

TABLAS

I	Y experimental-calculada (problema).	72
II	Y experimental-calculada (estándar).	75

I. RESUMEN

Para determinar la potencia antitetánica de inmunoglobulinas, existe un método *in vivo* introducido por J. Ipsen (1942), el cual determina el efecto neutralizante de la inmunoglobulina sobre la toxina tetánica titulada en unidades L_t/10/50 y es sensible para determinar cantidades pequeñas de inmunoglobulina.

Dicho efecto se observa sobre un modelo animal, generalmente ratones albinos a los que se inyectan, por vía subcutánea, diferentes concentraciones de inmunoglobulina, tomándose en cuenta el índice de mortalidad con signos de tetanización al quinto día después de la inoculación. Posteriormente se determina el 50% de protección (DE₅₀) por el método de Spearman-Kärber (20). Por este método se obtuvo, para una muestra de inmunoglobulina antitetánica una potencia de 234.73 UI/ml con una desviación estándar de 15.20 y un coeficiente de variación de 6.47, esta inmunoglobulina proviene de los laboratorios Merieux de Lyon/France.

Ya que en ocasiones se requiere determinar en poco tiempo la actividad protectora de este producto, por haber sufrido accidentes en su conservación o distribución, se planteó el desarrollo de un método *in vitro* denominado Inmunodifusión Radial Simple (IDRS), mismo que fué optimizado y correlacionado con la técnica *in vivo* para verificar si los resultados son consistentes entre ambos métodos.

Por medio de ésta técnica se obtuvo una reproducibilidad del 99% y una sensibilidad de 22 a 44 UI/ml, lo cual la hace adecuada para el propósito indicado, ya que es más sensible y reproducible que la técnica *in vivo* de J.Ipsen.

Con base en esto, se puede establecer la prueba de IDRS como un método alternativo que permitirá conocer de manera rápida y exacta la actividad antitetánica de las inmunoglobulinas, corroborando la actividad biológica periódicamente, con el método *in vivo*.

II. INTRODUCCION

Todos los vertebrados incluyendo al hombre, presentan un mecanismo de defensa llamado sistema inmune, el cual es activado por estructuras moleculares internas o externas denominadas antígenos, dando lugar a una respuesta celular y/o humoral que tiene como producto, entre otros, la formación de anticuerpos, moléculas de naturaleza protéica elaboradas por las células plasmáticas (1,2).

Las funciones principales de los anticuerpos son las de reconocimiento y combinación con el antígeno específico. En el suero existe un grupo de glucoproteínas denominadas inmunoglobulinas que presentan una estructura molecular característica, la cual le permite a la molécula, llevar a cabo las funciones de anticuerpo.

En 1962 Rodney Porter propuso un modelo básico de la estructura molecular de las inmunoglobulinas (Fig 1), en el que se plantea que cada molécula está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos largas o pesadas y dos cadenas más cortas o ligeras, unidas entre sí por puentes disulfuro intracatenarios (1,3).

Cada cadena pesada y ligera presenta una secuencia aminoácida invariable denominada región "C" o constante, con extremo carboxilo terminal, además de una región "V" o

variable, con extremo amino terminal, en la cual la secuencia aminoácida es distinta para cada anticuerpo específico (1,1).

En base a su estructura primaria y secundaria, existen cinco tipos diferentes de cadenas pesadas llamadas mu, gamma, delta, epsilon y alfa, mismas que determinan las cinco clases de inmunoglobulinas: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA y sólo existen dos tipos de cadenas ligeras, comunes en todas, denominadas kappa y lambda (1,1).

Cada clase tiene características fisicoquímicas diferentes según los tipos de cadenas que presenten (fig 2), lo cual permite advertir que las inmunoglobulinas son de una gran heterogeneidad molecular, aún compartiendo ciertas determinantes en las regiones constantes. Esto explica el porqué cada tipo de inmunoglobulina reacciona específicamente frente a distintas situaciones, estableciéndose así sus propiedades biológicas (1,5).

A continuación se nombran algunas propiedades biológicas de las inmunoglobulinas:

La IgG y la IgM representan en conjunto de un 85% a un 90% de la actividad total de anticuerpos en el suero. Actúan en la defensa del huésped contra infecciones. Pueden actuar como anticuerpos específicos contra toxinas bacterianas y de

otra indole (difteria, tétanos, botulismo , antrax, etc.)
(3,5).

La IgA es la inmunoglobulina principal en las secreciones externas del cuerpo. Asume una importancia fundamental respecto a la protección del tubo digestivo, vías respiratorias , aparato genitourinario y ojos, actúa contra la invasión microbiana (3,5,6).

La IgD se halla principalmente en la superficie de ciertos linfocitos B, donde funciona como receptor de antígenos. Esta proteína se ha identificado en el hombre, animales de laboratorio y pollos (3,5,6).

La IgE se encuentra en concentraciones muy bajas en el suero humano, a pesar de lo cual reviste una gran importancia por su intervención en reacciones de hipersensibilidad de tipo alérgico y anafiláctico, también está relacionada con la respuesta inmune en muchas infestaciones por helmintos (3,5,6).

Actualmente, dentro de la medicina preventiva existen productos biológicos de origen humano, en particular de sangre, plasma o suero, que son utilizados en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades y que su principal componente son las inmunoglobulinas. Es un procedimiento necesario determinar la potencia de estos biológicos, con la finalidad de obtener productos

seguros y eficaces. La calidad de un producto biológico debe ser diseñada, producida y conservada a un costo económico y que satisfaga por entero al usuario. La palabra calidad no tiene el significado popular, de lo mejor en sentido absoluto, sino que quiere decir mejor dentro de ciertas condiciones, características o requisitos previamente establecidos

Con relativa frecuencia también se requiere determinar la actividad inmunogénica o protectora de las inmunoglobulinas, por haber sufrido accidentes en su conservación o distribución y no conociendo el tiempo y temperatura de exposición con exactitud, es indispensable determinar de manera rápida si pueden o no usarse, sin embargo, los métodos de prueba existentes son complejos, tardados y costosos, por lo que en ocasiones no son accesibles, originando una inversión de tiempo considerable que puede incluso propiciar la no disponibilidad de los productos en caso de emergencia.

Atendiendo a esto, es necesario desarrollar métodos alternos que permitan conocer de manera rápida y exacta la actividad o potencia de los productos en cuestión, razón por la cual en el presente trabajo se planteó el desarrollo de un método *in vitro* y su correlación con el método *in vivo* existente para determinar la potencia antitetánica de las inmunoglobulinas.

Todas las características generales de las inmunoglobulinas, en conjunto, proveen a la molécula de una actividad

específica que le permite llevar a cabo determinadas reacciones antígeno-anticuerpo, lo cual las califica como hemolíticas, aglutinantes, precipitantes o fijadoras de complemento (5). Por tanto, es evidente que pueden identificarse de diferentes formas según sus propiedades particulares, lo cual es de utilidad en el laboratorio para crear puntos finales de reacción rápidamente detectables para estudios *in vitro*.

Dentro de las reacciones antígeno-anticuerpo, la precipitación es la base sobre la cual se ha desarrollado la inmunoquímica, su sensibilidad y especificidad la hace de gran valor para distinguir e identificar diferentes proteínas (7).

Existe una gran variedad de métodos cuantitativos dentro de los estudios inmunológicos donde se requiere de equipos especiales, sin embargo, para la determinación de los componentes de las inmunoglobulinas se necesita de simples métodos en donde se combina la precipitación inmunoquímica y la difusión en geles de agar (8).

Empleando soportes adecuados, en especial aquellos que tienen como base agar disuelto en electrolitos, es posible hacer que migren antígenos y anticuerpos de tal forma que al encontrarse interactúen. La técnica de difusión en gel generalmente utilizada en los análisis de cuantificación de

inmunoglobulinas, es la inmunodifusión radial simple o IDRS (9).

El término de inmunodifusión radial es aplicado a sistemas en los que el gel es extendido en una superficie, donde se lleva a cabo la difusión en forma radial comenzando de un pozo circular. La inmunodifusión fué utilizada aparentemente por primera vez por Petrie (1932) en sus estudios sobre el crecimiento de colonias bacterianas en un medio gelificado que contenía un antisuero específico. Él observó que alrededor de algunos cultivos se encontraban uno o más anillos de precipitación de diferentes calibres (10).

Ouchterlony (1949) fué el primero que utilizó a la inmunodifusión radial simple para propósitos semicuantitativos, esto fué durante los estudios que llevó a cabo para determinar la habilidad de producción de diferentes toxinas por Corynebacterium diphtheriae. Se basó principalmente en la relación existente entre el ancho del precipitado y la cantidad de antígeno producido por el cultivo y la relación inversa entre el tamaño del precipitado y la concentración del antisuero empleado (11).

Desafortunadamente estos estudios no se continuaron y fué en 1957 cuando Finber, Hayward, Augustin y Crowle, describieron una modificación semicuantitativa del método de IDRS, determinando principalmente puntos finales, llevando a cabo

una serie de diluciones de una solución antigénica y probándolas en placas con el antisuero. Denominaron puntos finales a aquellas diluciones más grandes donde fué posible aún visualizar un anillo de precipitado alrededor del pozo (ii).

En 1965 Mancini, Carbonara y Heremans introdujeron una técnica nueva utilizando la IDRS para determinar la cantidad exacta existente de los antígenos. Fundamentalmente basándose en la simple técnica de difusión lineal de Oudin e incorporando anticuerpos específicos en una placa de agar, y apoyándose en el principio de que existe una relación cuantitativa entre la cantidad de antígeno y el anillo de precipitación resultante. Concluyeron que el área circunscrita por el anillo de precipitación, es proporcional a la concentración del antígeno (iii).

En base a estos resultados, Mancini elaboró una curva patrón con estándares de antígenos conocidos, para así determinar la concentración de antígenos a cualquier diámetro del pozo, encontrando que la sensibilidad del método fué del orden de 1-3 mg/ml de antígeno. Para esto, los autores tomaron en cuenta varios aspectos que consideraron sumamente importantes para establecer el método, entre los que se encontraban las relaciones cuantitativas fundamentales, la reproducibilidad del método y la sensibilidad del mismo (iv).

1) Las relaciones cuantitativas fundamentales, básicamente fueron las siguientes:

a) Crecimiento de los precipitados en función del tiempo. Determinaron que existe una relación directa entre el tiempo requerido para llegar al tamaño final del precipitado y la correspondiente concentración del antígeno.

b) Relación entre la concentración del antígeno y el tamaño final de los precipitados. Encontraron una relación lineal entre la concentración del antígeno y el Área del precipitado al final de la difusión.

c) Relación entre la concentración del antisuero, el tamaño del pozo y el tamaño final del precipitado. Demostrando que ambos parámetros son totalmente independientes del diámetro del pozo.

