



Instituto Nacional
de Salud Pública | 2012



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA

**LABORATORIOS DE BIOLÓGICOS Y REACTIVOS
DE MÉXICO, S.A. DE C.V.**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD CON ÁREA DE
CONCENTRACIÓN EN VACUNOLOGÍA**

**“Evaluación de la cinética de producción de antivenenos
contra alacranes, orientado hacia la mejora del rendimiento
de faboterápicos de origen equino”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD CON ÁREA DE
CONCENTRACIÓN EN VACUNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

IQ. MARÍA ESTHER AGUILAR CASTRO

Director de Tesis:

Dr. Carlos Rubén Ortega Sánchez

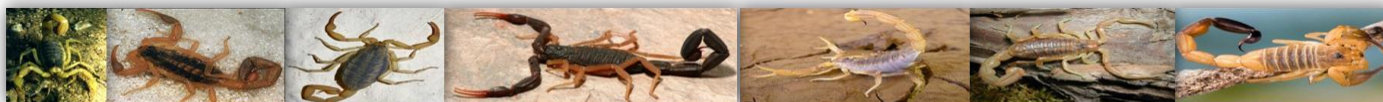
Asesores:

Dr. Mauricio Rodríguez Álvarez

Q.F.B. Antonio Sánchez Sánchez

Cuernavaca, Morelos

NOVIEMBRE 2012



**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LOS LABORATORIOS DE
INVESTIGACIÓN E INMUNOQUÍMICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE
HIGIENE, CON EL APOYO DE LA UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE PLASMAS
HIPERINMUNES PERTENECIENTES A LOS LABORATORIOS DE
BIOLÓGICOS Y REACTIVOS DE MÉXICO, S.A. DE C.V. BAJO LA
DIRECCIÓN DEL DR. CARLOS RUBÉN ORTEGA SÁNCHEZ**

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tablas.....	iv
Lista de Anexos.....	iv
Resumen.....	v
I. Marco teórico.....	1
1.1 Epidemiología.....	1
1.2 El alacrán.....	4
1.3 Características del veneno de alacrán y cuadro clínico.....	4
1.4 Tratamiento de la intoxicación por veneno de alacrán y su historia.....	6
II. Justificación.....	9
III. Planteamiento del problema.....	10
IV. Objetivos.....	11
V. Hipótesis.....	11
VI. Descripción del tipo de estudio.....	12
VII. Metodología.....	13
7.1 Materiales.....	13
7.2 Procedimientos.....	15
7.2.1 Obtención y preparación del veneno polivalente de alacrán.....	15
7.2.2 Preparación de inóculos.....	16
7.2.3 Esquemas de inmunización de refuerzo.....	17
7.2.4 Determinación de anticuerpos IgG contra veneno polivalente de alacrán mediante la técnica de ELISA indirecta.....	22
7.2.5 Análisis estadístico.....	24
VIII. Resultados.....	26
8.1 Diferencias entre los esquemas de inoculación.....	26
8.2 Resultados del hemograma y perfil bioquímico equino.....	26
8.3 Determinación de anticuerpos IgG contra veneno polivalente de alacrán del género <i>Centruroides</i> mediante la técnica de ELISA indirecta.....	30
IX. Discusión de resultados.....	43
X. Conclusiones.....	52
XI. Impactos y perspectivas.....	53
XII. Anexos.....	54
XIII. Referencias Bibliográficas.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag.	Antígeno.
As.	Absorbancia.
BCA	Ácido bicinconínico.
BIRMEX	Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México, S.A. de C.V.
C.	<i>Centruroides</i> .
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades.
CHGM	Concentración de hemoglobina globular media.
CK	Creatinina-cinasa.
DGE	Dirección General de Epidemiología.
DL₅₀	Dosis letales al 50%.
DP₅₀	Dosis protectoras al 50%.
ELISA	Ensayo de Inmuno-adsorción ligado a enzima (Enzyme-linked immunosorbent assay).
Fab	Fragmento de unión al antígeno.
F(ab')₂	Región Fab bivalente del anticuerpo. Es una porción de una molécula de IgG, producido por digestión con pepsina, que contiene dos fragmentos Fab, es decir dos cadenas ligeras y las porciones de dos cadenas pesadas, unidas por enlaces disulfuro en la región de bisagra.
Fc	Fragmento cristizable de la inmunoglobulina.
fl	Medida de femtolitros que cuantifica el volumen globular medio.
FPA	Faboterápico Polivalente Antialacrán.
g.l.	Grados de libertad.
IgG	Inmunoglobulina de la clase G.
INH	Instituto Nacional de Higiene.
IPPA	Intoxicación por picadura de alacrán.
PAB1	Plasma alacrán base 1. Esquema actual de inmunización con aplicación de 5 inóculos.
PAB2	Plasma alacrán base 2. Esquema a comparar con aplicación de 4 inóculos.
PAB3	Plasma alacrán base 3. Esquema a comparar con aplicación de 3 inóculos.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PBS-T	Solución amortiguadora de fosfatos adicionada con Tween-20.
PET	Polietilentereftalato.
rpm.	Revoluciones por minuto.
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
SUIVE	Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica.
UPPH	Unidad de Producción de Plasmas Hiperinmunes.
VGM	Volumen globular medio expresado en femtolitros.
VPA	Veneno polivalente de alacrán del género <i>Centruroides</i> .
WHO	Organización Mundial de la Salud, por sus siglas en inglés World Health Organization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Número de casos nuevos debido a intoxicación por picadura de alacrán en el territorio mexicano. Periodo 2000 al 2011.....	1
Figura 2.	Incidencia de intoxicación por picadura de alacrán, México 2010. En este mapa los Estados de Nayarit, Colima, Morelos y Guerrero fueron los de mayor incidencia durante el 2010.	2
Figura 3.	Incidencia de casos de intoxicación por picadura de alacrán por entidad federativa en el 2010.	3
Figura 4.	Número de casos nuevos de intoxicación por picadura de alacrán según grupos de edad y sexo, 2010.	3
Figura 5.	Representación de la inmunoglobulina IgG y la fracción F(ab') ₂	7
Figura 6.	Obtención de las regiones F(ab) ₂ y Fab de la inmunoglobulina IgG utilizados como faboterápicos.	7
Figura 7.	Recolección de especímenes de alacrán para su certificación de identidad.	15
Figura 8.	Corte y maceración de télsones.....	15
Figura 9.	Preparación de inóculos para los tres grupos de equinos en estudio: esquema actual PAB1; esquemas a comparar PAB2 y PAB3.	16
Figura 10.	Preparación del sitio de la inoculación. (Tricotomía)	21
Figura 11.	Lavado de los sitios de inoculación.....	21
Figura 12.	Desinfección de los sitios de inoculación.....	21
Figura 13.	Aplicación del inóculo por vía subcutánea	21
Figura 14.	Aplicación de pomada yodada.....	21
Figura 15.	Muestras de sangre de los equinos en estudio.	23
Figura 16.	Enzimoinmunoanálisis para la determinación de anticuerpos.	23
Figura 17.	Análisis gráfico y estadístico de los resultados del hematocrito equino a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación.	28

Figura 18. Análisis gráfico de los resultados de la concentración de globulina sérica equina a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación.	29
Figura 19. Curva de calibración para la determinación de la concentración proteica en el veneno polivalente de alacrán por la técnica del ácido bicinconínico en tubo.	30
Figura 20. Selección de la concentración de antígeno para la detección de anticuerpos IgG antiveneno polivalente de alacrán mediante la técnica de ELISA.	31
Figura 21. Selección de la dilución del primer y segundo anticuerpo para la detección de anticuerpos IgG antiveneno polivalente de alacrán.	32
Figura 22. Cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra VPA del género <i>Centruroides</i> por equino, pertenecientes al grupo de inmunización PAB1 (esquema actual).....	33
Figura 23. Cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra VPA del género <i>Centruroides</i> por equino, pertenecientes al esquema de inmunización a comparar PAB2	34
Figura 24. Cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra VPA del género <i>Centruroides</i> por equino, pertenecientes al esquema de inmunización a comparar PAB3	35
Figura 25. Cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra VPA del género <i>Centruroides</i> de los esquemas de inmunización actual (PAB1) y a comparar (PAB2 y PAB3)	36
Figura 26. Comparación gráfica y estadística de los promedio de las absorbancias a 492nm entre el esquema de inmunización actual PAB1 y el esquema a comparar PAB2 en los días 20, 21, 22 y 26 de las cinéticas de producción de IgG.....	39
Figura 27. Comparación gráfica y estadística de los promedio de las absorbancias a 492 nm entre el esquema de inmunización actual PAB1 y el esquema a comparar PAB3 en los días 20, 21, 22 y 26 de las cinéticas de producción de IgG.	40
Figura 28. Comparación gráfica y estadística de los resultados promedio de las absorbancias a 492 nm entre los días 22 y 26 de los esquemas en estudio (PAB1, PAB2 o PAB3).	41
Figura 29. Comparación gráfica y estadística de los resultados promedio de las absorbancias a 492 nm entre los días 20 y 16 de los esquemas en estudio (PAB1, PAB2 o PAB3)	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro clínico de IPPA de acuerdo al grado de severidad de la sintomatología.....	5
Tabla 2. Medidas generales de atención médica para personas picadas por alacrán.....	8
Tabla 3. Distribución de equinos por esquema de inmunización.....	17
Tabla 4. Esquemas de inmunización con Veneno Polivalente de Alacrán	18
Tabla 5. Clasificación de la condición física general de los equinos	19
Tabla 6. Especificaciones de aceptación del estado de salud de equino para la producción de sueros hiperinmunes.....	20
Tabla 7. Resumen del análisis estadístico de los principales parámetros evaluados en el Hemograma y Perfil Bioquímico, comparando el día -5 con el día 24 del estudio.	27

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Prueba biológica para determinar la dosis protectora al 50% (DP_{50}) de los suero.....	54
Anexo 2. Metodología de la cosecha de sangre (Plasmaféresis)	58
Anexo 3. Preparación de reactivos para la técnica de ELISA indirecta	62
Anexo 4. Cinética de producción de anticuerpos por ELISA indirecta	63
Anexo 5. Resultados y análisis estadístico del Hemograma equino.....	66
Anexo 6. Resultados y análisis estadístico del Perfil Bioquímico equino.....	74

RESUMEN

El alacranismo es un importante problema de salud pública en muchos países como India, Pakistán, Argelia, Sudáfrica, Túnez y Tanzania. En México, la picadura de alacrán constituye un motivo frecuente de consulta con una tasa de incidencia de 260 casos nuevos por 100 mil habitantes, ubicándola en el 6° lugar dentro de los 20 principales padecimientos no transmisibles en nuestro país.

México es el país con mayor número de especies de alacranes en todo el mundo, siendo sólo ocho especies, de aproximadamente 204 conocidas, las consideradas de importancia en salud pública por su alta toxicidad del veneno, todas ellas del género *Centruroides*. El veneno del alacrán es inoculado directamente a la víctima por vía subcutánea y se disemina por vía hematógena. El mecanismo de intoxicación del veneno consiste en una acción local debida a la serotonina y una acción neurotóxica sobre los centros nerviosos autonómicos hipotalámicos simpáticos y parasimpáticos. El tratamiento específico actual en México es el empleo de faboterápico polivalente antiveneno de alacrán.

En atención a las recomendaciones emitidas por la OMS acerca de la necesidad urgente de mejorar tanto los productos como los procesos para la producción de antivenenos, es que el presente trabajo aborda la evaluación de tres diferentes esquemas de inoculación de refuerzo en equinos, con el fin de determinar el esquema más eficiente en la producción de anticuerpos contra veneno de alacrán y de esta forma, mejorar el rendimiento en la producción del faboterápico que en consecuencia, puede reducir los costos del biológico para el beneficio de la población mexicana. También se evaluó el estado de salud, hemograma y perfil bioquímico de los equinos empleados en el estudio con el fin de mejorar el bienestar de los animales de producción.

Se seleccionaron 21 equinos los cuales fueron divididos en tres grupos de 7. A cada uno de los equinos se les evaluó su estado de salud al inicio y al término de los esquemas de inmunización sin detectar alteraciones que afectará su vida. Se aplicaron tres esquemas de inoculación y se les denominó como esquema actual (PAB1) y esquemas a comparar (PAB2 y PAB3), la diferencia entre los esquemas es el número de inóculos aplicados siendo de 5, 4 y 3 respectivamente.

Con respecto a la evaluación de los esquemas de inmunización de refuerzo, fue realizada mediante la determinación de cinéticas de producción de anticuerpos IgG antiveneno polivalente de alacrán obtenidas por ELISA indirecta y los resultados se analizaron empleando la Prueba de Hipótesis comparando las medias poblacionales de muestras pequeñas e independientes.

Los resultados obtenidos del monitoreo del estado de salud de los equinos junto con los resultados de la cinética de producción de anticuerpos IgG específicos contra veneno polivalente de alacrán, demostraron que los equinos de cada grupo después de la tercera plasmaféresis, fueron aptos para realizarles una cuarta plasmaféresis sin afectar la integridad del animal, aumentando un 33% la producción de plasma hiperinmune.

Con respecto al análisis de las cinéticas de la producción de anticuerpos IgG contra veneno polivalente de alacrán de los esquemas de inmunización PAB1, PAB2 y PAB3, no se encontraron diferencias significativas entre ellos con una confianza del 95%, por lo que se puede concluir que no se requiere la aplicación de cinco inóculos de veneno polivalente de alacrán para la producción de plasma hiperinmune en los esquemas de refuerzo ya que las cinéticas de producción de anticuerpos IgG específicos presentaron el mismo comportamiento al aplicarse 4 ó 3 inóculos.

Finalmente, con los resultados observados de las cinéticas de producción de anticuerpos, se propone un cambio en el día que se realiza actualmente la primera plasmaféresis, el cual puede ser entre el día 16 y 20 del esquema con el fin de disminuir los tiempos de producción.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Epidemiología

Se denomina alacranismo al cuadro clínico producido por la picadura de un escorpión o alacrán y que, dependiendo de diversos factores, puede involucrar características más o menos graves causando incluso la muerte a un ser humano adulto (SINAVE, 2007; CENAVECE, 2008).

El alacranismo es un importante problema de salud pública en muchos países como India, Pakistán, Argelia, Sudáfrica, Túnez, Tanzania, Australia y el sur de los Estados Unidos presentándose una alta incidencia con preocupantes cifras de mortalidad. En América, los países con mayor incidencia son México, Brasil y Venezuela. En nuestro país se registra un promedio de 250,000 casos de intoxicación por picadura de alacrán (IPPA) cada año (ver Figura 1), con una cifra promedio anual de 930 muertes, siendo principalmente entre menores de cinco años (más de 80% de las defunciones se registran en este grupo de edad) y ancianos, que son los más vulnerables al veneno (CENAVECE, 2010; DGE, 2011). En la Figura 1 se muestran los casos nuevos de IPPA durante los últimos 10 años observándose un ligero incremento.

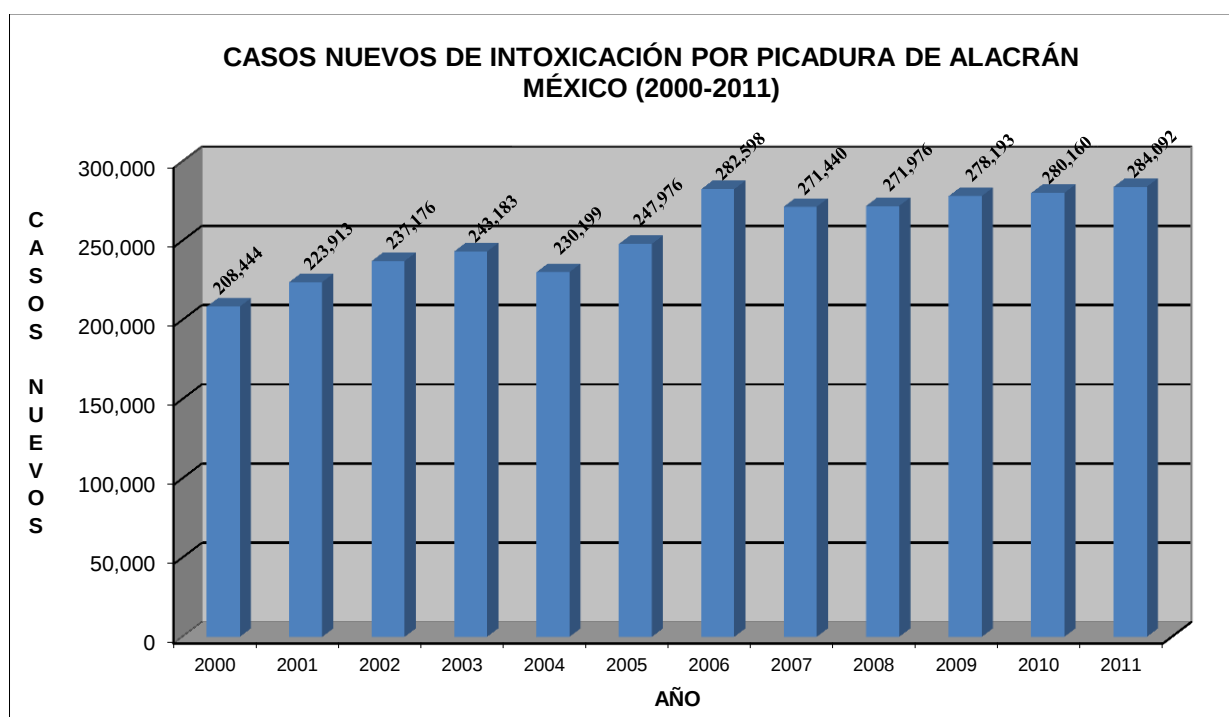


Figura 1. Número de casos nuevos debido a intoxicación por picadura de alacrán en el territorio mexicano. Periodo 2000 al 2011. FUENTE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA. 2011.

