

302827

C N=20
2Ej.



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

**ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS
A LA U.N.A.M.**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PRUEBAS
DE POTENCIA IN VIVO E IN VITRO PARA EL
SUERO ANTIALACRAN**

T E S I S
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
p r e s e n t a

MARIA ANTONIETA ROMAN TIBURCIO

México, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



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.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA GERENCIA GENERAL DE BIOLÓGICOS Y REACTIVOS DE LA SECRETARÍA DE SALUD, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JUAN RUIZ GÓMEZ Y DEL Q.B.P. JORGE F. GÓMEZ HERRERA.

SE AGRADECE A LAS AUTORIDADES DEL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, Y ESPECIALMENTE A LA Q. B. P. ROCIO ORTEGA POR LAS FACILIDADES BRINDADAS PARA LA ELABORACIÓN DE ESTE PROYECTO, ASÍ COMO A LA Q. B. P. MA. TERESA ALVAREZ Y MUÑOZ DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.

Le doy gracias a Dios por todo lo que me ha dado,
y en especial por mi familia

A mi papá, gracias por ser un gran ejemplo
de superación y honestidad

A mi mamá, gracias por ser mi mejor amiga
y por tu entrega total

A la memoria de mis abuelitos:

Sres. Rodolfo Tiburcio Márquez

y Miguel Román reyes

A mis abuelitas:

Sras. Estela Gallardo viuda de Tiburcio

y Anatividad González viuda de Román

A mis hermanos Laura y Saúl

gracias por su cariño, su paciencia y su apoyo

A mis tíos Jorge y Julia,

gracias por estar siempre conmigo

Al Dr. Juan Ruiz Gómez,
mil gracias por su confianza
y el gran apoyo que en todo momento
me ha brindado

Al Dr. Jorge Gómez Herrera,
gracias por la acertada dirección de este trabajo
y por toda la ayuda que me ha dado

**Al personal del laboratorio de Control Biológico
del Instituto Nacional de Higiene,
y especialmente a la Q. B. P. Rocio Ortega**

**A la Q. B. P. Ma. Teresa Alvarez y Muñoz,
gracias por su ayuda desinteresada,
así como a Lety, Memo, Adriana, Remedios y Emy**

**A mis maestros, Rosario Vázquez, Olga Galicia,
Ernesto Bautista, Graciela Sosa, Eva Barbosa,
Lourdes Negrete, Francisco López, Gloria Benedetto
y R.M. Enriqueta Estrada, GRACIAS**

**A Cheio, gracias por tu gran ayuda en
la elaboración de este trabajo**

**A los miembros del jurado:
Q. F. B. Graciela Sosa,
Q. F. B. Evangelina Barbosa y
Q. F. B. Francisco López**

A BARON, MI SIEMPRE FIEL COMPAÑERO

INDICE

Capítulo I

Página

1. INTRODUCCION

1.1	Plantéamiento del problema	1.
1.2	Objetivos	2.
1.3	Hipótesis	3.

Capítulo II

2. ANTECEDENTES

2.1	Alacranismo	4.
2.1.1	Generalidades del veneno de alacrán	6.
2.2	Suero antialacrán	8.
2.2.1	Historia del suero antialacrán en México	8.
2.2.2	Producción del suero antialacrán	9.
2.2.2.1	Obtención del plasma equino	9.
2.2.2.2	Fraccionamiento, envase y liofilización	10.

Capítulo III

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1	Diagrama general	13.
3.1.1	Diagrama contraelectroforesis (CIE)	14.
3.1.2	Diagrama inmunodifusión radial simple (IDRS)	15.
3.1.3	Diagrama inmunodifusión doble (Prueba de Ouchterlony, IDD)	16.
3.1.4	Diagrama precipitación en capilar (Pp capilar)	17.
3.2	Material, reactivos y equipo	18.
3.2.1	Material biológico	18.
3.2.2	Material de laboratorio	19.
3.2.3	Reactivos	19.
3.2.4	Equipo	20.
3.3	Metodología	21.
3.3.1	Contraelectroforesis (CIE)	21.
3.3.2	Inmunodifusión radial simple (IDRS)	23.
3.3.3	Inmunodifusión doble (Prueba de Ouchterlony, IDD)	25.
3.3.4	Precipitación en capilar (Pp capilar)	26.
3.3.5	Tinción con azul de Coomassie	27.
3.3.6	Determinación de la dosis efectiva al 50% (DE_{50}) (técnica <u>in vivo</u>)	27.
3.3.7	Método de Spearman - Kärber	30.
3.4	Análisis estadístico	32.

Capítulo IV

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1	Resultados	33.
4.1.1	Resultados de contraelectroforesis (CIE)	33.

4.1.2 Resultados de inmunodifusión radial simple (IDRS)	34.
4.1.3 Resultados de inmunodifusión doble (Prueba de Ouchterlony, IDD)	49.
4.1.4 Resultados de precipitación en capilar (Pp capilar)	50.
4.1.5 Resultados de pruebas <u>in vivo</u> efectuadas en dos laboratorios de control de calidad	50.
4.2 Discusión	51.
Capítulo V	
5. CONCLUSIONES	55.
APENDICE	56.
BIBLIOGRAFIA	58.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente en el Instituto Nacional de Higiene para la determinación de la potencia del suero equino antialacrán se lleva a cabo la prueba de dosis efectiva al 50% (DE_{50}), la cual requiere el uso de ratones (cepa NIH), presentando ciertas desventajas, tales como:

- Requerir bioterios
- Consumir mucho tiempo
- Tener alta variabilidad biológica
- Alto costo

Por lo tanto, en el presente trabajo se propone el desarrollar pruebas de potencia in vitro, que sean rápidas, reproducibles, sencillas y económicas, a fin de poder emplearlas como pruebas semicuantitativas o cuantitativas para el control de calidad durante el proceso de producción de dicho suero hiperinmune.

Las pruebas de potencia in vitro que se proponen son:

- Contraimmunoelectroforesis (CIE)
- Inmunodifusión radial simple (IDRS)
- Inmunodifusión doble (Prueba de Ouchterlony, IDD)
- Precipitación en capilar (Pp capilar)

Las cuales son sencillas, no requieren ni material ni reactivos de difícil acceso, ocupan un espacio reducido, proporcionan resultados en un tiempo menor que las pruebas in vivo y se elimina el riesgo de variabilidad biológica.

Además, si estas pruebas se llegan a aceptar en un futuro, serán de gran ayuda para determinar con exactitud cuál es el momento óptimo para sangrar a los caballos inmunizados.

Cabe mencionar que no se pretende sustituir a las técnicas actuales (técnicas in vivo), como métodos de control para producto final, ya que éstas son oficiales y no pueden ser sustituidas por procedimientos no oficiales; lo que se pretende es implementar alguno de los métodos in vitro propuestos como instrumentos de control durante el proceso de producción del suero equino antialacrán.

1.2 OBJETIVOS

1. Desarrollar pruebas de potencia in vitro para el suero antialacrán que sean reproducibles, rápidas, sencillas y económicas para su futura aplicación en trabajos rutinarios.
2. Determinar si existe o no correlación entre las pruebas de potencia in vivo e in vitro y establecer cuál de ellas es la más conveniente.

1.3 HIPOTESIS

Las pruebas de contraelectroforesis e inmunodifusión radial simple se han empleado para evaluar la potencia de vacunas y sueros como los antirrábicos con buenos resultados, por lo que es posible suponer que también se pueden aplicar con los mismos fines para la evaluación de la potencia de suero equino antialacrán ⁽⁹⁾.

Si las pruebas de contraelectroforesis e inmunodifusión radial simple han funcionado en la medición de potencia de vacunas, entonces otras pruebas in vitro basadas en reacciones de precipitación también deben proporcionar buenos resultados.