2) La reproducibilidad del método la obtuvieron de la siguiente forma:

a) Variaron las placas utilizadas y las posiciones de las soluciones dentro de cada pozo. Los resultados indicaron una variación perceptible entre una placa y otra, debida a los diferentes espesores de las placas y una insignificante variación en cuanto a la posición del antígeno en los diferentes pozos.

b) Variaron el volúmen de las soluciones del anticuerpo manteniendo constante el antígeno. En base a esto, llegaron a las siguientes conclusiones: Para volúmenes grandes de las soluciones se producen áreas grandes de precipitado con idénticas cantidades de antígeno.

c) Observaron la influencia de cambios de temperatura en las áreas finales de los precipitados, determinando una variación casi indistinguible del tamaño del precipitado a diferentes temperaturas.

3) Sensibilidad del método. En cuanto a este punto, Mancini y col. (1965) determinaron los límites de la sensibilidad en el momento en que el disco de precipitación se observa débilmente, por lo que no es leible de manera confiable y cuando el tamaño del mismo no llega más allá del borde del pozo. Por otro lado, concluyeron que la densidad del precipitado dependía de la concentración del anticuerpo incorporado en el gel y de la naturaleza del antígeno (10).

En el presente trabajo se determinó si la técnica de IDRS es útil como prueba *in vitro* para conocer la potencia antitetánica de inmunoglobulinas y se estableció la correlación entre ésta y la prueba *in vivo* ya establecida para dicho fin.

Actualmente se reconocen dos categorías de inmunoglobulina humana, la inmunoglobulina humana normal, preparada con una mezcla de plasmas humanos de un número grande de donadores selectos, y la inmunoglobulina humana específica para un anticuerpo en particular, que es una preparación de una mezcla de plasmas humanos obtenidos de pacientes convalecientes, de donadores inmunizados o de plasmas ricos en anticuerpos específicos.

La eficacia de la inmunoglobulina normal depende de la presencia de una cantidad adecuada de anticuerpos contra sarampión, tetanos, difteria y poliomielitis (12,13,14).

En esta investigación se trabajó con un tipo de inmunoglobulina específica: la antitetánica, que es una solución estéril de globulinas, derivada del plasma sanguíneo de hombres adultos que han sido inmunizados con toxoide tetánico.

Para conocer la potencia antitetánica, misma que indicará los niveles de anticuerpos neutralizantes presentes, se cuenta con pruebas de neutralización antígeno-anticuerpo, las que se llevan a cabo *in vivo*, siendo el sistema indicador de dicha neutralización un modelo animal. La capacidad de la inmunoglobulina antitetánica para neutralizar al antígeno (toxina tetánica) se evalúa por los índices de mortalidad de acuerdo a métodos experimentales que permiten el análisis estadístico de los resultados (15).

El agente etiológico del tétanos es el Clostridium tetani, el cual elabora una exotoxina muy activa compuesta por dos fracciones, la tetanospasmina, la cual afecta las células del tejido nervioso provocando la contracción espasmódica de los músculos y la tetanolisina que produce lisis en los eritrocitos (16).

Se conoce que 5×10^{-7} ml de la toxina tetánica obtenida del filtrado del caldo de cultivo de Clostridium tetani, es capaz de matar al ratón albino con un peso equivalente a los 20g, mientras que la toxina seca, obtenida por precipitación con sulfato de amonio, es mortal para el ratón a la dosis de 5×10^{-9} g (16).

En los animales de experimentación, el tétanos se manifiesta con contracciones convulsivas de los músculos del cuerpo donde se introduce el agente etiológico, después aparece la contracción tónica de los músculos maseteros y mimicos, posteriormente el proceso involucra los músculos del dorso y miembros describiendo el cuerpo un arco, para llegar por último a la muerte a consecuencia de asfixia y afección de los centros vitales (16).

Existen distintos métodos para titular o dosificar pequeñas cantidades de inmunoglobulina antitetánica y todos ellos son modificaciones de los siguientes:

Método de Feierabend (1930). Según este método se pueden titular las cantidades de 0.2, 0.067, 0.02, 0.0067 y 0.002 UI de inmunoglobulina, usando cinco diferentes dosis de prueba de la toxina. Estas deben estar preparadas de modo que al mezclarse con 1/5, 1/15, 1/50, 1/150 y 1/500 de UI causen tetanización local en cuyos (15).

Knerr y Hottle (1934) indicaron una técnica en la cual se miden valores de antitoxina de 0.0002 a 0.02 UI, usando una dosis de toxina equivalente a 1/125 de la dosis que mezclada con 1 UI de antitoxina mate a un cuyo al cuarto día.

Istrati (1938) desarrolló un método de graduación subcutánea en ratones. En éste se miden 0.0025 UI de antitoxina mínima y se utiliza como dosis de prueba de toxina, aquella que mezclada con 0.001 UI mate al quinto día a la mitad de ratones (L+/1000) (15).

En 1942 J. Ipsen introdujo el método que actualmente es utilizado. El propósito fundamental de este método es el de determinar el efecto neutralizante de un suero problema sobre una toxina conocida, en una serie de diluciones inyectadas por vía subcutánea a ratones entre los 16 y 18 g de peso. El factor más importante de esta prueba es el índice de mortalidad, con signos de tetanización, ocurrido al quinto día después de la inoculación. Para esta prueba se

utiliza como dosis de toxina, aquella cantidad minima que mezclada con 0.1 UI de inmunoglobulina e inyectada a ratones, produce su muerte al quinto dia después de la inoculación con sintomas de tetanización, a esta dosis se le denomina L+/10/50 (15). Este método fué utilizado en el presente trabajo para evaluar la potencia antitetánica de inmunoglobulinas específicas.

OBJETIVOS

- Implementar una prueba de inmunodifusión radial simple, como método *in vitro* para establecer la potencia antitetánica de inmunoglobulinas.

- Establecer una correlación entre la prueba de inmunodifusión radial simple y la prueba *in vivo* ya establecida, para determinar la potencia antitetánica de inmunoglobulinas.

- Reducir el tiempo de análisis en la determinación de potencia antitetánica de inmunoglobulinas y determinar la confiabilidad del sistema.

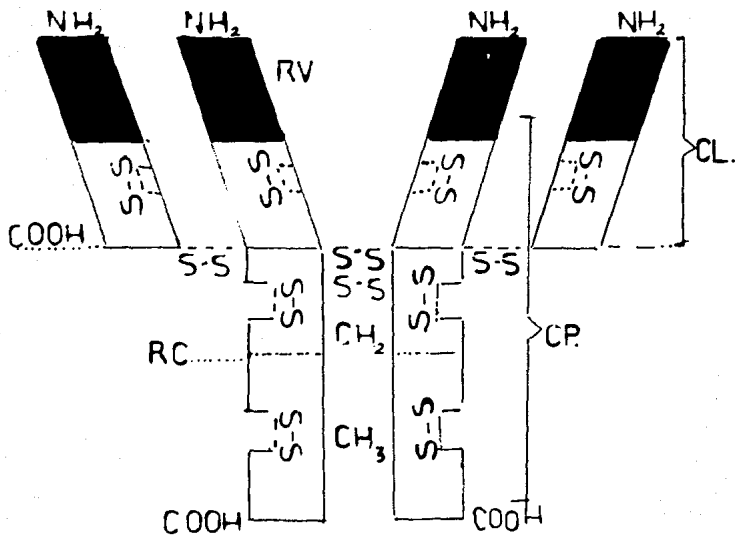


FIGURA 1. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LAS INMUNOGLOBULINAS SEGUN EL MODELO DE RODNEY-PORTER.

INMUNOGLOBULINA	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
TIPO DE CARGO PESADO	γ	μ	κ	δ	ε
PORCENTAJE EN EL SUERO HUMANO	70-75%	10%	15-20%	0.2%	0.004%
CONSTANTE DE SEDIMENTACION	7S	19S	7S	7S	9S
PESO MOLECULAR EN DALTONES	145,000	970,000	400,000	164,000	199,000
SUBCLASES	IgG ₁ IgG ₂ IgG ₃ IgG ₄	IgM ₁ IgM ₂	IgA ₁ IgA ₂	IgD	IgE

FIGURA 2. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS (3).

III. MATERIAL Y METODOS

1. METODO *IN VIVO*

Se determinó la potencia de la inmunoglobulina antitetánica lote B0383 10 veces en experimentos independientes de acuerdo al método que se describe a continuación:

1.1 Material.

- Inmunoglobulina hiperimmune antitetánica lote B0383
Institut Merieux Lyon /France
- Toxina tetánica estéril titulada en L+/10/50.
- Estandar Nacional de Antitoxina tetánica con 25 UI/fco.
(5UI/ml).
- Agua peptonada al 1% estéril.
- Solución salina al 0.85% estéril.
- Tubos de 15 mm x 110 mm.
- Gradilla para tubos de 15 mm x 110 mm.
- Pipetas serológicas estériles de 1.0 ml, 2.0 ml, 5.0 ml, y
10 ml.
- Papel parafilm.
- Jeringas de 3 ml con agujas calibre 27 x 13 mm de long.
- Balanza para roedores.
- Jaulas para ratón.
- Ratones hembras de 16 a 18 g de peso, cepa NIH (cepa
utilizada en pruebas inmunológicas)

1.2 Titulación de toxina tetánica en L+/10/50.

Para la determinación de la potencia antitetánica de las inmunoglobulinas, se tiene establecido un método *in vivo* basado en procedimientos Farmacopeicos (11,18). Para esto es necesario contar con una toxina tetánica titulada en dosis L+/10/50. La dosis L+/10/50 es la mínima cantidad de toxina que mezclada con 0.1 UI de antitoxina e inyectada a cuyos o ratones, produce su muerte al quinto día después de la inoculación con síntomas de tetanización (19).

1.3 Preparación del estandar.

Del estandar nacional de antitoxina tetánica con 50 UI/ml, se hace una dilución 1:5 con solución salina al 0.9% estéril, para obtener 1 UI de antitoxina/ml, posteriormente se hacen diluciones de la toxina de prueba con factor constante de dilución, utilizando agua peptonada para obtener una graduación de mezclas que permitan obtener la curva dosis-respuesta. Se coloca en la gradilla una serie de 5 tubos de 15mm x 110mm, se agrega 1.2ml de diluyente por tubo, enseguida se transfiere 0.8ml de la solución de antitoxina diluida y por último 2ml de las diluciones de toxina preparadas previamente.

Con objeto de encontrar la $L_{+}/10/50$, para cada prueba se elabora un protocolo de trabajo (figura 1) y éste se ajusta de acuerdo a los resultados obtenidos en cada experimento (18).