En México, la IPPA constituye un motivo frecuente de consulta y en algunas regiones del país se registran niveles altos de incidencia, que parecen haberse incrementado en los últimos años. En las Figuras 2 y 3 se muestra la incidencia de IPPA en el año 2010, observándose que los estados de Morelos, Colima, Guerrero, Nayarit, Michoacán, Jalisco, Guanajuato y Durango son los de mayor incidencia. La tasa de incidencia promedio en México en ese año fue de 258.5 casos nuevos por 100 mil habitantes, con esta cifra, la IPPA se ubica en el 6° lugar dentro de las 20 principales enfermedades no transmisibles en nuestro país (DGE, 2010).

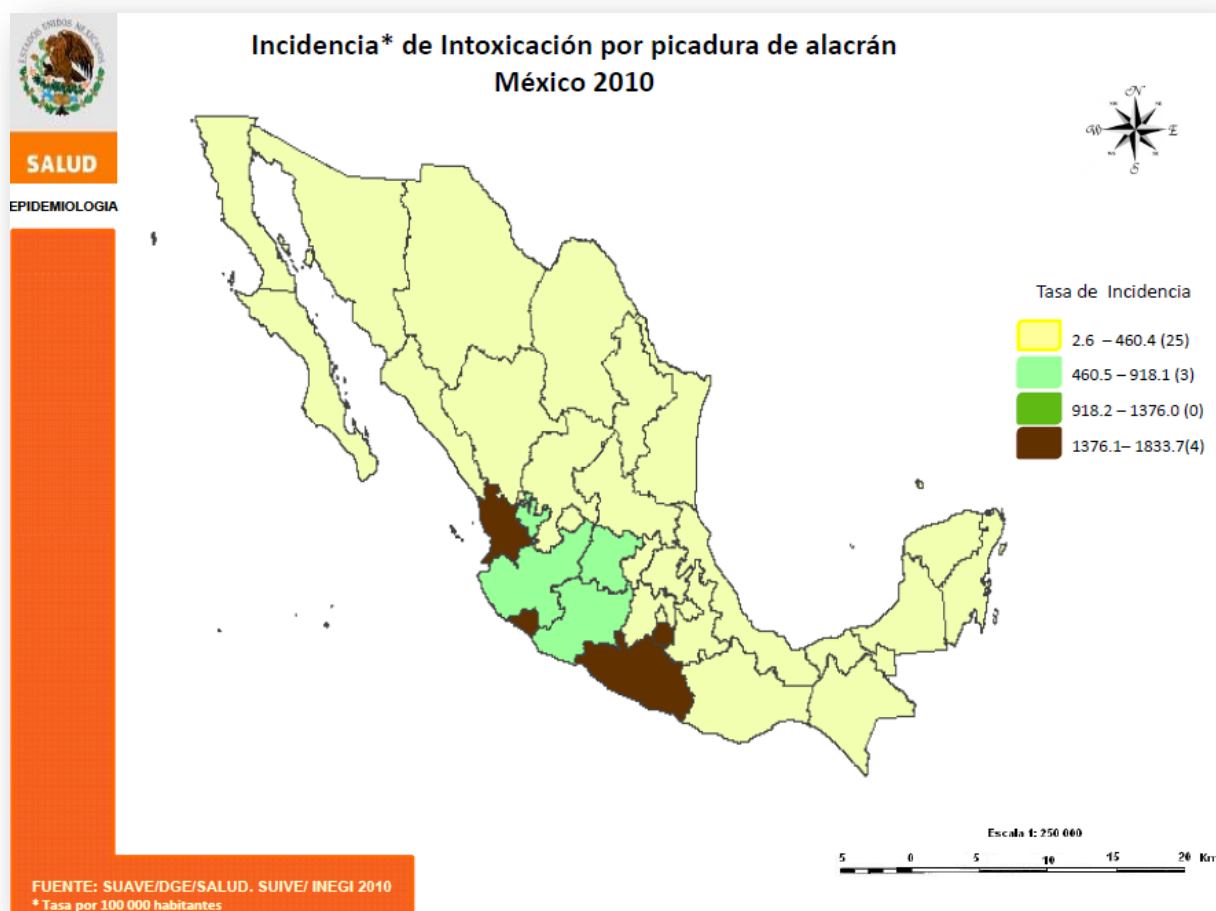


Figura 2. Incidencia de intoxicación por picadura de alacrán, México 2010. En este mapa los Estados de Nayarit, Colima, Morelos y Guerrero fueron los de mayor incidencia durante el 2010. El valor entre paréntesis corresponde al número de estados. FUENTE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA. 2010.

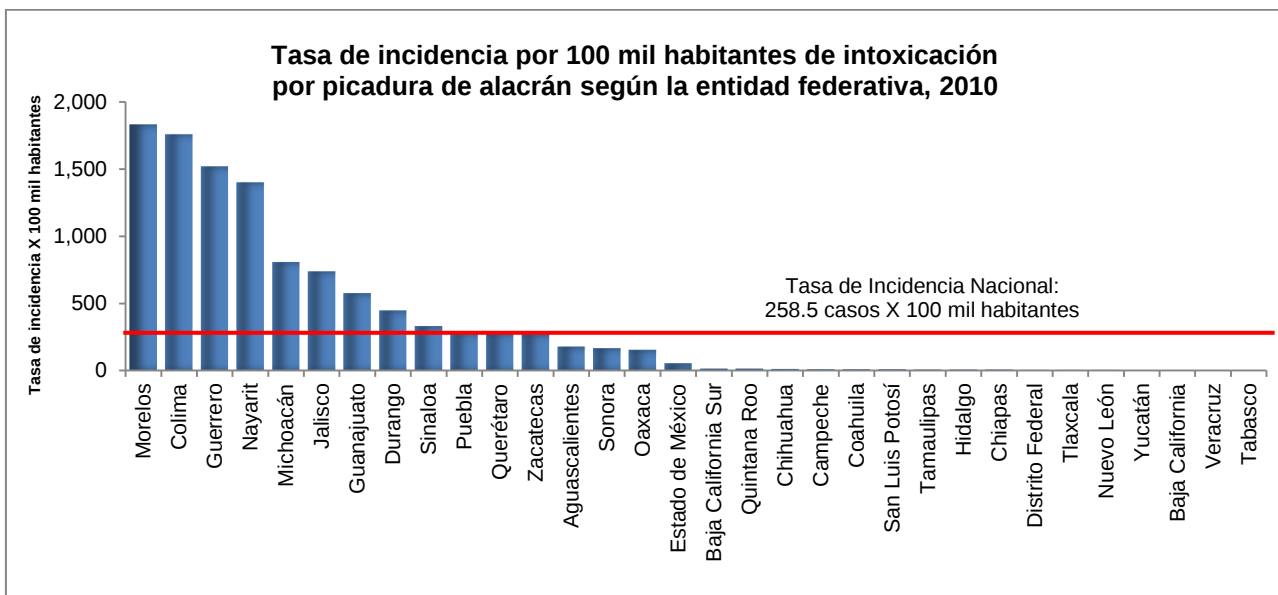


Figura 3. Incidencia de casos de intoxicación por picadura de alacrán por entidad federativa en el 2010. FUENTE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA. 2010.

De acuerdo a los datos consultados en la página de la Dirección General de Epidemiología, se establece que el grupo etario con mayor número de casos por IPPA es el de 25 a 44 años y de acuerdo a la distribución por sexo, la razón mujer hombre es de 1:1 aproximadamente (Figura 4).

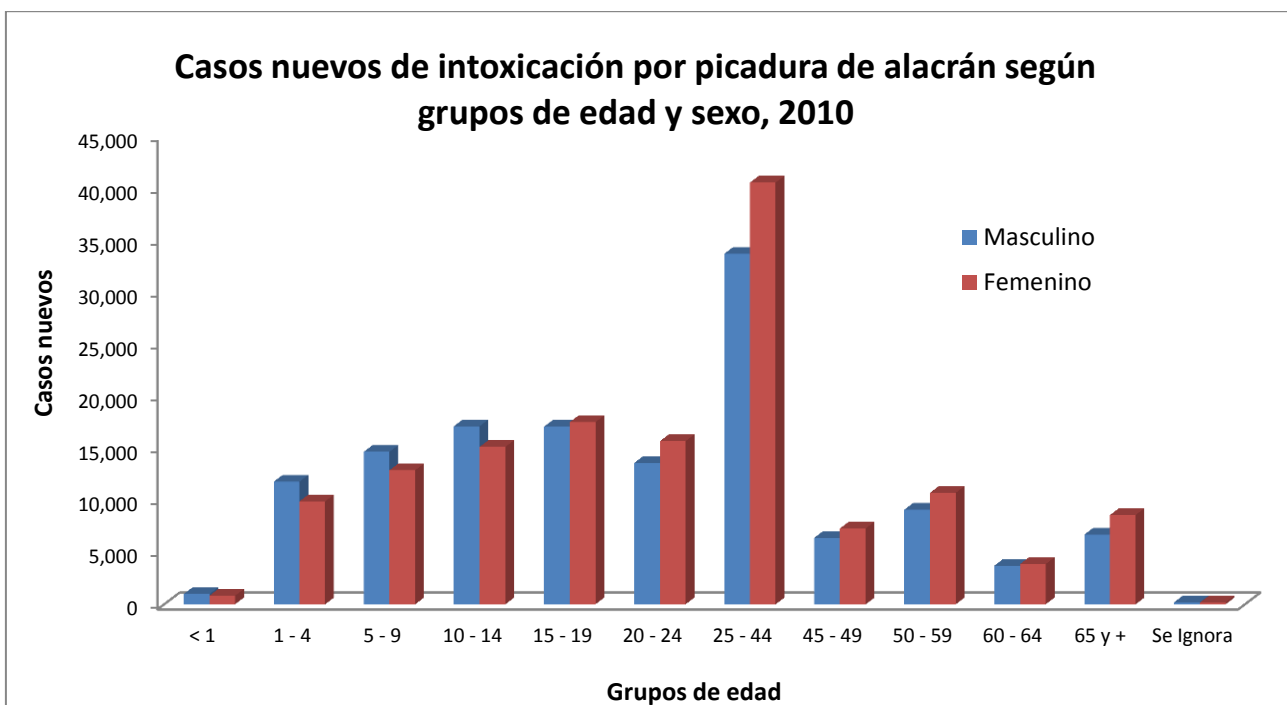


Figura 4. Número de casos nuevos de intoxicación por picadura de alacrán según grupos de edad y sexo, 2010. FUENTE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA. 2010.

1.2 El alacrán

México es el país con mayor número de especies de alacranes en todo el mundo, contenidas en 4 familias, 15 géneros, 109 especies y 16 subespecies, siendo sólo ocho especies de aproximadamente 204 conocidas consideradas de importancia en salud pública por su alta toxicidad, todas ellas pertenecientes al género *Centruroides*. Estas especies se localizan en los estados de la vertiente del Pacífico, desde Sonora hasta Oaxaca y en algunos del centro como Aguascalientes, Querétaro, Durango, Guanajuato, suroeste del Estado de México, Morelos, sur de Puebla y Zacatecas (Domingos, 2007; SINAVE, 2007; CENAVECE, 2008; DGE, 2010; NOM-033, 2011).

Las ocho especies de importancia para la salud pública son:

- ☠ *Centruroides noxius* (Nayarit, Sinaloa y Jalisco).
- ☠ *C. limpidus limpidus* (Colima, Guerrero, Estado de México, Morelos, Puebla).
- ☠ *C. suffusus suffusus* (Durango, Sinaloa).
- ☠ *C. limpidus tecumanus* (Colima, Jalisco, Michoacán).
- ☠ *C. infamatus infamatus* (Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Michoacán).
- ☠ *C. elegans* (Nayarit, Jalisco, Michoacán, Colima, Guerrero).
- ☠ *C. pallidiceps* (Sonora, Sinaloa, Nayarit).
- ☠ *C. exillicauda* (Sonora, Sinaloa).

Características del veneno de alacrán y cuadro clínico

Con respecto al veneno del alacrán, éste posee un pH ácido (4 a 6), es termorresistente a 62°C, miscible en agua y después de desecación mediante vacío, su actividad tóxica puede conservarse varios años. El veneno de alacrán del género *Centruroides* está compuesto principalmente por polipéptidos, enzimas proteolíticas, proteínas de bajo peso molecular de acción neurotóxica y serotonina. Cuarenta y un péptidos tóxicos han sido purificados a partir del veneno de los alacranes mexicanos, veintiocho de los cuales (péptidos de cadena larga) son ligados específicamente por canales de sodio de las células excitables; los restantes son péptidos de cadena corta con afinidad por los canales de potasio de células excitables, principalmente a nivel de tejido muscular y nervioso. Estos bloqueos son la causa de la sintomatología aun cuando la cantidad de veneno que inocula cada alacrán es de 100 a 300 microgramos. La unión de las toxinas es reversible, pero existe diferencia en la afinidad de acuerdo a la especie de alacrán (Domingos, 2005; Domingos, 2007; SINAVE, 2007b; CENAVECE, 2008).

El veneno es inoculado directamente a la víctima por vía subcutánea y se disemina por vía hematológica, posteriormente es eliminado por la orina y la secreción biliar. El mecanismo del envenenamiento consiste primeramente en una acción local del veneno debida a la serotonina, que provoca dolor intenso o prurito inmediato en el sitio de la picadura, parestesias locales y ocasionalmente, edema e hiperemia mínima; en segundo lugar, a una acción neurotóxica sobre los centros nerviosos autónomos simpáticos y parasimpáticos del hipotálamo. Los síntomas de intoxicación por veneno de alacrán en el hombre y en los animales de experimentación demuestran que la acción de las neurotoxinas semejan a la de las sustancias parasimpáticas (muscarina, acetilcolina, pilocarpina y serina) y compuestos simpáticos (adrenalina); la mejor analogía se establece en la acción de la nicotina, que produce bradicardia e hipotensión, seguida de taquicardia e hipertensión, estimulación de la médula de las glándulas suprarrenales para producir adrenalina e hiperglucemia, polipnea, aumento del peristaltismo y midriasis. En casos graves se produce edema cerebral grave, hipoxia, necrosis, degeneración neuronal y muerte cerebral, así como edema pulmonar, pancreatitis hemorrágica. (Domingos 2007, SINAVE, 2007b)

En resumen (Tabla1), la IPPA se manifiesta de diferente forma en cada persona, estas pueden ser desde leves hasta aquellas que pueden poner en riesgo la vida de la persona (NOM-033, 2011).

Tabla 1. Cuadro clínico de IPPA de acuerdo al grado de severidad de la sintomatología

Grado 1 LEVE	Grado 2 MODERADO	Grado 3 GRAVE
• Dolor local • Parestesias locales (hormigueo local) • Prurito (comezón en área afectada) • Inquietud leve	Los síntomas leves más: • Llanto persistente en menores de 5 años • Angustia • Cefalea (dolor de cabeza) • Epífora (lagrimeo) • Enrojecimiento ocular • Prurito en nariz, boca y garganta • Estornudos • Rinorrea (hipersecreción nasal) • Sialorrea (hipersecreción salival) • Sensación de cuerpo extraño en la faringe • Disfagia (dificultad para tragar) • Fasciculaciones linguales (temblor de la lengua) • Sensación de sequedad de boca • Taquicardia (aumento de la frecuencia cardíaca) • Disnea (dificultad para respirar) • Distensión abdominal • Dolores abdominales y musculares • Priapismo (erección involuntaria del pene) • Prurito vulvar (comezón en genitales femeninos)	Los síntomas moderados más: • Hipertensión o hipotensión arterial • Fiebre o hipotermia • Miosis (pupilas pequeñas) • Midriasis (pupilas grandes) • Fotofobia (rechazo a la luz) • Nistagmus (movimientos rápidos de los ojos) • Dislalia (dificultad para hablar) • Cianosis peribucal • Convulsiones • Amaurosis (ceguera) temporal • Bradicardia (disminución de la frecuencia cardíaca) • Arritmias (alteraciones del ritmo cardíaco) • Dolor retroesternal • Oliguria (disminución de la orina) • Inconciencia • Falla orgánica múltiple • Coma • Muerte

1.3 Tratamiento de la intoxicación por veneno de alacrán y su historia

Anteriormente se daba tratamiento en la zona de la picadura con extractores de veneno (Poison Pack) y uso de desinflamatorios locales. Actualmente está en desuso ya que no beneficia realmente la complicación en el resto del cuerpo. El tratamiento específico contra la intoxicación del veneno del alacrán es la inmunización pasiva mediante el uso de faboterápico, el cual es un producto orgullosamente desarrollado en México con resultados excelentes hasta hoy (WHO, 2010).

