

205. 174  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



# **PLASMAFERESIS EN LA PRODUCCION DE SUEROS HIPERINMUNES HETEROLOGOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A**

**LAZARO DE JESUS RODRIGUEZ LOPEZ**

**ASESORES: M.V.Z. BYRON PARRA ANGELES  
M.V.Z. MANUEL CABRERA VALTIERRA**

**MEXICO, D. F. 1979.**

**8347**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## C O N T E N I D O

- I. INTRODUCCION
- II. MATERIAL Y METODOS
- III. RESULTADOS
- IV. DISCUSION
- V. CONCLUSION
- VI. BIBLIOGRAFIA

## **INDICE**

	<b>PAGINA</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>5</b>
<b>METODO DE PRODUCCION DEL SUERO ANTIALACRAN</b>	<b>6</b>
<b>METODO DE PRODUCCION DEL SUERO ANTIOFIDICO</b>	<b>21</b>
<b>METODO DE PRODUCCION DE LA ANTITOXINA DIFTERICA</b>	<b>29</b>
<b>METODO DE PRODUCCION DE LA ANTITOXINA TETANICA</b>	<b>37</b>
<b>METODO DE PRODUCCION DEL SUERO ANTIRRABICO</b>	<b>44</b>
<b>PLASMAFERESIS</b>	<b>55</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>65</b>

## RESUMEN

La plasmaféresis, método de sangrado que por primera vez se realiza en México en el Instituto Nacional de Higiene, incrementa en un 300% la producción de Sueros Hiperinmunes de uso humano, logrando además una reducción de muertes por intoxicaciones y degeneraciones del hígado, bazo y médula ósea. Es necesario elaborar acertadamente cada uno de los antígenos utilizados en las inmunizaciones, por eso se ha detallado en este trabajo los métodos de producción de los sueros Antialacrán, Antidiférico, Antirrábico, Antitetánico y Antiuiperino.

Con la plasmaféresis, el título aumentó considerablemente, reduciendo en una mejor protección para el individuo.

La función que desempeña el Médico Veterinario es esencial para el buen logro de las inmunizaciones en la producción de sueros hiperinmunes de uso humano a partir de equinos.

## **I. INTRODUCCION**

---

---

Las técnicas de producción de sueros hiperinmunes obtenidos a través de equinos previamente seleccionados para tal fin, han sido reportadas por la O.M.S. desde hace muchos años. En algunas ciudades del Sudeste de Asia se preparaban dichos productos con técnicas muy rudimentarias que consistían en inocular caballos con antígenos de rabia, tétanos y serpientes principalmente, y sangrarlos a suero obteniéndose cantidades muy reducidas del producto final.

La demanda de estos productos en aquellos lugares, aunada a la escasez de caballos aptos para tal fin, fueron las causas dominantes para que dichas técnicas se fueran modificando al paso del tiempo, a fin de obtener mayor cantidad de producto sin producir lesiones degenerativas y que permitieran al mismo tiempo alargar la vida útil sérica de los caballos. No fué sino hasta el año de 1960 que en Massachussets se convino en sangrar a los caballos a PLASMA y obtener el paquete celular de cada uno de los mismos, para ser transfundido nuevamente y poder de ésta manera, obtener sangrías durante 3 y 4 días consecutivos, sin alterar la médula ósea, el hígado y el bazo, a éste procedimiento se le conoce actualmente con el nombre de PLASMAFERESIS.

En México, en el Instituto Nacional de Higiene por vez primera se ha llevado a cabo dicho proceso en los equinos destinados a obtener sueros de uso humano contra Alacrán, Crótalo, Difteria, Rabia y Tétanos, incrementándose la producción en un 300% en cuanto a producto final.

Dentro del mecanismo de trabajo de dicho Instituto, merece por su importancia mención especial la actividad del Médico Veterinario Zootecnista, principalmente en cuanto a las funciones que debe realizar para llevar a cabo dichas técnicas.

Para lograr el mayor provecho de los equinos y un control individual más completo de los mismos, tomando como base la función zootécnica a que están destinados en el Instituto, las actividades del Médico Veterinario Zootecnista deben abarcar 3 aspectos fundamentales:

- 1.- Aspecto Médico Zootécnico
- 2.- Aspecto Médico Sanitario
- 3.- Aspecto Médico Clínico específico

1.- ASPECTO MEDICO ZOOTECNICO.- Dadas las aptitudes de los caballos según la raza, variedad y características individuales, algunos poseen cualidades para el tiro, silla, carreras, polo, salto, etc.; la elección de nuestros caballos ya que se trata de "ANIMALES DE LABORATORIO", dependerá de una buena selección, tomando como base características específicas que deben reunir para tal fin.

#### a).- RAZA

La raza en sí no es factor determinante en nuestra selección, aún cuando se ha visto (caso excepcional) que un equino raza Pura Sangre Inglés, produjo en menos de 4 años 384 litros de sangre. Se recomiendan entonces aquellos equinos que reúnan las siguientes características: buen peso (aproximadamente 400 Kg.), gran desarrollo muscular en todas sus re-

*giones, masas musculares bien definidas, resistentes, nobles, de fácil alimentación y sanos.*

**b).- EDAD**

*Es el factor más importante para la selección de caballos destinados a la producción de sueros; se recomiendan animales que tengan edades comprendidas entre los 5 y los 10 años, debido a que antes de los 5 años no tienen la resistencia, ni el volumen sanguíneo requerido como para resistir en un momento determinado la extracción de 20-30 litros de sangre, y al contrario un equino de más de 10 años presenta sus resistencias disminuidas y tardará más tiempo en reponer sus energías y la cantidad de sangre que se le haya extraído. La vida útil sérica de un caballo hasta los 10 años es mayor que la de un adulto mayor.*

**c).- ALZADA**

*Se recomiendan animales de alzada entre 1.50 y 1.60 metros pelo a tierra, ya que animales menores de 1.50 mts. representan menor volumen de sangre.*

**d).- SEXO**

*Se prefiere al macho castrado por su temperamento más apacible, las yeguas no convienen por la pérdida de tiempo que representa su posible gestación en un período de inmunización.*

**2.- ASPECTO MEDICO SANITARIO.** *Este importante capítulo nos indica que desde antes de introducir los caballos a las inyecciones a que deberán ser sometidos, se tomarán medidas higiénicas y profilácticas para el buen*

logro de las inmunizaciones y sangrías a que están destinados, lógicamente es de gran importancia tomar en consideración las instalaciones con las que cuenta actualmente el Instituto.

3.- ASPECTO MEDICO CLINICO ESPECIFICO. Este aspecto trata del diagnóstico, pronóstico, tratamiento y profilaxis de las lesiones anatómicas patológicas específicas que se presentan en los equinos destinados a la producción de sueros de uso humano, así como de todos aquellos padecimientos no relacionados con los procesos inmunológicos a que están sujetos dichos animales.

Lo expuesto anteriormente se concreta a mencionar algunos de los procesos que el Médico Veterinario desarrolla en técnicas y trabajos tan importantes para la conservación de la salud humana, tomando como base los productos biológicos que en el Instituto se elaboran.

## **II. MATERIAL Y METODOS**

## METODO DE PRODUCCION DEL SUERO ANTIALACRAN

### I.- Obtención y conservación del veneno.

1.- Obtención de glándulas. En la actualidad, las glándulas de alacrán son enviadas al Instituto Nacional de Higiene (I.N.H.) por personas especializadas en la captura del arácnido. Las glándulas son examinadas minuciosamente en forma macroscópica y a la vez por su carácter tóxico, eliminándose las que no llevan los requisitos necesarios, principalmente de potencia tóxica.

### 2.- Control del veneno.

a) Preparación.- Se hace una mezcla de las glándulas de las diferentes especies: 50% de Durango (*Centruroides suffusus suffusus* Pocock), 40% de Nayarit (*C. noxius* Hoffman), 10% de Guerrero (*C. limpidus limpidus* Karsch).

Los telson se lavan con agua destilada estéril durante 10 minutos, las glándulas se resuspenden en solución salina al 0.85% estéril y con pH de 7.2 y son triturados en un mortero. La suspensión obtenida se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 15 minutos, el sobrenadante se recolecta y el precipitado se resuspende en solución salina y es centrifugado nuevamente, esta operación se repite 5 veces.

De acuerdo al criterio seguido en los mínimos requerimientos (U.S. Department of Health and Welfare) el antígeno obtenido

se mezcla con glicerina volumen a volumen, adicionando mer--  
thiolate 1: 3000. El veneno preparado es conservado a una tem--  
peratura de 4°C.

b) *Potencia de venenos (DL<sub>50</sub>).*

Este método permite determinar la potencia de los venenos -  
de alacrán y serpiente como dosis letal media (DL<sub>50</sub>) que -  
corresponde a la mínima cantidad de veneno capaz de matar -  
al 50% de la población sometida a la prueba. Utilizar el -  
procedimiento estadístico de Reed y Muench eliminando así -  
un factor biológico de sensibilidad ó resistencia al veneno -  
por parte de los animales en experimentación.

DETERMINACION DE LA DL<sub>50</sub>

Material

- 5 Frascos ampula de 25.0 ml con tapón de hule
- 3 pipetas de 1.0 ml graduadas en 0.01
- 4 pipetas de 5.0 ml graduadas en 0.1
- 2 pipetas de 10.0 ml graduadas en 0.1

*Etiquetas*

Papel aluminio

Balanza analítica

Espátula

2 Agujas del No. 27x13 mm.

2 Jeringas de 1 ml

*Torundas de algodón*

*Tablas logarítmicas*

*4 Jaulas chicas*

*1 Pinza de mosquito*

*1 soporte metálico*

*1 Trampa para ratón*

*Solución Salina al 0.85%*

*Veneno para titular*

*Ratones de 18 a 20 g.*

*Procedimiento*

1) *Diluir el veneno usado como diluyente solución salina al 0.85%*

*En el cuadro siguiente se muestra un ejemplo de las diluciones que pueden hacerse, aunque en éstas varía de veneno y a veces es necesario hacer más de dos determinaciones antes de encontrar el título exacto del veneno.*

*Las diluciones deben efectuarse de acuerdo con un factor de dilución común para todas ellas:*

<i>TUBO</i>	<i>ML. DE VENENO</i>	<i>ML. DE S.S.</i>	<i>DILUCION</i>
<i>1</i>	<i>0.1</i>	<i>4.9</i>	<i>1: 50</i>
<i>2</i>	<i>0.1</i>	<i>7.4</i>	<i>1: 75</i>
<i>3</i>	<i>0.1</i>	<i>11.1</i>	<i>1: 112</i>
<i>4</i>	<i>0.1</i>	<i>16.7</i>	<i>1: 1687</i>

2) *Inocular 6 ratones por dilución con 0.5 ml por vía endovenosa.*

3) *Observar entre las 2 y 24 horas después de la inoculación, -*

anotando los muertos y sobrevivientes de cada dilución. Haciendo uso del protocolo anexo.