Ciertos estudios reflejan que los alacranes del género Centruroides contienen diversas toxinas, por lo que se espera obtener más de una banda o halo de precipitación en los estudios de difusión en agar ^(5, 10, 15, 16, 17, 18).

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 ALACRANISMO

El alacranismo es un serio problema de salud pública originado por la picadura de alacranes, en varios países del mundo, que afecta a grandes núcleos de población, tanto en el medio rural como en el urbano, ocasionando aún en nuestros días considerables tasas anuales de morbilidad en algunas zonas de la República Mexicana ^(5, 7, 8, 19).

En México, cada año más de 100, 000 personas son picadas por alacranes, en donde se han encontrado aproximadamente 134 especies o subespecies, pero sólo 6 u 8 de ellas son importantes por los daños que ocasionan a la salud; las dos subespecies más peligrosas en México son Centruroides limpidus limpidus y Centruroides limpidus tecomanus ^(1, 5, 8, 18).

En México, el género Centruroides comprende una amplia distribución geográfica, habiéndose considerado históricamente que las zonas de mayor riesgo son Durango y Colima. La distribución geográfica de los alacranes en México se puede observar en la figura 1 ^(5, 8, 8, 13).

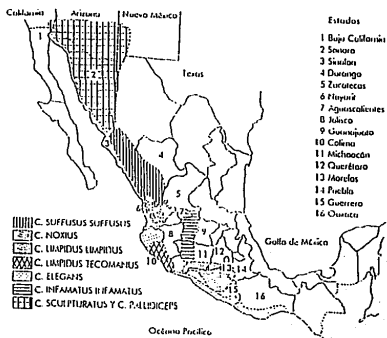


Figura 1. Distribución geográfica de alacranes del género *Centuroides* en la República Mexicana

2.1.1 GENERALIDADES DEL VENENO DE ALACRAN

COMPOSICION QUIMICA

El estudio de los venenos de alacrán ha contribuido para la elaboración de antiseros específicos y que contrarresten el envenenamiento ⁽⁷⁾.

El veneno de los alacranes de la familia Buthidae (a la cual pertenece entre otros el género Centruroides) está compuesto en su mayoría por polipéptidos neurotóxicos constituidos por 60 - 70 aminoácidos unidos entre sí por cuatro puentes disulfuro con un peso molecular aproximado de 7000 daltons y que inducen la despolarización de la unión a los canales de sodio de las membranas excitables. El veneno es una sustancia poco fluida, opaca, opalescente y con pH alrededor de 7.0. Las técnicas más usadas para obtener el veneno son por estimulación eléctrica del telson (último segmento del postabdomen del alacrán), o por trituración de los telsones en un mortero con solución salina seguida de filtración y centrifugación ^(6,7, 12, 14, 17, 18, 19, 20).

CARACTERIZACION FISIOLOGICA, ACCION Y SINTOMATOLOGIA

La respuesta del organismo provocada por el veneno de alacrán no se debe del todo al efecto directo de sus componentes. El veneno manifiesta su acción liberando algunos componentes celulares (acción autofarmacológica) ⁽⁷⁾.

La picadura en humanos por alacranes del género Centruroides en el continente Americano desarrolla síntomas potencialmente letales debidos a la acción del veneno sobre el sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático) y los órganos vitales, provocando un intenso dolor,

adormecimiento proveniente del sitio de la picadura, linfadenitis (inflamación de los ganglios linfáticos), parálisis motora ascendente con convulsiones, pulso rápido, salivación excesiva, sed y disuria extrema (dolor y molestia al orinar), irritabilidad, alteraciones de la temperatura, además de desórdenes cardiovasculares, respiratorios y gástricos principalmente (dolor epigástrico debido a una pancreatitis aguda)^(7, 14, 18, 25).

Por lo que respecta al tratamiento por picadura de alacrán, inicialmente se debe retardar la expansión del veneno a partir del sitio de la picadura mediante la aplicación de un torniquete temporal (sin incisión) y enfriamiento prolongado, pero no excesivo con paquetes de hielo. En muchos países se aplica el antisero correspondiente por vía intramuscular asociada con un antihistamínico para prevenir la reacción alérgica, aunque la mayor limitante del uso del suero antialacrán es la presencia de la reacción alérgica por proceder de suero equino y por ese motivo se combina con un antihistamínico, aún cuando actualmente el suero antialacrán se elabora mediante un proceso de purificación y digestión enzimática que disminuye la reacción alérgica. El tratamiento de soporte consiste inicialmente en infiltrar a través de la picadura una solución de procaína al 2% que contenga epinefrina 1:1000 para mitigar el dolor, posteriormente administración parenteral de soluciones de glucosa y aminoácidos. El shock se debe tratar con soluciones parenterales, incluyendo plasma sanguíneo ^(7, 9, 25).

2.2 SUERO ANTIALACRAN

2.2.1 HISTORIA DEL SUERO ANTIALACRAN EN MEXICO

En 1896 Calmette estableció la técnica de preparación de sueros antiofídicos (un suero es una fracción de plasma sanguíneo que permanece en estado líquido después de la coagulación), concluyendo que el veneno de cobra tiene propiedades antigénicas al igual que las toxinas diftérica y tetánica ⁽⁷⁾.

En una época se supuso que los sueros antiofídicos podían neutralizar venenos de serpientes y de alacranes, pero Vital Brazil fue quien demostró que los sueros europeos no neutralizaban los venenos de serpientes sudamericanas ^(7, 13).

Finalmente, se aceptó que los sueros antiofídicos son específicos y neutralizan únicamente los venenos que han servido de antígeno en su preparación y de acuerdo con esto, se consideró la posibilidad de que el veneno de alacrán pudiera tener propiedades antigénicas, además de su acción tóxica, comenzando así la búsqueda para preparar el primer suero antialacrán ⁽¹⁵⁾.

En México, el primer suero antialacrán se preparó en 1904 en el Instituto Médico Nacional de México por el Dr. Daniel Vergara Lope, habiendo inyectado perros con glándulas venenosas de alacrán en maceración glicerinada ⁽¹⁵⁾.

Posteriormente, en 1926 en Durango iniciaron la inmunización de caballos, de acuerdo con la técnica del Dr. Vital Brazil aplicaron 24 inyecciones de glándulas de alacrán en solución salina con intervalos de 3 a 5 días entre una y otra. La inyección inicial fue de 0.6 de glándula y la última de

350 glándulas; 12 días después de la inyección, se sangró al caballo, se separó el suero y se tituló, habiendo encontrado que neutralizaba el veneno de 8 glándulas/ml y finalmente se mandó una muestra al Director del Instituto Nacional de Higiene, para que a partir de ese momento, éste se encargara de la producción del suero antialacrán (7, 15).