La producción de faboterápicos tiene su origen desde el siglo antepasado cuando se descubrió que los antisueros presentaban propiedades protectoras contra toxinas. En 1890, Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato reportaron las propiedades protectoras del suero de cobayos inmunizados con la toxina diftérica y sugirieron el uso de este antisuero para el tratamiento de dichas enfermedades. La seroterapia nace cuando Roux utiliza con éxito la antitoxina de von Behring para salvar a niños que presentaban difteria severa (Rojas, 2007; WHO, 2010). Con este trabajo, von Behring se hace merecedor al primer Premio Nobel concedido en Medicina y Fisiología en 1901.

En el siglo pasado en América, Brasil inicia la producción de sueros hiperinmunes contra venenos de ofidios en el Instituto Butantán de Sao Paulo, esta experiencia sirve de motivación a Carlos de la Peña e Isauro Venzor, ciudadanos de Durango (México), quienes hacia el año 1926 inician la producción de sueros contra veneno de alacrán (*Centruroides suffusus suffusus*) inmunizando caballos con dosis crecientes del veneno. Posteriormente, transfirieron la tecnología desarrollada a la Secretaría de Salud de México de aquel entonces y en 1930, la seroterapia inicia en nuestro país con un suero polivalente contra las especies ponzoñosas (Vega, 2007).

La utilización de sueros para el tratamiento de enfermedades infecciosas y envenenamientos por plantas, animales o insectos se hizo muy popular hasta la década de los cincuenta y una vez reconocidos los efectos secundarios del suero (enfermedad del suero) y sobre todo, una vez obtenido el conocimiento sobre las inmunoglobulinas, se inicia la utilización de la fracción gammaglobulinas hiperinmunes con una reducción considerable en las reacciones secundarias (Vega, 2007). Sin embargo, la enfermedad del suero se seguía presentando, por lo que surgió la tercera generación de sueros, en donde la inmunoglobulina IgG específica es tratada con pepsina obteniéndose los fragmentos $F(ab')_2$ (Figura 5), evitándose así las reacciones tempranas adversas debidas principalmente por la activación del complemento. A la utilización de la región Fab del anticuerpo como tratamiento, se le conoce con el término de “faboterapia” (Otero, 2002).

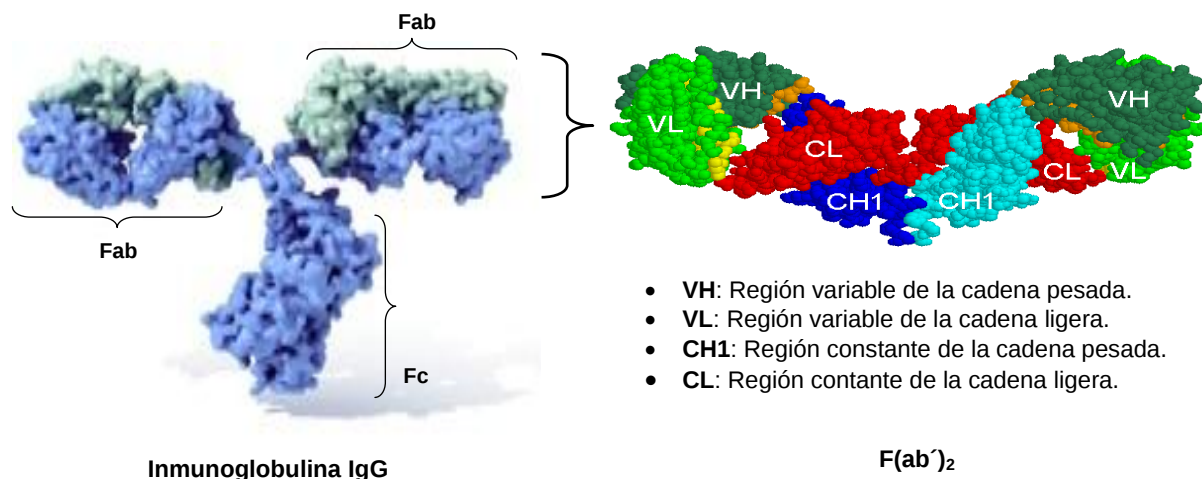


Figura 5. Representación de la inmunoglobulina IgG y la fracción F(ab')₂.

El uso del antiveneno de alacrán que es obtenido del plasma hiperinmune de animales (caballo, camello, oveja, etc.), (Gutiérrez, 2011), es uno de los tratamientos específicos contra los accidentes por picadura de alacrán (WHO, 2010). La eficacia del antisuero para este tratamiento depende de su capacidad para la neutralización de las diferentes actividades biológicas de los diversos componentes de este veneno (Chippaux, 1997; Tay, 1982).

Existen tres tipos principales de preparaciones de antivenenos (Morais, 2005; Theakston, 1983), los cuales se clasifican dependiendo de la naturaleza de las moléculas neutralizantes (Figura 6):

- Preparaciones con anticuerpos IgG.
- Preparaciones con la región F(ab')₂
- Preparaciones con los fragmentos Fab.

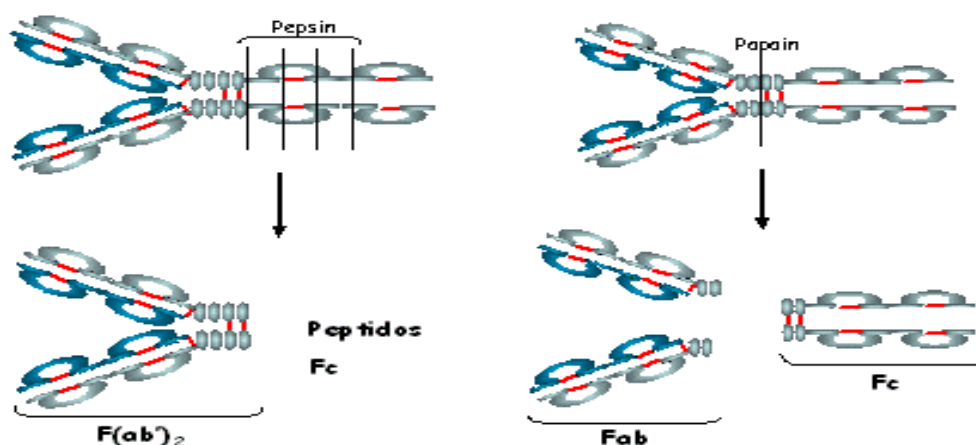


Figura 6. Obtención de las regiones F(ab)₂ y Fab de la inmunoglobulina IgG utilizados como faboterápicos.

El primero corresponde a los biológicos conformados por la IgG total proveniente del plasma equino hiperinmune; los anticuerpos IgG son obtenidos mediante fraccionamiento con sulfato de amonio o con ácido caprílico. El primero precipita directamente a las IgG's mientras que el segundo precipita las proteínas no inmunes del plasma como son la albúmina, fibrinógeno, alfa y beta proteínas, este procedimiento permite la obtención de mayor cantidad de IgG en menor tiempo y con una mayor pureza (Rojas, 1994). El segundo biológico corresponde a los digeridos con pepsina de los anticuerpos IgG que dan como producto a los fragmentos $F(ab')_2$; después del tratamiento enzimático, los fragmentos Fc son coagulados por calentamiento a 57°C y los fragmentos $F(ab')_2$ son purificados. El tercer tipo corresponde al biológico proveniente de ovinos hiperinmunes, el anticuerpo es digerido con papaína para obtener los fragmentos Fab, los cuales son purificados por cromatografía de afinidad (Otero, 2002).

Como se mencionó, la faboterapia es el tratamiento específico para la IPPA y, por tanto, el recurso de primera elección; además de proteger la vida, reduce la permanencia hospitalaria, gastos médicos, calma el dolor, evita molestias y complicaciones diversas. La Norma Oficial Mexicana NOM-033-SSA2-2011, para la vigilancia, prevención y control de la intoxicación por picadura de alacrán, recomienda las siguientes medidas generales de tratamiento:

Tabla 2. Medidas generales de atención médica para personas picadas por alacrán

Medidas Generales de Atención	
Menor de 5 años	Aplicación inmediata de dos frascos de faboterápico con observación durante 20 minutos; si no hay mejoría, aplicar otra dosis igual a la inicial. Monitoreo permanente de signos vitales.
Niños mayores de 5 años y adultos	
Grado 1	Un frasco ampola vía intravenosa, lenta, con observación durante 20 minutos; sino hay mejoría, aplicar otro frasco. Monitoreo permanente de signos vitales, reposo absoluto, observación.
Grado 2	Monitoreo permanente de signos vitales y aplicación inmediata de faboterápico en bolo desde 2 hasta un máximo de 5 frascos por paciente; reposo absoluto, observación, vías aéreas y vena permeable.
Grado 3	Monitoreo permanente de signos vitales y aplicación inmediata de faboterápico, en bolo un máximo de 5 frascos por paciente; reposo absoluto, observación, vías aéreas y vena permeable, oxígeno.
Menores de 5 años con grado 2-3 y mayores de 65; mujeres embarazadas y pacientes con cardiopatía, asma, insuficiencia renal, desnutrición, cirrosis, alcoholismo, diabetes, hipertensión y con rápida evolución de grado 1 a grado 2	Por su alto riesgo, requieren que una vez iniciada la terapéutica con faboterápicos se trasladen a la unidad médica más cercana de segundo nivel de atención o de mayor capacidad resolutive.

II. JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su taller sobre la “estandarización y control de los antivenenos” realizado en 2001, concluyó que la vasta mayoría de la producción de los antisueros comerciales se realiza todavía siguiendo las tecnologías tradicionales, la persistencia de reacciones adversas por el uso de antivenenos, hace evidente la necesidad de mejorar los métodos de producción, el control de calidad y el perfil de seguridad de estos productos; la OMS recomendó que no se debe escatimar esfuerzos para mejorar los protocolos de producción de estos antivenenos, con el objetivo de aumentar su pureza y minimizar así el contenido de proteínas contaminantes y de sus agregados (WHO, 2010, Theakston, 2003), las cuales son en gran parte las causantes de las reacciones adversa en los faboterápicos. Este taller reunió a expertos de instituciones académicas, productores de antivenenos y autoridades regulatorias de 21 países, incluido México con representantes de BIRMEX.

En atención a las recomendaciones emitidas por la OMS (WHO, 2010; Theakston, 2003) acerca de la necesidad urgente de mejorar tanto los productos, como los procesos para la producción de antivenenos con mayor pureza y seguridad (que induzcan menos reacciones alérgicas en los pacientes de picaduras de alacrán), es por lo cual diversos grupos han abordado líneas de investigación, como el diseño de nuevos esquemas de inmunización, estudio de la patogénesis de las reacciones anafilácticas inducidas por la administración de antivenenos, el perfil farmacocinético, la estabilidad de las moléculas que constituyen los principios activos y la remoción o inactivación de virus presentes en los plasmas animales durante el proceso de manufactura.

Por las razones antes mencionadas, el presente trabajo aborda la comparación de tres diferentes esquemas de inmunización de refuerzo en equinos, con el fin de determinar el esquema más eficiente en la producción de anticuerpos contra veneno de alacrán, que nos permita mejorar el rendimiento en la producción del faboterápico, lo que a su vez redundaría en un menor costo por dosis, ocasionando un beneficio a la población mexicana. Por otro lado, se realizó la evaluación clínica de los equinos destinados para la producción de sueros hiperinmunes con en el fin de monitorear el estado de salud de los mismos para asegurar la inocuidad de los esquemas de inmunización conduciendo así a un incremento de su vida productiva.



III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el programa de producción de plasma hiperinmune equino que lleva acabo la Gerencia de Producción de Sueros de BIRMEX, permite obtener entre 6 a 8 litros de plasma hiperinmune por equino tras la administración de esquemas de refuerzo con cinco inóculos de veneno polivalente de alacrán en dosis crecientes, y en concordancia a las recomendaciones emitidas por la OMS acerca de la necesidad de mejorar los productos y los procesos para la producción de antivenenos, es que en el presente estudio se analizaron las cinéticas de producción de anticuerpos siguiendo tres esquemas de inmunización de refuerzo. Con los resultados que se obtengan de esta evaluación junto con los resultados de la valoración de la salud de los equinos, se decidirá a proceder la obtención de más volumen de plasma, empleando menor cantidad de veneno inoculado y procurando mejorar el bienestar de los animales de producción. Cabe mencionar que este trabajo forma parte del proyecto titulado “Mejoramiento de la línea de faboterápicos polivalentes de los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México”.

IV. OBJETIVOS

General

Comparar tres esquemas de inmunización de refuerzo mediante la cinética de producción de anticuerpos IgG contra veneno polivalente de *Centruroides spp*, utilizando la técnica de ELISA indirecta, con la finalidad de mejorar la producción de faboterápicos de origen equino.

Específicos

1. Plantear dos esquemas de inoculación alternativos a partir del modelo actual de inmunización contra veneno polivalente de alacrán para su posterior comparación.
2. Determinar las cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra veneno polivalente de alacrán de los esquemas de inmunización actual y de comparación, empleando pruebas de inmunoensayo enzimático (ELISA indirecta).
3. Comparar las cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra veneno polivalente de alacrán empleando la Prueba de Hipótesis para muestras pequeñas e independientes.
4. Verificar el estado de salud, el perfil bioquímico y el hemograma de los equinos de cada grupo, antes del esquema de inoculación y después de la tercera plasmaféresis.
5. Valorar la posibilidad de efectuar una cuarta plasmaféresis adicional con base a los resultados del estado de salud y los de la cinética de producción de anticuerpos, para aumentar la obtención de plasma hiperinmune.
6. Proponer el mejor momento para efectuar la primera plasmaféresis dependiendo de los resultados de la cinética de producción de anticuerpos, con el fin de disminuir el tiempo de producción de plasmas hiperinmunes contra veneno polivalente de alacrán.

V. HIPÓTESIS

Las diferencias en las cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra veneno polivalente de alacrán se determinaron con una confianza del 95%.

H_0 = No hay diferencia en la producción de anticuerpos IgG entre el esquema actual y el esquema de comparación ($\mu_1 = \mu_2$)

H_i = Sí hay diferencia en la producción de anticuerpos IgG entre el esquema actual y el esquema de comparación ($\mu_1 \neq \mu_2$)

VI. DESCRIPCIÓN DEL TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo es de tipo experimental, longitudinal y prospectivo. Es experimental ya que se aplican tres esquemas diferentes de inmunización de refuerzo a equinos que corresponden al “grupo VI” pertenecientes a BIRMEX. Es un estudio longitudinal y prospectivo debido a que se recolectan datos y muestras de sangre de los equinos en tiempos determinados de acuerdo a los tres esquemas de inoculación. Las muestras de sangre se recolectan a lo largo del estudio con el objetivo de elaborar cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra veneno polivalente de alacrán.

Es un estudio longitudinal debido a que se recolectan datos sobre las variables de cada equino, como el estado de salud antes del esquema de inmunización y después de la aplicación de dichos esquemas. En este procedimiento se realiza una inspección física que abarca, el estado de carnes, la actitud del animal, la expresión de los ojos, integridad de la piel y el estado del pelo. También se determina el microhematocrito, la historia clínica y se verifica ausencia de anticuerpos contra anemia infecciosa equina y con base a estas variables se determina si el equino es apto o no para el estudio.

VII. METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoquímica del Instituto Nacional de Higiene (INH) con el apoyo del Área de Investigación y la Unidad de Producción de Plasmas Hiperinmunes (UPPH) de BIRMEX ubicada en Tecámac, Estado de México.

7.1 MATERIALES

a) MATERIAL BIOLÓGICO

Veneno polivalente de alacrán: Veneno obtenido en BIRMEX mediante la maceración de télsones de las especies *Centruroides noxius*, *C. limpidus limpidus* y *C. suffusus suffusus* (Lote VPA-0903 04-SEP-09, potencia de 141.53 DL₅₀/mL).



Grupos de equinos de inmunización: Se emplearon 21 equinos, los cuales pertenecen al grupo “VI de alacrán” y fueron divididos en tres grupos de siete caballos cada uno. Se inocularon con veneno polivalente de alacrán (VPA) en dosis crecientes según los esquemas de inmunización de refuerzo descrito en la sección correspondiente.

Sueros de equinos: Se obtuvieron los sueros a partir de muestras de sangre de cada uno de los equinos los días -5, 0, 3, 5, 7, 11, 16, 20, 21, 22, 24, 26, 33 y 40 del esquema.

b) EQUIPO

- Agitador magnético de tubos. Fisher-Brand, 12-812.
- Balanza analítica. Mettler Toledo, AT20.
- Campana de seguridad biológica clase II-A, Veco.
- Centrífuga refrigerada. Eppendorf, 5804R.
- Espectrofotómetro. Perkin Elmer, Lambda 35.
- Incubadora de 37 ± 1°C. Blinder.
- Lavadora de microplacas. TECAM-Hydroflex.
- Lector de ELISA, Labsystems Multiskan Plus.
- Micropipetas de volumen variable. Eppendorf.

- Potenciometro. Orion, 420A.
- Ultracongelador de $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$, Revco.

c) REACTIVOS

- Ácido sulfúrico 8N.
- Adyuvante (hidróxido de aluminio).
- Anticuerpos anti-IgG de caballo producido en cabra y conjugada a peroxidasa. Sigma Chemical, A9292.
- Cloruro de sodio cristales. Merck, 1.06404.
- Leche descremada en polvo. Svelty, Nestlé.
- Orto-feniléndiamina, Sigma Chemical.
- Peróxido de hidrógeno al 30%. Merck, 1.06097.
- Kit de reactivos para determinación de proteínas totales y albúmina sérica bovina. Sigma, B9043.
- Solución reguladora de carbonatos pH 9.3.
- Solución reguladora de fosfatos (PBS) 10mM, pH 7.4.
- Tween-20. Merck, 817072.

d) MATERIAL DIVERSO

- Jeringas desechables con capacidad para 10 mL.
- Placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano. Nunc-Immunosorb F96.
- Puntas para micropipetas de 1 a 20 μL , 10 a 200 μL y 100 a 1200 μL .
- Tubos para microcentrífuga de 1 y 2 mL. Eppendorf.
- Frascos PET desechables de 30 y 60 mL.