Cálculos. - La dosis letal media se calcula por el Método de Reed y Muench:

$$DL_{50} = \text{Log. D.M.} - \text{Log. F.D.} \times \frac{50\% - P_m}{PM - P_m} \times$$

DM = Dilución inmediata inferior al 50% de mortalidad

FD = Factor de dilución

P<sub>m</sub> = Proporción inmediata inferior al 50% de mortalidad

PM = Proporción inmediata superior al 50% de mortalidad

El último miembro de la fórmula se le designa como distancia proporcional (D.P.).

Dilución	Muertos	Vivos A.	Muertos A.	Vivos	Mort/Total	% Mort.
1:50	6	0	13	0	13/13	100
1:75	5	1	7	1	7/8	87
1:112	2	4	2	5	2/7	28
1:1687	0	6	0	11	0/11	0

$$D.P. = \frac{50 - P_m}{PM - P_m} \quad \text{ó sea} \quad D.P. = \frac{50 - 28}{87 - 28} = \frac{22}{59} = 0.37$$

Substituyendo en la fórmula:

$$DL_{50} = 2.0492 - 0.17609 \times 0.37$$

$$DL_{50} = 2.0492 - 0.0651 = 1.9841$$

$$\text{Antilog. de } 1.9841 = 9640$$

$$96.40 - 0.5 \text{ ml}$$

$$x - 1.0 \text{ ml}$$

$$x = \frac{96.4 \times 1.0}{0.5}$$

$$DL\ 50/ml = 192.8$$

## II.- Obtención del Suero.

Los caballos de nuevo ingreso son inoculados con 10 ml de Toxóide Tetánico y permanecen en observación durante 40 días. Los caballos destinados a éste tipo de trabajo deberán tener una edad de 6 a 9 años, estar perfectamente sanos y libres de enfermedades tales como tuberculosis, muermo, gurma, fiebre de embarque, etc., así mismo ser vacunados cuando lo amerite contra la encefalitis equina. Los venenos deberán ser inoculados subcutáneamente en la región costal. La ruta intramuscular es inconveniente por las extensas necrosis que provocan y por la insuficiente respuesta inmunológica.

### 1.- Esquema de inmunización.

El esquema de inmunización se divide en dos: base y refuerzo, éste último es repetido posteriormente en las reinmunizaciones.

a) Esquema base: Consta de 8 inóculos con un lapso de 26 días, siendo los dos primeros el antígeno mezclado con adyuvante y las 6 restantes al antígeno soluble.

Las sangrías de prueba se realizan a partir del 6° día después del último inóculo y de acuerdo a la potencia obtenida, la cosecha se inicia el 7°, 8°, 9° y 10° día.

<b>DIAS</b>	<b>INOCULO</b>
1	50 DL 50 en 20 ml con adyuvante completo de Freund
8	50 DL 50 en 20 ml con adyuvante incompleto de Freund
16	50 DL 50 en 20 ml
18	75 DL 50 en 20 ml
20	75 DL 50 en 20 ml
22	100 DL 50 en 20 ml
24	125 DL 50 en 20 ml
26	150 DL 50 en 20 ml
32	Sangría de prueba = S.P.
33	S.P. y Cosecha
34	" "
35	" "
36	" "

b) *Esquema refuerzo.*

*Terminado el esquema base los caballos descansan de 6 a 8 semanas, posteriormente se reinician las inoculaciones con el esquema refuerzo que es el siguiente:*

<b>DIAS</b>	<b>INOCULO</b>
1	100 DL 50 en 20 ml
3	100 DL 50 en 20 ml
5	150 DL 50 en 20 ml
7	200 DL 50 en 20 ml

<i>DIAS</i>	<i>INOCULO</i>
9	200 DL 50 en 20 ml
17	S.P.
18	S.P. y cosecha
19	" "
20	" "
21	" "

*Las inoculaciones del antígeno se realizan en forma fraccionada (4 sitios de 5 ml c/u).*

2 - *Determinación de la potencia del suero antialacrón DE 50.*

*Generalidades.- La potencia del suero antialacrón se mide - determinando la capacidad protectora de un antisuero contra - el efecto letal del veneno de alacrón y se determina cuantitativamente añadiendo el antisuero a una solución de venenos de título conocido (12 LD 50/ml) e inyectando posteriormente la mezcla.*

*La dosis efectiva (DE 50) se calcula por medio del método - estadístico de REED y MUENCH.*

*Material*

*Veneno recientemente titulado en LD 50 (generalmente se acostumbra hacerlo el mismo día de la prueba).*

*Suero antialacrón líquido o liofilizado*

*5 Fcos. de 25 ml con tapón de hule*

*4 Fcos. de 5 ml con tapón de hule*

3 pipetas de 1.0 ml

4 pipetas de 5.0 ml

3 pipetas de 10.0 ml

Solución salina al 0.85 %

Etiquetas, espátula y papel aluminio

4 Jaulas chicas

Soporte y trampa para ratones

2 jeringas de 1.0 ml

3 agujas del No. 27 x 13 mm

1 pinzas de mosquito

Torundas con alcohol

Tablas logarítmicas

28 ratones de 18-20 g.

### Procedimiento

- 1) Hacer diluciones seriadas del suero problema polivalente conservando un factor de dilución constante.
- 2) Tomar 2.0 ml de cada dilución y mezclar con un volumen igual de veneno de reto, con una concentración fija de 12 DL 50/ml.
- 3) Incubar la mezcla una hora a temperatura ambiente con el fin de que se equilibre el proceso de neutralización.
- 4) Inyectar 0.5 ml de las mezclas a grupos de 6 ratones por cada dilución en la vena caudal.
- 5) Observar el efecto protector del suero, a las 24 horas después de la inoculación, anotando el número de sobrevivientes y de muertos.

**Cálculos**

Calcular la DE 50 por el método de Reed y Muench como se muestra en el ejemplo siguiente:

Dilución del veneno de reto 192.8/12(DNI. 1:16), que contiene -  
12 LD/50 ml.

Diluciones del suero

FRASCO	DILUCIÓN	ML. SUERO	ML. de S.S.
A	1:4	1.0 ml	3 ml
B	1:6	1.0 ml	5 ml
C	1:9	1.0 ml	8 ml
D	1:13.5	1.0 ml	12.5 ml

Factor de dilución = 1.5

Preparación de la mezcla de veneno-suero:

ML. SUERO DILUIDO	ML. VENENO RETO
2 ml de A	2 ml
2 ml de B	2 ml
2 ml de C	2 ml
2 ml de D	2 ml

Incubar todos los frascos a temperatura ambiente. Protegerlos de la luz durante una hora.

Dil.	Muertos	Vivos	A. Muertos	A. Vivos	Mortalidad	% Mortalidad
1:4	0	6	0	11	0/11	0
1:6	3	3	3	5	3/8	37
1:9	4	2	7	2	7/9	77
1:13.5	6	0	13	0	13/13	100

D.P. - 0.32

Log. F.D. = 1.5 = 0.17609

Log. de la dilución inferior al 50% = 0.7782

Fórmula:  $DE_{50} = \text{Log. dil. } 50\% \text{ M. Log. F.D. (D.P.)}$

Substituyendo en la fórmula:

$$DE_{50} = 0.7782 \quad 0.17609 \quad (0.32)$$

$$DE_{50} = 6.831$$

$$\text{Antilog. } DE_{50} = 6.831$$

$$1/6.8 = 0.147$$

Si 0.147 ml de suero neutralizan a 12 DL 50 entonces 1.0 ml de suero neutraliza X DL 50

$$X = 81.6$$

Reporte: Un mililitro de suero neutraliza 81.6 LD50 de veneno de alacrán.

### III. Concentración y Purificación del Suero.

A partir del plasma obtenido de los esquemas de inmunización antes mencionados, se inicia el proceso de concentración y purificación de globulina, por medio del método de SULFATACION (Salting out) que a continuación se describe:

#### 1.- Técnica de proceso (sulfatación)

Precipitación I (al 23%).- Eliminación de la fibrina. A cada litro de plasma se le agregan 298 ml de sulfato de amonio sobresaturado, a pH 7.0 con agitación y a 4°C.

**Filtración del precipitado.** El precipitado se filtra, se mide el volumen del sobrenadante.- El precipitado se desecha.

**Precipitación II (al 60%).**- Obtención de globulinas. Por cada litro de sobrenadante se agregan 1.2 lts. de sulfato de amonio de pH 7.0. Se agita mientras se agrega el sulfato y se mantiene sobresaturado a temperatura de 4°C.

**Filtración del precipitado II.** Se cosecha el sobrenadante y se pesa el precipitado seco.

**Lavado del precipitado (60%).** Se prepara una solución de saturación de sulfato de amonio al 60%, y se lleva el precipitado al doble del volumen inicial.

**Separación del precipitado III.**- Se desecha el sobrenadante y se pesa el precipitado.

**Dialisis.**- El precipitado se coloca en una bolsa de papel celulosa en el seno de agua destilada (10 veces su peso en Kg en litros de agua). Al día siguiente se cambia la dialisis a Buffer de fosfatos - de pH 7.0. Esta operación se continúa haciendo hasta tener el producto libre de sulfatos. La temperatura se mantiene a 4°C.

**Ajuste de fórmula.**- Se determinan proteínas y cloruros. Las proteínas se llegan a tenerlas a una concentración del 13% y los cloruros al 0.6% con NaCl. Se agrega el cresol a tener una concentración de 0.3% y carbonato de sodio. Con estos dos reactivos se hace una emulsión y se agrega agitando al suero.

Se ajusta el pH a 6 con Buffer de acedados; se agregan 30 g de gli-

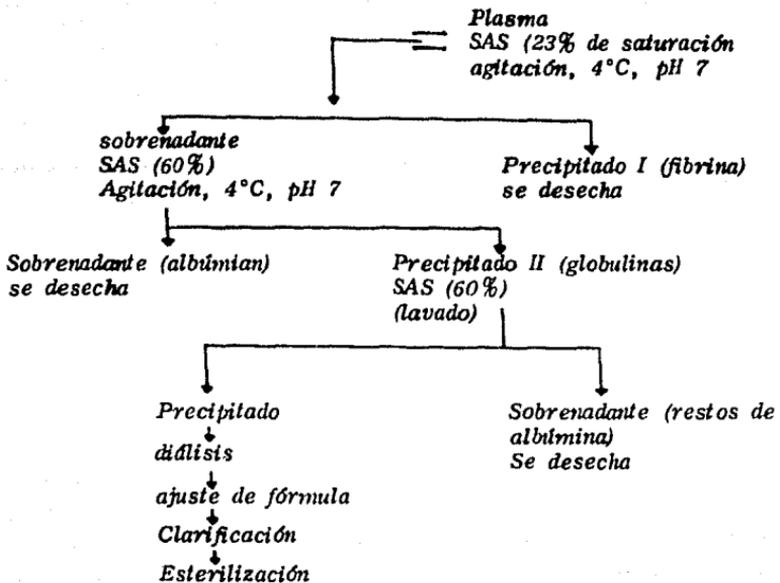
cina por c/100 g de proteínas y 15 de sacarosa, también por la misma cantidad se proteínas.

Clarificación.- Primero se pasa el suero por tela de molino, posteriormente se clarifica a través de membranas de acetato de celulosa, de distinto tamaño de poro.