2.2.2 PRODUCCION DEL SUERO ANTIALACRAN

2.2.2.1 OBTENCION DEL PLASMA EQUINO

El plasma equino se obtiene de acuerdo con el siguiente diagrama:

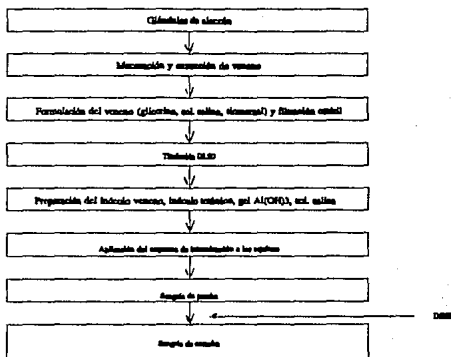


Diagrama 1

2.2.2.2 FRACCIONAMIENTO, ENVASE Y LIOFILIZACION

Este proceso se lleva a cabo de acuerdo con los siguientes diagramas:

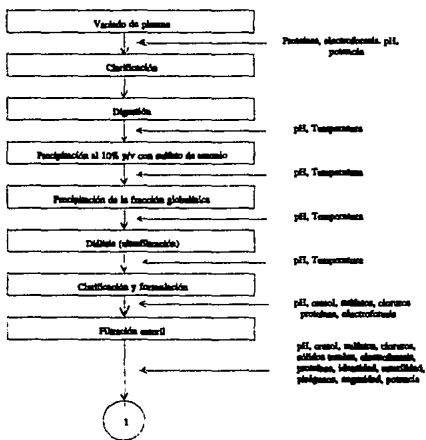


DIAGRAMA 2

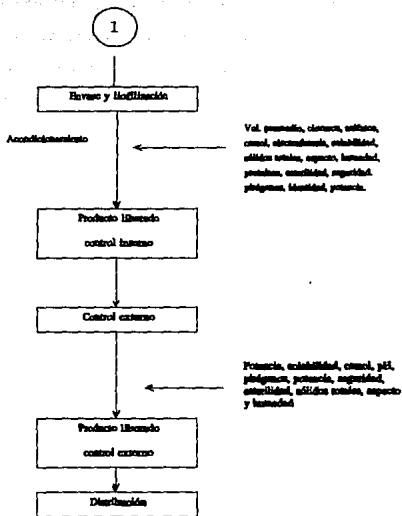


DIAGRAMA 3

Las pruebas de potencia para sueros heterólogos se realizan in vivo; una de las razones principales por las que se desea implementar pruebas de potencia in vitro es eliminar la dificultad existente al extrapolar especies no humanas con especies humanas, además de que se desea eliminar el sufrimiento y la muerte de los animales. En realidad en el caso del suero antialacrán éstas no han sido muy estudiadas, ya que se llevó a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva de 1983 a la fecha, y sólo se cuenta con 2 estudios relacionados con el tema. Las pruebas de potencia in vitro miden el

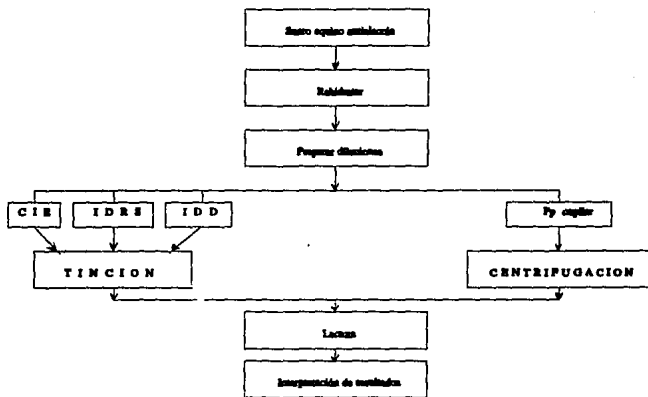
decremento de una actividad específica de una cantidad dada de veneno mezclada con cantidades ascendentes de antisuero. Si los métodos in vitro miden la capacidad de salvar vidas con una precisión similar a la que se obtiene con los métodos in vivo, entonces existe una razón importante para eliminar el continuo uso de animales ^(3, 4, 5, 24).

La preservación de la potencia de los antisucros depende principalmente de la formulación (líquido, seco o liofilizado en viales de vidrio sellados o en viales con tapón de hule)⁽²⁾

CAPTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA GENERAL



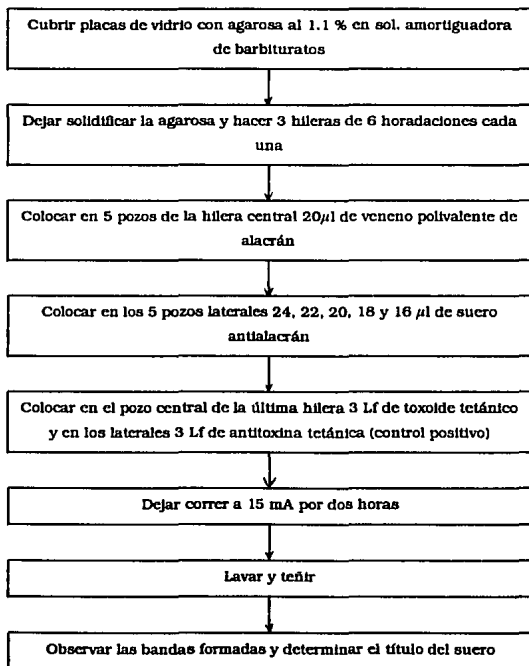
CIE = Contraimmunoelectroforesis

IDRS = Immunodifusión Radial Simple

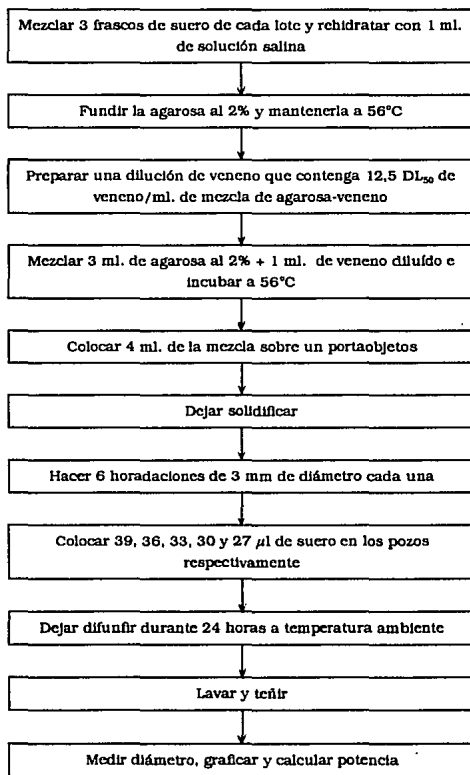
IDD = Immunodifusión Doble

Pp Capilar = Precipitación en capilar

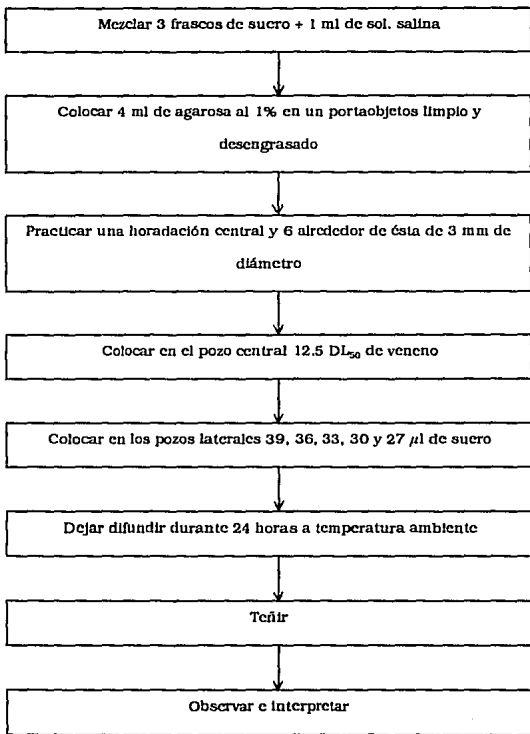
3.1.1 DIAGRAMA CONTRAINMUNOELECTROFESIS (CIE)