7.2 PROCEDIMIENTOS

7.2.1 OBTENCIÓN DEL VENENO POLIVALENTE DE ALACRÁN

Personal calificado del Herpetario de BIRMEX realiza el trabajo de campo desplazándose a las zonas de colecta de las especies de interés, para realizar la certificación de identidad. Las especies utilizadas en el INH para la producción del Faboterápico Polivalente Antialacrán (FPA) son *Centruroides noxius*, *C. limpidus limpidus* y *C. suffusus suffusus*.



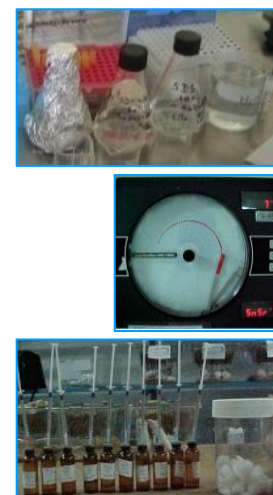
Figura 7. Recolección de especímenes de alacrán para su certificación de identidad.

Después de la identificación se prosigue a realizar el corte de los télsones en el sitio de la colecta y son trasladados en refrigeración al INH donde son lavados y macerados con solución salina.



Figura 8. Corte y maceración de télsones.

Posteriormente se realiza el tamizado del macerado y se clarifica la suspensión de veneno polivalente a través de filtración en membrana de 1.2, 0.8 y 0.45 μm . Finalmente se esteriliza la suspensión a través de filtración en membrana de 0.22 μm y se adiciona glicerina y tiomersal estéril como conservadores. Se deja reposar de 2 a 8°C durante 30 días y se le determina su potencia en dosis letales al 50% (DL_{50}) en modelo murino. (FEUM, 2011). Esta determinación fue realizada por personal calificado del Departamento de Control Biológico de BIRMEX. El veneno polivalente lote VPA-0903 se utilizó como antígeno para preparar los inóculos y para las determinaciones de anticuerpos por ELISA.



7.2.2 PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS

Los inóculos se prepararon en condiciones asépticas con el adyuvante como parte de su formulación y con potencias gradualmente ascendentes de veneno polivalente. La formulación específica de los inóculos se clasifica como reservada de acuerdo a la Ley de Transparencia y Acceso a la Información Pública.

Esta formulación se llevó a cabo en las instalaciones del INH dentro del Laboratorio de Antígenos pertenecientes a la Gerencia de Sueros de BIRMEX.



Figura 9. Preparación de inóculos para los tres grupos de equinos en estudio: esquema actual PAB1; esquemas a comparar PAB2 y PAB3.

7.2.3 ESQUEMAS DE INMUNIZACIÓN DE REFUERZO

En este estudio se trabajó con 21 equinos, los cuales se dividieron en tres grupos de 7 como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Distribución de equinos por esquema de inmunización

ESQUEMA DE REFUERZO	NÚMERO DE INÓCULOS	EQUINOS	EDAD PROMEDIO	PESO PROMEDIO
PAB1 (ESQUEMA ACTUAL)	5	3 machos 4 hembras	17 años	490 Kg
PAB2 (ESQUEMA A COMPARAR)	4	3 machos 4 hembras	16 años	470 Kg
PAB3 (ESQUEMA A COMPARAR)	3	3 machos 4 hembras	16 años	475 Kg

Se manejaron tres esquemas de inmunización de refuerzo usando dosis crecientes de VPA; un esquema corresponde al empleado por BIRMEX para la producción del faboterápico y se denominó como esquema actual (PAB1), mientras que los dos subsecuentes corresponden a dos esquemas a comparar derivados del primero (PAB2 y PAB3), cuyas diferencias se detallan en las Tablas 3 y 4.

En cada uno de los esquemas se evaluó el estado de salud de los equinos por personal veterinario, también se determinó la cinética de producción de anticuerpos IgG empleando la técnica de ELISA indirecta y se realizó la prueba de potencia empleando el modelo murino (DP_{50}); cabe señalar que ésta última prueba se llevó a cabo en dos puntos especificados en la Tabla 4 denominados como sangrías de prueba, siendo esta parte realizada por personal calificado del Departamento de Control Biológico del INH.

Para los tres esquemas de inmunización de refuerzo se construyeron las cinéticas de producción de anticuerpos IgG hasta el día 40. Adicionalmente, se realizó una sangría de prueba en el día 24 con la finalidad de evaluar el título de anticuerpos y si el estado de salud del equino lo permite, se procederá a realizar una cuarta plasmaféresis en el día 26 de los esquemas (Tabla 4).

Tabla 4. Esquemas de inmunización de refuerzo con Veneno Polivalente de Alacrán.

Día	PAB1 Esquema actual 7 equinos; 5 inóculos	PAB2 Esquema a comparar 7 equinos; 4 inóculos	PAB3 Esquema a comparar 7 equinos; 3 inóculos
-5*,**	Evaluación del Estado de Salud	Evaluación del Estado de Salud	Evaluación del Estado de Salud
0**	1° inóculo	1° inóculo	1° inóculo
3**	2° inóculo	No Aplica	No Aplica
5**	3° inóculo	2° inóculo	2° inóculo
7**	4° inóculo	3° inóculo	No Aplica
11**	5° inóculo	4° inóculo	3° inóculo
16***	Sangría de prueba	Sangría de prueba	Sangría de prueba
20**	1° Plasmaféresis	1° Plasmaféresis	1° Plasmaféresis
21**	2° Plasmaféresis	2° Plasmaféresis	2° Plasmaféresis
22**	3° Plasmaféresis	3° Plasmaféresis	3° Plasmaféresis
24*,***	Nueva Sangría de Prueba	Nueva Sangría de Prueba	Nueva Sangría de Prueba
26**	Plasmaféresis Propuesta	Plasmaféresis Propuesta	Plasmaféresis Propuesta
33**	Muestra de sangre	Muestra de sangre	Muestra de sangre
40**	Muestra de sangre	Muestra de sangre	Muestra de sangre

* Toma de muestra de sangre para la determinación del hemograma y perfil bioquímico de cada uno de los equinos (días -5 y 24).

** Toma de muestra de sangre para la determinación de IgG contra veneno polivalente de alacrán del género *Centruroides* mediante ELISA indirecta. Estos resultados son necesarios para la elaboración de las cinéticas de producción de anticuerpos.

*** Toma de muestra de sangre para determinación de IgG contra veneno polivalente de alacrán del género *Centruroides* mediante ELISA indirecta y determinación de pertinencia para realizar la plasmaféresis mediante la determinación de potencia por dosis protectoras al 50% (DP₅₀) de sueros equinos individuales (días 16 y 24).

Para llevar a cabo los esquemas de inmunización se realizaron las siguientes actividades:

7.2.3.1 Monitoreo del estado de salud de los equinos

Se realizó la valoración del estado de salud inicial de los equinos para saber si eran **aptos** de ser considerados en el programa de producción de plasmas hiperinmunes. Esta evaluación fue realizada por personal calificado de la UPPH de BIRMEX y los puntos a evaluar fueron:



a) Evaluación de la **Condición Física General** de cada equino:

- **Estado de carnes:** Las masas musculares deben ser lo suficientemente voluminosas para evitar que se aprecien salientes óseas.
- **Actitud del animal:** Se debe encontrar en estado de alerta y reaccionar adecuadamente a los estímulos del medio.
- **Expresión de los ojos:** No se debe apreciar manifestación de dolor o angustia.
- **Integridad de la piel:** No se deben apreciar laceraciones o áreas sin pelo.
- **Estado del pelo:** Debe ser brillante y suave.

Se determina la condición física general con base en la siguiente Tabla:

Tabla 5. Clasificación de la condición física general de los equinos

CONDICIÓN FÍSICA GENERAL	ESTADO DE CARNES	CARACTERÍSTICAS
Buena	No se observan las costillas, las apófisis espinosas de las vértebras torácicas, lumbares y sacras. Muestra excelente volumen en masas musculares del cuello y miembros.	Actitud en estado de alerta, reacción adecuada a los estímulos del medio, sin expresión de patologías en los ojos, piel intacta sin lesiones o áreas sin pelo, sin infecciones aparentes en la piel o pelo, buen apetito.
Regular	Se aprecian ligeramente las costillas y regular volumen de masas musculares del cuello y miembros.	Actitud en estado de alerta, reacción adecuada a los estímulos del medio externo, mirada atenta, ojos brillantes, sin patologías aparentes en el globo ocular, piel intacta sin lesiones, provista de pelo firme y brillante en su totalidad, sin infecciones aparentes, buen apetito.
Mala	Se observan las costillas y el volumen muscular en cuello y miembros es pobre.	Actitud apática, reacción inadecuada a los estímulos del medio externo, manifestación de dolor, mirada sin brillo y ausente, lesiones en la piel, áreas sin pelo, pelo hirsuto, opaco, apetito disminuido o ausente.

- b) Determinación del **Microhematocrito** de cada uno de los equinos, de acuerdo al procedimiento normalizado de operación de la UPPH.
- c) Revisión del **Historial Clínico** de cada uno de los equinos.
- d) Verificar en cada equino la ausencia de **Anticuerpos contra Anemia Infecciosa Equina**.

Finalmente, se dictamina si el caballo es apto o no con base en la siguiente Tabla:

Tabla 6. Especificaciones de aceptación del estado de salud de equino para la producción de sueros hiperinmunes.

CONDICIONES DEL EQUINO	CONDICIÓN FÍSICA GENERAL	MICROHEMATOCRITO	ANTICUERPOS CONTRA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA
Apto	Buena o regular	$\geq 32\%$	Ausente
No apto	Malo	$< 32\%$	Presente

7.2.3.2 Determinación del hemograma y perfil bioquímico equino

Se decidió realizar estas determinaciones antes de la administración de los inóculos y después de la tercera plasmaféresis, con la finalidad de determinar los efectos que produce la inoculación del veneno y las plasmaféresis sobre los componentes sanguíneos de los 21 equinos en estudio.

Las muestras de sangre se tomaron en los días marcados como -5 y 24 como se muestran en los esquemas de la Tabla 4. Las muestras fueron enviadas a un laboratorio especializado en patología clínica veterinaria (EXPERTO) donde se determinaron los diferentes componentes del hemograma (hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, VGM, fibrinógeno, etc.) y del perfil bioquímico (urea, CK, proteínas totales, albúmina, globulinas, calcio, creatinina, etc.).

Se realizó el análisis gráfico y estadístico (prueba de Fisher y *t* de Student) de los resultados obtenidos antes de la aplicación de los inóculos (día -5) y después de la tercera plasmaféresis (día 24), con el propósito de determinar si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre los principales parámetros obtenidos en el hemograma y perfil bioquímico con un 95% de confianza.

7.2.3.3 Inoculación de equinos

a) Preparación de los sitios de inoculación.

Se cepilló el costado de cada equino con almohaza y se procedió a realizar la tricotomía en forma de cuadro de 5 centímetros por lado en los espacios intercostales del caballo (Figura 10), los cuales se lavaron con solución jabonosa (Figura 11). Posteriormente se desinfectó el sitio de inoculación utilizando torundas con etanol al 70% (Figura 12).



Figura 10. Preparación del sitio de la inoculación.
(Tricotomía)



Figura 11. Lavado de los
sitios de inoculación.



Figura 12. Desinfección de
los sitios de inoculación.

b) Aplicación del inóculo.

El inóculo se homogenizó mediante agitación manual y se aplicó por vías subcutánea en los sitios previamente preparados, para ello se introdujo la aguja en forma inclinada por debajo de la piel formando un ángulo entre 30° y 45° con el cuerpo del equino, se depositó la cantidad correspondiente del inóculo (Figura 13). Se realizaron las punciones necesarias hasta concluir con el volumen total del inóculo por equino y la aguja fue eliminada en el contenedor para punzocortantes. Finalmente se aplicó pomada yodada para sellar el orificio de la punción y favorecer el aporte sanguíneo (Figura 14). Se realizó el mismo proceso de inoculación al resto de los caballos del grupo y se registró la actividad realizada.



Figura 13. Aplicación del inóculo por vía
subcutánea.



Figura 14. Aplicación de pomada yodada.

7.2.3.4 Sangría de prueba

Antes de realizar la cosecha de plasma (plasmaféresis) se realizó la sangría de prueba en el día 16 para determinar la pertinencia de realizar dicha cosecha (ver Tabla 4); el criterio para tomar la decisión consistió en evaluar la actividad neutralizante del suero de cada equino mediante la prueba de dosis protectoras al 50% (DP_{50}) que se realiza en ratones (FEUM, 2011). Cabe mencionar que esta prueba se describe únicamente como informativa en el anexo 1 y debido a su importancia, sólo es realizada por personal calificado del área de Control de Calidad de BIRMEX.

7.2.3.5 Plasmaféresis

Después de la evaluación de los resultados del estado de salud de cada equino y la prueba de potencia por DP_{50} en el día 16, se prosiguió a realizar la cosecha del plasma (plasmaféresis) en los días 20, 21 y 22 como se indica en la Tabla 4. La metodología de la plasmaféresis se describe en el anexo 2.

7.2.4 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgG CONTRA VENENO POLIVALENTE DE ALACRÁN MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA

a) Determinación de la concentración proteica del veneno polivalente de alacrán del género *Centruroides* lote VPA0903.

Para la sensibilización de las placas empleadas en las pruebas de ELISA, se requiere del conocimiento de la concentración proteica del antígeno (veneno) que será utilizado para la determinación de anticuerpos. La concentración de proteínas del VPA se determinó empleando el método del ácido bicinconínico (BCA) en tubo (Sigma Technical Bulletin), para lo cual se construyó una curva de calibración empleando una solución estándar de albúmina sérica bovina (Sigma Chemical) desde 0 hasta 50 μ g. La curva de calibración y la muestra a analizar se realizaron por triplicado.

En los tubos para la muestra se colocaron 200 μ L de las diluciones del lote de VPA o de los estándares, posteriormente se adicionaron 2 mL del reactivo para el ensayo de proteínas del BCA (50 partes del reactivo A: carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, reactivo para detección del BCA y tartrato de sodio en NaOH 0.2 N; con una parte del reactivo B: solución de sulfato de cobre al 4%). Los tubos de reacción fueron incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 minutos y se determinó la absorbancia (A_s) a 562 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Precisely). La concentración de proteína de cada veneno se determinó interpolando la absorbancia obtenida para cada dilución en la

curva de calibración. Una vez conocida la concentración proteica del veneno polivalente, se ajustó a una concentración de 4 mg/mL con solución salina isotónica y fueron envasados en viales con alícuotas de 20 μ L, conservándose a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ hasta su uso.

b) Obtención y procesamiento de muestras de sangre para la determinación de anticuerpos IgG.

Se tomaron muestras de sangre a cada uno de los 21 equinos pertenecientes a los tres grupos en estudio (PAB1, PAB2, PAB3), los días -5, 0, 3, 5, 7, 11, 16, 20, 21, 22, 24, 26, 33 y 40 (Figura 15) conforme a la Tabla 4. Los sueros fueron separados mediante centrifugación a 1,500 rpm durante dos minutos y almacenados a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ en viales de 2 mL.

Estos sueros de equinos fueron empleados para la determinación del contenido de anticuerpos de clase IgG contra el veneno polivalente de alacrán (*C. noxius*, *C. limpidus limpidus* y *C. suffusus suffusus*), utilizando la técnica de enzoinmunoanálisis indirecto (ELISA, por las siglas en inglés de Enzyme Linked Immunosorbent Assay) descrito por Engvall y Perlman, en 1971 (Figura 16).



Figura 15. Muestras de sangre de los equinos en estudio.

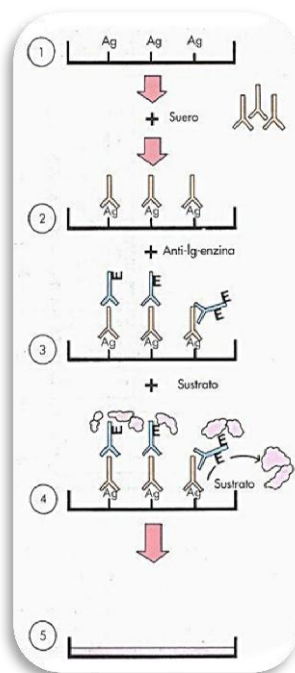


Figura 16. Enzoinmunoanálisis para la determinación de anticuerpos. (Murray, 2007).

1. El antígeno (veneno polivalente de alacrán) se fija a la superficie del pozo;
2. Se agrega la dilución del suero del equino en estudio y se permite que se una al antígeno, los anticuerpos no fijados se eliminan a través de un lavado;
3. Se adiciona anticuerpo anti-IgG de caballo conjugado con una enzima (peroxidasa) y el anticuerpo no fijado se elimina por medio de lavado;
4. Se agrega el sustrato de la enzima y cromóforo;
5. Existe una reacción oxido-reducción y el cromóforo vira de color.

c) Optimización de la técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos IgG contra veneno polivalente de alacrán.