Los tubos se incuban a temperatura ambiente y en la obscuridad durante 1 hora, lapso en que se lleva a cabo la neutralización. Transcurrido el tiempo, se inyectan 6 animales por cada dilución preparada, vía subcutánea, se observan durante cinco días y se registran los resultados en un formato específico para esto, se determina la dosis $L_{+}/10/50$ por el método de Spearman - Kärber (19,20), en donde se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Log } 10 \text{ de la dilución final} = - \left(X_0 - \frac{d}{2} + d \frac{r}{n} \right)$$

X_0 = log 10 del recíproco de la dilución mínima con la que todos los animales mueren.

d = log 10 del factor de dilución.

r = Número de ratones muertos.

n = Número de ratones por dilución.

1.4 Determinación de la potencia antitetánica de la inmunoglobulina humana hiperinmune antitetánica.

Con la toxina tetánica titulada en L+/10/50, se preparan diluciones para obtener 4 unidades L+/10/50/ml, concentración ya establecida para titular la inmunoglobulina antitetánica, utilizando como diluyente agua peptonada al 1%. El patrón de inmunoglobulina antitetánica se diluye con solución salina para obtener 1 UI/ml. (Figura 4) (13).

Se lleva a cabo una serie de cinco mezclas de volúmenes constantes de toxina tetánica y volúmenes variables del patrón de inmunoglobulina. El volumen de cada tubo se ajusta a 4ml con agua peptonada.

Todos los tubos se incuban a temperatura ambiente en la obscuridad durante 1 hora. De cada dilución se inocula 0.5ml por vía subcutánea a grupos de 6 ratones y se observa durante cinco días. Se registran las muertes con signos de tetanización que se presenten en cada jaula, diariamente y a la misma hora (13).

Se determina el 50% de protección (DE₅₀) por el método de Spearman - Kärber o por un método equivalente, tomándose en cuenta el índice de sobrevivencia por dosis.

Se calculan las UI de antitoxina tetánica por mililitro de muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{UI ANTITOXINA} = \frac{\text{DEso P}}{\text{DEso M}} \times \text{FD}$$

TETANICA

en donde:

DEso P = dosis efectiva de la preparación del patrón de antitoxina, que protege al 50 % de los animales.

DEso M = dosis efectiva de la preparación de la muestra o problema que protege al 50 % de los animales.

FD = factor de dilución de la muestra o problema de inmunoglobulina

2. METODO *IN VITRO* (Prueba optimizada de IDRS)

Así también, la potencia de la inmunoglobulina antitetánica lote B0383 fué determinada 16 veces en 6 experimentos independientes, por el método de IDRS implementado y optimizado para este fin, mismo que a continuación se describe:

2.1 Material.

- Estandar nacional de antitoxina tetánica con 50 UI/ml
- Inmunoglobulina humana hiperinsune antitetánica-Toxina tetánica estéril (184 L+/10/50)
- Agar al 2% en amortiguador Tris-barbital (pH = 8.6-9.00)
- Probetas de 100 ml
- Matraces de 250 ml
- Placas para IDRS
- Mechero
- Baño María.
- Pipetas serológicas estériles de 10 ml
- Superficie perfectamente horizontal
- Oradadores de 2 mm y 5 mm
- Equipo para vacío (Sifón)
- Plantilla para oradaciones de las placas
- Microjeringas de 5 µl y 10 µl
- Reglilla para IDRS
- Lector para placas de inmunodifusión.
- Papel semilogarítmico de dos ciclos.

2.2 Preparación de las placas.

- Preparar 50 ml de agar tipo VII al 2% en amortiguador de Tris-barbital PH = 8.6 - 9.0
- Mantener la agarosa a 45-48°C en baño María
- Añadir 50 ml de toxina tetánica estéril - Mezclar perfectamente
- Agregar a cada una de las placas 2.0 ± 0.1 ml de la mezcla

toxina - agar

- Dejar solidificar a temperatura ambiente en una superficie completamente horizontal durante 60 min.
- Refrigerar durante 60 min.
- Hacer por cuadrante cuatro oradaciones de 3 mm de diámetro. Conservar las placas dentro de una bolsa de plástico a una temperatura de 2-8°C.

2.3 Método de inmunodifusión radial simple (IDRS)

- Depositar en cada uno de los pozos de las placas 5 µl de cada una de las concentraciones del estándar de antitoxina tetánica y las diferentes concentraciones de inmunoglobulina problema (Fig. 1 a, b).
- Incubar a 35°C durante 18 hrs.
- Teñir las placas de acuerdo al método descrito en 2.4 .
- Llevar a cabo la medición de los halos.

2.4 Optimización del método de IDRS.

Para establecer el método descrito fue necesario la optimización de éste variando los siguientes parámetros: Tamaño del pozo, concentración de anticuerpo, temperatura de incubación, concentración de antígeno y técnica de tinción.

2.4.1 Tamaño del pozo: Se probaron dos oradores, uno de 5mm cuyo volumen fue de 10 μ l y otro de 2mm con 5 μ l de volumen.

2.4.2 Concentración de inmunoglobulina humana hiperinsune antitetánica. Para determinar la concentración óptima de inmunoglobulina y poder conocer la sensibilidad del método, se elaboraron diluciones al doble del anticuerpo, de 1:2 hasta 1:128, con solución salina al 0.9%, manteniendo fija la concentración de antígeno.

2.4.3 Temperatura de incubación. Se probaron 2 temperaturas de incubación para las placas: 25 y 37°C.

2.4.4 Concentración de toxina. Para determinar la concentración óptima de toxina, se trabajaron las mezclas siguientes de toxina - agar:

- 25 ml de agar + 25 ml de toxina.
- 25 ml de agar + 12 ml de toxina.
- 25 ml de agar + 6 ml de toxina.

2.5 Técnica de tinción: La técnica de contraste utilizada fue la de tinción de proteínas con Negro - Amido (10), modificada en base a los resultados obtenidos y se describe a continuación:

Las placas se lavan en cajas de petri con solución salina por 2 o 3 días, con varios cambios del fluido. Enseguida se sumergen por 1 día en agua destilada para remover la sal. Después se secan a 37°C. Posteriormente se les agrega por 30min. una solución que contenga 4.ig de acetato de sodio, 30ml de ácido acético y 1g de Amido Black, por litro.

El color negruzco se remueve por tres baños de una solución con 50ml de ácido acético y 5ml de glicerina por litro.

La técnica original (18) se modificó en base a los resultados obtenidos previamente. En ésta fué necesario variar factores tales como el tiempo de lavado con solución salina y con agua destilada, así como el tiempo con el colorante. Finalmente fué necesario remover el color negruzco con baños de ácido acético - glicerina .

3. CORRELACION

Con los resultados de potencia de la inmunoglobulina por ambos métodos, se llevó a cabo el análisis de correlación,

tomando en cuenta por un lado la concentración de inmunoglobulina en UI/ml y por otro el diámetro de los anillos en mm. La fórmula a utilizar es la siguiente:

$$r = \frac{\sum XiYi - n \bar{X} \bar{Y}}{(\sum Xi^2 - n \bar{X}^2)(\sum Yi^2 - n \bar{Y}^2)}$$

Donde :

r = Coeficiente de correlación

X = Concentración de inmunoglobulina

Y = Diámetro del anillo de precipitación

No. TUBO	TOXINA				ANTITOXINA 0.1 UI/ml		
	CONCENTRACION.	DILUCION	VOL. DE TOXINA	REGULADOR AL	NEUTRALIZACION		
					TOXINA (ml)	ANTITOXINA (ml)	REGULADOR (ml)
1					2.0	0.4	1.6
2					2.0	0.4	1.6
3					2.0	0.4	1.6
4					2.0	0.4	1.6
5					2.0	0.4	1.6
6					2.0	0.4	1.6

FIGURA 3. PROTOCOLO DE TRABAJO PARA LA PRUEBA DE L+/10/50

TOXINA DE PRUEBA TITULO 4L+ / 1g / ML	MUESTRA O PATRON DE 1g 1 UI / ml	SOLUCION DE PEPTONA AL 1%
2.8 ml	0.96 ml	1.04 ml
2.8 ml	0.88 ml	1.12 ml
2.8 ml	0.80 ml	1.20 ml
2.8 ml	0.72 ml	1.28 ml
2.8 ml	0.64 ml	1.36 ml

**FIGURA 4 .PROTOCOLO DE TRABAJO PARA LA
LA TITULACION DE INMUNOGLOBULINA
ANTITETANICA.**

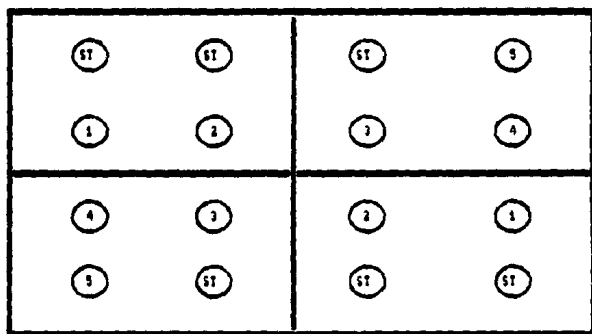
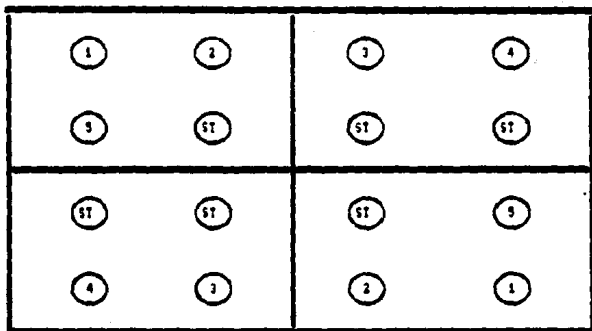


FIGURA 5 ESQUEMAS DE PLACAS PARA IDRS.

IV. RESULTADOS.

- Método In Vivo.

Para titular la toxina tetánica en unidades L+/10/50 se tiene como base que todo antisuero debe reconocer a su antígeno precursor, aún si se encuentra en pequeñas cantidades, existiendo un rango en el cual ya no es posible esa identificación dependiendo de la sensibilidad del mismo.

Para determinar el título de la toxina, se hicieron diferentes diluciones de ésta manteniendo constante la cantidad del antisuero, lo que permitió determinar la actividad de la toxina tetánica, expresada en unidades L+/10/50.

Para ésto fué necesario llevar a cabo las pruebas preliminares que permitieron establecer los experimentos número 1 y 2 (fig. 6 y 7).

Como puede observarse, para cada prueba existen factores que son sumamente importantes para llevar a cabo los cálculos y así establecer el título de la toxina, dichos factores

son el número de ratones por dilución denominado N, el número de ratones muertos por dilución denominado R, la relación número de ratones utilizados entre el número de ratones muertos por dilución R/N y el logaritmo de la dilución, mismos que son utilizados en la fórmula de Spearman-Kärber, ya mencionada en la metodología, para calcular la potencia de la toxina.