Esterilización.- El producto se esteriliza usando membranas de celulosa e iniciando en la parte superior con 1.2 micras de porosidad, posteriormente 0.8, 0.45 y 0.2 micras al finalizar.

### Separación de Globulinas Plasmáticas

#### SULFATACION



2.- *Control del producto a nivel de producción.*

*Obtenido el producto concentrado y purificado es sometido a las siguientes pruebas químicas y biológicas:*

**QUIMICAS:**

*Electroforesis*

*Proteínas*

*Sulfatos*

*Cresol*

*pH*

**BIOLOGICAS:**

*Esterilidad*

*Pirógenos*

*Potencia*

*El producto será envasado de acuerdo a la potencia obtenida, es necesario neutralizar 150 DL 50 por frasco, adicionando un 15% de exceso.*

**IV. Liofilización del Suero.**

*De acuerdo a los resultados de las pruebas químicas y biológicas - antes mencionadas, se procede a envasar el producto. El llenado de frascos se realiza en el área estéril de liofilización. Envasado el producto se liofiliza, este proceso se lleva a cabo a temperaturas bajas, dentro del rango de - 40°C a más de 40°C dentro de cajas - herméticas en la que por medios mecánicos se han obtenido vacíos*

de orden de 0.01 a 1 milímetro de mercurio.

El fenómeno que se presenta en estas circunstancias es el cambio de estado directo de la forma sólida a la forma gaseosa, mismo que se denomina "Sublimación de una sustancia" que es uno de los fenómenos de la liofilización.

El calentamiento es un paso necesario durante el secado de sublimación ya que proporciona a las moléculas de agua, la energía requerida para que aumente su energía cinética y pueda abandonar su sitio original.

Una vez terminado el proceso de liofilización, el frasco se tapona y se engargola inmediatamente.

#### V. Control del Producto

El suero liofilizado y engargolado pasa a la sección de Procesos Finales, donde es etiquetado y es muestreado por control interno y externo.

Las pruebas que se realizan en el producto terminado son las siguientes:

##### Pruebas químicas:

Humedad, identidad

Solubilidad, electroforesis

pH, volumen promedio

Concentración de cresol

Concentración de cloruro de sodio

Concentración de glicina

**Concentración de proteínas**

**Concentración de nitrógeno**

**Sólidos totales**

**Pruebas biológicas:**

**Esterilidad**

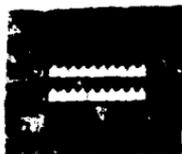
**Potencia**

**Seguridad: 1) ratones y 2) cobayos**

**Pirógenos**

**El producto para ser liberado debe pasar por control interno del -  
INH; aprobado totalmente, es muestreado por control externo locali-  
zado en el Laboratorio Nacional, donde se realizan nuevamente todas  
las pruebas antes mencionadas. Si el producto cubre los requisitos  
mínimos, el suero puede ser liberado.**

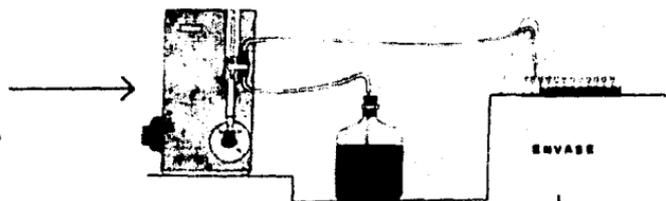
# PROCESO DE LIOFILIZACION DE SUEROS HETEROLOGOS



PREPARACION Y ESTERILIZACION



ETAPA B

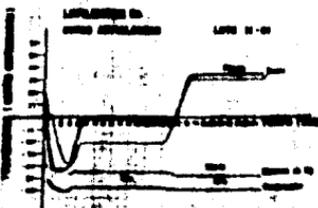


DISTRIBUCION

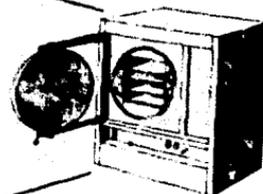


ACONDICIONAMIENTO DE PRODUCTO FINAL

GRAFICA DE PROCESO



TIPOGRAFADO Y ENPAQUETADO



PROCESO DE LIOFILIZACION

# PRODUCCION DEL SUERO ANTIOFIDICO

## GENERALIDADES

### I. OBTENCION DEL VENENO

#### 1.- *Serpentario*

a) *Organización*

b) *Extracción del veneno*

#### 2.- *Control del veneno*

a) *Preparación*

b) *Potencia DL 50*

### II. OBTENCION DEL SUERO

1.- *Esquemas de inmunización*

2.- *Determinación de potencia DE 50*

### III. CONCENTRACION Y PURIFICACION DEL SUERO

### IV. LIOFILIZACION DEL SUERO

### V. CONTROL DEL PRODUCTO

Existe la presentación de los siguientes sueros antiofídicos:

- a) Suero antiofídico (monovalente)
- b) Suero anticrotálico (monovalente)
- c) Suero antiviéperino (polivalente)

Diferentes animales se han utilizado en la producción de los antivenenos, tales como cabra, carnero, conejos y caballos, de ellos el equino es el más utilizado, ya que suministra altos niveles de anticuerpos, siendo de fácil manejo y mantenimiento y además de obtenerse gran rendimiento plasmático.

Se ha observado que el suero antiofídico se obtiene con cierta facilidad en períodos cortos con títulos altos, sin embargo en el suero anticrotálico es más difícil de obtener un buen grado de inmunidad y sobre todo ser reproducible de esquema a esquema de inmunización.

Los sueros polivalentes se obtienen mediante la inmunización de caballos con las mezclas de venenos de crotalo y de Bothrops. En pruebas de neutralización de reacción cruzada con los tres sueros y los venenos de víboras más peligrosas de México (18 especies) se ha encontrado lo siguiente:

La reacción cruzada obtenida de los sueros monovalentes de especie a especie es muy pobre, por lo tanto el uso de estos sueros se recomienda cuando existe una fauna específica local, ya sea crotálica ó bothrópica sin riesgo de confundir la especie de víbora que causó el accidente.

El uso del suero antiviéperino es más recomendable en las zonas-

donde existe una gran variedad de especies de víboras dificultando así su identificación. Se ha observado a nivel de laboratorio una potencialización en la respuesta obtenida en la reacción cruzada con otros venenos, fenómeno que no ocurre cuando el suero se encuentra en forma monovalente.

## I. OBTENCION DEL VENENO

### 1.- Serpentario

a) Organización.- Sólomente el personal previamente entrenado debe realizar este tipo de trabajo. No debe permitirse la presencia de extraños en el área de trabajo, pues constituye un factor de distracción, incrementando la posibilidad de ocurrir accidentes.

Las serpientes deben permanecer en cajas individuales, a una temperatura de 26 a 28°C, y una humedad relativa de 60%.

Los terrarios deben lavarse periódicamente con agua y jabón, utilizando además desinfectantes.

b) Extracción del veneno. Las serpientes se inmovilizan mediante ganchos, se inyectan por la cabeza y se hacen morder una copa de cristal recubierta con tela de molino.

El veneno obtenido es centrifugado inmediatamente para eliminar el precipitado amorfo y atóxico que se forma. El sobrenadante se decanta y se envasa en frascos donde se congela a 4°C y se liofiliza para su mejor conservación.

Cada frasco debe estar perfectamente rotulado indicando número de frasco, especie y fecha de extracción.

## 2.- Control del veneno

a) Preparación.- Las especies de víboras utilizadas en la elaboración de los sueros antiofídicos son: *Crotalus basiliscus*, y *Bothrops asper*. Al trabajar los venenos liofilizados debe exigirse el uso de cubrebocas y guantes, para evitar su inhalación, ya que con mucha frecuencia induce hipersensibilidad. A partir del veneno liofilizado se prepara una solución al 2% en S.S. al 0.85%, que posteriormente es mezclada volumen a volumen con glicerina, adicionando finalmente el merthiolate (1:3000). En esta forma se conserva en refrigeración en un recipiente perfectamente cerrado. Se ha observado que en el lapso de 2 meses su potencia se mantiene estable.

b) Potencia del veneno (DL 50).- Al igual que la ponzoña de alacrán, los venenos ofídicos se determinan en potencia en DL 50 correspondiendo a la mínima cantidad de veneno capaz de matar al 50% de la población sometida a la prueba, utilizando posteriormente el método de Reed y Muench para valorar la determinación realizada - como se explicó anteriormente. Generalmente las potencias obtenidas a una concentración del 1% son las siguientes:

*Crotalus basiliscus* b.      140 DL 50/ml

*Bothrops asper*                      1200 DL 50/ml

## II. OBTENCION DEL SUERO

Se requieren caballos en buen estado de salud cuya edad oscile de los 6 a los 10 años. Inmediatamente a su llegada se vacunan con

toxoides tétánico, se desparasitan y cuarentenan. Terminado este tiempo y si no existe ningún cambio patológico aparente, se dispone a iniciar el esquema de inmunización que consiste en lo siguiente:

1.- Esquema de inmunización.

El esquema a seguir consta de dos fases: Esquema de base y de refuerzo, el primero es utilizado en caballos de nuevo ingreso.

a) Esquema base.

Consta de 6 inóculos en un lapso de 22 días. Las dos primeras inyecciones que se aplican a los caballos están provistas de Adyuvante de Freund, mientras que en las restantes el antígeno se suministra en forma soluble.

Las sangrías de prueba se llevan a cabo a partir del 7° día después del último inóculo y de acuerdo a la potencia obtenida la cosecha se inicia el 8°, 9°, 10° y 11° día.