La cantidad de antígeno para la sensibilización de las placas así como las diluciones del anticuerpo primario (suero de prueba) y secundario (conjugado anti-IgG de caballo obtenido en cabra), fueron estandarizadas previas a las titulaciones de los sueros problema. El antígeno que fue utilizado para sensibilizar las placas fue el mismo lote de veneno polivalente de alacrán (VPA-0903) que el empleado para la inmunización de los equinos.

Para la estandarización de la técnica se ensayaron tres concentraciones de antígeno (0.1, 0.5 y 1.0 µg de veneno de alacrán lote VPA-0903) para la sensibilización de los pozos de la placa y cinco diluciones del primer y segundo anticuerpo (1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:12000 y 1:16000). La metodología se describe en detalle más adelante.

d) Cinética de producción de anticuerpos IgG antiveneno polivalente de alacrán.

Con base a los resultados de la estandarización de la técnica de ELISA, se emplearon 0.5 µg de antígeno para la sensibilización de placas, así como las diluciones 1:8000 del primer y segundo anticuerpo para la elaboración de las cinéticas de producción de IgG contra VPA. La preparación de soluciones y reactivos para la realización de las pruebas se muestra en el Anexo 3.

La metodología de la determinación de anticuerpos IgG contra VPA en las catorce muestras de suero obtenidas por cada equino se describe en el Anexo 4.

7.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo y gráfico para determinar el comportamiento de las variables (hemograma, perfil bioquímico, producción de anticuerpos IgG antiveneno de alacrán) dentro de cada grupo en estudio (PAB1, PAB2 y PAB3).

Para el análisis de los resultados del perfil bioquímico y hemograma equino se realizó la prueba de Fisher para determinar la variabilidad entre los grupos de comparación así como la prueba de *t* de Student para establecer si los promedios de los resultados existen diferencias entre los grupos de equinos antes de aplicar el esquema de inmunización y después de la tercera plasmaféresis. Para todos los análisis se utilizó un intervalo de confianza al 95% y los resultados menores o iguales a 0.05 se consideran estadísticamente significativos.

Con respecto al análisis de los resultados de las cinéticas de producción de anticuerpos IgG antiveneno de alacrán de los tres esquemas en estudio, se realizó mediante la Prueba de Hipótesis comparando dos medias poblaciones para muestras pequeñas e independientes (Hoel, 1974), con la finalidad de conocer cuál de los esquemas de comparación (PAB2 ó PAB3) es mejor que el esquema actual (PAB1) o si existe diferencia significativa entre ellos con una confianza del 95%.

Hipótesis nula:

H_0 = No hay diferencia en la producción de anticuerpos IgG antiveneno polivalente de alacrán entre el esquema actual (PAB1) y el esquema a comparar (PAB2 o PAB3)

$$H_0 = (\mu_1 = \mu_2)$$

Hipótesis alterna:

H_i = Sí hay diferencia en la producción de anticuerpos IgG antiveneno polivalente de alacrán entre el esquema actual (PAB1) y el esquema a comparar (PAB2 o PAB3)

$$H_i = (\mu_1 \neq \mu_2)$$

Región de rechazo:

Se rechaza hipótesis nula (H_0) si $t_c > t_{\alpha/2}$ o $t_c < -t_{\alpha/2}$

En donde t_c es el valor de t calculado,

En donde t_{α} tiene (n_1+n_2-2) grados de libertad, y

El valor de α es el valor de p al 0.05

Estadística de prueba:

$$t_c = \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2)}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad S_p = \sqrt{s_p^2}$$

Muestra de tamaño n_1 , de la población 1 con media $\bar{Y}_1$ y varianza s_1^2 .

Muestra de tamaño n_2 , de la población 2 con media $\bar{Y}_2$ y varianza s_2^2 .

VIII. RESULTADOS

8.1 DIFERENCIAS ENTRE LOS ESQUEMAS DE INMUNIZACIÓN.

Se seleccionaron 21 equinos pertenecientes al grupo “Alacrán VI” los cuales fueron aptos para inmunizar debido a que se encontraron en condiciones óptimas de salud. Los equinos fueron divididos en tres grupos procurando que fueran homogéneos con respecto a la edad y sexo del animal, quedando 3 machos y 4 hembras en cada grupo (Tabla 3). Los 21 equinos fueron numerados consecutivamente empezando con los del esquema PAB1 y terminado con el esquema PAB3.

Tres esquemas de inmunización de refuerzo fueron aplicados usando como antígeno el veneno polivalente de alacrán lote VPA-0903 en dosis crecientes. La diferencia entre los esquemas de refuerzo es el número de inóculos aplicados como se observa en la Tabla 4.

- a) Esquema actual PAB1, con aplicación de 5 inóculos.
- b) Esquema a comparar PAB2, con aplicación de 4 inóculos.
- c) Esquema a comparar PAB3, con aplicación de 3 inóculos.

Durante la aplicación de los inóculos, el caballo número 7 perteneciente al grupo PAB1, no completó el esquema debido a que después de la tercera inoculación, presentó un cuadro de hipersensibilidad cutánea y por su seguridad se excluyó del grupo, por lo que los cálculos estadísticos para este grupo tendrán un valor de $n=6$ equinos.

Los 20 equinos restantes completaron los esquemas de inoculación y concluyeron el estudio hasta los 40 días posteriores a la primera inoculación. Por lo que la los grupos PAB2 y PAB3 tienen una $n=7$ equinos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la evaluación del hemograma y perfil bioquímico equino antes de la aplicación de los inóculos (día -5) y después de la tercera plasmaféresis (día 24).

8.2 RESULTADOS DEL HEMOGRAMA Y PERFIL BIOQUÍMICO EQUINO.

La determinación de los parámetros (analitos) del hemograma y perfil bioquímico de cada equino fue realizado por un laboratorio externo certificado (EXPERTO, profesionales en patología clínica veterinaria).

Debido a la gran cantidad de resultados, en esta sección sólo se muestra un resumen de los resultados de la comparación entre los valores obtenidos en el día -5 (antes de la aplicación de los inóculos) y el día 24 (después de la tercera plasmáfesis), empleando la *prueba de Fisher* y *prueba t de Student* (Tabla 7), así como el análisis gráfico de los valores obtenidos del hematocrito y la globulina sérica (Figuras 17 y 18). Los resultados detallados así como el análisis gráfico y estadístico de los analitos determinados se muestran en los anexos 5 y 6.

Tabla 7. Resumen del análisis estadístico de los principales parámetros evaluados en el Hemograma y Perfil Bioquímico, comparando el día -5 con el día 24 del estudio.

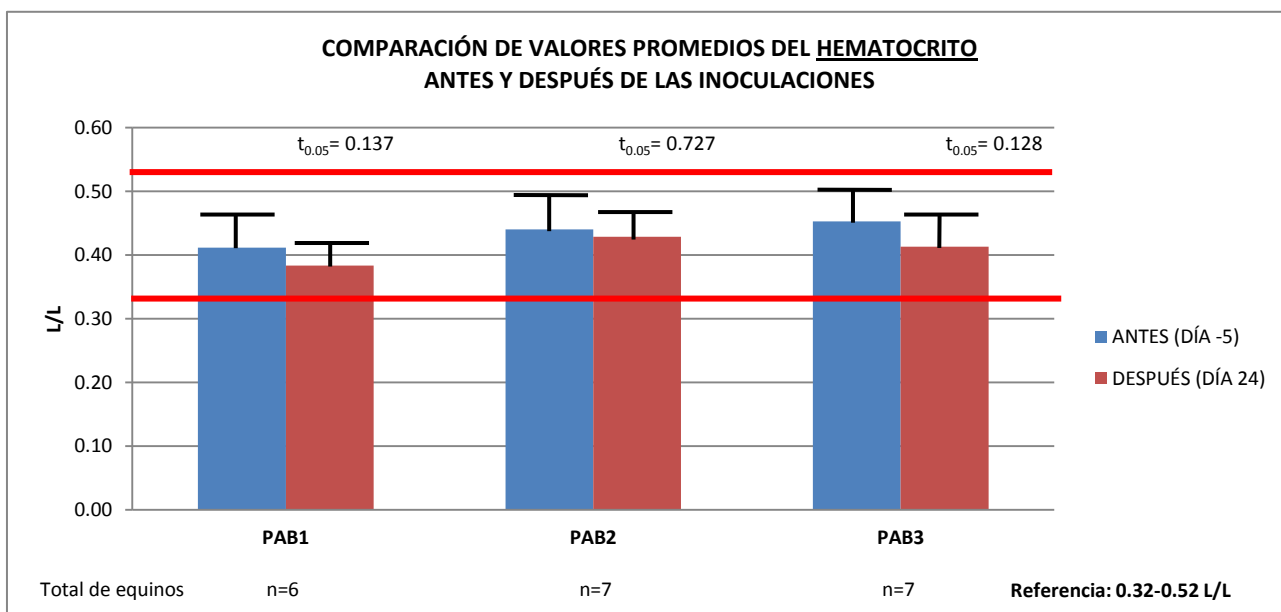
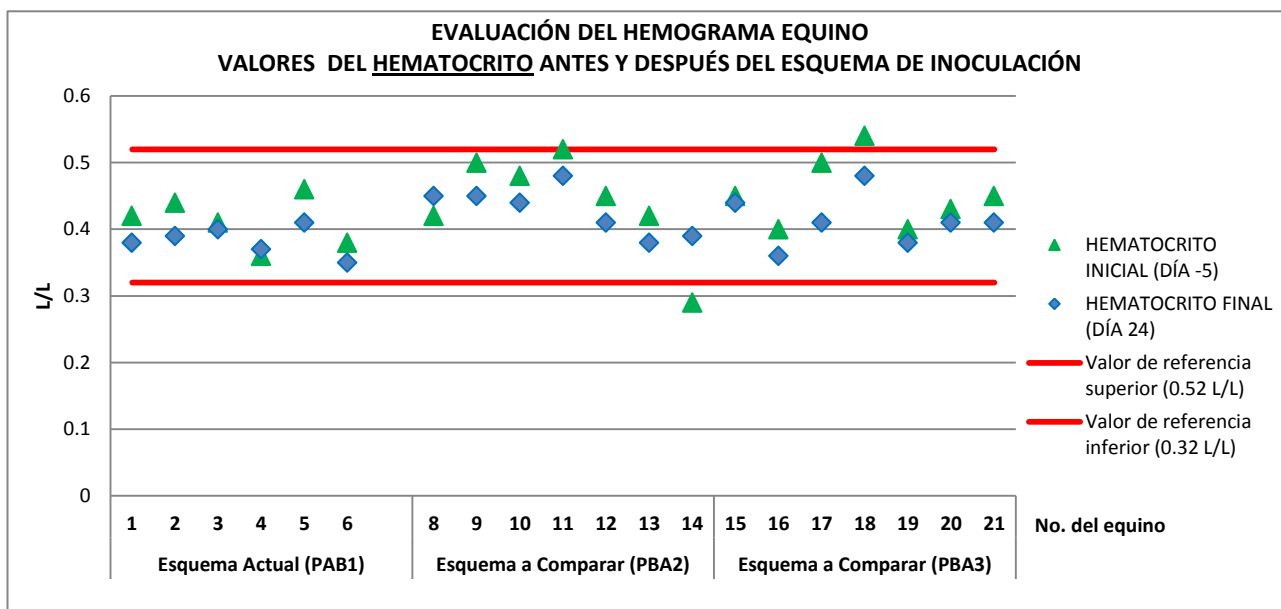
ANALITO	ESQUEMA ACTUAL (PAB1)		ESQUEMA (PAB2)		ESQUEMA (PAB2)	
	*Prueba de Fisher	**Prueba t de Student	*Prueba de Fisher	**Prueba t de Student	*Prueba de Fisher	**Prueba t de Student
HEMOGRAMA						
HEMATOCRITO	0.130	0.137	0.064	0.727	0.258	0.128
HEMOGLOBINA	0.167	0.113	0.082	0.344	0.123	0.265
ERITROCITOS	0.334	0.171	0.090	0.639	0.144	0.181
VGM	0.296	0.835	0.486	0.311	0.159	0.871
CGMH	0.432	0.105	0.080	0.386	0.070	0.362
FIBRINOGENO	0.286	1.000	0.210	0.822	0.081	0.278
PERFIL BIOQUÍMICO						
UREA	0.092	0.778	0.118	0.017	0.476	0.138
BILIRRUBINA TOTALES	0.471	0.061	0.028	0.331	0.353	0.394
CK	0.202	0.167	0.315	0.436	0.246	0.016
PROTEINAS TOTALES	0.005	0.021	0.377	0.004	0.148	0.002
ALBUMINA	0.003	0.209	0.092	0.001	0.163	0.0001
GLOBULINAS	0.002	0.029	0.373	0.0001	0.004	0.018

* Valores menores de 0.05 en la prueba de Fisher indican que la variación de los resultados obtenidos entre el día -5 y el día 24 es diferente significativamente.

** Valores menores de 0.05 en la prueba de t de student indican que las medias poblacionales de los resultados obtenidos entre el día -5 y el día 24 son diferentes significativamente.

En la Tabla 7 se comprueba que los parámetros analizados en el hemograma equino, no presentan diferencia significativa entre sus valores promedios obtenidos antes de la aplicación de los inóculos (día -5) y después de la tercera plasmáfesis (día 24) como se observa en la Figura 17, en donde se muestra gráficamente que el hematocrito no se ve afectado significativamente.

Caso diferente se observa en el caso del perfil bioquímico con respecto a las proteínas totales, albúmina y globulinas séricas (Tabla 7), en donde si existen diferencias significativas de los valores promedios obtenidos entre el día -5 y el día 24, un ejemplo se ilustra en la Figura 18, donde se comprueba un incremento significativo de las globulinas sérica después de la aplicación de los esquemas de inmunización de refuerzo.



Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	0.130	0.137
PAB2	0.064	0.727
PAB3	0.258	0.128

Figura 17. Análisis gráfico y estadístico de los resultados del **hematocrito** equino a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y *t* de Student obtenidos al comparar los datos del **hematocrito** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio, mostrando que no existen diferencias significativas de los valores promedios obtenidos entre el día -5 y el día 24.

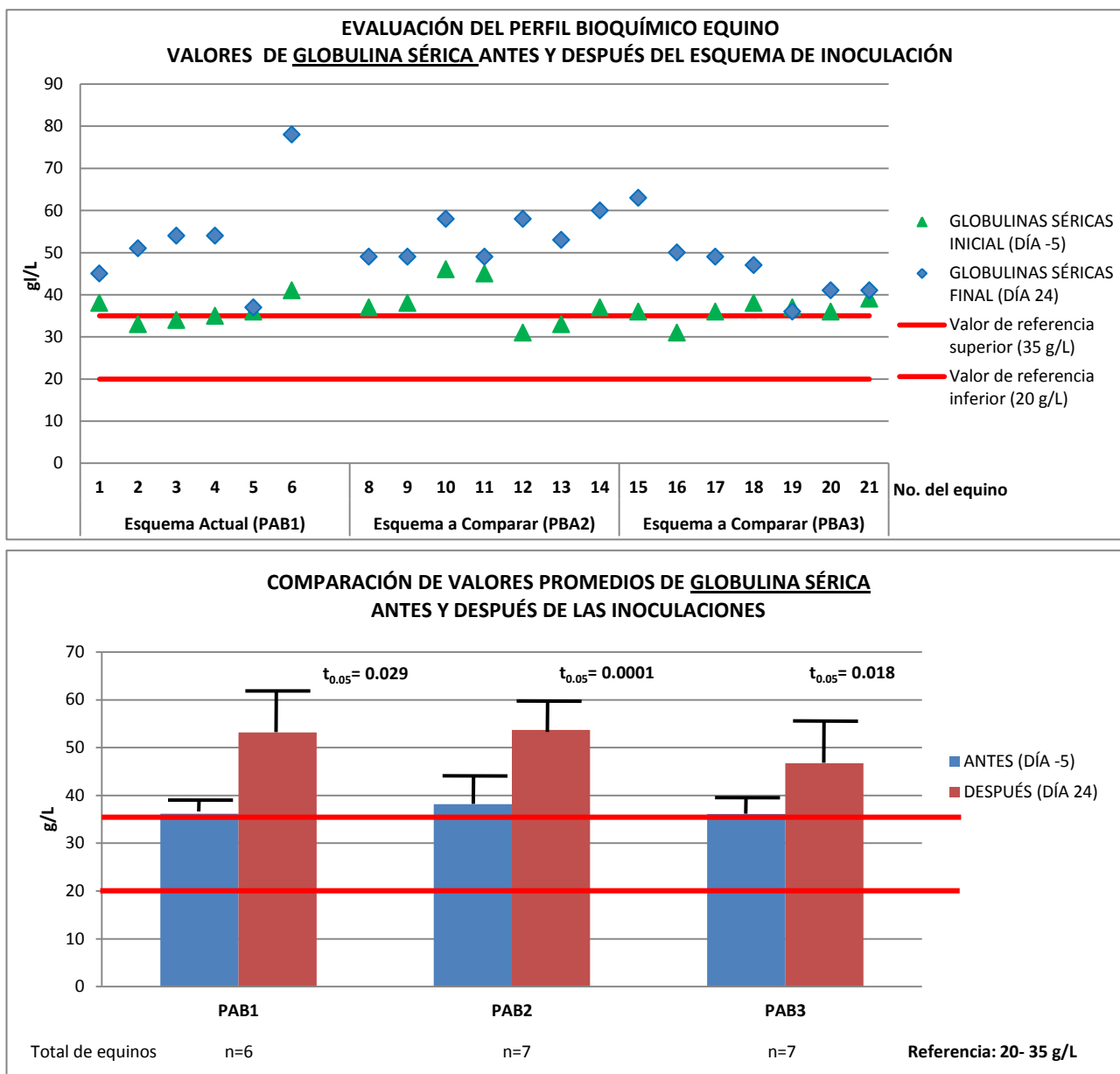


Figura 18. Análisis gráfico de los resultados de la concentración de **globulina sérica** equina a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y t de Student obtenidos al comparar los datos de la concentración de **globulinas séricas** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio. *Valores < 0.05, existe diferencia estadística al 95% de confianza entre los valores promedios obtenidos en el día -5 y el día 24.