En el caso de los experimentos 1 y 2 (fig 6 y 7) no fue posible utilizar dicha fórmula ya que es necesario que existan porcentajes de 90 a 100 % de mortalidad, de 90 a 100 % de sobrevivencia y porcentajes de mortalidad-sobrevivencia intermedios, pero en base a estos resultados, se establecieron las diluciones de los experimentos posteriores.

Sustituyendo en la fórmula los resultados del experimento 3 la toxina trabajada presentó 187.96 unidades $L+/10/50$, para confirmar esto se efectuó el experimento 4 exactamente igual, obteniéndose 180.36 $L+/10/50$. Por lo tanto se estableció que la toxina contenía 184.16 unidades $L+/10/50$ (Fig. 8 y 9)

Una vez titulada la toxina tetánica se llevaron a cabo las pruebas para determinar la potencia de la inmunoglobulina problema (Fig. 10 a la 19) la cual fué en promedio de 234.73 UI/ml de acuerdo al mismo método de Spearman-Kärber. (Fig. 20)

Para ello fué necesario seleccionar concentraciones de inmunoglobulina adecuadas en base a pruebas preliminares, para así poder determinar la potencia de la inmunoglobulina.

En los experimentos 1 al 10 (fig. 11 a la 20) puede observarse que existen variaciones debidas, probablemente a factores biológicos, encontrándose resultados incongruentes, como fué en los experimentos 2, 6, 8 y 9, que con esquemas de trabajo exactamente iguales, en un caso se obtuvo 100% de mortalidad, y en dos casos 100% de sobrevivencia, y en otro caso 6.6% de sobrevivencia. Sin embargo, podemos observar en la fig. 21 que en los demás experimentos se obtuvieron resultados aceptables, con los que se calculó la potencia de la inmunoglobulina, siendo de 234.73 UI/ml, con una variación de 6.47 y una desviación

estándar de +/- 15.20 lo cual es aceptable dentro del control de productos biológicos.(23)

-Método In Vitro .

Como se mencionó en la metodología, se procedió a la optimización de la técnica nombrada por Mancini (11), tomando en cuenta varios factores que son importantes y se llegó a los siguientes resultados: las placas con oradaciones de 4mm de diámetro y un volumen de 5µl de inmunoglobulina, presentaron mejores resultados al formarse halos de precipitación perfectamente concentricos y sobre todo bien definidos dentro de la placa de agar. Sin embargo, las placas con oradaciones de 5mm y un volumen de 10µl presentaron halos ovalados y en algunos casos fué tan grande la difusión que impidió medir el halo de precipitación.(Fig.22)

En relación a las temperaturas probadas (25 °C y 37 °C), se presentó una ligera diferencia en cuanto a la definición de los halos de precipitación, observandose halos mejor

definidos a 25°C, sin embargo a ambas temperaturas se formaron halos concéntricos y ónicos.(Fig.23)

Cuando se probaron las diferentes mezclas de toxina-agar se encontró que la mezcla óptima fué de 50% de agar y 50% de toxina,obteniendose así halos bien definidos, concéntricos y ónicos lo que permitió hacer lecturas confiables.(Fig.24)

Para mejorar aún el contraste de los precipitados,se procedió a tratar las placas con la técnica para tinción de proteínas con Negro Amido (11), misma que fué necesario optimizar de acuerdo a lo siguiente:

a) Tiempo con el colorante. En este caso se disminuyó el tiempo teórico de 30 minutos a 10 minutos para evitar así el color negruzco intenso de las placas, que obligaba a tener que decolorar exhaustivamente.

b) Tiempo de lavado con solución salina.Cuando los lavados se hicieron cada hora durante 3 horas,los halos no se definieron y contrastaron,sin embargo cuando se hicieron 3 veces en 24 horas o en 48 horas,los halos se definieron y contrastaron.

De acuerdo a estos resultados, podemos decir que el tiempo óptimo de lavado con solución salina es de 24 a 48 horas con tres cambios del fluido.

c) Tiempo de lavado con agua destilada. En este caso, cuando los lavados se hicieron durante una hora se obtuvieron halos no bien definidos, sin embargo cuando se hicieron durante 2 horas o 1 día, se obtuvieron halos definidos y contrastados. El tiempo de lavado con agua destilada es importante para remover el exceso de sales en las placas, si no es el adecuado no se definen perfectamente los halos.

De acuerdo con los resultados, el tiempo de lavado óptimo con agua destilada fué de 2 a 24 horas, con tres cambios del fluido.

Concentración mínima y máxima de inmunoglobulina detectable por IDRS:

Con ayuda de los resultados anteriores se determinó cual era la concentración mínima y máxima de inmunoglobulina detectable con el método optimizado de IDRS. Para poder determinar esto y la correlación entre el método de IDRS y

el método *in vivo*, se prepararon curvas patrón con la inmunoglobulina problema cuya potencia fué determinada por el método *in vivo*, así también fué necesario preparar una curva patrón con la inmunoglobulina estándar que sirvió de referencia.

Las concentraciones, tanto de la inmunoglobulina problema como del estándar, óptimas para el propósito del estudio se presentan en las figuras 25 y 26.

Como puede observarse en los resultados de estas dos curvas, los halos de precipitación son menores a los obtenidos en los experimentos realizados para optimizar la técnica, lo cual se debió a que para éstas y para estudios posteriores, se utilizó una toxina tetánica distinta al lote original, por haber sufrido inactivación debido a un accidente de refrigeración, sin embargo, al igual que la anterior, se tituló primeramente con la técnica *IN VIVO*. Se utilizaron las concentraciones descritas para llevar a cabo los experimentos 1 al 6. (Fig. 27 a la 32) con la inmunoglobulina problema bajo las mismas condiciones de prueba, obteniéndose como puede observarse en la fig. 33 una gran reproducibilidad en los resultados.

En condiciones exáctamente iguales se efectuaron los experimentos 1 al 4 con la inmunoglobulina estándar, los resultados pueden observarse en las Fig.34 a la 37.

En la fig.36 se observa el comportamiento del estándar el cual es semejante al del problema.

ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS Y CORRELACION

Para llevar a cabo la correlación se tomaron en cuenta, como ya se había mencionado la concentración de la inmunoglobulina determinada por el método de J. Ipsen y el diámetro de los anillos de precipitación obtenidos por el método de IDRS.

En la muestra de inmunoglobulina problema, con la Y experimental y la Y calculada se obtuvo una correlación de 0.9 y la curva que la describe es $Y = 2.928 \exp(0.002 X)$. (Tabla I)

Con la inmunoglobulina estándar se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.837 con un comportamiento similar al de la inmunoglobulina problema con la siguiente ecuación que la describe $Y = 2.972 \exp(0.002 X)$. (Tabla II)

Al comparar las dos curvas podemos observar que la actividad de la inmunoglobulina problema es ligeramente mayor a la del estándar, en base a la distancia que las separa, confirmandose la validéz de esta curva dosis respuesta y la precisión del ensayo.

No. de DILUCION	F=0.909 Log=-.04 DILUCION	Log. DE LA DILUCION	No. DE RATONES POR DILUCION (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE RATONES MUERTOS (P)	R / N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	1:75.62	1.87	1	--	--	--	--	--	0	0
2	1:60.75	1.82	6	--	--	--	--	--	0	0
3	1:62.9	1.79	6	--	--	--	--	--	0	0
4	1:56.81	1.75	6	--	--	--	--	--	0	0
5	1:51.69	1.71	6	--	--	--	--	--	0	0
6	1:46.95	1.67	6	--	--	--	3	3	6	1

PRUEBA PRELIMINAR QUE ORIENTA HACIA EL TITULO DE LA TOXINA. EN BASE A ESTOS RESULTADOS SE ESTABLECEN LAS PROXIMAS DILUCIONES.

FIGURA 16 TITULACION DE TOXINA TETANICA EN 4/18/58
EXPERIMENTO 1.

No. DE DILUCION	F _{50.0} Log ₁₀ - 09 DILUCION	Log. DE LA DILUCION	No. DE RATONES POR DILUCION (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE RATONES MUERTOS (R)	R / N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	1:75	1.87	6	--	--	--	--	--	0	0
2	1:68.5	1.79	6	--	--	--	--	--	0	0
3	1:58	1.69	6	--	--	--	--	--	0	0
4	1:37.5	1.57	6	--	5	1	--	--	6	1
5	1:25	1.39	6	--	6	--	--	--	6	1
6	1:12.5	1.09	6	6	--	--	--	--	6	1

PRUEBA PRELIMINAR QUE ORIENTA HACIA EL TITULO DE LA TOXINA. EN BASE A ESTOS RESULTADOS SE ESTABLECEN LAS DILUCIONES SIGUIENTES EXPERIMENTOS.

FIGURA 1. TITULACION DE LA TOXINA TETANICA EN 12/18/58.
EXPERIMENTO 2.

No. DE DILUCION	F=1.015 Ley=0.006 DILUCION	Ley DE LA DILUCION	No. DE PATONES POR DILUCION (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE RATONES HUERTOS (R)	R / N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	1:47.5	1.676	6	--	--	--	--	6	6	1
2	1:48.21	1.683	6	--	--	--	--	6	6	1
3	1:48.93	1.689	6	--	--	--	--	2	2	0.33
4	1:49.66	1.696	6	--	--	--	--	3	3	0.50
5	1:50.41	1.702	6	--	--	--	--	3	3	0.50
6	1:51.17	1.709	6	--	--	--	--	0	0	0

$$\begin{aligned}
 \text{Ley DE LA DILUCION FINAL} &= (-1.683 - 0.006/2 + 0.006(1 + 0.33 + 0.5 + 0.5)) \\
 &= (-1.683 - 0.003 + 0.01398) \\
 &= 1.680 - 0.003 - 0.01398 \\
 &= 1.672202 \text{ ANTILOG} = 46.99 \times 4 \text{ (FD)} = 187.96 \text{ U/L/10}^{50}
 \end{aligned}$$

DE ACUERDO CON ESTA PRUEBA LA TOXINA TRABAJADA CONTIENE 187.96 UNIDADES U/L/10⁵⁰.
SE PRUBO NUEVAMENTE PARA CONFIRMAR EL RESULTADO.

FIGURA 3. TITULACION DE LA TOXINA TETANICA EN U/L/10⁵⁰.
EXPERIMENTO 3.