DIAS INOCULO

1	50	LD 50 en 20 ml de S.S. con Ady. completo de Freund
8	50	LD 50 en 20 ml de S.S. con Ady. incompleto de Freund
16	50	LD 50 en 20 ml de S.S.
18	50	LD 50 en 20 ml de S.S.
20	50	LD 50 en 20 ml de S.S.
22	50	LD 50 en 20 ml de S.S.
29		Sangría de prueba = S.P.
30		S.P. y cosecha
31		S.P. y cosecha
32		S.P. y cosecha
33		Cosecha

*El adyuvante de Freund completo se aplica en una sola ocasión debido al tipo de hipersensibilidad celular que provoca.*

*b) Esquema de refuerzo.*

*Una vez realizada la primera cosecha se procede a dejar descansar los caballos de 6 a 8 semanas, al cabo de las cuales se reinician las inyecciones con el esquema de refuerzo el cual es descrito a continuación.*

**DIAS    INOCULO**

1	100 LD 50 en 20 ml de S.S.
3	150 LD 50 en 20 ml de S.S.
5	200 LD 50 en 20 ml de S.S.
8	250 LD 50 en 20 ml de S.S.
10	300 LD 50 en 20 ml de S.S.
17	Sangría de prueba - S.P.
18	S.P. y cosecha
19	S.P. y cosecha
20	S.P. y cosecha
21	Cosecha

*El antígeno es aplicado en 4 sitios por vía subcutánea.*

**2.- Determinación de la potencia del suero DE 50.**

*La potencia del suero es medida por su capacidad protectora - contra el efecto letal del veneno y se determina cuantitativamente mezclando concentraciones variables de suero con cantidades constantes de veneno, inyectando posteriormente dicha mezcla a ratones de 18-20 g. de peso por vía endovenosa.*

*Esta determinación se lleva a cabo en las siguientes etapas de proceso:*

- a) *Sangría de prueba*
- b) *Producto en la etapa inicial et<sup>1</sup>*
- c) *Producto en la etapa concentración et<sup>8</sup>*
- d) *Suero liofilizado*

*Latitudinal se determina igual que el suero de antialacrón.*

### III. CONCENTRACION Y PURIFICACION DEL SUERO

*La concentración y purificación de los plasmas se realiza por la técnica de sulfatación, este proceso tiene una duración a proximadamente de 21 días (descrito en la producción de suero antialacrón).*

*Control del producto a nivel de producción. Terminado el proceso de purificación, el suero es sometido a las siguientes pruebas químicas y biológicas:*

#### QUIMICAS:

*Electroforesis*

*Proteínas*

*Sulfato*

*Cresol*

*Cloruros*

*pH*

#### BIOLOGICAS:

*Esterilidad*

*Pirógenos*

*Potencia*

**El producto es envasado de acuerdo a la potencia obtenida, siendo necesario neutralizar:**

**Suero anticrotálico: 780 DL 50 de veneno**

**Suero antibotrópico: 790 DL 50 de veneno**

**Suero antiviperino: a) 780 DL 50 de veneno crotálico  
b) 790 DL 50 de veneno botrópico**

**Adicionando un exceso de 15%**

#### **IV. LIOFILIZACION DEL SUERO**

*Si el producto llena los requisitos químicos y biológicos antes mencionados se procede a envasar.*

*El llenado de frascos se realiza en el área estéril de liofilización.*

*El proceso de liofilización se encuentra explicado en el método de producción del suero antialacrón.*

#### **V. CONTROL DE PRODUCTO**

*El suero liofilizado y engargolado pasa a la sección de Procesos - Finales donde es etiquetado y es muestreado por control interno y externo. Si el producto llena todos los requisitos mínimos (pruebas químicas y biológicas) el suero es liberado.*



## PRODUCCION DE LA ANTITOXINA DIFTERICA

### **I. OBTENCION DEL ANTIGENO**

- a) *Cultivo estacionario con medio Muller*
- b) *Cultivo estacionario con medio Martin*
- c) *Control del veneno*

### **II. OBTENCION DEL SUERO**

- a) *Esquema base*
- b) *Esquema refuerzo*

### **III. CONCENTRACION Y PURIFICACION DEL SUERO**

### **IV. LIOFILIZACION DEL SUERO**

### **V. CONTROL DEL PRODUCTO**

## I. OBTENCION DEL ANTIGENO

Las toxinas y toxoides diftéricos utilizados en la inmunización de los caballos son obtenidos por dos métodos:

- a) Cultivo estacionario con medio de Muller y Miller, elaborado por el Laboratorio de Difteria.
- b) Cultivo estacionario con medio de Martin el cual se lleva a cabo por sueros.

### A) Cultivo estacionario medio de Muller y Miller

Elaboración del medio Michigan

- a) Pase de la semilla liofilizada a tubos
- b) Resiembra cada 48 hs.

Preparación del medio Muller y Miller

- a) Envase
- b) Esterilización

Preparación de la maltosa

- a) Tindalización
- b) Adición al medio Muller

Siembra de Corynebacterium diphtheriae al medio Muller en garra-  
fones de 20 lts.

- a) Incubación

Obtención de la toxina

- a) Decantación
- b) Clarificación y ajuste de pH

### **Obtención del toxoide**

- a) Adición de fenol
- b) Ajuste de pH durante 5 días
- c) Clarificación
- d) Filtración estéril

Mantener en refrigeración una semana para checar esterilidad en éste lapso, posteriormente llevar a la estufa durante 30 días para la destoxificación.

### **B) Cultivo estacionario - Medio Martin.**

Mezcla de autolizados de estómago de cerdo con la infusión de ternera (medio Martin).

La siembra del microorganismo se lleva al igual que con el medio Muller, así como la obtención de la toxina y toxoide.

Este medio es excelente en la obtención de los antígenos para inmunización de los caballos y no debe utilizarse para uso humano.

### **MEDIO MARTIN**

#### **I. Estómagos frescos desangrados y picados.**

11 Kgs. de carne, 31.5 lts. de agua, 515 HCl concentrado, calentar a 60°C/24 hs./10 minutos.

Llevar a 50°C/24 hs. con agitación constante.

Inactivar a 95°C/10 minutos.

Sifonear y mantener 4°C/24 hs.

Sifonear y filtrar (papel húmedo) 4°C/12 hs.

Alcalinizar a pH 7.4 y llevar a 95°C/1 hora

Filtrar con algodón y mantener a 4°C/12 hs.

Añadir 10 g. de levadura/1 litro de medio y calentar a 35°C

40°C/3 hs.

Llevar a 70°C y ajustar a pH 8

## II. Ternera

600 g. de ternera limpia y picada en un litro de agua

Reposar 4°C durante 12 hs.

Hervir durante 10-15 minutos

Filtrar, esterilizar a 115°C/45 minutos

## III. Ajustar a pH 8; hervir a 70°C el agua de carne (ternera)

1 parte de ternera mezclarla en 2 partes de agua peptonada

Después a 80°C y ajustar a pH 8

Llevar a 95°C/10 minutos y filtrar

Añadir 7 g. de acetato de Na/1 litro de medio

Esterilizar a 115°C/30 minutos

## C) Control del antígeno

Se determina esterilidad, atoxicidad, potencia y pruebas químicas.

La potencia se determina "in vitro" por la técnica de Lf y "in vivo"

por la determinación en Lf/10 realizada en cuyes ó conejos.

Titulación en Lf. - La determinación de la unidad de floculación

(Lf/ml) se define como la cantidad de toxina que flocula más rápida-

mente con una unidad de antitoxina.

La titulación de las Lf permite conocer la antigenicidad tanto de toxoides como toxinas, sin tener que usar animales, es una prueba rápida pero costosa y reproducible. Es aplicable a sistemas homólogos de toxina y antitoxina.

## II. OBTENCION DEL SUERO

Para obtener una buena producción de antitoxina diftérica, es importante tomar en cuenta lo siguiente:

- a) Los caballos deberán tener una edad de 6 a 9 años.
- b) Serán seleccionados exclusivamente aquellos que al primer estímulo con toxoide diftérico, su respuesta sea no menor a 20 UI.
- c) El antígeno debe obtenerse de preferencia a partir del medio Martin.
- d) El gel de aluminio es utilizado como adyuvante en la inmunización.
- e) Es importante inyectar en forma fraccionada los inóculos, en el lomo del caballo y por vía subcutánea.

### A) Esquema base.

Tiene una duración de 52 días, terminando el esquema se procede a realizar la sangría de cosecha por plasmaféresis durante 3-4 días.

DIAS	ANTIGENO
1	5 ml de toxoide diftérico + 5 ml de gel de aluminio
35	10 ml de toxoide diftérico + gel de aluminio (g.a.)
38	20 ml de toxoide diftérico + g.a.
40	40 ml de toxoide diftérico + g.a.
42	80 ml de toxoide diftérico + g.a.
44	50 ml de toxina diftérica + g.a.

**DIAS ANTIGENO**

- 52 60 ml de toxina diftérica + g.a.
- 59 Sangría de prueba (S.P.)
- 60 S.P. y cosecha
- 61 S.P. y cosecha
- 62 S.P. y cosecha
- 63 S.P. y cosecha

*Terminado el esquema base, los caballos se dejan descansar de 6 a 8 semanas y posteriormente se reinicia la inmunización conforme al esquema que a continuación se indica:*

**DIA ANTIGENO**

- 1 20 ml de toxoide + g.a.
- 3 40 ml de toxoide + g.a.
- 5 80 ml de toxoide + g.a.
- 8 50 ml de toxoide + g.a.
- 18 60 ml de toxina + g.a.
- 25 Sangría de prueba
- 26 Sangría de prueba y cosecha
- 27 Sangría de prueba y cosecha
- 28 Sangría de prueba y cosecha
- 29 Sangría de prueba y cosecha

*Determinación de la potencia del suero. Unidades Internacionales/ml.*

*La prueba determina el número de unidades protectoras por mm. Una unidad de antitoxina es aquella dilución que en presencia de un Lf/ml*

de toxina, nos da 10 mm de área de reacción al ser inoculado al cobayo ó conejo. La titulación debe llevarse en forma conjunta con un suero standard referencia.

### III.- CONCENTRACION Y PURIFICACION DEL SUERO

#### 1) Técnica de proceso.

Se lleva a cabo por medio de la sulfatación

#### 2) Control del producto a nivel de producción

El producto concentrado es muestreado por control biológico para determinar la prueba de esterilidad y pirógenos, mientras que en control químico se realizan las pruebas de rutina que son:

Proteínas

Electroforesis

pH

Cresol

Sulfatos y

Cloruros

La potencia se realiza en el laboratorio de sueros determinando las unidades internacionales por mililitro y de acuerdo a la potencia obtenida se envasa el producto en 10,000 UI por dosis, con un exceso del 15%.

### IV. LIOFILIZACION DEL SUERO

Habiendo cumplido todos los requisitos antes mencionados el producto se liofiliza.

## V. CONTROL DEL PRODUCTO

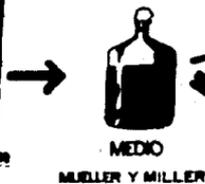
### *Control interno*

*El producto liofilizado es posteriormente etiquetado, es muestreado por control interno (INH), donde es sometido a las pruebas químicas y biológicas ya mencionadas, cumplidas estas especificaciones, es muestreado a su vez por control externo (INH), donde se determinan estas pruebas. El producto es liberado cuando el resultado de las pruebas son satisfactorias.*

# PRODUCCION DE ANTITOXINA DIFTERICA



*Corynebacterium diphtheriae*



TOXINA

TITULACION L<sub>1</sub>/10



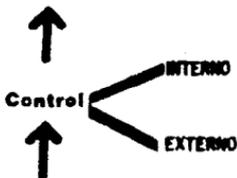
TITULACION L<sub>1</sub>



INMUNIZACION

TOXOIDE

## DISTRIBUCION



TITULACION U.L.