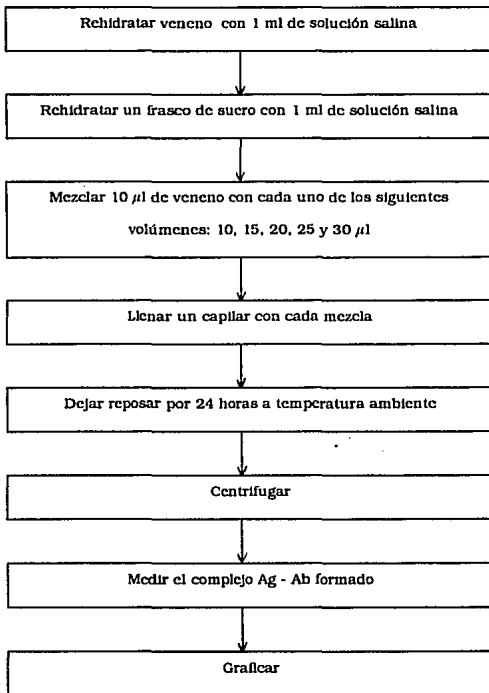
3.1.2 DIAGRAMA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS)



3.1.3 DIAGRAMA DE INMUNODIFUSION DOBLE (PRUEBA DE OUCHTERLONY, IDD)



3.1.4 DIAGRAMA DE PRECIPITACION EN CAPILAR (Pp CAPILAR)



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Veneno polivalente de alacrán* lote VPA-02,

Suero equino antialacrán* lotes Nos.:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14

Toxide tetánico* lote s/n 300 Lf/ml,

Antitoxina tetánica* lote s/n 300 Lf/ml

* *Producido en el Instituto Nacional de Higiene de la S. S. A.*

3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

Portaobjetos de vidrio de 2.45 x 7.4 cm,
Placas de vidrio de 6.2 x 7.6 cm,
Tubos capilares,
Probetas de 100 ml,
Pipetas de 5 y 10 ml,
Micropipetas de 5 - 50 μ l y de 200 - 1000 μ l,
Puntas para micropipetas,
Nivel con burbuja,
Horadador de 3 mm de diámetro,
Regla de plástico transparente,
Gasas,
Mechero Fisher,
Jeringas de plástico desechables de 1, 5 y 10 ml,
Matraces Erlenmeyer de 125 y 200 ml,
Termómetro,
Lupa,
Plastilina.

3.2.3 REACTIVOS

Agarosa Sigma reactivo para biología molecular,
Solución reguladora de barbituratos Gelman,

Solución salina fisiológica Abbott,
Azida de sodio Merck, grado reactivo,
Azul de Coomassie R-250 Sigma, grado analítico,
Metanol Merck, grado analítico,
Acido acético glacial Merck, grado analítico,
Isopropanol Monterrey, grado analítico

3.2.4 EQUIPO

Balanza analítica Sartorius,
Cámara para contraelectroforesis Gelman Instruments Company, modelo deluxe
electrophoresis chamber,
Fuente de poder Helena laboratories, modelo Titán,
Estufa a 37°C,
Secadora de pelo,
Campana de extracción,
Baño de agua a 56°C,
Cámara húmeda,
Centrífuga para microhematocrito,
Lector para microhematocrito

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE)

Antígeno

Se rehidrató un frasco de veneno polivalente de alacrán con 1.5 ml de solución salina, a fin de obtener 200 dosis letales al 50% por mililitro (DL_{50}/ml).

Suero

Se rehidrató un frasco de cada lote de suero problema antialacrán con 1 ml de solución salina.

La prueba de CIE se efectuó de la siguiente manera: se cubrieron láminas de vidrio de 6.2 x 7.6 cm (previamente lavadas y desengrasadas) con 8 ml de agarosa al 0.5% en agua destilada y se mantuvieron a 37°C durante 24 hrs; a continuación, las mismas laminillas se cubrieron con 8 ml de agarosa al 1.1% en solución amortiguadora de barbituratos (pH = 8.2), las que se dejaron solidificar a temperatura ambiente y posteriormente se mantuvieron en cámara húmeda a 4°C por no menos de 10 minutos.

En cada una de tres filas paralelas se marcaron a una distancia de 10 mm 6 cavidades de 3 mm de diámetro cada una; en los 5 primeros pozos de la hilera central se colocaron 20 μ l de veneno; a ambos lados del pozo central se colocaron los siguientes volúmenes de antisuero: 24 μ l, 22 μ l, 20 μ l, 18 μ l y 16 μ l; la última hilera de cavidades corresponde al control positivo, que en los

pozos laterales contenía 3 Lf de antitoxina tetánica y en el pozo central, 3 Lf de toxoide tetánico.

Figura 2:

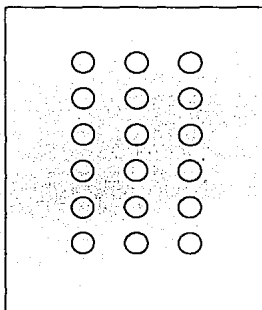


Figura 2

Cada una de las placas se introdujo en la cámara de CIE, que se había llenado previamente con solución amortiguadora de barbituratos (pH = 8.2); en ambos extremos de cada placa se colocaron puentes de papel filtro. La CIE se corrió durante 2 horas a 2 mA por cada cm de lámina.

Los geles se mantuvieron refrigerados durante 24 horas y posteriormente se prepararon para ser teñidos con azul de Coomassie.

Después de la tinción se observaron detenidamente las placas y el título del suero se determinó considerando el último pozo en el que se obtuvo un número considerable de bandas,

tomando en cuenta que en todos los pozos se mantuvo constante la concentración de veneno, la cual fue de 4 DL_{50} /pozo, por lo que la regla de cálculo es la siguiente:

$$\begin{aligned} 4 \text{ } DL_{50} & - \text{ vol. final}^* \\ \text{Título del suero (DE}_{50}\text{/ml)} & - 1000 \mu\text{l} \end{aligned}$$

$\text{vol. final}^* = \mu\text{l añadidos al último pozo en el que se observa un número considerable de bandas}$

3.3.2 INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS)

Antígeno

Se rehidrató cada frasco de veneno polivalente de alacrán con 6 ml de solución salina para tener 50 DL_{50} de veneno/ml.

Suero

Se mezclaron tres frascos de cada lote de suero antialacrán, los cuales fueron rehidratados con 1 ml de solución salina.

La agarosa al 2% en PBS se fundió y se mantuvo en baño de agua a 56°C, se mezcló con un volumen de veneno adecuado para tener 12.5 DL_{50} de veneno/ml en cada placa a 56°C y se añadieron 4 ml de dicha mezcla a cada portaobjetos de 2.45 x 7.4 cm (previamente desengasados y

limpios) en una superficie plana (nivel), se dejó solidificar y posteriormente se colocaron en cámara húmeda a 4°C por no menos de 10 minutos.

Transcurrido este tiempo, se practicaron 6 horadaciones de 3 mm de diámetro a cada placa y se añadieron los siguientes volúmenes de suero respectivamente: 39 μ l, 36 μ l, 33 μ l, 30 μ l, 27 μ l, 24 μ l. Se permitió la difusión por 24 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente y transcurrido ese tiempo se prepararon para ser teñidas con azul de Coomassie; después de la tinción se midieron los diámetros de las zonas de reacción antígeno-anticuerpo y se graficó el diámetro contra la concentración de suero correspondiente a cada pozo. Figura 3:

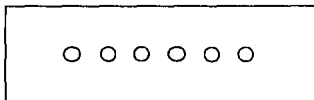


Figura 3

Con los datos graficados se calculó la pendiente de cada recta, a fin de determinar la potencia de cada lote de suero, de acuerdo con el siguiente cálculo:

$$\text{Potencia del suero} = \text{pendiente curva problema} / \text{pendiente curva estándar} \times 100$$

para lo cual, se empleó la pendiente de una curva estándar, obtenida de un suero estándar.

3.3.3 INMUNODIFUSION DOBLE (PRUEBA DE OUCHTERLONY, IDD)

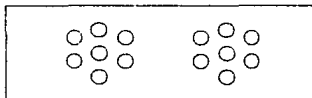
Antígeno

Se empleó el mismo veneno que en la técnica de CIE.