No. DE DILUCION	F=1.015 Log. DE DILUCION	Log. DE LA DILUCION	No. DE RATONES POR DILUCION (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE RATONES MUERTOS (R)	R / N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	1:147.5	1.676	6	--	--	1	5	--	6	1
2	1:148.21	1.683	6	--	--	--	4	1	5	0.83
3	1:148.93	1.689	6	--	--	--	1	3	4	0.66
4	1:149.66	1.696	6	--	--	--	4	1	5	0.83
5	1:150.41	1.702	6	--	--	--	1	4	5	0.83
6	1:151.17	1.709	6	--	--	--	--	--	0	0

$$\begin{aligned}
 \text{Log. DE LA DILUCION FINAL} &= -(-1.676 - 0.806/2 + 0.006(1 + 0.83 + 0.83 + 0.66 + 0.83)) \\
 &= -(-1.676 - 0.803 + 0.8249) \\
 &= 1.676 + 0.803 - 0.8249 \\
 &= 1.6541 \quad \text{ANTILOG} = 45892 \times 4 \text{ (FD)} = 188.36 \text{ L}/10/50
 \end{aligned}$$

DE ACUERDO CON ESTA PRUEBA LA TOXINA TRABAJADA CONTIENE 188.36 UNIDADES L/10/50, LO QUE CONFIRMA EL RESULTADO DEL EXPERIMENTO 3.

FIGURA 9. TITULACION DE LA TOXINA TETANICA EN L/10/50. EXPERIMENTO 4.

TITULO TEORICO: 350 UI/ML

No. DE DILUCION	F=1.1 Log ₁₀ DE LA DOSIS	Log. DE LA DOSIS	No. DE RATONES POR DOSIS (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE RATONES MUERTOS (R)	R / N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	0.36 UI/ML	-0.817	6	--	--	--	--	--	0	0
2	0.80 UI/ML	-0.093	6	--	--	--	--	--	0	0
3	0.80 UI/ML	-0.096	6	--	--	--	--	--	0	0
4	0.72 UI/ML	-0.142	6	--	--	--	--	3	3	0.5
5	0.64 UI/ML	-0.193	6	--	--	--	5	1	6	1

Log. DE LA DOSIS FINAL = $-(0.096 - 0.04/2 + 0.04(0.5+1))$

$$= -(0.096 - 0.02 + 0.06)$$

$$= -0.096 + 0.02 - 0.06$$

$$= -0.136 \quad \text{ANTILOG} = 0.7311 \quad \text{DE}_{80} = 0.7311 \times 350 = 255.88 \text{ UI/ML}$$

FIGURA : 10 . DETERMINACION DE LA POTENCIA ANTITETANICA DE LA INMUNOGLOBULINA ESTANDAR.

TITULO TEORICO: 250 UI/ML

No. DE DILUCION	F=1.1 Log=0.04 DOSIS	Log. DE LA DOSIS	No. DE RATONES POR DOSIS (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE RATONES MUERTOS (R)	R / N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
				1	0.96 UI/ML	-0.017	6	--		
2	0.89 UI/ML	-0.055	6	--	--	--	--	2	2	0.33
3	0.88 UI/ML	-0.096	6	--	--	--	2	4	6	1
4	0.72 UI/ML	-0.142	6	--	--	4	2	--	6	1
5	0.64 UI/ML	-0.193	6	--	--	6	--	--	6	1

$$\text{Log. DE LA DOSIS FINAL} = -(0.017 - 0.04/2 + 0.04(1 + 0.33))$$

$$= -(0.017 - 0.02 + 0.0532)$$

$$= -0.017 + 0.02 - 0.0532$$

$$= -0.0502 \quad \text{ANTILOG} = 0.8989 \quad \text{DE}_{50} = 0.6989$$

$$0.7311 / 0.8989 \times 250 = 205.19 \text{ UI/ML}$$

FIGURA 11 : DETERMINACION DE LA POTENCIA ANTITETANICA DE LA INMUNOGLOBULINA PROBLEMA. EXPERIMENTO 1.

TITULO TEORICO: 298 UI/ML

No. DE DILUCION	F=1.1 Log: 0.04 DOSIS	Log. DE LA DOSIS	No. DE RATONES POR DOSIS (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE RATONES MUERTOS (R)	R / N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	0.36 UI/AL	-0.217	6	--	6	--	--	--	6	1
2	0.89 UI/AL	-0.023	6	--	6	--	--	--	6	1
2	0.89 UI/AL	-0.096	6	--	6	--	--	--	6	1
4	0.72 UI/AL	-0.142	6	--	6	--	--	--	6	1
3	0.64 UI/AL	-0.192	6	--	6	--	--	--	6	1

COMO PUEDE OBSERVARSE, CON ESTOS RESULTADOS NO ES POSIBLE EFECTUAR LOS CALCULOS NECESARIOS YA QUE HUBO UNA MORTALIDAD DEL 100 %

FIGURA : 12 . DETERMINACION DE LA POTENCIA ANTITOXICA DE LA INMUNOGLOBULINA PROBLEMA. EXPERIMENTO 2.

TITULO TEORICO: 250 UI/ML

No. DE DILUCION	F=1.1 Log=0.04 DOSIS	Log. DE LA DOSIS	No. DE RATONES POR DOSIS (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE RATONES MUERTOS (R)	R/N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	0.26 UI/ML	-0.017	6	--	--	--	--	--	0	0
2	0.12 UI/ML	-0.093	6	--	--	--	--	--	0	0
3	0.08 UI/ML	-0.096	6	--	--	--	--	1	1	0.166
4	0.22 UI/ML	-0.142	6	--	--	1	2	2	5	0.833
5	0.64 UI/ML	-0.192	6	--	--	2	4	--	6	1

$$\begin{aligned} \text{Log. DE LA DOSIS FINAL} &= -(0.095 - 0.04/2 + 0.04(0.166 + 0.833 + 1)) \\ &= -(0.095 - 0.02 + 0.8799) \\ &= -0.095 - 0.02 - 0.8799 \\ &= -0.11496 \quad \text{ANTILOG} = 0.7674 \quad \underline{DE_{50} = 0.7674} \end{aligned}$$

$$0.7311/0.7674 \times 250 = 238.17 \text{ UI/ML}$$

FIGURA 13. DETERMINACION DE LA POTENCIA ANTITETANICA DE LA INMUNOGLOBULINA PROBLEMA. EXPERIMENTO 3.

TITULO TEORICO: 250 UI/ML

No. DE DILUCION	F=1.1 Log=0.04 DOSIS	Log. DE LA DOSIS	No. DE RATONES POR DOSIS (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE RATONES MUERTOS (R)	R/N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	0.26 UI/ML	-0.017	6	--	--	--	--	--	0	0
2	0.10 UI/ML	-0.095	6	--	--	--	--	--	0	0
3	0.08 UI/ML	-0.096	6	--	--	--	--	--	0	0
4	0.22 UI/ML	-0.142	6	--	--	--	--	1	1	0.166
5	0.64 UI/ML	-0.192	6	--	--	--	1	4	5	0.833

$$\text{Log. DE LA DOSIS FINAL} = -(-0.096 - 0.04/2 + 0.04(0.166 + 0.833))$$

$$= -(0.096 - 0.02 + 0.03996)$$

$$= -0.096 + 0.02 - 0.03996$$

$$= -0.11596 \quad \text{ANTILOG} = 0.7656 \quad \text{DE}_{50} = 0.7656$$

$$0.7311/0.7656 \times 250 = 238.7301/\text{ML}$$

FIGURA 15. DETERMINACION DE LA POTENCIA ANTITETANICA DE LA INMUNOGLOBULINA PROBLEMA. EXPERIMENTO 5.

TITULO TEORICO: 290 UI/ML

No. DE DILUCION	F=1.1 Log=0.84 DOSIS	Log. DE LA DOSIS	No. DE RATONES POR DOSIS (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE RATONES MUERTOS (R)	R / N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	0.75 UI/ML	-0.017	6	--	--	--	--	--	0	0
2	0.80 UI/ML	-0.053	6	--	--	--	--	--	0	0
3	0.88 UI/ML	-0.096	6	--	--	--	--	--	0	0
4	0.72 UI/ML	-0.142	6	--	--	--	--	--	0	0
5	0.64 UI/ML	-0.192	6	--	--	--	--	--	0	0

COMO PUEDE OBSERVARSE, CON ESTOS RESULTADOS NO ES POSIBLE EFECTUAR LOS CALCULOS NECESARIOS YA QUE HUBO UNA SOBREVIVENCIA DEL 100%

FIGURA 16 . DETERMINACION DE LA POTENCIA ANTITETANICA DE LA INMUNOGLOBULINA PROBLEMA. EXPERIMENTO 6.

TITULO TEORICO: 250 UI/ML

No. DE DILUCION	F=1.1 Log=0.04 DOSIS	Log. DE LA DOSIS	No. DE RATONES POR DOSIS (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE RATONES MUERTOS (R)	R / N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	0.26 UI/ML	-0.017	6	--	--	--	--	--	0	0
2	0.12 UI/ML	-0.053	6	--	--	--	--	--	0	0
3	0.08 UI/ML	-0.096	6	--	--	--	--	--	0	0
4	0.22 UI/ML	-0.142	6	--	--	--	--	2	2	0.33
5	0.64 UI/ML	-0.193	6	--	--	--	2	4	6	1

$$\begin{aligned}
 \text{Log. DE LA DOSIS FINAL} &= -(0.096 - 0.04/2 + 0.04(0.33 + 1)) \\
 &= -(0.096 - 0.02 + 0.2532) \\
 &= -0.096 + 0.02 - 0.2532 \\
 &= -0.1292 \quad \text{ANTILOG} = 0.7426 \quad \text{DE}_{50} = 0.7426
 \end{aligned}$$

$$0.7311 / 0.7426 \times 250 = 246.12 \text{ UI/ML}$$

FIGURA 1 1 . DETERMINACION DE LA POTENCIA ANTIITANICA DE LA INMUNOGLOBULINA PROBLEMA. EXPERIMENTO 7.

TITULO TEORICO: 250 UI/ML

No. DE DILUCION	FALTA Log ₁₀ DE LA DOSIS	Log. DE LA DOSIS	No. DE RATONES POR DOSIS (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE RATONES MUERTOS (R)	R / N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	0.35 U/ML	-2.057	6	--	--	--	--	--	0	0
2	0.89 U/ML	-0.855	6	--	--	--	--	--	0	0
3	0.89 U/ML	-0.896	6	--	--	--	--	--	0	0
4	0.35 U/ML	-0.142	6	--	--	--	--	--	0	0
5	0.64 U/ML	-0.193	6	--	--	--	--	--	0	0

COMO PUEDE OBSERVARSE CON ESTOS RESULTADOS NO ES POSIBLE EFECTUAR LOS CALCULOS NECESARIOS YA QUE HUBO UNA SOBREVIVENCIA DEL 100%

FIGURA 1 : 19 DETERMINACION DE LA POTENCIA ANTITOXICA DE LA INMUNOGLOBULINA PROBLEMA. EXPERIMENTO 6.