8.3 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgG CONTRA VENENO POLIVALENTE DE ALACRÁN DEL GÉNERO *Centruroides* MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA

8.3.1 Determinación de la concentración proteica del veneno polivalente de alacrán

Para la detección de anticuerpos por la técnica de ELISA, primero fue necesario determinar la concentración proteica del lote de veneno polivalente de alacrán VPA0903. Para ello se empleó la técnica del BCA en tubo obteniéndose la siguiente curva de calibración y resultado:

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CONCENTRACIÓN PROTEICA (BCA)

TUBO	Proteína (µg)	Absorbancia a 562 nm	Promedio
1	0.00	0.0671	0.07173
		0.0698	
		0.0783	
2	6.25	0.1565	0.16867
		0.1879	
		0.1616	
3	12.50	0.2332	0.23113
		0.2249	
		0.2353	
4	25.00	0.3751	0.37273
		0.3673	
		0.3758	
5	37.50	0.4987	0.50430
		0.5049	
		0.5093	
6	50.00	0.6235	0.64087
		0.6470	
		0.6521	

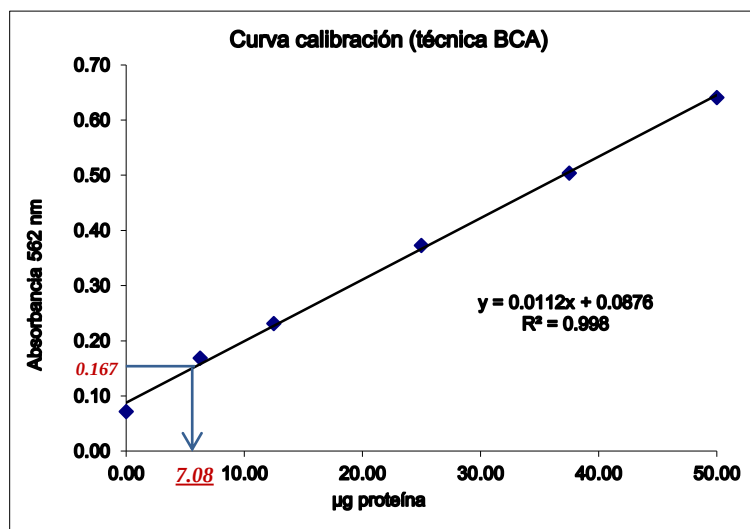


Figura 19. Curva de calibración para la determinación de la concentración proteica en el veneno polivalente de alacrán por la técnica del ácido bicinonínico en tubo (BCA).

Al interpolar el resultado promedio de absorbancia obtenido de la muestra de VPA (0.1669), arrojó un resultado de 7.08 µg/µL de proteína para el lote VPA0903.

8.3.2 Optimización de la técnica de ELISA indirecta.

Para este propósito, primeramente se determinó la concentración proteica óptima del veneno polivalente de alacrán para sensibilizar las placas de ELISA. Se ensayaron las concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 μg de veneno y se emplearon los sueros del día 20 de los equinos 2 y 6 debido a que pertenecen al esquema PAB1, los cuales recibieron mayor número de inóculos de refuerzo. Se manejó la dilución 1:8000 tanto para el primero como para el segundo anticuerpo.

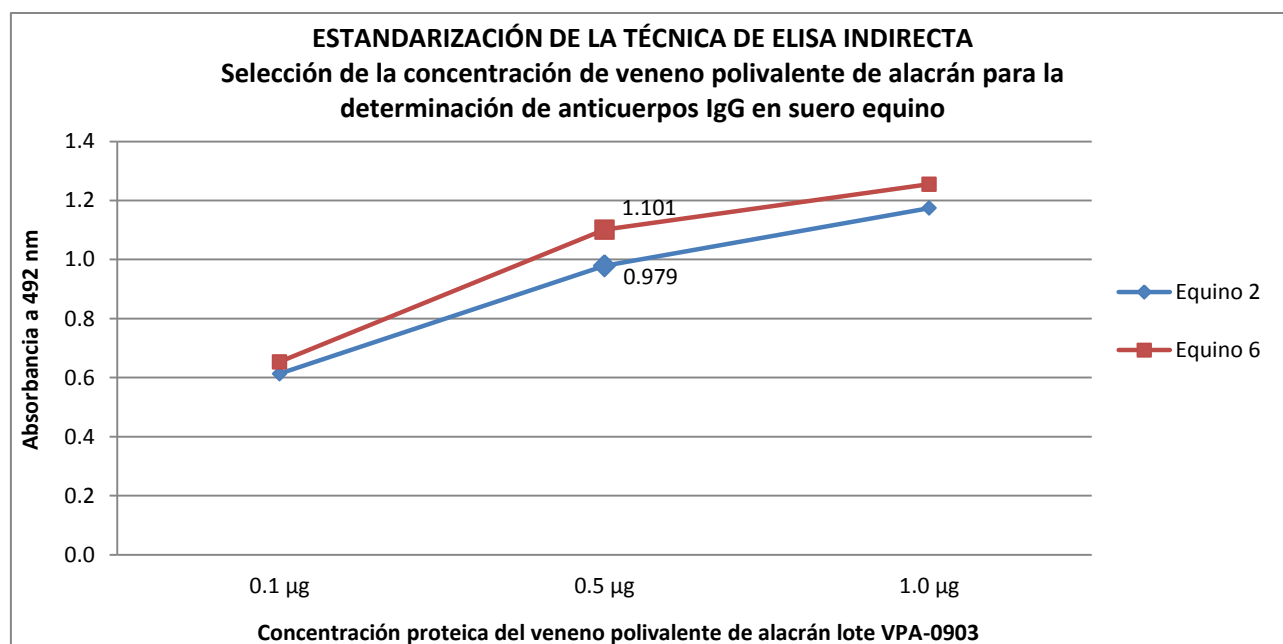


Figura 20. Selección de la concentración de antígeno para la detección de anticuerpos IgG antiveneno polivalente de alacrán mediante la técnica de ELISA. La dilución utilizada para el primer y segundo anticuerpo fue 1:8000 y se emplearon los sueros de los equinos 2 y 6 del esquema actual (PAB1).

Los resultados muestran que al emplear la concentración de 0.5 μg de proteína (VPA) por pozo, los valores de absorbancia caen entre la valor medio de la escala de absorbancia que es de 0.0 a 2.0.

Posteriormente se ensayaron diferentes diluciones del primer y segundo anticuerpo para elegir la dilución que arroje resultados de absorbancia de alrededor de 1.0 en la detección de IgG antiveneno de alacrán. Se utilizó el suero del día 20, del caballo número 6 perteneciente al grupo PAB1 debido a que en el día 20 del esquema se espera una mayor concentración de anticuerpos, además de que fue uno de los equinos que recibió los cinco inóculos y presentaron resultados dentro de especificaciones en el hemograma y perfil bioquímico.

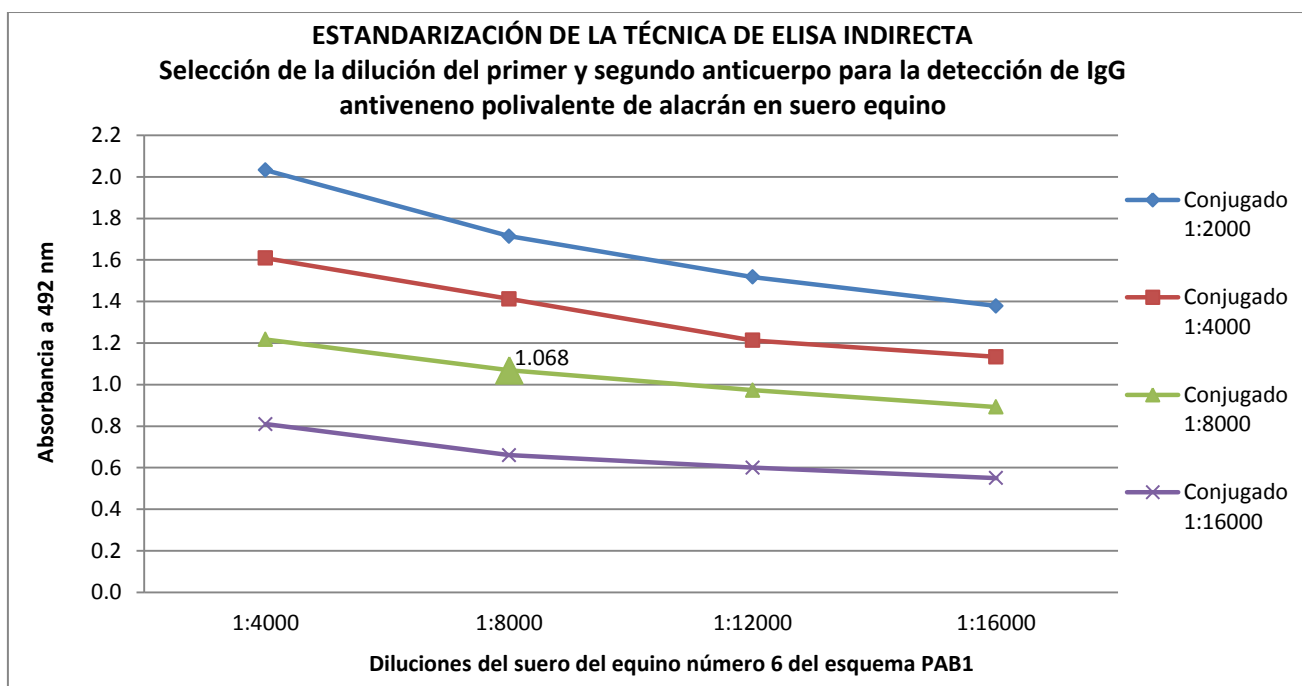


Figura 21. Selección de la dilución del primer y segundo anticuerpo para la detección de anticuerpos IgG antiveneno polivalente de alacrán. Se sensibilizaron las placas con 0.5 µg/pozo del veneno lote VPA0903 y el suero empleado fue del día 20 del equino 6 perteneciente al esquema actual PAB1.

Los resultados de la estandarización de la técnica de ELISA mostraron que:

- ✓ La concentración seleccionada de veneno polivalente de alacrán para sensibilizar los pozos de las placas fue de 0.5 µg.
- ✓ La dilución seleccionada del primer anticuerpo (suero equino antiveneno de alacrán) fue de 1:8000.
- ✓ La dilución seleccionada del segundo anticuerpo (conjugado: anti-IgG de equino producido en cabra y unido a peroxidasa de rábano) fue de 1:8000.

Los resultados de las cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra VPA se muestran a continuación.

8.3.3 Cinética de producción de anticuerpos IgG antiveneno polivalente de alacrán por la técnica de ELISA indirecta.

a) Cinéticas de producción de IgG contra VPA empleando el esquema de inmunización actual (PAB1) con 5 inóculos.

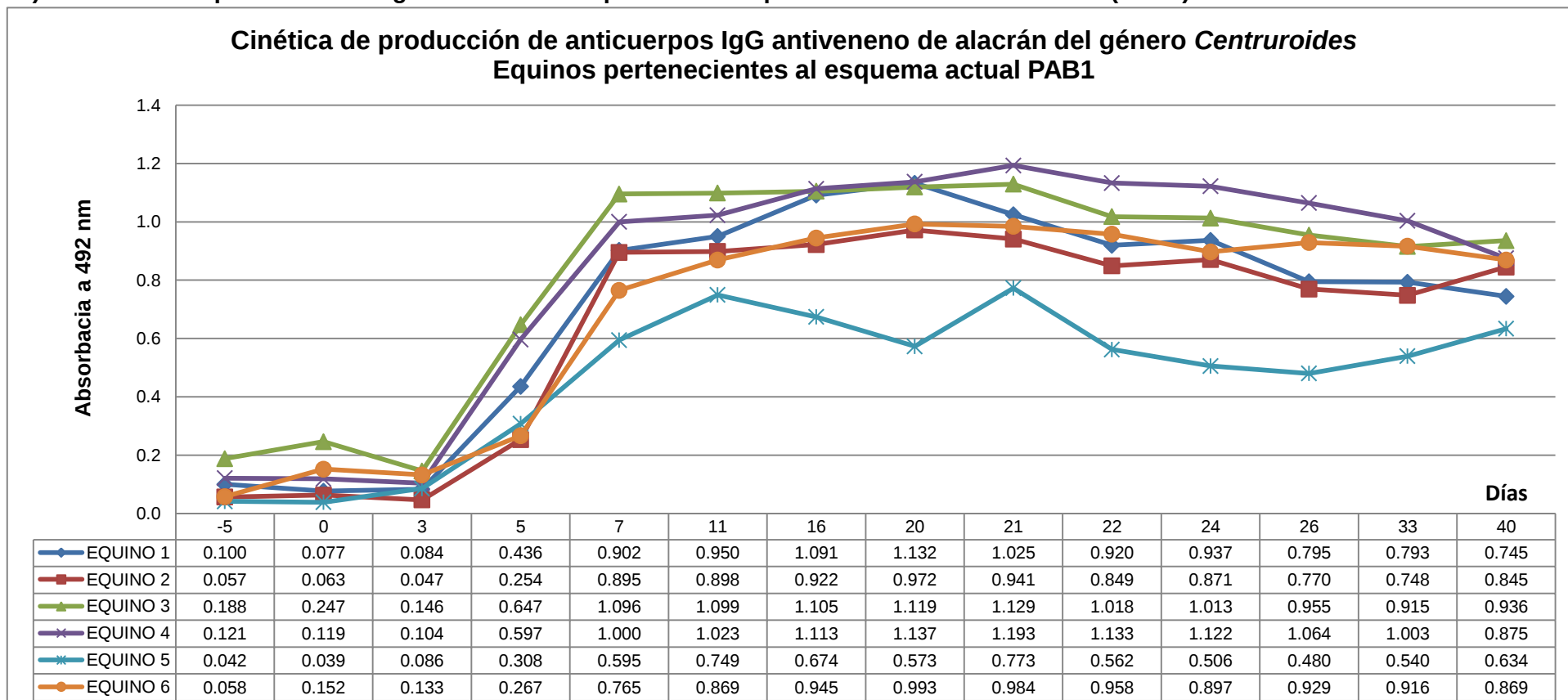


Figura 22. Cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra VPA del género *Centruroides* por equino, pertenecientes al grupo de inmunización **PAB1** (esquema actual). El monitoreo fue realizado desde el día cinco antes de la primera inoculación hasta el día cuarenta. Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con 0.5 µg/pozo del veneno de alacrán lote VPA0903 y se utilizó una dilución 1:8000 para el primer y segundo anticuerpo. En la tabla se muestran los valores promedio de las absorbancias obtenidos a 492 nm por triplicado de las muestras de suero de los equinos que recibieron el esquema PAB2. Se descartó los resultados del equino número 7 debido a que en la tercera aplicación del inóculo presentó reacción de hipersensibilidad cutánea, por lo cual se decidió retirarlo del estudio, por lo tanto, el esquema actual PAB1 se manejó solamente con una n=6 equinos para los estudios estadísticos.

b) Cinéticas de producción de anticuerpos IgG obtenidas empleando el esquema de inmunización a comparar PAB2.