Suero

Se utilizaron los mismos sueros que en la técnica de IDRS

Sobre un portaobjetos de 2.45 x 7.4 cm previamente desengrasado y limpio se vaciaron 4 ml de agarosa al 1% en PBS, que se dejó solidificar y posteriormente se mantuvo en cámara húmeda a 4°C por no menos de 10 minutos. Sobre la placa se practicaron 2 juegos de 7 horadaciones de 3 mm de diámetro cada una, colocando para cada juego una de las horadaciones en el centro y las 6 restantes alrededor de ésta, de acuerdo a la figura 4:



(cada juego de horadaciones corresponde a un lote de suero).

Figura 4

En el pozo central de cada conjunto, se colocaron 12.5 DL_{50} de veneno y alrededor de éste se añadieron los siguientes volúmenes de suero respectivamente: 39 μ l, 36 μ l, 33 μ l, 30 μ l, 27 μ l y 24

μ l, los cuales se dejaron difundir en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 24 horas y transcurrido ese tiempo se observaron las bandas formadas y se prepararon las placas para ser teñidas con azul de Coomassie.

El título del suero se calculó considerando el último pozo en el que se obtuvo un número importante de bandas, tomando en cuenta que en todos los pozos se mantuvo constante la concentración de veneno, la cual fue de 12.5 DL_{50} /pozo, por lo que el cálculo para determinar el título es el siguiente:

$$12.5 DL_{50} - Vol. final^*$$

$$\text{Título del suero } (DE_{50}/ml) - 1000 \mu l$$

$Vol. final^* = \mu l$ añadidos al último pozo en el que se observa un número considerable de bandas

3.3.4 PRECIPITACION EN CAPILAR (Pp CAPILAR)

Antígeno

Se rehidrató un frasco de veneno polivalente de alacrán con 25 ml de solución salina reguladora (PBS), para tener 12 DL_{50} de veneno/ml

Suero

Cada frasco de suero se rehidrató con 5 ml de PBS y se prepararon las siguientes diluciones por lote: 1:2.19, 1:2.85, 1:3.75, 1:4.82, 1:6.26.

Los capilares se llenaron de antígeno por capilaridad hasta la mitad del tubo capilar y posteriormente se introdujo cada capilar en la dilución correspondiente de suero hasta llenar la mitad restante; se taparon por el extremo en que se colocó el antígeno con plastilina y se centrifugaron por 5 minutos en la centrifuga para microhematocrito, para posteriormente medir la cantidad de sedimento formado y determinar el porcentaje de complejo antígeno-anticuerpo obtenido.

3.3.5 TINCION CON AZUL DE COOMASIE

Las placas de CIE e IDRS se dejaron sumergidas en solución salina reguladora (PBS) durante toda la noche, se lavaron con agua destilada para retirar el exceso de sales, se secaron con una corriente de aire caliente y se colorearon con azul brillante de Coomassie durante 10 minutos; se lavaron con agua corriente, se decoloraron durante 5 minutos sumergiendo las placas en solución decolorante, se enjuagaron con agua corriente, se secaron y se observaron.

3.3.6 DETERMINACION DE LA DOSES EFECTIVA AL 50% (DL_{50}) (TECNICA IN VIVO)

a. Determinación de la DL_{50} de venenos

1. Se reconstituyó al 2% m/v, la preparación liofilizada de veneno, con solución 0.15M de NaCl. Se agregó glicerol volumen a volumen y tiomersal a una concentración final de 0.075% m/v.
2. Se diluyó el veneno en progresión geométrica, con factor constante, usando como diluyente solución 0.15M de NaCl. La serie de diluciones y el factor de dilución se seleccionaron de manera que la respuesta fuera progresiva, el 50% de mortandad se hallara comprendido en la serie, y se obliexeran el 0 y 100% de mortandad.

3. De cada dilución se inyectaron 0.5 ml a cada uno de 6 ratones de 18 a 20 g de peso (cepa NIH, sexo indistinto); se administró este volumen por la vena caudal y en un tiempo aproximado de 15 segundos. Se mantuvo un grupo control en iguales condiciones, excepto que a éste se le inyectó solución salina fisiológica.
 4. Se observó a los animales al cabo de 24 horas después de la inoculación, anotando los muertos en cada dilución.
 5. Se calculó la DL_{50} de los muertos por el método de Spearman Kärber (el cual se detalla en el punto 3.3.7), usando como reactores para el cálculo los muertos en un lapso de 24 h.
 6. Para calcular la dilución de prueba para la determinación de la potencia del suero equino antialacrán, se multiplicó la DL_{50} obtenida por 2 para obtener el número de DL_{50} en 1 ml, ya que la dosis inyectada fue 0.5 ml, y posteriormente se dividió el resultado obtenido entre 12.
- b. Selección de las diluciones de los sueros
1. Se calculó el número de DL_{50} /ml que el suero neutralizó, dividiendo lo que indica el marbete entre el volumen promedio.
 2. Se calculó la dilución teórica necesaria del suero para neutralizar 12 DL_{50} , dividiendo el valor obtenido anteriormente entre 12.
 3. Se consideró esta dilución como la central de la serie, y con un factor de dilución constante, se calcularon dos diluciones superiores y dos inferiores a ésta. El factor de dilución se eligió

de manera que la respuesta fuera progresiva.

4. Las diluciones y/o el factor de dilución deben modificarse en caso necesario para que contengan la dosis protectora al 50% (DP_{50}) y abarquen el 0 y 100% de mortandad.

c. Procedimiento.

1. Se diluyó el suero en progresión geométrica, con un factor constante. Se usó como diluyente solución 0.15M de NaCl.
2. Se mezclaron 3 ml de cada dilución con un volumen igual de una solución del veneno correspondiente que contuviera 12 DL_{50} /ml.
3. Se incubaron las mezclas por una hora a temperatura ambiente y protegidas de la luz.
4. Se inyectaron 0.5 ml de cada una de las muestras a cada uno de seis ratones de 18 a 20 g, en la vena caudal, procurando que el volumen se inyectara en un tiempo de 15 segundos.
5. Se observó el efecto protector del suero a las 24 horas posteriores a la inyección, anotando el número de sobrevivientes y muertos.
6. Se calculó la DP_{50} del suero por el método de Spearman Kärber.
7. Se confirmó en paralelo si el veneno utilizado contenía aproximadamente 12 DL_{50} /ml. (Ver 1). La prueba se considera válida si se cumplen las condiciones establecidas en 3. y 4. de

selección de las diluciones de los sueros, y si el veneno utilizado contiene entre 10 y 14 DL_{50}/ml .

8. Se calculó el número de DL_{50} neutralizadas por frasco, considerando el volumen promedio por frasco y el número de DL_{50} contenidas en la dilución de veneno utilizada (Ver 7).

3.3.7 METODO DE SPEARMAN - KÄRBER

Este método se emplea para estimar la DE_{50} .

PROCEDIMIENTO

El logaritmo de la DE_{50} (M) se estima mediante la siguiente ecuación:

$$M = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^k (P_{i+1} - P_i)(x_i + x_{i+1}) \quad (1)$$

Donde $k = k_{\text{ultima}}$ dosis a la cual se obtiene el 100% de reacción.

Para x_i igualmente espaciadas, se define al intervalo entre ellas como:

$$f = x_{i+1} - x_i \quad (2)$$

Al substituir (2) en (1) y reducir se obtiene:

$$M = x_k + f/2 - f \sum_{i=1}^k P_i \quad (3)$$

o alternativamente:

$$M = k_x - f \sum_{i=1}^k P_i \quad (3a)$$

si para cada dosis se tiene igual número de unidades de prueba (n), (3) se transforma en:

$$M = k_x + f/2 - (f/n) \sum_{i=1}^k r_i \quad (4)$$

Donde r_i = número de reactores a la i ésima dosis.