SANGRIA DE PRUEBA

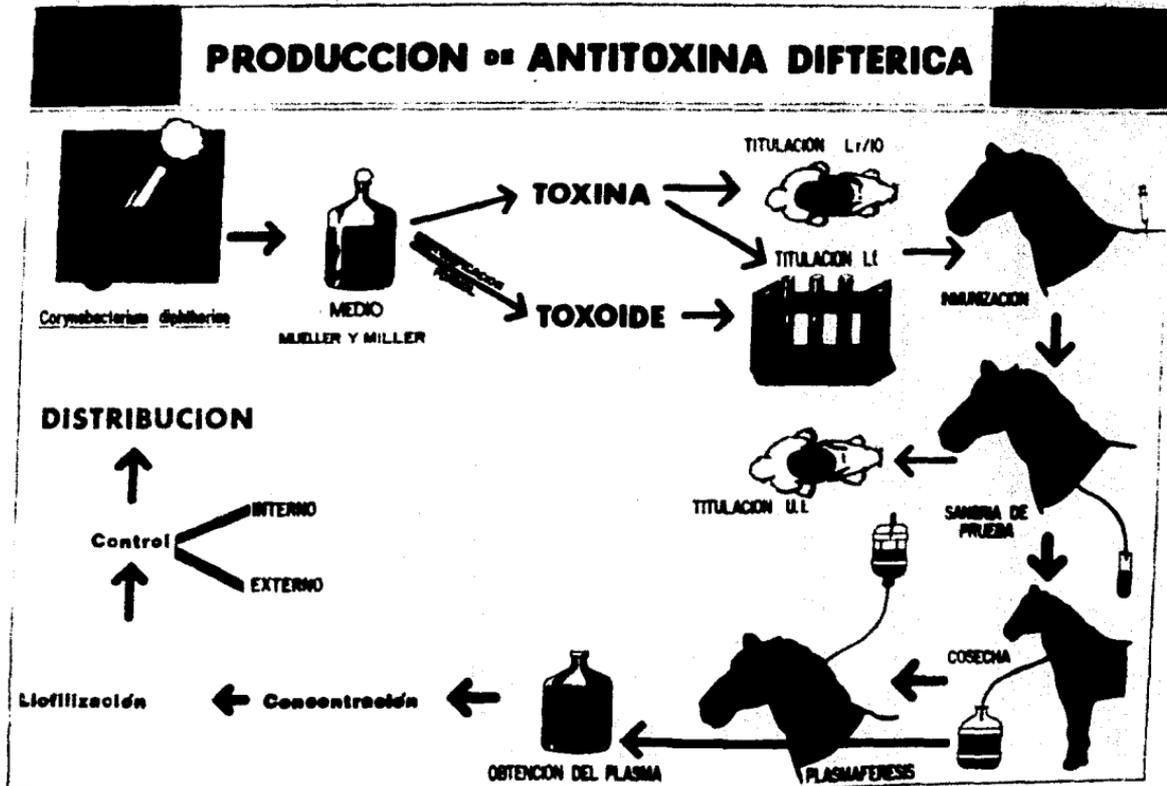
COSECHA

Liofilización

Concentración

OBTENCION DEL PLASMA

PLASMAFERESIS



## PRODUCCION DE LA ANTITOXINA TETANICA

### **I. OBTENCION DEL ANTIGENO**

a) *Control del antígeno*

### **II. OBTENCION DEL SUERO**

1) *Esquema de inmunización*

a) *Esquema refuerzo*

2) *Determinación de la potencia del suero. Unidades internacionales por mililitro.*

### **III. CONCENTRACION Y PURIFICACION DEL SUERO**

### **IV. LIOFILIZACION DEL SUERO**

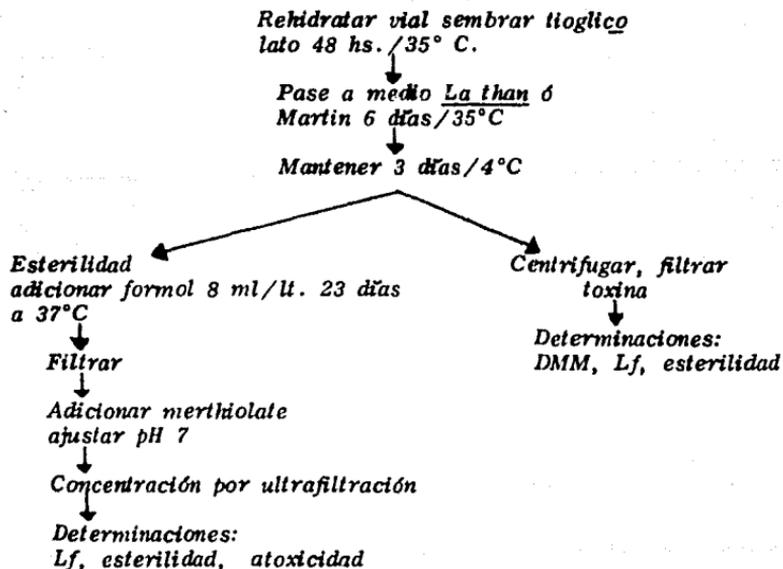
### **V. CONTROL DEL PRODUCTO**

La obtención de la antitoxina tetánica al igual que los productos antes mencionados, es a partir de caballos hiperinmunizados contra la toxina de *Clostridium tetani*.

## 1. OBTENCION DEL ANTIGENO

La toxina y el toxoide tetánico se obtiene en el laboratorio de Anaerobios, donde utilizan el medio de Lathan (medio modificado de Muller y Miller) y el de Martin que es un autolizado de estómagos frescos de cerdo, adicionando la infusión de ternera.

### PRODUCCION DE TOXINA Y TOXOIDE TETANICO, UTILIZANDO EL MEDIO LATHAN ó MARTIN



Se ha observado claramente que los antígenos obtenidos a partir del medio Martin son más antigénicos induciendo a su vez una respuesta inmunológica mayor y más rápida en los caballos a los cuales se les aplica.

a) Control del antígeno

El control que se lleva a cabo en los antígenos tetánicos con la DMM, Lf/10 y la titulación "in vitro" de Lf, basándose generalmente en ésta última para la inmunización de los caballos.

La técnica de titulación de Lf es la siguiente:

Diluir la antitoxina tetánica patrón Lf, a tener 50 Lf/ml usando como diluyente amortiguador de fosfatos pH 7 a 7.4. En tubos de ensayo colocar las siguientes cantidades (ml) de antitoxina, amortiguador de fosfatos y toxina:

TUBOS	1	2	3	4	5	6
Antitoxina	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80
A. Fosfatos	1.2	1.10	1.0	0.90	0.80	0.70
Toxina	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Agitar e incubar en baño maría a 50°C

Leer continuamente a través de una lámpara para observar mejor la floculación.

Anotar el tubo donde se observe primero el flóculo y el tiempo que tardó en aparecer (Lf).

### Cálculo

$$Lf = \frac{Lf \text{ suero} \times \text{volumen del suero}}{\text{volumen de la toxina}}$$

## II. OBTENCION DEL SUERO

Los caballos deben de tener de 6 a 9 años de edad, cuando son de nuevo ingreso son inoculados con 10 ml de toxoide tetánico y desparasitados y permanecen en observación durante 40 días.

El adyuvante utilizado es el gel de aluminio. Los antígenos deben ser obtenidos de preferencia a partir del medio Martin.

### 1) Esquema de inmunización

Los caballos son seleccionados de acuerdo a su respuesta inmune al primer estímulo aplicado. Noventa días después de la inoculación se inicia el esquema de inmunización:

#### DIAS ANTIGENO

1	10 ml de toxoide tetánico + gel de aluminio
90	10 ml de toxoide tetánico
92	20 ml de toxoide tetánico
94	40 ml de toxoide tetánico
96	60 ml de toxoide tetánico
98	80 ml de toxoide tetánico
102	50 ml de toxina
110	80 ml de toxina
115	Sangría de prueba
117	Sangría de prueba y cosecha

**DIAS ANTIGENO**

- 118 Sangría de prueba y cosecha
- 119 Sangría de prueba y cosecha
- 120 Sangría de prueba y cosecha

Los animales se dejan descansar de 6 a 8 semanas y posteriormente se inicia la reinmunización.

**a) Esquema refuerzo.**

Consta de 6 inóculos, dos de los cuales son con toxina. El esquema tiene una duración de 19 días.

**DIAS ANTIGENO**

- 1 20 ml de toxoide + gel de Hidróxido de aluminio
- 3 40 ml de toxoide + gel de Hidróxido de aluminio
- 5 60 ml de toxoide + gel de Hidróxido de aluminio
- 7 80 ml de toxoide + gel de Hidróxido de aluminio
- 11 60 ml de toxina + gel de Hidróxido de aluminio
- 19 80 ml de toxina + gel de Hidróxido de aluminio
- 25 Sangría de prueba
- 26 Sangría de prueba y cosecha
- 27 Sangría de prueba y cosecha
- 28 Sangría de prueba y cosecha
- 29 Sangría de prueba y cosecha

Se dejan descansar de 6 a 8 semanas y posteriormente se inicia la inmunización. Se realiza una programación anual, obteniéndose 5 cosechas y un período de descanso de dos meses aproximadamente.

### III. CONCENTRACION Y PURIFICACION DEL SUERO.

#### 1.- Técnica de proceso

Se lleva a cabo por el método de sulfatación.

#### 2.- Control del producto a nivel producción.

Una vez concentrado y purificado el producto es muestreado por Control interno donde se determinan las siguientes pruebas:

Control biológico:

Esterilidad

Pirógenos

Control Químico:

pH

Proteínas

Electroforesis

Cl

SO<sub>4</sub>

Cresol

La prueba de potencia se realiza en el laboratorio de sueros, - determinándose a su vez la dosis de envase, la cual deberá - contener 2,000 UI y 10,000 UI con un exceso del 15%.

### IV. LIOFILIZACION DEL SUERO

Aprobados todos los requisitos químicos y biológicos el producto se liofiliza.

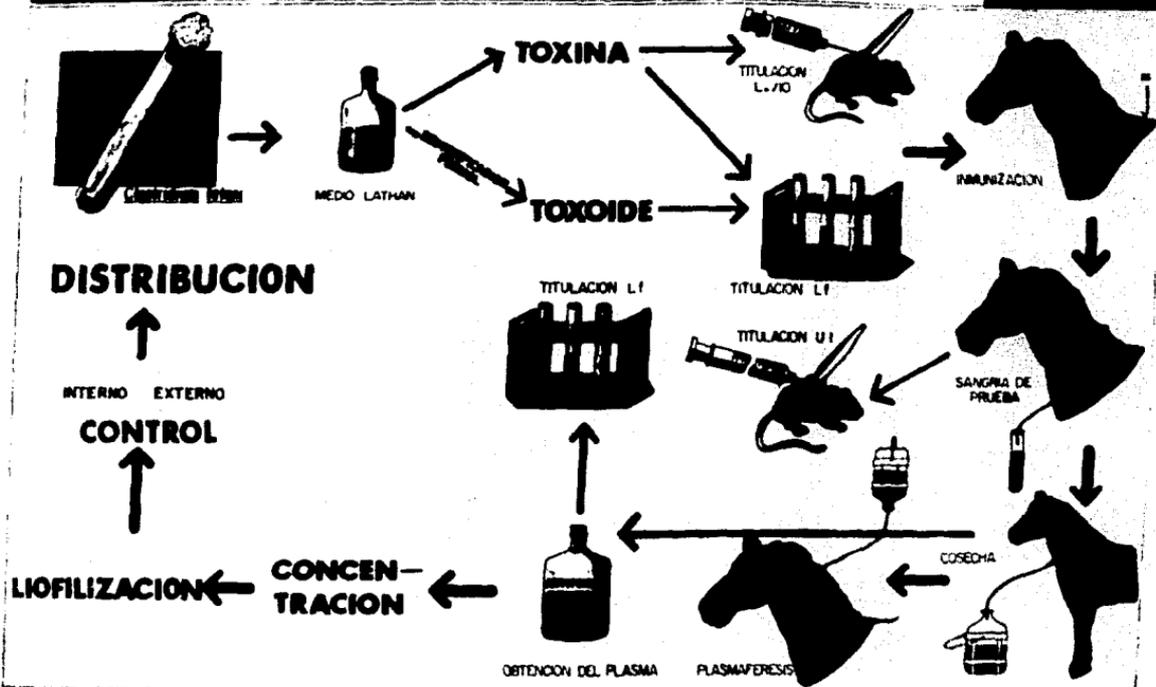
## V. CONTROL DEL PRODUCTO

*El producto liofilizado es entregado a la Sección de Marbetado donde es etiquetado.*