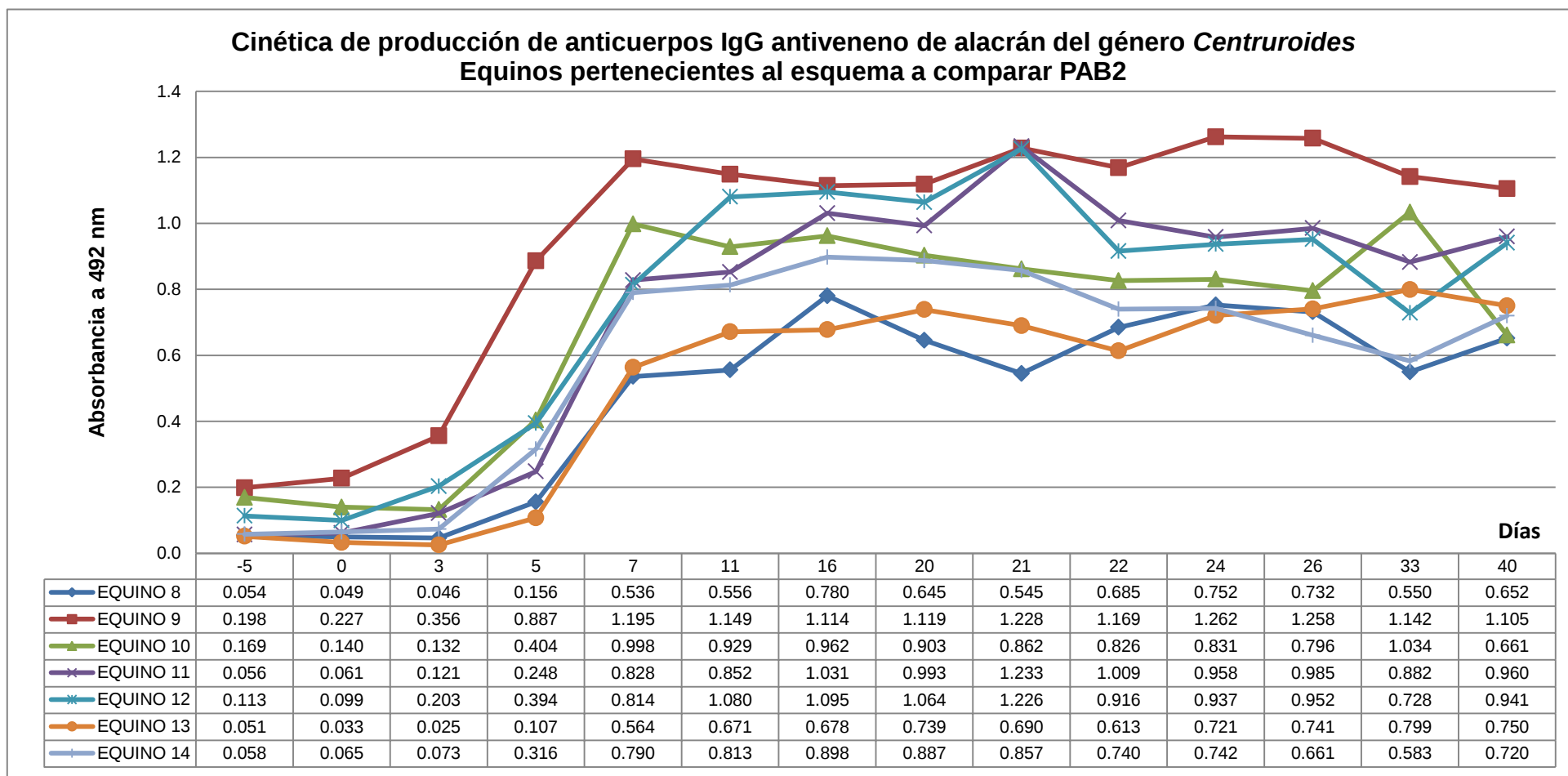


Figura 23. Cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra VPA del género *Centruroides* por equino, pertenecientes al esquema de inmunización a comparar PAB2. El monitoreo fue realizado desde el día cinco antes de la primera inoculación hasta el día cuarenta. Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con 0.5 µg/pozo del veneno de alacrán lote VPA0903 y se utilizó una dilución 1:8000 para el primer y segundo anticuerpo. En la tabla se muestran los valores promedio de las absorbancias obtenidos a 492 nm por triplicado de las muestras de suero de los equinos que recibieron el esquema PAB2.

c) Cinéticas de producción de anticuerpos IgG obtenidas empleando el esquema de inmunización a comparar PAB3.

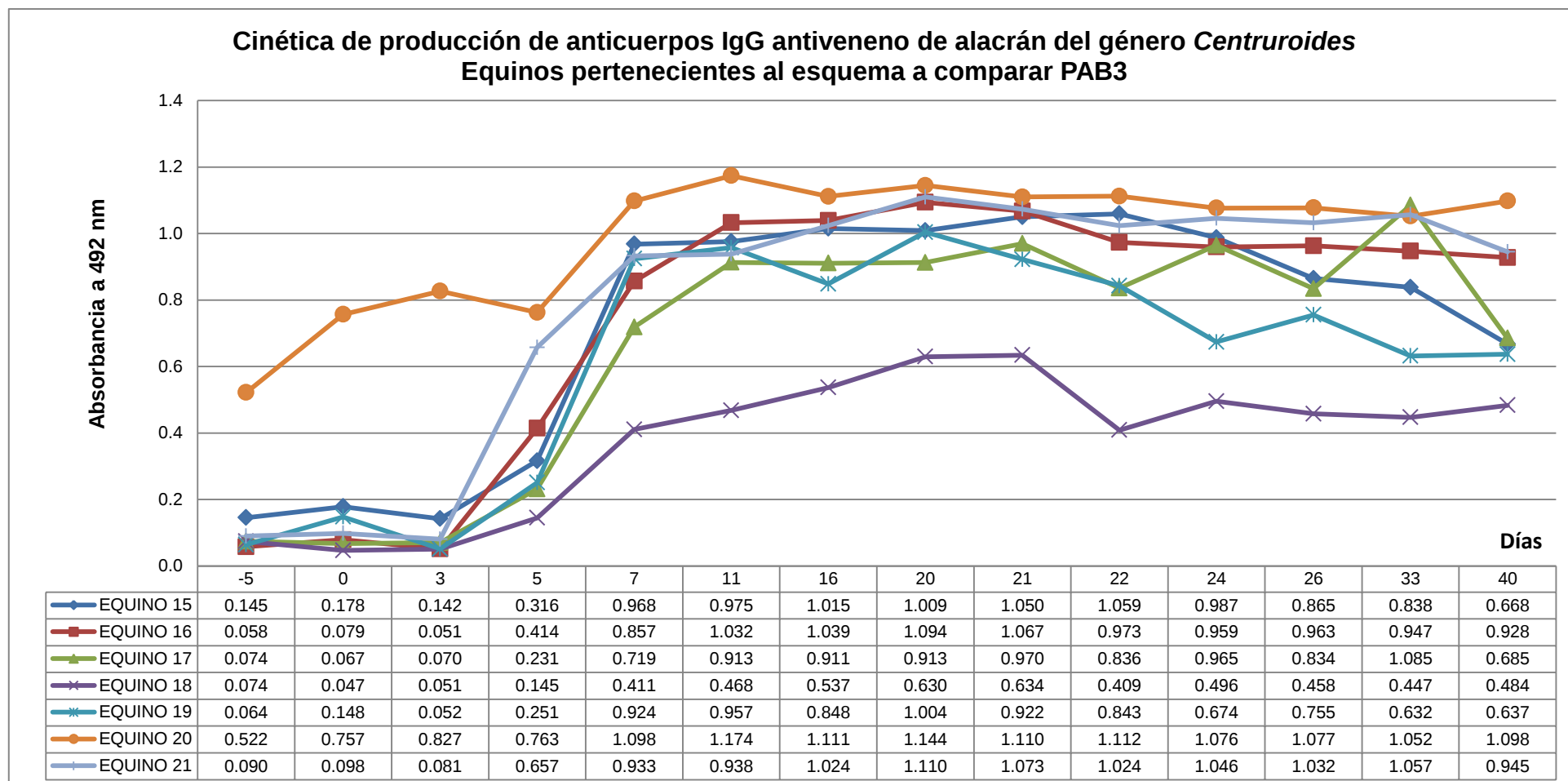


Figura 24. Cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra VPA del género *Centruroides* por equino, pertenecientes al esquema de inmunización a comparar PAB3. El monitoreo fue realizado desde el día cinco antes de la primera inoculación hasta el día cuarenta. Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con 0.5 µg/pozo del veneno de alacrán lote VPA0903 y se utilizó una dilución 1:8000 para el primer y segundo anticuerpo. En la tabla se muestran los valores promedio de las absorbancias obtenidos a 492 nm por triplicado de las muestras de suero de los equinos que recibieron el esquema PAB2.

d) Valores promedio de las cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra VPA obtenidos en los tres esquemas de inmunización.

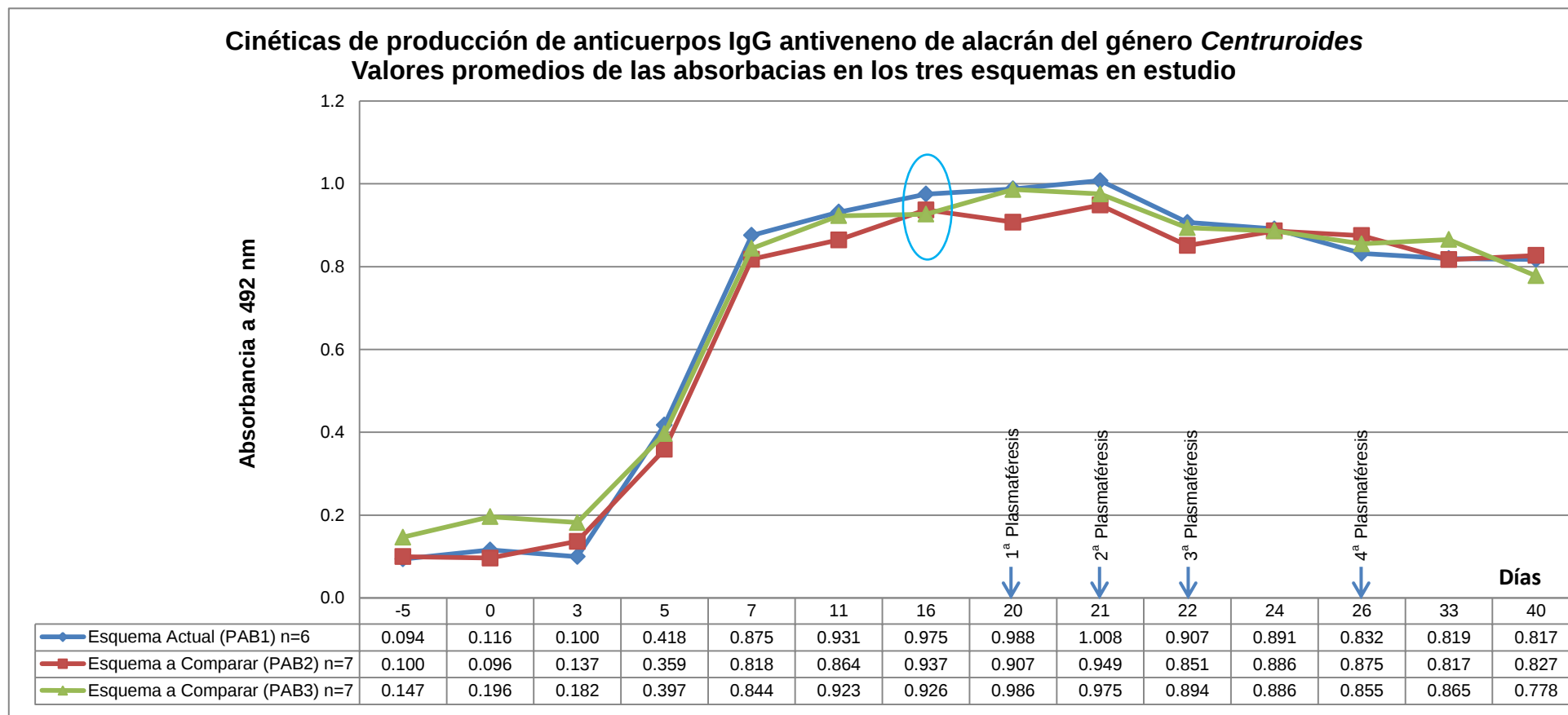


Figura 25. Cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra VPA del género *Centruroides* de los esquemas de inmunización actual (**PAB1**) y a comparar (**PAB2** y **PAB3**). El monitoreo fue realizado desde el día cinco antes de la primera inoculación hasta el día cuarenta. Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con 0.5 µg/pozo del veneno de alacrán lote VPA0903 y se utilizó una dilución 1:8000 para el primer y segundo anticuerpo. En la tabla se muestran los valores promedios de los resultados de las absorbancias a 492nm por cada grupo de equinos en estudio. En el esquema actual se descartó los resultados del equino número 7 debido a que no completó las cinco inoculaciones por presentar reacción de hipersensibilidad cutánea, por lo tanto, el esquema actual **PAB1** se manejó con una n=6 equinos. Para los esquema PAB2 y PAB3 son el promedio de los resultados de los 7 equinos (n=7).

e) Comparación gráfica y estadística de las cinéticas de producción de anticuerpos IgG entre los esquemas PAB1-PAB2 y PAB1-PAB3 en los días 20, 21, 22 y 26 del esquema.

Para realizar la comparación de las cinéticas de producción de anticuerpos, se seleccionaron los días 20, 21, 22 y 26 debido a que son las fechas cuando se realizan las cosechas de sangre (plasmaféresis) de los equinos (Tabla 4 y Figura 25). Cabe mencionar que la concentración de anticuerpos detectados es directamente proporcional a la absorbancia determinada a 492 nm, es decir, a mayor valor de la absorbancia obtenida en los ensayos de ELISA, mayor es la concentración de anticuerpos IgG antiveneno de alacrán presentes en la muestra.

Para comprobar la existencia de diferencias significativas en estos resultados, se utilizó el método de **Prueba de Hipótesis** de comparación de dos medias poblaciones para muestras pequeñas e independientes (Hoel, 1974), la cual menciona que:

Consiste de n_1 unidades experimentales del tratamiento 1 con media μ_1 , y varianza σ_1^2 , y de n_2 unidades del tratamiento 2, con media μ_2 , y varianza σ_2^2 . Los datos que se van a examinar consisten de las mediciones de las respuestas (absorbancia a los 492 nm), de los $(n_1 + n_2)$ sujetos de los 2 tratamientos. Cada miembro del primer grupo recibe el tratamiento 1 y cada uno del segundo grupo, el tratamiento 2. El objetivo es hacer una prueba de hipótesis de la diferencia entre dos medias poblacionales $(\mu_1 - \mu_2)$.

Las muestras son independientes, en el sentido de que las mediciones de la respuesta bajo el primer tratamiento no están relacionadas con las mediciones de respuesta bajo el otro tratamiento. Además de estas suposiciones, en el método para muestras pequeñas, se supone que ambas poblaciones tienen una distribución de probabilidad que es normal y sus varianzas son iguales $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$. Suponer que las varianzas son iguales, significa que la variabilidad de las mediciones, en las dos poblaciones o tratamientos es la misma y puede ser medida con una varianza común, es decir, $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma^2$. Se realizó la prueba de Fisher para comprobar este último supuesto.

La varianza común σ^2 , se puede estimar combinando la información de ambas muestras, con lo que obtenemos una varianza estimada S_p , que se calcula de la siguiente forma:

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

En donde:

Muestra de tamaño n_1 , de la población 1 con media $\bar{Y}_1$ y varianza S_1^2 .

Muestra de tamaño n_2 , de la población 2 con media $\bar{Y}_2$ y varianza S_2^2 .

La Hipótesis nula es $H_0: \mu_1 = \mu_2$ y la Hipótesis alternativa o de investigación es $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

$$\text{Estadística de prueba: } t_{\text{calculada}} = t_c = \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2)}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Región de rechazo: Se rechaza H_0 si $t_c > t_{\alpha/2}$ o $t_c < -t_{\alpha/2}$

En donde t_{α} tiene $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad.

Se ejemplificará un caso para la determinación de la $t_{\text{calculada}}$ (t_c) y los restantes resultados de t_c sólo se mostraran en las posteriores figuras.