A partir de (3) o (4) se obtiene la DE_{50} mediante el antilogaritmo de M.

El estimado de la varianza de M es:

$$s^2 = f^2 \sum_{i=1}^k [p_i (1 - p_i) / n_{i1}] \quad (5)$$

Cuando hay el mismo número de unidades de prueba por dosis, la ecuación (5) se reduce a:

$$s^2 = \{f^2 / [(n-1)n2]\} \sum_{i=1}^k [r_i(n-r_i)] \quad (6)$$

Un intervalo de confianza aproximado para el verdadero valor de M, siempre y cuando n o n_i no sean demasiado pequeñas, es:

$$M \pm 1.96s \quad (7)$$

y al transformar a la variable original, obteniendo el antilogaritmo para cada límite, se determina el intervalo de confianza para la DE_{80} .

3.4 ANALISIS ESTADISTICO

Para determinar si es que existen o no diferencias significativas entre las técnicas in vitro propuestas y las técnicas in vivo, se emplearon la prueba "t" y la prueba "F".

La prueba "t" se aplica en este caso porque las muestras que se comparan entre sí fueron obtenidas de la misma población. En esta prueba se calcula la probabilidad de que la diferencia $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ tenga un valor tan grande como el observado para x_1 o x_2 . Para calcular "t" se aplica la siguiente fórmula:

$$t = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| / \sqrt{[\Sigma(x_1 - \bar{x}_1)^2 + \Sigma(x_2 - \bar{x}_2)^2] / n(n - 1)} \quad (8)$$

El valor de "t" calculado debe compararse con valores tabulados de "t", correspondientes a un nivel de significación o de probabilidad α de una variable aleatoria, para un número dado de grados de libertad (V) de que se dispone para el caso de la estimación del error; si el valor de "t" calculada es menor al de "t" tabulada, se considera que no hay diferencia significativa entre las medias comparadas. El número de grados de libertad es la cantidad de observaciones menos dos (que se emplearon para determinar las varianzas), es decir $(n_1 - 1) + (n_2 - 1)$ ⁽¹⁴⁾.

La prueba "F" se emplea para verificar que las varianzas de las dos muestras comparadas son congruentes entre sí, es decir que no difieren de manera significativa ⁽¹⁴⁾.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS

4.1.1 RESULTADOS DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE)

TABLA 1

LOTE N°	CONCENTRACION FINAL (μ l)	TITULO (DL ₅₀ / ml)
1	22	181.81
2	24	166.66
3	20	200.00
4	No interpretable	No interpretable
5	21	190.90
6	23	174.23
7	21	190.90
8	19	211.11
9	22	181.81
10	21	190.90
11	23	174.23
12	24	166.66
13	22	181.81
14	20	200.00

4.1.2 RESULTADOS DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS)

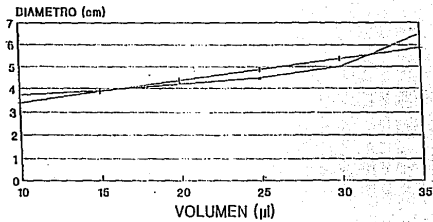
TABLA 2

LOTE N°	DIAMETRO (mm)/ μ l						m°	TITULO (U ₅₀ /ml)
	35	30	25	20	15	10		
1	65	50	45	42	39	37	0.100	183.01
2	59	53	45	43	42	40	0.074	135.43
3	69	64	62	55	50	46	0.093	170.20
4	65	56	45	42	40	39	0.108	188.50
5	71	65	62	60	55	51	0.075	137.28
6	70	65	62	60	58	45	0.084	153.73
7	75	71	61	58	55	48	0.106	194.00
8	72	62	59	51	50	42	0.110	201.32
9	80	75	70	65	55	50	0.122	223.28
10	65	62	59	55	45	40	0.102	186.67
11	72	69	61	60	52	49	0.095	173.86
12	70	67	65	59	51	45	0.102	186.67
13	72	69	65	55	51	49	0.102	186.67
14	67	62	58	51	50	46	0.083	151.90