TITULO TEORICO: 250 UI/ML

No. DE DILUCION	F=1.1 L=2.04 DOSIS	Log. DE LA DOSIS	No. DE PATONES POR DOSIS (N)	MORTALIDAD POR DIA.					No. DE PATONES MUERTOS (P)	R/N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	0.96 UI/ML	-0.017	6	--	--	-	--	--	0	0
2	0.92 UI/ML	-0.033	6	--	--	--	--	--	0	0
3	0.88 UI/ML	-0.056	6	--	--	--	--	--	0	0
4	0.72 UI/ML	-0.142	6	--	--	--	--	--	0	0
5	0.64 UI/ML	-0.193	6	--	--	--	--	2	2	0.33

COMO PUEDE OBSERVARSE, CON ESTOS RESULTADOS NO ES POSIBLE APLICAR LA FORMULA PARA EFECTUAR LOS CALCULOS.

FIGURA : 13 DETERMINACION DE LA POTENCIA DE LA INMUNOGLOBULINA PROBLEMA.
EXPERIMENTO 9.

TITULO TEORICO: 250 UI/ML

No. DE DILUCION	Frac. de Log. de Dosis	Log. de LA Dosis	No. DE RATONES PCA Dosis (N)	NOPTA-LIC-1 POR DIA.					No. DE RATONES MUEPTOS (P)	R/N
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1	0.25	-0.217	6	--	--	--	--	--	2	2
2	0.08	-0.255	6	--	--	--	--	--	0	0
3	0.28	-0.214	6	--	--	--	--	1	1	0.16
4	0.28	-0.142	6	--	--	--	2	2	4	0.66
5	0.64	-0.130	6	--	--	--	5	1	6	1

$$\text{Log. DE LA DOSIS FINAL} = -0.215 - 0.04 \cdot 2 - 0.24 \cdot 0.16 + 0.66 \cdot 1$$

$$= -0.215 - 0.08 + 0.072$$

$$= -0.051 - 0.01 - 0.072$$

$$= -0.133 \quad \text{MUEPTOS} = 0.7801 \quad \underline{15.88} = 0.7801$$

$$0.7801 / 0.7801 \times 250 = 254.2991 \text{ UI/ML}$$

FIGURA 1 20 DETERMINACION DE LA POTENCIA ANTITETANICA DE LA INMUNOGLOBULINA PROBLEMA. EXPERIMENTO 10.

No. DE EXPERIMENTO	POTENCIA ANTITETANICA DE LA Ig. PROBLEMA.	
1	285.18 UI/ML	$\bar{X}=234.73$ UI/ML $S=6.4763$ $S=19.282$
2	--	
3	238.17 UI/ML	
4	245.89 UI/ML	
5	238.73 UI/ML	
6	--	
7	246.12 UI/ML	
8	--	
9	--	
10	234.29 UI/ML	

FIGURA 21 . POTENCIA ANTITETANICA DE LA INMUNOGLOBULINA PROBLEMA.

CONCENTRACION DE IG.	TAMANO DE LA ORADACION EN MM.		VOLUMEN DE IG POR POZO EN μ l		DIAMETRO DE LOS HALOS EN MM.	
	A	B	A	B	A	B
234.73 UI/ML	2.0	5.0	5.0	10.0	8.0	--
117.36 UI/ML	2.0	5.0	5.0	10.0	7.0	10.0
56.68 UI/ML	2.0	5.0	5.0	10.0	5.5	9.0
29.34 UI/ML	2.0	5.0	5.0	10.0	4.0	7.0
14.67 UI/ML	2.0	5.0	5.0	10.0	--	6.0
7.33 UI/ML	2.0	5.0	5.0	10.0	--	--
3.66 UI/ML	2.0	5.0	5.0	10.0	--	--
1.83 UI/ML	2.0	5.0	5.0	10.0	--	--

ASPECTO DE LOS HALOS

A. BIEN DEFINIDOS, CONCENTRICOS UNICOS

B. DEFINIDOS, OVALADOS, UNICOS.

LOS RESULTADOS DE LAS PLACAS CON ORADACIONES DE 2mm Y UN VOLUMEN DE 5 μ l DE INHIBIDORA FUERON MAS CONFIABLES AL FORMARSE HALOS DE PRECIPITACION PERFECTAMENTE CONCENTRICOS Y SOBRETODO BIEN DEFINIDOS DENTRO DE LA PLACA DE AGAR. SIN EMBARGO LAS PLACAS CON ORADACIONES DE 5mm Y CON UN VOLUMEN DE 10 μ l PRESENTARON HALOS OVALADOS Y EN ALGUNOS CASOS FUE TAN GRANDE LA DIFUSION QUE NO FUE POSIBLE MEDIR EL HALO DE PRECIPITACION.

FIGURA 122 OPTIMIZACION DE LA PRUEBA DE ID96. TAMANO Y VOLUMEN POR POZO.

DILUCION	CONCENTRACION DE IC.	DIAMETRO DE LOS HALOS EN MM.	
		25°C	37°C
1:1	274.73 UI/ML	8.8	9.5
1:2	137.36 UI/ML	7.8	7.8
1:4	68.68 UI/ML	5.5	5.5
1:8	34.34 UI/ML	4.8	4.5
1:16	17.17 UI/ML	--	--
1:32	7.23 UI/ML	--	--
1:64	3.66 UI/ML	--	--
1:128	1.83 UI/ML	--	--

SE PRESENTO UNA LIGERA DIFERENCIA ENTRE LOS HALOS PRODUCIDOS CON LAS DOS TEMPERATURAS PROBADAS. OBSERVANDOSE MAYOR DEFINICION A 25°C. AUNQUE EN AMBOS CASOS SE FORMARON HALOS CONCENTRICOS Y UNICOS.

FIGURA 123 . OPTIMIZACION DE LA PRUEBA DE IDRS. TEMPERATURA DE INCUBACION.

TOXINA CON 184 L-18/58

DILACION	CONCENTRACION DE T.C.	DIAMETROS DE LOS HALOS EN MM.		
		MEZCLA 1	MEZCLA 2	MEZCLA 3
1:1	234.73 UI/ML	9.3	4.5	--
1:2	117.36 UI/ML	6.3	--	--
1:4	58.68 UI/ML	6.0	--	--
1:8	29.34 UI/ML	4.3	--	--
1:16	14.67 UI/ML	--	--	--
1:32	7.33 UI/ML	--	--	--
1:64	3.66 UI/ML	--	--	--
1:128	1.83 UI/ML	--	--	--

RESPECTO DE LOS HALOS.

MEZCLA 1. 25ml de agar + 25ml de toxina. HALOS DEFINIDOS, CONCENTRICOS, UNICOS.

MEZCLA 2. 25ml de agar + 12.5ml de toxina. HALOS NO DEFINIDOS, LIGERAMENTE DIFUSOS, CONCENTRICOS, UNICOS.

MEZCLA 3. 25ml de agar + 6 ml de toxina. HALOS TOTALMENTE DIFUSOS.

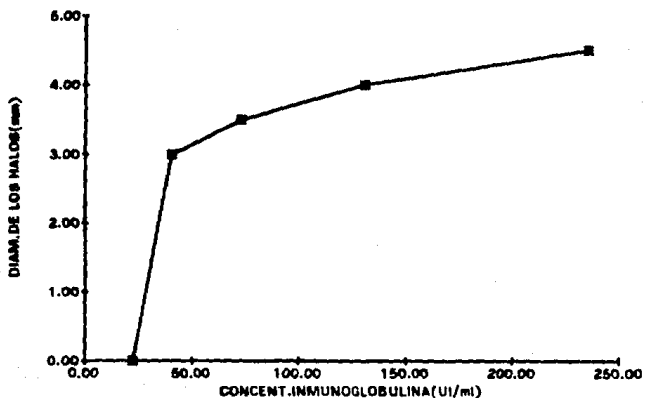
COMO PUEDE OBSERVARSE LA MEZCLA OPTIMA PARA LA PRUEBA ES DE 50 % DE AGAR + 50 % DE TOXINA PARA OBTENER HALOS BIEN DEFINIDOS, CONCENTRICOS Y UNICOS, TENIENDOSE ASI LECTURAS CONFIABLES.

**FIGURA 24 .OPTIMIZACION DE LA PRUEBA DE IBRS.
MEZCLAS TOXINA-AGAR.**

Concentración (P.D.=1.8)	Volumen de Ig	Volumen de sol.salina	Diámetro del halo
1.- 234.73 UI/ml...	0.1ml	4.5 mm
2.- 130.40 UI/ml...	0.1ml	0.08 ml	4.0 mm
3.- 72.44 UI/ml...	0.1ml	0.224 ml.....	3.5 mm
4.- 40.24 UI/ml..	0.1ml	0.483 ml.....	3.0 mm
5.- 22.36 UI/ml...	0.1ml	0.949 ml.....	-----

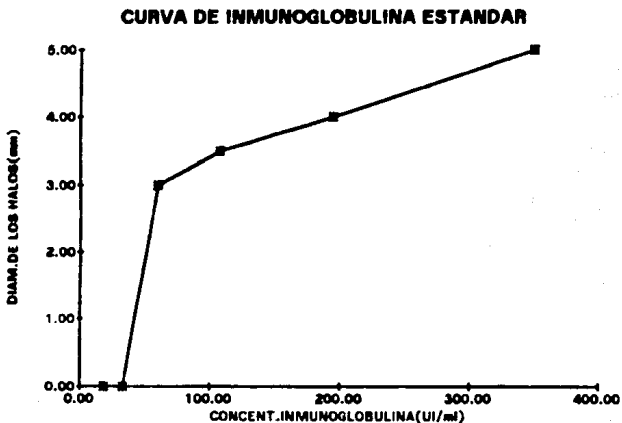
Figura 2 Curva de inmunoglobulina problema.

CURVA DE INMUNOGLOBULINA PROBLEMA



Concentración (F.D.=1.8)	Volumen de Ig	Volumen de Sol.salina	Diámetro del halo
1.- 350.00 UI/ml....	0.1 ml.....	-----5.0 mm
2.- 194.44 UI/ml....	0.1 ml.....	0.080 ml4.0 mm
3.- 108.02 UI/ml....	0.1 ml.....	0.224 ml3.5 mm
4.- 60.01 UI/ml....	0.1 ml.....	0.483 ml3.0 mm
5.- 33.34 UI/ml....	0.1 ml.....	0.949 ml-----
6.- 18.52 UI/ml....	0.1 ml.....	1.788 ml-----

Figura 16. Curva de inmunoglobulina estándar.



NUMERO. DE TUBO	CONCENTRA- CION DE IG.	DIAMETRO DE LOS HALOS EN MILIMETROS.
1	234.73 UI/ML	4.5 4.5
2	138.48 UI/ML	4.0 4.0 4.0
3	72.44 UI/ML	3.5 3.5 3.5
4	48.24 UI/ML	3.0 3.0 3.0
5	22.36 UI/ML	---

GAMMA GLOBULINA HUMANA HIPERIMUNE ANTIETANICA TETAGLOBULINA, LOTE B0383. INSTITUT
SERIEUX LYON/FRANCE 1ML=234.73 UI/ML

FIGURA 1 27 . POTENCIA DE INMUNOGLOBULINA PROBLIMA POR IDRS.
EXPERIMENTO 1.