*Es muestreado primeramente por Control Interno donde se vuelven a realizar las pruebas químicas y biológicas, adicionando además, seguridad en cobayos y ratones. Si los resultados son satisfactorios el producto es muestreado por Control Externo, donde se determinan nuevamente las pruebas química y biológicas antes referidas.*

*Cumplidos estos requisitos y si el resultado es satisfactorio el producto puede ser liberado.*

# PRODUCCION DE ANTITOXINA TETANICA



## PRODUCCION DEL SUERO ANTIRRABICO

### I. OBTENCION Y TITULACION DEL ANTIGENO

- a) *Preparación*
- b) *Titulación del C. V. S.*

### II. OBTENCION DEL SUERO ANTIRRABICO

- 1.- *Esquema de inmunización*
  - a) *Esquema base*
  - b) *Esquema refuerzo*
  - c) *Plasmaféresis*
- 2.- *Titulación de los sueros*
  - a) *Suero de referencia*
  - b) *Titulación del virus reto 300 LD50*

### III. CONCENTRACION Y PURIFICACION DEL SUERO

- 1.- *Técnica de proceso*
- 2.- *Control de producto a nivel de producción*

### IV. LIOFILIZACION

### V. CONTROL DEL PRODUCTO

- 1.- *Control interno*
- 2.- *Control externo*

## I. OBTENCION Y TITULACION DEL ANTIGENO

### a) Preparación

El virus rábico utilizado en la producción de suero antirrábico es el CVS (Challenge- Virus- Strain), el cual es conservado en ampollitas a temperatura de 20°C.

Para la propagación del CVS, son inoculados por vía intracerebral 0.03 ml del virus a ratones de 10 a 14 g.

Una vez presentados los síntomas de rabia (aproximadamente cinco días), en forma aséptica se extraen los cerebros, que son triturados en la licuadora, llegando a una concentración final de 20%, el diluyente utilizado es el siguiente:

PBS pH 7.6

Sol. A  $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  11.876 g/lit.

Sol. B  $\text{KH}_2 \text{PO}_4$  9.08 g/lit.

a 9 ml de la sol. A adicionar 1 ml de la sol. B

Antibiótico:

1 Fco. de Estreptomina

1 Fco. de penicilina más 50 ml de PBS

Diluyente:

220 ml de agua destilada

25 ml de antibiótico

5 ml de suero normal inactivado a 56°C durante 30 min.

Esta suspensión es utilizada como antígeno inmunizante, el antígeno reto es proporcionado por el Instituto Nacional de Virología, ambos antígenos son conservados a 20°C.

b) Titulación del CVS

Se empieza por descongelar rápidamente la ampolleta de virus - bajo el chorro de agua, a partir de ésta emulsión 1/5 se preparan diluciones de 10 en 10.

En los tubos (previamente rotulados) se colocan 0.5 ml de cada - dilución adicionando 0.5 ml de suero de caballo inactivado y diluído 1:5.

Después de agitadas las mezclas, se incuban durante una hora y media a 37°C. Luego se colocan tubos en un recipiente con agua de hielo, y su contenido se inocula por vía intracerebral en dosis de 0.03 ml utilizando 10 ratones por cada dilución. Puede utilizarse la misma jeringa si se tiene la precaución de empezar por la dilución mayor.

A partir del sexto día al 21 día después de la inoculación, se anota el número de muertos y sobrevivientes, las muertes que ocurran antes del sexto día se consideran por traumatismos.

EJEMPLO:

Titulación del CVS							
TUBO	1	2	3	4	5	6	7
CVS	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
DILUYENTE	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
	2X10	2X10	2X10	2X10	2X10	2X10	
DIL. CVS		1 ml					
S. CABALLO		1	1	1	1	1	
		-3	-4	-5	-6	-7	
1: 5		10	10	10	10	10	

## LECTURAS

DILUCIONES	No. RATONES	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
<sup>-3</sup> 10	10	9	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<sup>-4</sup> 10	10	10	8	5	5	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<sup>-5</sup> 10	10	10	9	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<sup>-6</sup> 10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8
<sup>-7</sup> 10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

El cálculo del título del virus se hace de acuerdo al método de Reed y Muench:

	V	M	AV	AM	T	%M
<sup>-3</sup> 10	0	10	0	24	24	100
<sup>-4</sup> 10	2	8	2	14	16	87.5
<sup>-5</sup> 10	6	4	8	6	14	42.8
<sup>-6</sup> 10	8	2	16	2	18	11.1
<sup>-7</sup> 10	10	0	26	0	26	0

$$LD 50 = \text{Log. } 10^{-5} - \frac{50-42.8}{87.5-42.8} = \text{Log. } 10$$

$$LD 50 = -5 (0.1610) \times 1 = -4.839$$

$$LD 50 = 10^{-4} .839$$

Obteniéndose que 1/ml de C.V.S. contiene 10<sup>-4</sup>.839 LD 50 (dilución a la cual sobreviven el 50% de los ratones).

## II. OBTENCION DEL SUERO ANTIRRABICO

### 1.- Esquema de inmunización

Los caballos destinados a la inmunización deberán tener una edad que fluctúe entre 6 y 9 años de edad.

Deben ser vacunados con toxoide tetánico y permanecer en observación durante 40 días aproximadamente.

El esquema de inmunización para la producción del suero anti-rábico consiste en utilizar básicamente el CVS al 5% inactivado por calor, en baño maría durante hora y media a 56°C, mezclada con toxoide tetánico adsorbido en gel de aluminio.

#### a) Esquema base:

DIAS	INOCULO
1, 3, 5	10 ml de CVS más 50 Lf de adsorbido
8, 10 y 12	20 ml de CVS más 100 Lf de adsorbido
15, 17 y 19	40 ml de CVS más 200 Lf de adsorbido
26	10 ml de CVS
34	15 ml de CVS
42, 43, 44 y 45	SANGRIAS DE COSECHA

Los plasmas obtenidos son titulados en forma individual de acuerdo al método de Pasui Atanastu.

#### b) Esquema refuerzo:

DIAS	INOCULO
1	10 ml de CVS 50 Lf de adsorbido
4	20 ml de CVS 100 Lf de adsorbido

DIAS	INOCULO
6	10 ml de CVS inactivado mas Tt y g.a.
8	10 ml de CVS
11	20 ml de CVS
18, 19	
20, y 21	SANGRIAS DE COSECHA

Tt. y g.a. = Toxide tetánico adsorbido en gel de aluminio

c) Plasmaféresis.- Por 4 días de sangrado.

## 2.- Titulación de los sueros

El método descrito a continuación consiste en neutralizar por - cantidades variables de suero (obtenidas por diluciones), con cantidades constantes de un virus rábico de prueba previamente titulado.

Una prueba completa es aquella en la cual están incluidas las siguientes titulaciones:

- Suero de referencia
- Titulación del virus reto 300 LD 50

### a) Seroneutralización

Con anterioridad es titulado el virus reto, el título obtenido - permite calcular la dilución a la cual debe emplearse el virus para la titulación de los sueros antirrábicos.

$$1 \text{ LD } 50 = 10^{-4.839} = \frac{1}{69020}$$

Para titular los sueros antirrábicos se utilizan 300 LD 50. Por lo tanto la dilución necesario será la siguiente:

$$\frac{300}{69020} = \frac{1}{230} = 1:230$$

Los sueros a ensayar son inactivados en baño María durante 30 minutos a 56°C.

Para la neutralización se practican diluciones crecientes del suero:

1: 500    1: 1000    1: 2000    1: 4000

En una serie de tubos se colocan 0.5 ml de las diluciones del suero. Cada tubo recibe además 0.5 ml. de virus en la dilución correspondiente a 300 LD50. Esta operación tiene por objeto diluir la mitad del virus y el suero, lo que da una dilución final de 150 LD50, neutralizados por diluciones finales de suero de: 1: 1000    1: 2000    1: 4000    1: 8000

Titulación del suero de referencia y el suero problema

TUBO	1	2	3	4	5	6	7
SUERO	0.5 ml	1 ml	0.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
DILUYENTE	4.5	4.0	4.5	2.5	2.5	2.5	2.5
DILUCION	1:10	1:50	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
DILUCION SUERO			1 ml				
CVS 300 LD <sub>50</sub>			1 ml				
			1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000

b) *Titulación del virus de referencia.*

A partir de los 300 LD<sub>50</sub> se aumentan las diluciones a 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup>, se colocan 0.5 ml de cada dilución del virus en tubos conteniendo 0.5 ml de suero normal de caballo inactivado deluído previamente 1:5. Esta última dilución de virus representa lo siguiente:

$$1:230 = 300 \text{ LD}_{50}$$

10 <sup>-1</sup>	1:4600	ó sea	10 <sup>-3.66</sup>	3.66
10 <sup>-2</sup>	1:46000	ó sea	10 <sup>-4.66</sup>	4.66
10 <sup>-3</sup>	1:460 000	ó sea	10 <sup>-5.66</sup>	5.66
10 <sup>-4</sup>	1:4 600 000	ó sea	10 <sup>-6.66</sup>	6.66

Tanto los sueros como el virus, después de agitar los tubos se colocan en Baño María durante hora y media a 37°C.

Posteriormente los tubos son colocados en un baño de hielo y se inoculan las diluciones a ratones de 10 a 14 g. a razón de 0.03 ml por vía intracerebral, siendo inyectada cada dilución a un grupo de 10 ratones. Cuando existen varios lotes por probar es conveniente inyectar el virus y el suero de referencia después de haber inoculado la mitad de los sueros problema.