• Pendiente de la recta

IDRS

LOTE 1



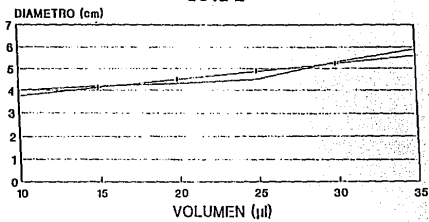
GRAFICA 1

— EXPERIMENTAL - - - CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

IDRS

LOTE 2



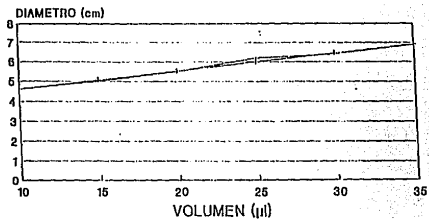
GRAFICA 2

— EXPERIMENTAL - - - CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

IDRS

LOTE 3



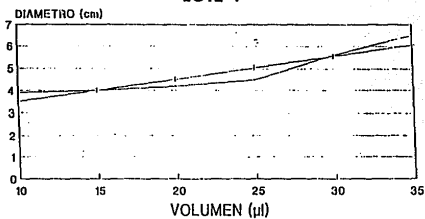
GRAFICA 3

— EXPERIMENTAL - - - CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

IDRS

LOTE 4



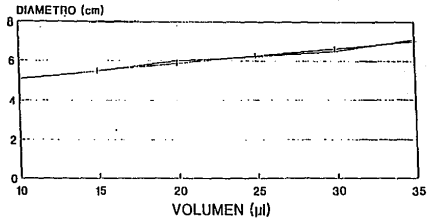
GRAFICA 4

— EXPERIMENTAL - - - CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

IDRS

LOTE 5



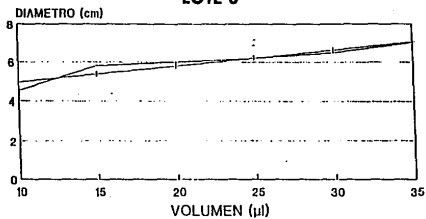
GRAFICA 5

— EXPERIMENTAL - - - CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

IDRS

LOTE 6



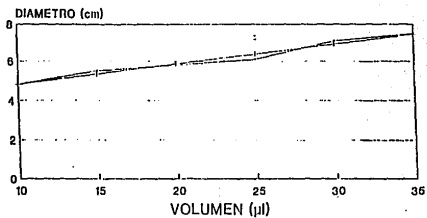
GRAFICA 6

— EXPERIMENTAL - - - CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

IDRS

LOTE 7



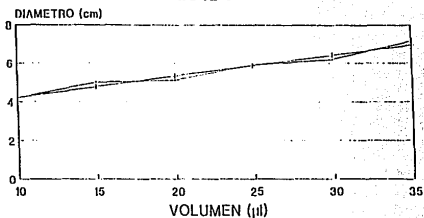
GRAFICA 7

--- EXPERIMENTAL - - - CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

IDRS

LOTE 8



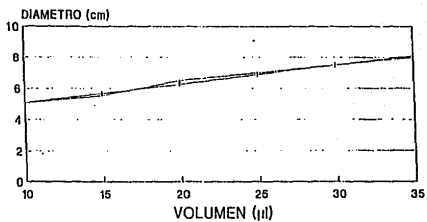
GRAFICA 8

--- EXPERIMENTAL. — CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

IDRS

LOTE 9



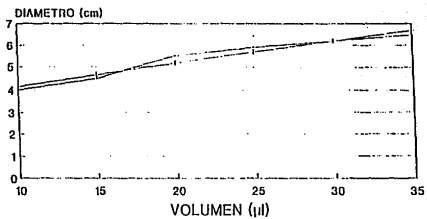
GRAFICA 9

— EXPERIMENTAL - - - CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

I D R S

LOTE 10



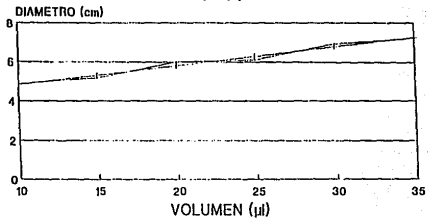
GRAFICA 10

--- EXPERIMENTAL. — CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

IDRS

LOTE 11



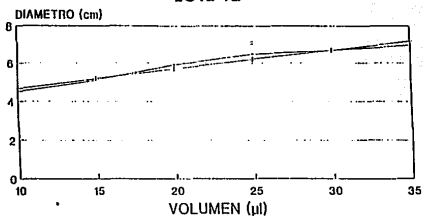
GRAFICA 11

--- EXPERIMENTAL — CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

IDRS

LOTE 12



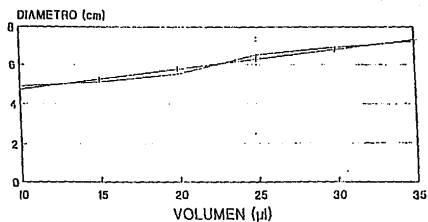
GRAFICA 12

— EXPERIMENTAL - - - CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

IDRS

LOTE 13



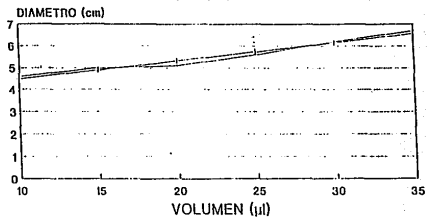
GRAFICA 13

— EXPERIMENTAL - - - CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

IDRS

LOTE 14



GRAFICA 14

— EXPERIMENTAL - - - CORRELACION

GRAFICA DE INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (IDRS) EXPERIMENTAL Y CORREGIDA

4.1.3 RESULTADOS DE INMUNODIFUSION DOBLE (PRUEBA DE OUCHTERLONY, IDD)**TABLA 3**

LOTE N°	CONCENTRACION FINAL (µl)	TITULO (DI₅₀/ml)
1	30	208.33
2	No interpretable	No interpretable
3	No interpretable	No interpretable
4	No interpretable	No interpretable
5	No interpretable	No interpretable
6	30	208.33
7	36	173.61
8	No interpretable	No interpretable
9	30	208.33
10	30	208.33
11	30	208.33
12	27	231.48
13	30	208.33
14	27	231.48

4.1.4 RESULTADOS DE PRECIPITACION EN CAPILAR (Pp capilar)

Los precipitados obtenidos fueron tan escasos, que resultó imposible medirlos, por lo que no es factible reportar ningún resultado con respecto a esta prueba.

4.1.5 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS IN VIVO EFECTUADAS EN DOS LABORATORIOS DE CONTROL DE CALIDAD

TABLA 4

LOTE N°	LABORATORIO 1 (DL ₅₀ /ml)	LABORATORIO 2 (DL ₅₀ /ml)
1	163.00	164.40
2	173.00	205.70
3	162.00	217.65
4	166.00	217.65
5	194.60	194.55
6	178.00	217.65
7	194.00	205.80
8	185.97	183.95
9	212.04	194.00
10	170.11	164.44
11	186.07	173.92
12	170.11	217.41
13	170.11	217.41
14	179.91	217.41

4.2 DISCUSION

La discusión de resultados se llevará a cabo en base a la comparación del título obtenido para cada lote de suero de acuerdo con las técnicas¹ antes mencionadas:

TABLA 5

LOTE Nº	CIE (DI ₅₀ /ml)	IDES (DI ₅₀ /ml)	QUANTERONY (DI ₅₀ /ml)	LABORATORIO 1 ² (DI ₅₀ /ml)	LABORATORIO 2 ² (DI ₅₀ /ml)
1	181.81	183.01	208.33	183.00	164.40
2	166.66	135.43	No interpretable	173.00	205.70
3	200.00	170.207	No interpretable	162.00	217.65
4	No interpretable	188.50	No interpretable	166.00	217.65
5	190.90	137.26	No interpretable	194.60	104.55
6	174.23	153.73	208.33	178.00	217.65
7	190.90	194.00	173.61	194.00	205.8
8	211.11	201.32	No interpretable	185.97	183.95
9	181.81	223.28	208.33	212.04	194.00
10	190.90	186.67	208.33	170.11	104.55
11	174.23	173.86	208.33	170.11	164.94
12	166.66	186.67	231.48	186.07	173.92
13	181.81	186.67	208.33	170.11	217.41
14	200.00	151.90	231.48	179.91	217.41

¹ No se incluye la técnica de precipitación en capilar, debido a que no se obtuvieron resultados objetivos.

² Técnicas in vivo

Para realizar la discusión de los resultados se empleó la prueba "t", así como la prueba "F", a fin de determinar si es que existen o no diferencias significativas entre las medias obtenidas por las técnicas desarrolladas en este trabajo y la técnica in vivo. Para este fin, no se tomaron en cuenta ni la técnica de Inmunodifusión doble ni la de precipitación en capilar, debido a que en la mayoría de los lotes no se obtuvieron los resultados esperados.

La prueba "t" se aplicó a los resultados obtenidos mediante la técnica de CIE y de IDRS, en comparación con los obtenidos por el LABORATORIO 1 y el LABORATORIO 2, habiéndose obtenido los siguientes valores:

TABLA 6

MÉTODOS	GRADOS DE LIBERTAD	$t_{calculada}$	$t_{tabulada} (\alpha = 0.05)$
CIE - LABORATORIO 1	24	1.017	2.064
IDRS - LABORATORIO 1	26	0.302	2.056
CIE - LABORATORIO 2	24	1.842	2.064
IDRS - LABORATORIO 2	26	2.654	2.056

α = Nivel de significancia de una variable aleatoria

Debido a que la $t_{calculada}$ en los primeros tres casos es menor que la $t_{tabulada}$, en el nivel de significación elegido ($\alpha = 0.05$), se considera que no hay diferencia entre las medias; en cambio, en

el último caso sí se observa diferencia entre las medias y la desviación estándar, ya que la $t_{calculada}$ es mayor que la $t_{tabulada}$.

Por lo anterior, es posible afirmar que de acuerdo con la prueba "t", los resultados obtenidos por las dos técnicas in vitro propuestas, son semejantes a los obtenidos por la técnica in vivo en el LABORATORIO 1, en cambio, con respecto a los resultados proporcionados por el LABORATORIO 2, se observa que no hay diferencia con la prueba de CIE, pero sí la hay con la de IDRS.

Para confirmar que realmente no existen variaciones entre los resultados proporcionados por el LABORATORIO 1 y los obtenidos in vitro, se llevó a cabo la prueba "F", con la cual se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA 7

GRADOS DE LIBERTAD (V_1)	GRADOS DE LIBERTAD (V_2)	$F_{calculada}$	$F_{tabulada} (\alpha=0.05)$
2	36	0.899	3.27

Ya que el valor de $F_{calculada}$ es menor que el de $F_{tabulada}$, es posible afirmar que los tres métodos no difieren entre sí.