NUMERO.	CONCENTRACION DE IG.	DIAMETRO DE LOS HALOS EN MILIMETROS.
1	234.73 UI/ML	4.5
		4.5
		4.5
2	130.40 UI/ML	4.0
		4.0
		4.0
3	72.44 UI/ML	3.5
		3.5
4	40.24 UI/ML	3.0
		3.0
		3.0
5	22.36 UI/ML	---

GAMA GLOBULINA HUMANA MIPERIMUNE ANTICETANICA TETAGLOBULINA, LOTE 80383, INSTITUT
 MERIEUX LYON/FRANCE SCL=234.73 UI/ML.

FIGURA 1 23 .POTENCIA DE INMUNOGLOBULINA PROBLEMA POR IDRS.
 EXPERIMENTO 2.

NUMERO. DE TUBO.	CONCENTRA- CION DE IG.	DIAMETRO DE LOS HALOS EN MILIMETROS.
1	234.73 UI/ML	4.5 4.5 4.5
2	138.48 UI/ML	4.0 4.0 4.0
3	72.44 UI/ML	3.5 3.5 3.5
4	48.24 UI/ML	3.0 3.0 3.0
5	22.36 UI/ML	---

GAMMA GLOBULINA HUMANA HIPERINMUNE ANTITETANICA TETAGLOBULINA, LOTE B0303 INSTITUT
MERICUX LYON/FRANCE IML=234.73 UI/ML.

FIGURA 1 29 .POENCIA DE IMMUNOGLOBULINA PROBLEMA POR IDAS.
EXPERIMENTO 3.

NUMERO. DE TUBO	CONCENTRACION DE IG.	DIAMETRO DE LOS HALOS EN MILIMETROS.
1	234.73 UI/ML	4.5 4.5 4.5
2	138.48 UI/ML	4.8 4.8 4.8
3	72.44 UI/ML	3.5 3.5 3.5
4	48.24 UI/ML	3.0 3.0 3.0
5	22.36 UI/ML	---

GAMMA GLOBULINA HIPERIMUNE ANTITETANICA TETASLOBULINA, LOTE BC393 INSTITUT MERICUX
LYON /FRANCE 1ML=234.73 UI/ML

FIGURA 238 . POTENCIA DE IMMUNOGLOBULINA PROBLEMA POR IDRS.
EXPERIMENTO 4.

NUMERO. DE TUBO	CONCENTRA- CION DE IG.	DIAMETRO DE LOS HALOS EN MILIMETROS.
1	234.73 UI/ML	4.5 4.5 4.5
2	138.48 UI/ML	4.0 4.0 4.0
3	72.44 UI/ML	3.5 3.5 3.5
4	48.24 UI/ML	3.0 3.0 3.0
5	22.36 UI/ML	---

GAMA GLOBULINA HUMANA ANTIETANICA TETAGLOBULINA, LOTE B0393 INSTITUT MERIEUX
LYON/FRANCE 1ML=234.73 UI/ML

FIGURA 31 . POTENCIA DE INMUNOGLOBULINA PROBLEMA POR IDRS.
EXPERIMENTO 5.

NUMERO. DE TUBO.	CONCENTRA- CION DE IG.	DIAMETRO DE LOS HALOS EN MILIMETROS.
1	234.73 UI/ML	4.5
		4.5
		4.5
2	138.48 UI/ML	4.0
		4.0
		4.0
3	72.44 UI/ML	3.5
		3.5
		3.5
4	48.24 UI/ML	3.0
		3.0
		3.0
5	22.36 UI/ML	---

GAMA GLOBULINA HUMANA HIPERINMUNE TETAGLOBULINA, LOTE 80393 INSTITUT PASTEUR
LYON/FRANCE SML=234.73 UI/ML

FIGURA 8 32 . POTENCIA DE INMUNOGLOBULINA PROBLEMA POR IDRS.
EXPERIMENTO 6.

DIAMETROS DE LOS HALOS DE PRECIPITACION EN MM.

FACTOR DE DILUCION=1.8

No. DE TUBO	CONCEN- TRACION	DIA 1		DIA 2		DIA 3	
		EX.A	EX.B	EX.A	EX.B	EX.A	EX.B
1	234.73	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
	UI/ML	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
2	138.48	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	UI/ML	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
3	72.44	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
	UI/ML	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
4	48.24	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
	UI/ML	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
5	22.36	--	--	--	--	--	--
	UI/ML	--	--	--	--	--	--

FIGURA 133. PRUEBA DE IDRS. INMUNOGLOBULINA PROBLEMA.

NUMERO. DE TUBO	CONCENTRA- CION DE I.G.	DIAMETROS DE LOS HALOS EN MILIMETROS.
1	255.88 UI/ML	5.0 5.0 5.0
2	142.15 UI/ML	4.8 4.8 4.8
3	78.97 UI/ML	3.5 3.5 3.5
4	43.87 UI/ML	3.0 3.0 3.0
5	24.37 UI/ML	--
6	13.54 UI/ML	--

INTERNACIONAL STANDARD FOR TETANUS ANTITOXIN 47mg. APROX. = 1400 UI .SE RECONSTITUYO
CON 4.0 ML DE SOLUCION SALINA .255.88 UI/ML ,DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE.

FIGURA 124 .POTENCIA DE INMUNOGLOBULINA ESTANDAR POR IDMS.
EXPERIMENTO 1.

NUMERO. DE TUBO.	CONCENTRA- CION DE IG.	DIAMETROS DE LOS HALOS EN MILIMETROS.
1	255.88 UI/ML	5.0 5.0 5.0
2	142.15 UI/ML	4.0 4.0
3	78.97 UI/ML	3.5 3.5
4	43.87 UI/ML	3.0 3.0
5	24.97 UI/ML	--
6	13.54 UI/ML	--

INTERNATIONAL STANDARD FOR TETANUS ANTITOXIN. 47mg. APROX=1400 UI .SE RECONSTITUVO
CON 4.0 ML DE SOLUCION SALINA. 255.88 UI/ML ,DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE.

FIGURA : 35 .POTENCIA DE INMUNOGLOBULINA ESTANDAR POR IDRS.
EXPERIMENTO 2.

DIAMETROS DE LOS HALOS DE PRECIPITACION EN MM.

FACTOR DE DILUCION=1.8

No. DE TUBO	CONCENTRACION	EXPERIMENTO	
		1	2
1	255.90 UI/ML	5.0	5.0
		5.0	5.0
		5.0	5.0
2	142.15 UI/ML	4.0	4.0
		4.0	4.0
		4.0	4.0
3	70.97 UI/ML	3.5	3.5
		3.5	3.5
		3.5	3.5
4	47.07 UI/ML	3.0	3.0
		3.0	3.0
		3.0	3.0
5	24.37 UI/ML	--	--
6	13.94 UI/ML	--	--

FIGURA 1 76 .PIEZA DE IDRS. ESTANDAR

ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS

Y CORRELACION.

TABLA I
Y EXPERIMENTAL-CALCULADA
PROBLEMA

CONCENT. UI/ml	Y EXPERIMENTAL	Y CALCULADA
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
234.73	4.50	4.66
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
130.40	4.00	3.79
72.44	3.50	3.38
72.44	3.50	3.38
72.44	3.50	3.38
72.44	3.50	3.38
72.44	3.50	3.38
72.44	3.50	3.38
72.44	3.50	3.38
72.44	3.50	3.38
72.44	3.50	3.38
72.44	3.50	3.38
72.44	3.50	3.38
72.44	3.50	3.38

CORRELACION DIAMETRO-CONCENTRACION
GRAFICA 3(PROBLEMA)

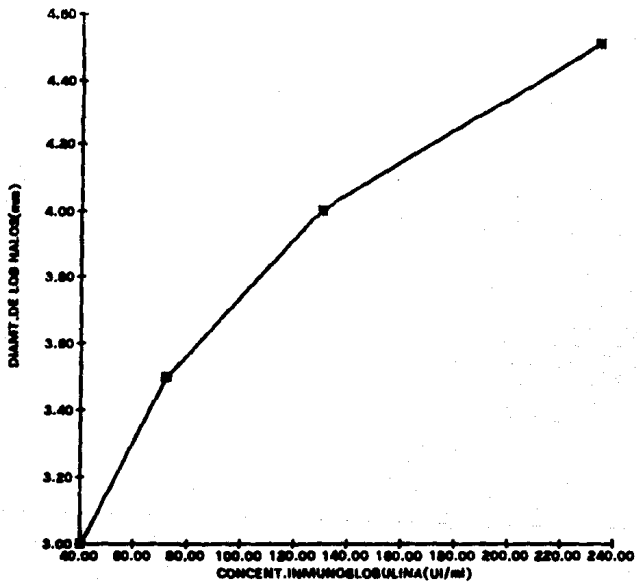


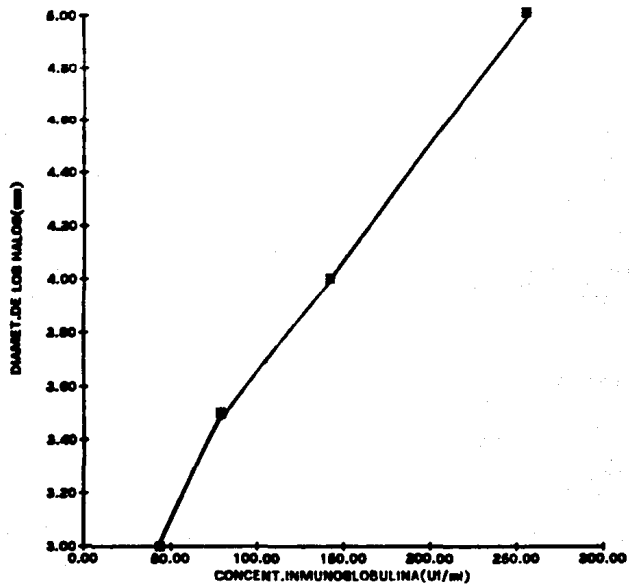
TABLA II
Y EXPERIMENTAL-CALCULADA
ESTANDAR

CONCENT.(UI/ml)	Y EXPERIMENTAL	Y CALCULADA
255.88	5.00	5.10
255.88	5.00	5.10
255.88	5.00	5.10
255.88	5.00	5.10
142.15	4.00	4.01
142.15	4.00	4.01
142.15	4.00	4.01
142.15	4.00	4.01
142.15	4.00	4.01
78.97	3.50	3.51
78.97	3.50	3.51
78.97	3.50	3.51
78.97	3.50	3.51
78.97	3.50	3.51
43.87	3.00	3.26
43.87	3.00	3.26
43.87	3.00	3.26
43.87	3.00	3.26
43.87	3.00	3.26

$$Y = 3.540 \exp(0.860 x)$$

COEFICIENTE DE CORRELACION
r² = 0.896

CORRELACION DIAMETRO-CONCENTRACION
GRAFICA 4 (ESTANDAR)



V. DISCUSION

METODO IN VIVO

De acuerdo al método descrito por J. Ipsen, es necesario antes que nada tener titulada la toxina utilizada en unidades $L+/10/50$. Para titular la toxina trabajada, fué necesario llevar a cabo una serie de pruebas, ya que para poder aplicar el método estadístico de Spearman-Kärber (10), es necesario que dentro de los resultados de una prueba exista de 90 a 100% de mortalidad, de 90 a 100% de sobrevivencia y porcentajes de mortalidad-sobrevivencia intermedios entre las diferentes concentraciones, por lo tanto, al no obtener porcentajes de mortalidad-sobrevivencia intermedios era imposible aplicar el método, pero aún así, fueron de gran interés, ya que indicaban que el título de la toxina se encontraba entre las diluciones 1:37.5 y 1:51.65, además de servir como base para plantear los siguientes experimentos, que indicaron que la toxina contenía 184.16 unidades $L+/10/50$.