Los grupos de ratones se colocan en cajas perfectamente rotulados y son observados los ratones que mueren entre el 6o. y 20o. día.

c) *Cálculo e interpretación de resultados*

Número de LD<sub>50</sub> empleado en la prueba

DILUCION	MUERTOS	VIVOS	A. MUERTOS	A. VIVOS	% MORTALIDAD
10 <sup>-3.66</sup>	10	0	20	0	100
10 <sup>-4.66</sup>	10	0	10	0	100
10 <sup>-5.66</sup>	0	10	0	10	0
10 <sup>-6.66</sup>	0	10	0	20	0

$$LD_{50} = \log. 10^{-5.66} - \frac{50 - 0}{100 - 0} \log. 10$$

$$LD_{50} = 5.66 - 0.5 = 5.16 \quad \therefore \quad 5.16 - 2.66 = 2.5$$

2.5 es el logaritmo de 316, ó sea que se han utilizado

316 LD<sub>50</sub>/ml

SUERO PROBLEMA

DILUCION	VIVOS	MUERTOS	A. MUERTOS	A. VIVOS	% MORTALIDAD
1: 1000	10	0	24	0	0
1: 2000	8	2	14	2	14
1: 4000	4	6	6	8	57
1: 8000	2	8	2	16	88

$$ED_{50} = \log. 2000 \text{ más } \frac{50 - 14}{57 - 14} \log. 2$$

$$ED_{50} = 3.3010 \text{ más } (.837) (.3010) = 3.3010 + 0.2519$$

$$3.5529 \text{ antilog.} = 7426$$

$$ED_{50} = \underline{7426}$$

**SUERO PATRON**

<b>DILUCION</b>	<b>VIVOS</b>	<b>MUERTOS A.</b>	<b>MUERTOS A. VIVOS</b>	<b>%MORTALIDAD</b>	
1: 1000	9	1	16	1	5.9
1: 2000	5	5	7	6	46
1: 4000	2	8	2	14	87.5
1: 8000	10	10	0	24	100

$$ED_{50} = \log. 2000 \text{ más } \frac{50 - 46}{87.5 - 46} \log. 2$$

$$ED_{50} = 3.3010 \text{ más } (.096) (.3010) = 3.3010 \quad 0.0289$$

$$3.3299 \text{ antilog.} = 2136$$

Una dilución de 2136 del suero de referencia corresponden a 80 UI/ml. Para calcular las UI del suero problema se realiza la siguiente relación:

$$80 \text{ UI} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1: 2136$$

$$X \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1: 7426$$

$$X = \underline{278.12} \text{ UI/ml}$$

Un mililitro de suero problema contiene 278.12 UI/ml

**III. CONCENTRACION Y PURIFICACION DEL SUERO**

**1.- Técnica de proceso**

El proceso que se lleva a cabo en la concentración y purificación de los sueros es la sulfatación, técnica descrita en la producción de suero antialacrán.

**2.- Control del producto a nivel producción.**

Para poder ser liofilizado el suero deben ser satisfactorias las siguientes pruebas químicas biológicas.

**Pruebas Químicas**

**pH**

**Electroforesis**

**Cl**

**SO<sub>4</sub>**

**Cresol**

**Proteínas**

**Pruebas Biológicas**

**Esterilidad**

**Pirógenos**

**Potencia**

**IV. LIOFILIZACION**

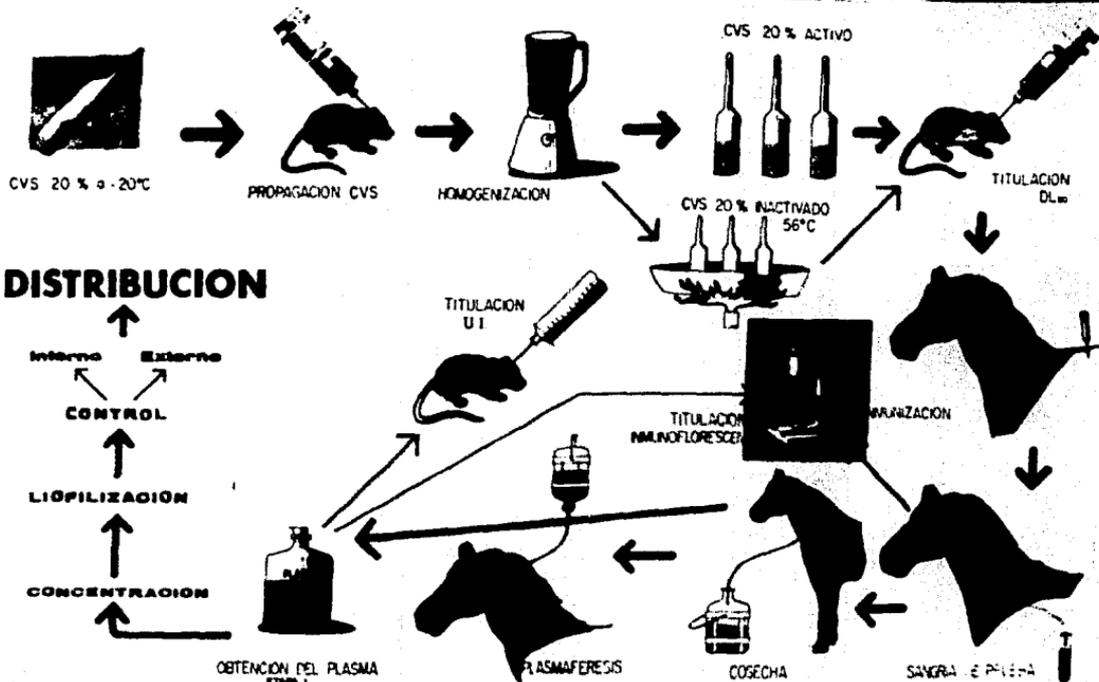
**Control interno**

*Se efectúa en el INH las pruebas químicas biológicas que están ya descritas.*

**Control externo**

*Liberado el producto por control interno, el Laboratorio Nacional realiza nuevamente todas las pruebas químicas-biológicas, si estas salen satisfactorias el lote puede ser liberado.*

# PRODUCCION DE SUERO ANTIRRABICO



**PLASMAFERESIS.**- Para el sangrado de los animales, se inmovilizan en un cepo similar a la que se muestra en la figura No.2. Si los animales han sido manejados con buen trato, la operación es sencilla y hasta puede dejarse prácticamente sueltos, caballos nerviosos ó agresivos son peligrosos y es preferible eliminarlos del programa.

Durante el proceso de inmunización es conveniente ensayar la operación en el cepo, a fin de acostumbrarlos.

El sangrado se practica por la vña yugular, la cual se distiende mediante un torniquete (ahogadero) que se coloca en la base del cuello del animal.

Una aguja de 4 mm de diámetro y un bisel de 10 mm es adecuada.

Las cámulas no son recomendables, ya que producen severas cicatrices en la vena y llegan con el tiempo a inutilizar la vña.

**METODO DE SANGRADO.**- El primer día se recogen 6 litros de sangre en una botella de 9 litros. Se emplea como anticoagulante 250 ml de ACD por cada 4 litros de sangre. La fórmula del ACD es la siguiente:

Citrato de sodio	50 g.
Acido cítrico	18 g.
Dextrosa	100 g.
Agua destilada c. s. p.	1000 ml.

La sangre se deja sedimentar en refrigeración toda la noche y al día siguiente se succiona asépticamente el plasma sobrenadante. Las células rojas se filtran asépticamente a través de un filtro de tela nylon, se diluyen ligeramente con 500 ml de S.S.F. estéril y se colocan en botellas de transfusión de 9 litros, equipada con un filtro de tela nylon y una entrada de aire, tal y como se muestra en la figura No. 2.

El segundo día de sangrado se extrae una cantidad de 5 litros y se transfunde el paquete celular del día anterior.

La operación de extracción de sangre y transfusión del paquete celular - puede efectuarse sin necesidad de mover la aguja de la vena, basta con acoplar y desacoplar mangueras a la altura de la unión como aparece en la figura.

El tercer día de sangrado se repite exactamente la operación anterior.

El cuarto día se extraen únicamente 4 litros de sangre, cuyos eritrocitos serán descartados y se transfunde el paquete celular del día anterior.

En total, se practica sangría durante 4 días consecutivos con un total de 20 litros de sangre, que proporcionan alrededor de 10 litros de plasma - por caballo. Este procedimiento es perfectamente soportado aún por caballos pequeños (300 Kg.).

Los plasmas obtenidos se adicionan de cresol al 2% y se almacenan en - cuarto frío en botellas de vidrio estériles hasta su utilización. Los caballos se dejan descansar entre seis y ocho semanas, al final de las cuales se reinicia la inmunización.

El Instituto cuenta actualmente con 84 caballos, distribuidos de la siguiente manera:

- 3 caballos destinados para sangría normal
- 5 caballos destinados para la producción de Suero Antidiftérico
- 15 caballos destinados para la producción de Suero Antirrábico
- 15 caballos destinados para la producción de Suero Anticrotálico
- 21 caballos destinados para la producción de Suero Antialacrán
- 25 caballos destinados para la producción de Suero Antitelámico

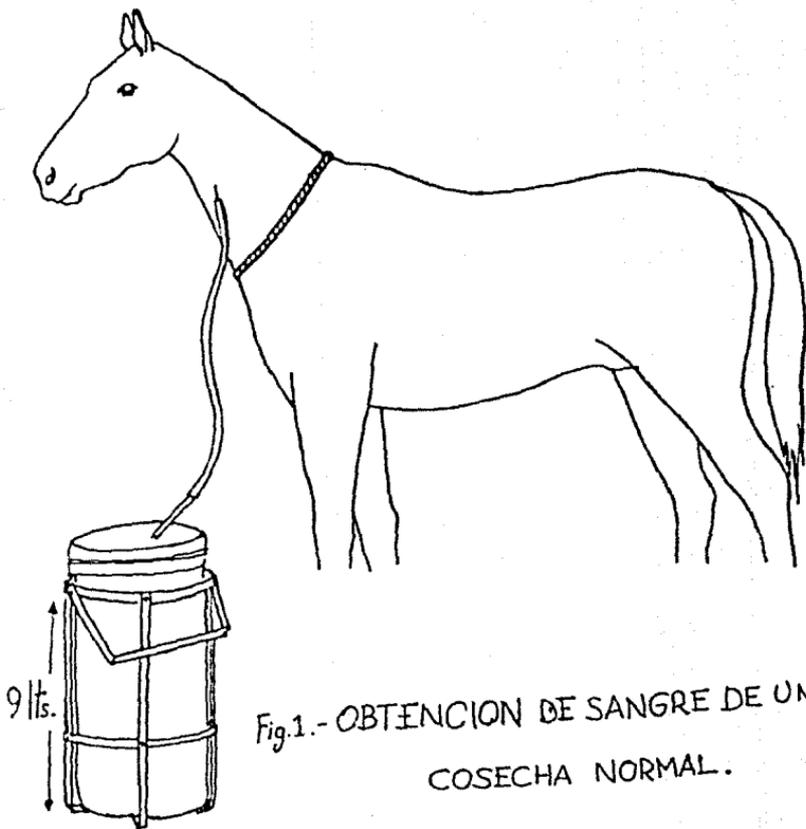
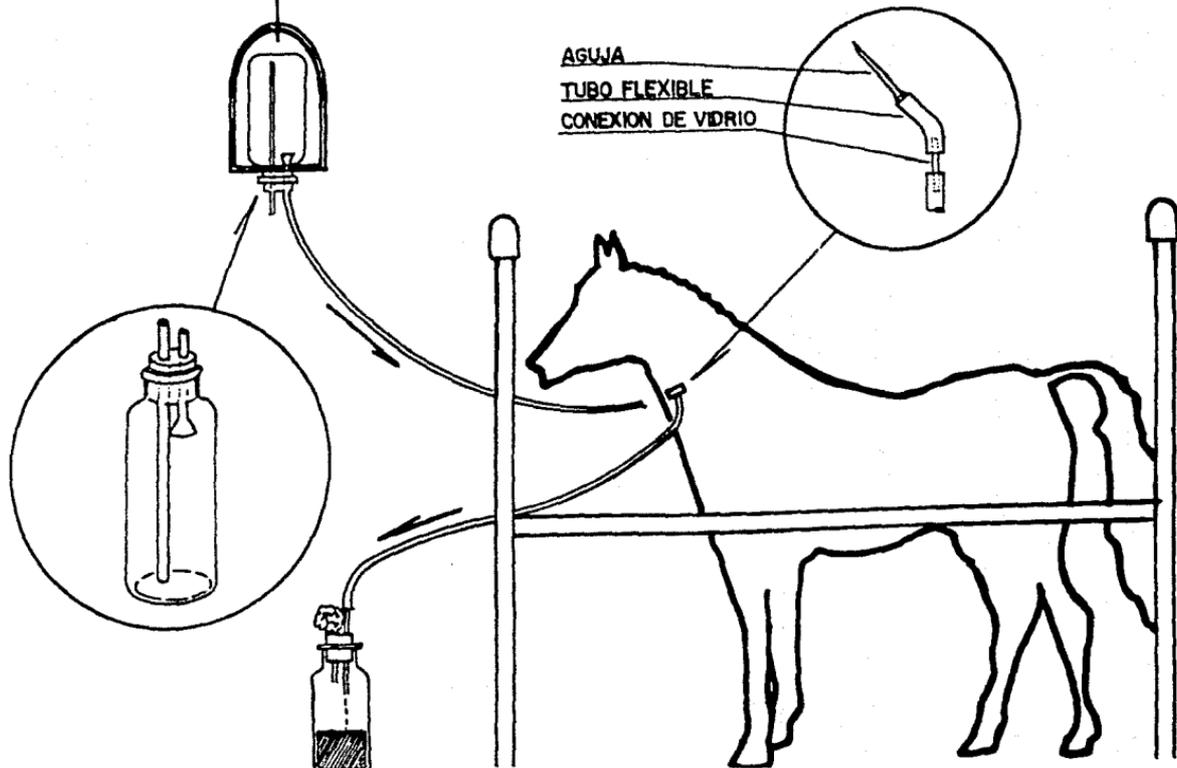