Los resultados de la prueba de precipitación en capilar no se consideran, debido a que el precipitado obtenido resultó ser tan pequeño, que no fue posible medirlo, y mucho menos realizar

comparaciones entre las diferentes diluciones empleadas, así mismo, los resultados de la prueba de Ouchterlony tampoco se tomaron en cuenta, porque estadísticamente no se contó con una cantidad aceptable de éstos, lo cual se debió a que en muchos de los casos, era tal la cantidad de bandas observadas, que no era posible distinguir hasta qué punto se debía considerar el título del antisuero.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

De las cuatro técnicas inmunológicas in vitro propuestas para determinar la potencia del suero equino antialacrán, se observó que las mejores son las de difusión en un medio sólido (agarosa), y principalmente aquellas en las que se destina a cada concentración de antisuero problema un pozo con el antígeno correspondiente.

La técnica de IDRS presenta las ventajas de ser reproducible, sencilla y no requerir un equipo costoso, pero necesita mayores cuidados en su preparación que la de CIE, para la cual se debe contar con un equipo y una solución amortiguadora adecuada, con la gran ventaja de que la reacción antígeno-anticuerpo se acelera y se pueden observar resultados en un lapso de tiempo muy corto.

Para la realización de ambas técnicas no es necesario tener personal muy entrenado, ni trabajar en condiciones ambientales especiales, lo cual permite que cualquiera de estas técnicas se pueda desarrollar en el sitio de sangría de los caballos y esto representará un ahorro de tiempo para la producción del suero, así como una disminución en el uso de animales para pruebas de control durante el proceso.

La adopción de alguna de estas técnicas in vitro de manera rutinaria, sólo podría ser considerada como una prueba de control durante el proceso de producción del suero equino antialacrán, ya que la prueba definitiva para producto terminado es la de dosis efectiva al 50% (DE_{50}), que es un método establecido en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, y por lo tanto no puede ser sustituido por técnicas no oficiales.

APENDICE

PREPARACION DE SOLUCIONES

a) SOLUCION SALINA AMORTIGUADORA (PBS)

Fosfato de sodio	8.33 g
Fosfato diácido de potasio	1.09 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua bidestilada	1000 ml

b) SOLUCION AMORTIGUADORA DE BARBITURATOS 0.05M pH = 8.2

Disolver un vial de solución amortiguadora de barbituratos en 1000 ml de agua bidestilada y ajustar el pH en caso necesario.

c) PREPARACION DEL GEL DE AGAROSA PARA CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

Preparar una suspensión de agarosa al 0.9% en solución amortiguadora de barbituratos 0.05M, pH 8.2, que contenga una pizca de azida de sodio.

d) PREPARACION DEL GEL DE AGAROSA PARA INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE

Preparar una suspensión de agarosa al 2% en solución salina amortiguadora (PBS), que contenga una pizca de azida de sodio.

c) PREPARACION DEL GEL DE AGAROSA PARA INMUNODIFUSION DOBLE

Preparar una suspensión de agarosa al 1% en solución salina amortiguadora (PBS), que contenga una pizca de azida de sodio.

f) COLORANTE AZUL DE COOMASIE

Azul de Coomasic	1 g
Agua destilada	250 ml
Metanol	250 ml
Acido acético glacial	100 ml

Filtrar por papel filtro Whatman Nº 2

g) DECOLORANTE

Acido acético	200 ml
Isopropanol	700 ml
Agua destilada	1100 ml

BIBLIOGRAFIA

1. Alagón, A. C., H. S. Guzmán, B. M., Martín, A. N. Ramírez, E. Carbone y L. D. Possani. Isolation and characterization of two toxins from the mexican scorpion Centruroides limpidus limpidus karsch. Comp. Biochem. Physiol. **89B** (1): 153-161. 1988.
2. Bond, G. R. Antivenin administration for Centruroides scorpion sting: risks and benefits. Ann. Emerg. Med. **21** (7):788-791. 1992.
3. Chippaux J-P. Production and use of snake antivenin. Bulletin of the World Health Organization. **61** (6): 529-555. 1983.
4. Das Gupta, S. C., A. Gomes, A. Gomes, A. Basu, S. C. Lahiri. Pharmacological and immunological evaluation of scorpion (Heterometrus bengalensis) venom antiserum. Indian J. Exp. Biol. **27** (1): 47-51. 1989.
5. Das Gupta, S. C., A. Gomes, A. Gomes, A. Basu, S. C. Lahiri. Immunological cross reactivity & paraspecificity of the scorpion Heterometrus bengalensis antivenom. Indian J. Med. Res. **90**: 140-146. 1989.
6. Dent M. A. R., L. D. Possani, G. A. Ramírez and P. L. Fletcher Jr. Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. **18**: 343-350. 1980.
7. Dehesa, D. M. Alacranismo. Salud y enfermedad en el medio rural. **18**: 175 - 183. 1987.

8. Dehesa, D. M. Estado actual del manejo farmacológico por picadura de alacrán. Salud pública. 28:83-91. 1986.
9. Dehesa, D. M. Epidemiological characterization of scorpion sting in Leon, Guanajuato, México. Toxicon. 27 (3): 281-286. 1989.
- 10 Díaz A. M. Técnica de contraelectroforesis para el diagnóstico serológico de la rabia. Serie de Monografías científicas y técnicas del Centro Panamericano de Zoonosis. 13: 1-38. 1981.
- 11 FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 5a. edición, México (1988).
- 12 Fontecilla-Camps, J. C., R. J. Almassy, F. L. Suddath and C. E. Bugg. The three dimensional structure of scorpion neurotoxins. Toxicon. 20 (1): 1-7. 1982.
- 13 Hawgood, B. J. Review article. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr. Vital Brazil (1865-1950). Toxicon. 30 (5/6): 573-579. 1992.
- 14 Kennedy J. B., Neville A. M. ESTADISTICA PARA CIENCIAS E INGENIERIA, editorial Haria, 2ª edición, México, 1982.
- 15 Monroy, V. J. y J. M. Monroy N. Alacranes venenosos de México. Rev. Mex. Ciencias Med. Biol. 1, 3, 4, 5 y 6. 1-32. 1960-61.
- 16 Osman El-A. E. Issues in management of scorpion sting in children. Toxicon. 30 (1): 11-115. 1992.

- 17 Possani, L. D., G. A. Ramírez, P. L. Fletcher, Jr. and M. A. H. Gurrola. Isolation of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides elegans (Thorell). Febs letters. **91** (2): 261-264. 1978.
- 18 Possani, L., W. E. Steinmetz, M. A. R. Dent, A. C. Alagón and K. Wüthrich. Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from latin american scorpions. Biochimica et Biophysica Acta. **669**:183-192. 1981.
- 19 Possani, L. D., P. L. Fletcher, Jr., A. B. C. Alagón, A. C. Alagón and J. Z. Juliá. Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the mexican scorpion, Centruroides limpidus tecomanus Hoffmann. Toxicon. **18**:175-183. 1980.
- 20 Possani L. D., J. F. de Castro and J. Z. Juliá. Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (Centruroides noxius Hoffmann) venom. Toxicon. **19** (2): 323-329. 1981.
- 21 Raw, I., R. Guidolin, H. G. Higashi, and E. M. A. Kelen. Antivenins in Brazil: Preparation. Bulletin of the World Health Organization. **61** (6): 557-581. 1981.
- 22 Ruiz, C. M. Preparación del suero antialacrán y su titulación. Boletín del Instituto de Higiene del Departamento de Salubridad Pública. **6**:199-208. 1933.
- 23 Suresh, S. J. and S. V. Kapre. Antivenin production in India. Bulletin of the World Health Organization. **61** (6): 583-610. 1983.

- 24 Theakston, R. D. C. Immunological aspects of snake venom research. Bulletin of the World Health Organization. **61** (6): 495-527. 1983.
- 25 Vaughan, V. C., McKay R. J., Nelson W. E. TEXTBOOK OF PEDIATRICS, W. B. Saunders Company, 10th. edition, 769, U. S. A. 1975.