J. Ipsen en 1942 plantea que este tipo de métodos se ven limitados por diversos factores, entre los cuales el principal es la sensibilidad de los animales de prueba. Los resultados experimentales confirmaron lo anteriormente citado aunque se trató de homogeneizar los lotes de animales trabajados ya que en cada lote se utilizaron ratones del

mismo sexo, con un peso corporal de 16 a 18 g y la edad generalmente no varió más de 2 a 3 días, sin embargo, la sensibilidad de los animales se vió afectada por factores tales como el nivel nutricional en que se encontraban, lo cual pudo fundamentarse un poco más con las curvas de crecimiento de poblaciones semejantes durante este tiempo, lo cual puede atribuirse a una mala calidad del alimento disponible en México para roedores (21). Lo anterior trae como consecuencia, en ocasiones, resultados totalmente incongruentes como ocurrió en algunos experimentos para determinar la potencia de la inmunoglobulina problema. En los experimentos 2, 6 y 8 (fig. 12, 16 y 18) se presentó con las mismas dosis, en un caso mortalidad del 100% y en los otros dos casos sobrevivencia del 100%, por lo consiguiente no se pudieron tomar en cuenta para obtener la potencia de la inmunoglobulina.

Sin embargo, este método in vivo, es el único que nos permite conocer la potencia biológica de la inmunoglobulina antitetánica y no solamente su actividad neutralizante.

Un aspecto importante a notar, es que los reactivos biológicos son en general caros, difíciles de obtener y conservar, y si aunado a esto se necesitan animales que requieren de condiciones ambientales especiales, manipuleo cuidadoso y experiencia técnica adecuada, dificulta aún más la realización de estos métodos. Por lo tanto se ha deducido que es necesario establecer métodos alternos más convenientes en los casos en que sean adecuados.

METODO IN VITRO

Mancini y col, en 1965 (11) encontraron que la técnica de IDRS es aceptable para la determinación cuantitativa de antígenos, incorporando anticuerpos específicos en las placas de agar. Para los propósitos de este estudio fué necesaria la incorporación del antígeno en la placa, determinando la cantidad exacta de anticuerpo.

Para optimizar la técnica se consideraron algunos factores tales como los siguientes:

1. Relación entre la concentración del anticuerpo y el tamaño final del anillo de precipitación. Cuando se mantiene constante la concentración del antígeno, el área circunscrita por el halo de precipitación es proporcional a la concentración del anticuerpo, ya que a concentraciones mayores de anticuerpo, mayor es el área del anillo de precipitación.

2. Relación entre la concentración del antígeno, el tamaño del pozo y el tamaño final del halo de precipitación. Entre más grande es el tamaño del pozo y menor la concentración del antígeno, es más difícil obtener halos concéntricos, definidos y únicos por lo que debe determinarse para cada sistema antígeno-anticuerpo, la relación óptima entre el tamaño del pozo y la concentración.

3.Reproducibilidad del método.Para determinar la reproducibilidad fué necesario repetir los experimentos bajo las mismas condiciones de prueba, así también fué necesario variar las posiciones de las soluciones dentro de cada placa y previamente a esto se observó la influencia de cambios de temperatura (fig 13).

No existe una variación considerable de los diámetros de los halos de precipitación cuando las soluciones se colocan en las distintas posiciones de las placas, siempre y cuando éstas sean preparadas cuidadosamente sobre una superficie horizontal. Así también las diferentes temperaturas de incubación no alteran los resultados significativamente; pero a 25°C, la difusión de la inmunoglobulina produce halos de precipitación mejor definidos.

4.Sensibilidad del método.Se refiere a los límites inferior y superior donde el halo de precipitación es visible. La sensibilidad mínima del método es de 40.24 a 43.87, menor a la de la técnica de J.Ipsen de 0.1 UI/ml, siendo una desventaja para calcular pequeñas cantidades de inmunoglobulina.

Con la técnica optimizada se llevaron a cabo seis de experimentos por duplicado y en base a éstos, la reproducibilidad inter e intraensayo fué muy alta, existiendo la posibilidad de que las diferencias se encuentren en

centésimas de milímetro, lo cual fué imposible detectar con el sistema de medición utilizado.

Igualmente, en los experimentos de la inmunoglobulina estándar, existieron diferencias no detectables para el sistema de medición propuesto.

El análisis estadístico aplicado reveló un comportamiento exponencial entre diámetros de los halos y las concentraciones de inmunoglobulina antitetánica, con una correlación de 0.9 entre los dos métodos, lo que establece una correlación exponencial directa entre las dos variables.

En base a esto fué posible determinar la validez de la curva dosis respuesta, la precisión del ensayo.

Aún así es difícil establecer la técnica como totalmente sustituyente, ya que puede ser que no nos permita conocer la potencia biológica de la inmunoglobulina, y si solamente la neutralizante.

VI. CONCLUSIONES

El método de Inmunodifusión radial simple optimizado, planteado en esta investigación como alternativo para la determinación de la actividad antitetánica de inmunoglobulinas, es aceptable como técnica *in vitro* en base a los resultados obtenidos. Su sensibilidad es menor a la de la técnica de J. Ipsen, ya que es de 22.36 UI/ml a 43.87 UI/ml. Su reproducibilidad es superior a la obtenida en la técnica *in vivo*, con una desviación estándar y un coeficiente de variación cercanos a cero, además de que es posible obtener resultados más precisos en 24 hrs, cuestión importante para disponer del producto en casos de emergencia.

El coeficiente de correlación obtenido entre ambos métodos, es aceptable dentro del control de productos biológicos al ser de 0.9 (23), y la curva dosis - respuesta es válida ya que los valores medios no se apartan significativamente de una línea recta, además de que la pendiente de la misma es mayor a cero. (23)

Atendiendo a ésto, se puede establecer la técnica de Inmunodifusión radial simple como método alternativo para obtener en poco tiempo la actividad antitetánica de las inmunoglobulinas, corroborando la actividad biológica periódicamente con el método *in vivo*, ya que no es conveniente considerar que esta técnica deba sustituir a la tradicional *in vivo*.

VII. LITERATURA CITADA

1. Fraga S., Seijo L., Campillo M. y Bhagirath S.: prevención del rechazo de trasplantes. Investigación y Ciencia, vol.2: 25-32 (1987).
2. Figueredo M.A, Alvarez R. y PUNCH C.: Antígenos, anticuerpos y sus interacciones. Medicine, vol.1: 35-56 (1989).
3. Roitt I., Brostoff J. and Male D.: Immunology. Londres Grower Medical. Enero 1985.
4. Leder Philip: Bases genéticas de la diversidad de anticuerpos. Investigación y Ciencia, Inmunología, vol.32: 40-45 (1982).
5. Gordon B.L, Ford D.K. : Lo esencial de la inmunología. El manual moderno S.A., México D.F., 1973.
6. Tizard I.: Inmunología Veterinaria, segunda edición, Interamericana, México D.F., 1984.
7. Becerra T. M.A.: Determinación de proteínas plasmáticas específicas por Turbidimetría y su correlación con Nefelometría. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1989

8. Fahey L. and McKelvey M.: Quantitative Determination of serum immunoglobulins in Antibody agar plates. The Journal of Immunology, vol.94: 84-90 (1964).

9. Reimer C.B. and Maddison S.E: Standardization of Human Immunoglobulin Quantitation: A Review of Current Status and Problems. Clinical Chemistry, vol.22: 577-582 (1976).

10. Mancini G, Carbonara A. and Heremans J.:Immunochemical Quantitation of Antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry, vol.2: 235-254 (1965).

11. Hugh. H,:Manual de Inmunologia Clinica. Ed.Manual moderno S.A., México D.F., 1986.

12. Normas de Inmunoglobulina humana normal. Instituto Mexicano del Seguro Social. Subdirección general de Abastecimiento. Jefatura de control de calidad, 1965.

13. Code of Federal Regulations, F.D.A.(1980) U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. Title 21, Chapter I, Parts 2,246 pp.

14. Normas de inmunoglobulina humana hiperinmune antitetánica. Instituto Mexicano del Seguro Social. Subdirección general de abastecimiento. Jefatura de control de calidad, 1965.

15. Ipsen.J.: Systematische und zufällige Fehlerquellen bei Messung kleiner Antitoxinmengen. Zf. Immun.-Forsch. 102:347, 368 (1942).
16. Piatkin K. yu Krivoshein: Microbiologia. 2a. Ed., Editorial MIR, Moscú 1981.
17. The United States Pharmacopeia, 1985, 21 st. Ed.Mack Publishing co. Elaston Pennsylvania.940pp.
18. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 1988, 5a. ed., Secretaria de Salud, México D.F.1576pp.
19. Manual de Laboratorio (1978), II Curso Internacional sobre Producción y Control de Biológicos, S.S.A., México D.F.385 pp.
20. Lorenz R.J. and Bogel K.: Methods of calculation. Appendix 1.
- 21.-Chirino Vargas Rosario.:Curvas comparativas de crecimiento y parámetros reproductivos en ratas cepa Wistar, alimentadas con una dieta balanceada de fabricación nacional y una dieta de fabricación extranjera.Tesis de Licenciatura.Fac.Medicina Veterinaria.Universidad Nacional Autónoma de México.México,D.F.,1985.

22.-Fortmeyer Hans P.:The influence of exogenous factors such as maintenance and nutrition on the course and results of animal experiments.Animals in toxicological research,edited by.I.Bartsek et al.Raven press.New York.1982.32pp.

23.-R.Glansz Pigel y A.Rosenk Ranz .Control Biológico de Medicamentos.Farmacotecnia Teórica y Práctica.