Fig.1.- OBTENCION DE SANGRE DE UNA  
COSECHA NORMAL.

Fig.2.- **PLASMAFERESIS**



### **III. RESULTADOS**

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la producción de sueros, se incrementó a partir de emplear el método de Plasmaféresis, tal y como lo muestra la estadística que a continuación se presenta (extraída en tres años de producción: 1976 sangrías a suero, con relación a los años 1977 y 1978 con obtención de sangrías a plasmaféresis):

Matrícula del equino (1-100)	Cantidad de sangre en 1976 (litros)	Cantidad de sangre en 1977 (litros)	Cantidad de sangre en 1978 (litros)	Incremento de Producción con relación a 1976. (%)	
				1977	1978
1	26	51.5	80	198	307
2	20	68	72	340	360
3	destinado a sangría normal				
4	destinado a sangría normal				
5	destinado a sangría normal				
6	23.5	44	60	255	136
7	22	52	54	236	245
8	31	74	69	238	222
9	24	46.5	66	193	275
10	42	69.5	descanso	165	---
11	35	51	68	145	194
12	44	68	85	154	193
13	42	68.5	75	163	178
14	24	62.5	75	260	312

Matrícula del equi- no. (1-100)	Cantidad de sangre en 1976 (litros)	Cantidad de sangre en 1977 (litros)	Cantidad de sangre en 1978 (litros)	Incremento de Producción con relación a 1976 (%)	
				1977	1978
15	16	82.5	79	515	493
16	31	56	61	180	196
17	<i>Ingresó</i>	60	62	---	---
18	27	71	81	262	300
19	18	45	58	250	322
20	21	83	82	395	390
21	20	47.5	55.5	237	277
22	38	73.5	75	193	197
23	33	65	77	196	233
24	17	27	35	158	205
25	22	56	58	254	263
26	37	51.5	57.5	139	155
27	23	49	57	213	247
28	16	42.5	47.5	265	296
29	32	84	88	262	275
30	28	41	52	146	185
31	17	36	47.5	211	279
32	35	53	61.5	151	175
33	<i>Ingresó</i>	73	82	---	---
34	10	47.5	59	475	590
35	20	60	<i>Descanso</i>	300	---
36	26	54.5	51.5	209	198

Matrícula del equi- no. (1-100)	Cantidad de sangre en 1976 (litros)	Cantidad de sangre en 1977 (litros)	Cantidad de sangre en 1978 (litros)	Incremento de Producción con relación a 1976. (%)	
				1977	1978
37	20	42	44.5	210	222
38	15	43.5	50	290	333
39	17	55	58	323	341
40	18	56	43.5	311	241
41	43	66.5	falleció	154	---
42	28	62	81	221	289
43	19	69.5	64	365	336
44	42	61	79	145	188
45	43	63	75	146	174
46	descanso	59.5	61.5	---	---
47	31	48	66	154	212
48	37	88.5	84.5	239	228
49	18	47	71	261	394
50	43	66	74	153	172
51	16	41.5	44.5	259	278
52	11	34	43.5	309	395
53	13	40.5	42	311	323
54	23	78	81.5	339	354
55	matrícula vacante				
56	17	67	57	394	335
57	12	37	77	308	641
58	26	63	51	242	196

Matrícula del equi- no (1-100)	Cantidad de sangre		Cantidad de sangre en 1978 (litros)	Incremento de Producción con relación a 1976 (%)	
	en 1976 (litros)	en 1977 (litros)		1977	1978
59	22	58	69	263	313
60	26	62.5	67.5	240	259
61	56	80	94	142	167
62	Descanso	Descanso	74.5	---	---
63	16	73	83	456	518
64	20	52	66	260	330
65	20	vacante	vacante	---	---
66	16	69.5	83	434	518
67	28	falleció	vacante	---	---
68	10	22	36.5	220	365
69	19	76	57.5	400	302
70	Ingresó	16.5	48	---	---
71	Descanso	Descanso	11	---	---
72	29	86.5	83	298	286
73	Ingresó	22.5	38	---	---
74	Ingresó	20	80	---	---
75	37	77.5	67	209	181
76	19	57	58	300	305
77	Ingresó	75.5	85	---	---
78	58	67	86	115	148
79	39	78	81	200	207
80	Ingresó	74.5	83	---	---

Matrícula del equi- no (1-100)	Cantidad de sangre en 1976 (litros)	Cantidad de sangre en 1977 (litros)	Cantidad de sangre en 1978 (litros)	Incremento de Producción con relación a 1976 (%)	
				1977	1978
81	19	79	80	415	421
82	16	24.5	81	153	506
83	26	71	59	273	226
84	24	86	88.5	358	368
85	<i>Vacante</i>	<i>Vacante</i>	87	---	---
86	<i>Matrícula vacante</i>				
87	<i>Ingresó</i>	34	57.5	---	---
88	<i>Ingresó</i>	32.5	57.5	---	---
89	<i>Matrícula vacante</i>				
90	<i>Matrícula vacante</i>				
91	37	89.5	<i>fallació</i>	241	---
92	<i>Matrícula vacante</i>				
93	<i>Ingresó</i>	20	72	---	---
94	31	82.5	88	266	283
95	28	49.5	86	176	307
96	<i>Ingresó</i>	24	74	---	---
97	43	69.5	68	161	158
98	<i>Matrícula vacante</i>				
99	<i>Ingresó</i>	18.5	41	---	---
100	<i>Matrícula vacante</i>				

<b>Producción Total de sangre en 1976</b>	<b>Producción Total de sangre en 1977</b>	<b>Producción Total de Sangre en 1978</b>	<b>Incremento con relación al año de 1976 (%)</b>	
1951.5 litros	4851 litros	5570 litros	248.57	285.42

<b>Núm. de Caballos en producción en 1976</b>	<b>Núm. de Caballos en producción en 1977</b>	<b>Núm. de Caballos en producción en 1978</b>
74 Equinos	85 Equinos	84 Equinos

#### **IV. DISCUSION**

Los resultados obtenidos aún cuando se obtuvieron incrementos de suma importancia, deben ser tomados como relativos, ya que aún falta mucho por perfeccionar las técnicas de inmunización y sangrías de cosecha.

Los programas elaborados para tal fin deben ser modificados de tal manera que los caballos puedan ser estimulados en un período de tiempo más corto y como consecuencia se puedan sangrar mayor número de veces. En esta forma se podrán sangrar los caballos cada 30-40 días.

Lo limitado de nuestros recursos necesarios, hace que no podamos obtener aún mas cantidad de sangre.

Este estudio debe tomarse como base y principio de posteriores estudios y modificaciones en técnicas, para poder obtener mejores resultados en la importantísima labor de la producción de Sueros Heterólogos de uso humano.

## **V. CONCLUSIONES**

- 1.- *Se expusieron las técnicas de elaboración de 5 sueros diferentes: ANTIALACRAN, ANTICROTALICO, ANTIDIFTERICO, ANTIRRABICO y ANTITETANICO.*
- 2.- *Las técnicas enunciadas son las que rigen actualmente dicha elaboración.*
- 3.- *La atención de los equinos a nivel Medicina Veterinaria es indispensable y definitivo, ya que sin ella, la producción sería deficiente y en grado sumo peligrosa.*
- 4.- *Los resultados obtenidos por medio de Plasmaféresis fueron del todo satisfactorios.*
- 5.- *Se debe contar con equinos específicamente seleccionados para tal fin.*
- 6.- *La creación de nuevas caballerizas, laboratorios de análisis clínicos e instalaciones más modernas, ya propuestas a la S.S.A., podrán situar al Instituto Nacional de Higiene a la altura de los mejores Institutos de producción de biológicos que existen actualmente.*

## **VI. BIBLIOGRAFIA**

- 1.- *American Association of Blood Banks: MANUAL OF BLOOD COMPONENT PREPARATION. Chicago, T.C.P., 1969*
- 2.- *American Association Of Blood Banks: TECHNICAL METHODS - AND PROCEDURES. Twentieth Century Press, Chicago, 1969.*
- 3.- *Asociación Americana de Bancos de sangre: MANUAL DE TERAPIA CON COMPONENTES SANGUINEOS. Primera Edición en español 1971.*
- 4.- *Kliman A. Carbone P.P., Gaydos L.A. y E.J. Freirech: EFFECTS OF INTENSIVE PLASMAPHERESIS ON NORMAL BLOOD DONORS. Cap. 23 647-656, 1964*
- 5.- *Leo Levine y Edward J. Broderich: PLASMAFERESIS EN CABALLOS HIPERINMUNIZADOS, O.M.S., 1970*
- 6 - *Manual de Procedimientos de la Organización Panamericana de la Salud. Costa Rica, Enero 1977.*