EJEMPLO PARA LA COMPARACIÓN DE LOS ESQUEMAS PAB1 Y PAB2 EN EL DÍA 20:

Hipótesis nula:

H_0 : No hay diferencia en la producción de anticuerpos IgG en el día 20 de la cinética, entre el esquema actual (PAB1) y el esquema a comparar PAB2 con una confianza del 95%. Es decir:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

Hipótesis alterna:

H_1 : Hay diferencia en la producción de anticuerpos IgG en el día 20 de la cinética, entre el esquema actual (PAB1) y el esquema a comparar PAB2 con una confianza del 95%. Es decir:

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Cálculos:

	Datos del día 20 (esquema PAB1)	Datos del día 20 (esquema PAB2)
Promedio de absorbancias:	$\bar{Y}_1 = 0.9877$	$\bar{Y}_2 = 0.9071$
Desviación estándar:	$S_1^2 = 0.0466$	$S_2^2 = 0.0290$
No. total de equinos:	$n_1 = 6$	$n_2 = 7$
Grados de libertad:	$\text{g.l.} = 6 - 1 = 5$	$\text{g.l.} = 7 - 1 = 6$

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \frac{(6 - 1)0.0466 + (7 - 1)0.0290}{6 + 7 - 2} = \frac{0.233 + 0.174}{11} = \frac{0.407}{11} = 0.037$$

$$S_p = \sqrt{S_p^2} = \sqrt{0.037} = 0.1924$$

$$t_c = \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2)}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} = \frac{(0.9877 - 0.9071)}{0.1924 \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{7}}} = \frac{0.0806}{0.1924 \sqrt{0.3095}} = \frac{0.0806}{0.1924(0.55635)} = \frac{0.0806}{0.10704} = 0.753$$

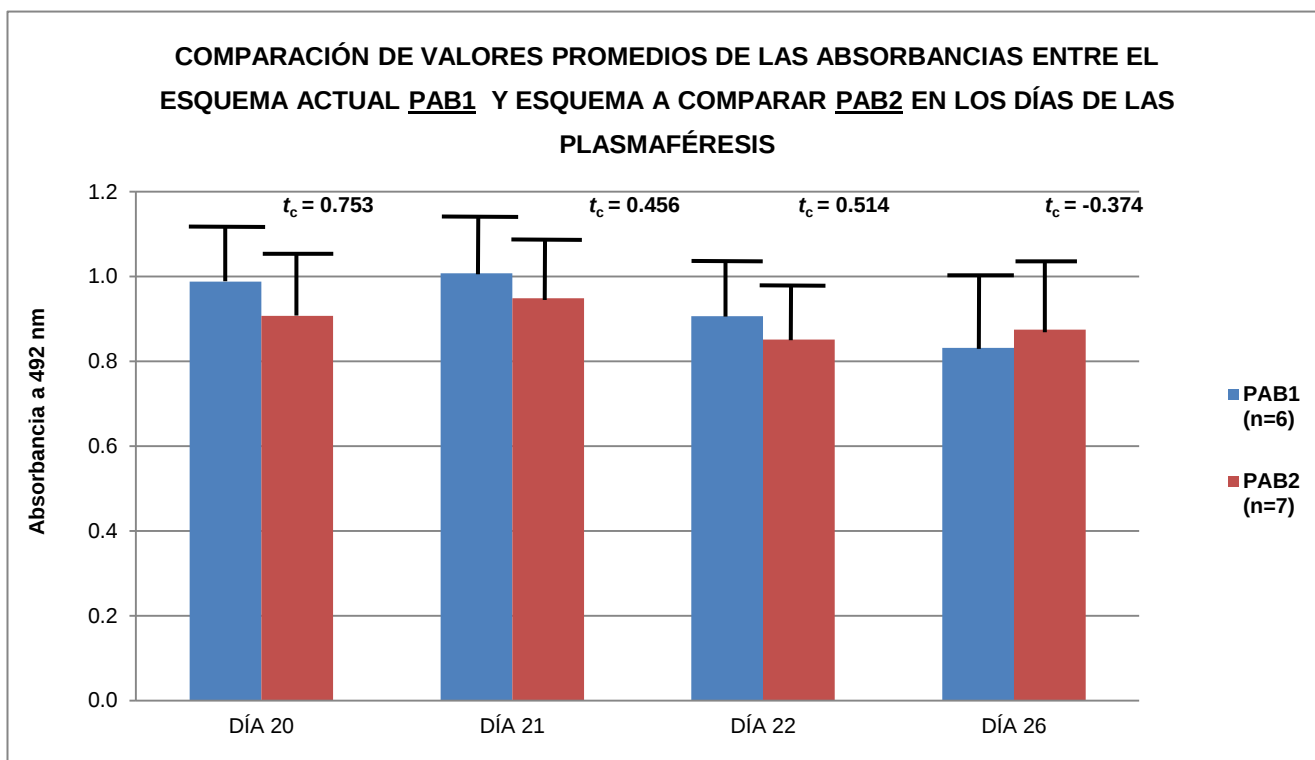
Región de rechazo de H_0 :

Se rechaza H_0 si $t_c > t_{\alpha/2}$ o $t_c < -t_{\alpha/2}$

Para una probabilidad de $\alpha=0.05$, (valores obtenidos en tablas de distribución de t)

$$t_{\alpha/2} = t_{0.05/2, \text{ con } 11 \text{ g.l.}} = 2.2; \quad -t_{\alpha/2} = -t_{0.05/2, \text{ con } 11 \text{ g.l.}} = -2.2$$

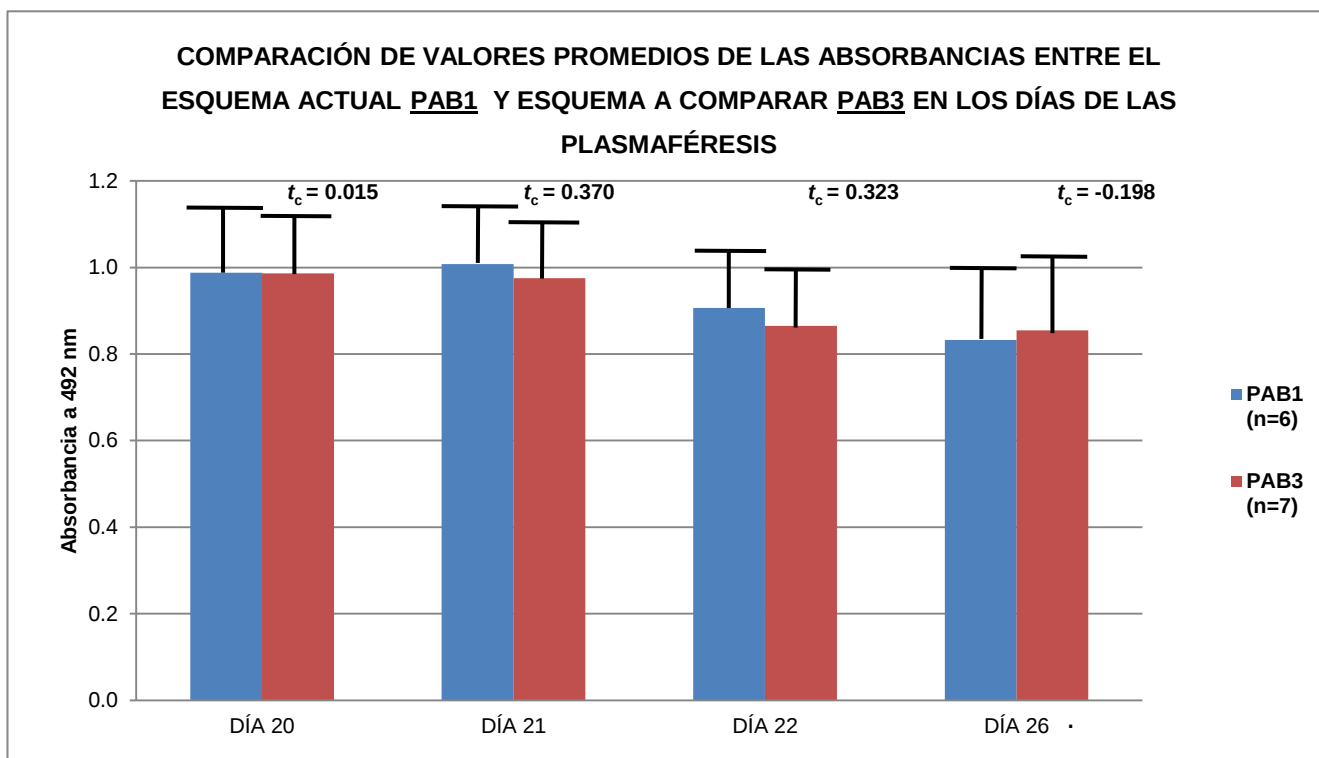
Como $0.753 < 2.20$ y $0.753 > -2.20$, **NO SE RECHAZA LA HIPÓTESIS NULA**, por lo que el valor promedio de la producción de anticuerpos IgG antiveneno polivalente de alacrán en el día 20, no existe diferencia estadística entre el esquema actual PAB1 y el esquema a comparar PAB2 con una confianza del 95%.



Esquema a comparar (PAB1 vs PAB2)	Prueba de Fisher	t calculada (t_c)	$t_{0.05/2,11}$ ($t_{\alpha/2,gl}$)	$-t_{0.05/2,11}$ ($-t_{\alpha/2,gl}$)	Región de rechazo de la H_0 ($t_c > t_{\alpha/2}$ o $t_c < -t_{\alpha/2}$)
Día 20	0.289	0.753	2.20	-2.20	No se rechaza
Día 21	0.073	0.456	2.20	-2.20	No se rechaza
Día 22	0.487	0.514	2.20	-2.20	No se rechaza
Día 26	0.477	-0.374	2.20	-2.20	No se rechaza

Figura 26. Comparación gráfica y estadística de los promedio de las absorbancias a 492 nm entre el esquema de inmunización actual **PAB1** y el esquema a comparar **PAB2** en los días 20, 21, 22 y 26 de las cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra VPA.

La tabla de la Figura 26 resume los resultados de la prueba de Fisher indicando que la variación de los datos entre los grupos de comparación es la misma ya que los resultados son mayores de 0.05; también se muestran los resultados de la t calculada (t_c) observándose que todos ellos son menores que el valor de $t_{\alpha/2}$ con 11 grados de libertad, por lo que la Hipótesis nula no se rechaza y se puede concluir que no hay diferencia significativa en la cantidad de anticuerpos IgG antiveneno de alacrán entre el esquema actual PAB1 y el esquema a comparar PAB2 en los días 20, 21, 22 y 26 con un 95% de confianza.



Esquema a comparar (PAB1 vs PAB3)	Prueba de Fisher	t calculada (t_c)	$t_{0.05/2,11}$ ($t_{\alpha/2,gl}$)	$-t_{0.05/2,11}$ ($-t_{\alpha/2,gl}$)	Región de rechazo de la H_0 ($t_c > t_{\alpha/2}$ o $t_c < -t_{\alpha/2}$)
Día 20	0.3136	0.015	2.20	-2.20	No se rechaza
Día 21	0.3997	0.370	2.20	-2.20	No se rechaza
Día 22	0.2554	0.323	2.20	-2.20	No se rechaza
Día 26	0.4686	-0.198	2.20	-2.20	No se rechaza

Figura 27. Comparación gráfica y estadística de los promedio de las absorbancias a 492 nm entre el esquema de inmunización actual **PAB1** y el esquema a comparar **PAB3** en los días 20, 21, 22 y 26 de las cinéticas de producción de anticuerpos IgG contra VPA.

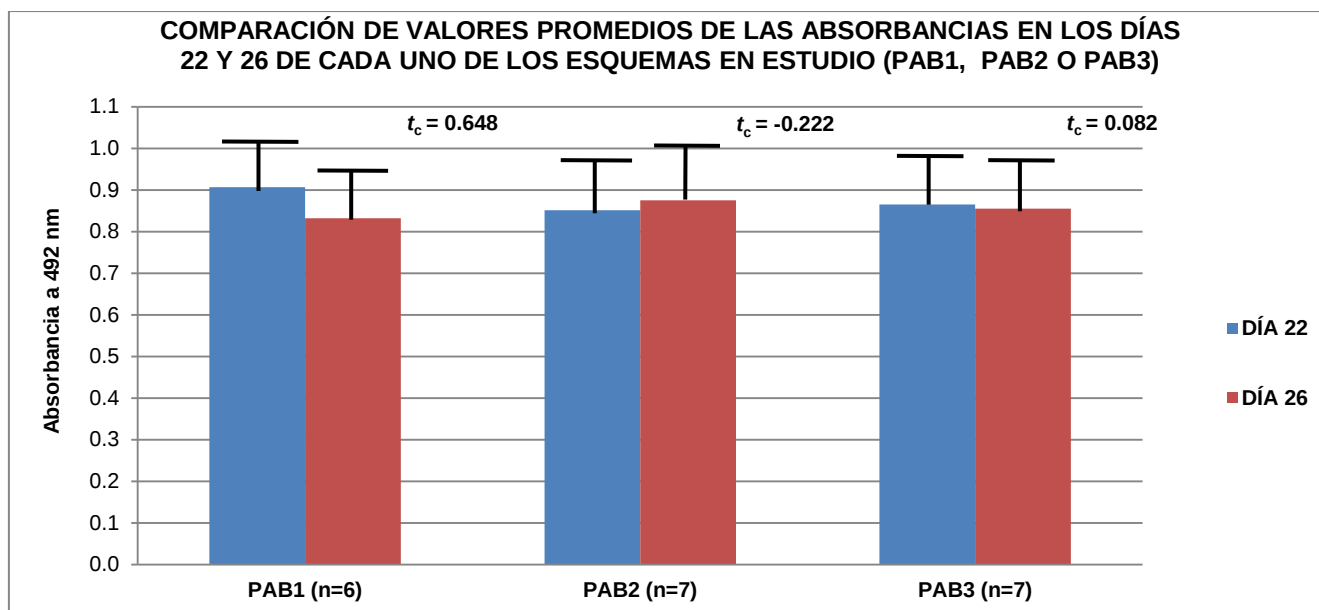
La tabla de la Figura 27 resume los resultados de la prueba de Fisher indicando que la variación de los datos entre los grupos de comparación es la misma ya que los resultados son mayores de 0.05; también se muestran los resultados de la t calculada (t_c) observándose que todos ellos son menores que el valor de $t_{\alpha/2}$ con 11 grados de libertad, por lo que la Hipótesis nula no se rechaza y se puede concluir que no hay diferencia significativa en la cantidad de anticuerpos IgG antiveneno de alacrán entre el esquema actual PAB1 y el esquema a comparar PAB3 en los días 20, 21, 22 y 26 con un 95% de confianza.

f) Comparación gráfica y estadística entre los días 22 y 26 de la cinética de producción de anticuerpos IgG de los esquemas inmunización PAB1, PAB2 o PAB3.

La comparación entre los resultados obtenidos en los días 22 (3ª plasmaféresis) y el día 26 de un mismo esquema de inmunización tiene la finalidad de justificar una 4ª plasmaféresis en el día 26. Se utilizó la misma Prueba de Hipótesis que se manejó anteriormente para comprobar la existencia de diferencias en las absorbancias (cantidad de anticuerpos detectados por ELISA) entre estos días. Por lo que las Hipótesis nula y alterna quedan de la siguiente manera:

Hipótesis nula (H_0): No hay diferencia en la cantidad de anticuerpos IgG antiveneno de alacrán entre el día 22 y el día 26 del esquema en estudio (PAB1, PAB2 o PAB3) con una confianza del 95%. $H_0: \mu_1 = \mu_2$

Hipótesis alterna (H_1): Hay diferencia en la cantidad de anticuerpos IgG antiveneno de alacrán entre el día 22 y el día 26 del esquema en estudio (PAB1, PAB2 o PAB3) con una confianza del 95%. $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$



Días comparados (22 vs 26)	Prueba de Fisher	Grados de libertad ($n_1 + n_2 - 2$)	t calculada (t_c)	$t_{0.05/2, gl}$ ($t_{\alpha/2, gl}$)	$-t_{0.05/2, gl}$ ($-t_{\alpha/2, gl}$)	Región de rechazo de la H_0 ($t_c > t_{\alpha/2}$ o $t_c < -t_{\alpha/2}$)
Esquema PAB1	0.459	10	0.648	2.23	-2.23	No se rechaza
Esquema PAB2	0.445	12	-0.222	2.18	-2.18	No se rechaza
Esquema PAB3	0.311	12	0.082	2.18	-2.18	No se rechaza

Figura 28. Comparación gráfica y estadística de los resultados promedio de las absorbancias a 492 nm entre los días 22 y 26 de los esquemas en estudio (PAB1, PAB2 o PAB3).

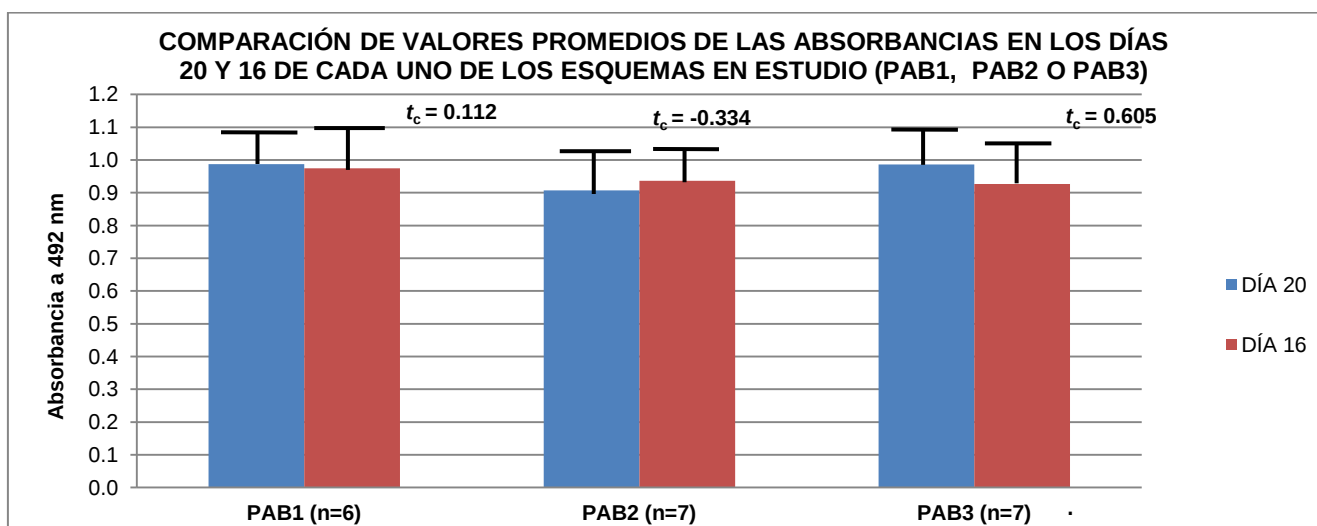
La tabla de la Figura 28 resume los resultados de la prueba de Fisher indicando que la variación de los datos entre los grupos de comparación (día 22 y 26) es la misma, ya que los resultados son mayores de 0.05; también se muestran los resultados obtenidos de la t calculada (t_c) observándose que todos ellos son menores que el valor de $t_{\alpha/2}$, por lo que la Hipótesis nula no se rechaza y se puede concluir que no existe diferencia significativa en la cantidad de anticuerpos IgG antiveneno de alacrán entre los días 22 y 26 de cada uno de los esquemas.

g) Comparación gráfica y estadística entre los días 20 y 16 de la cinética de producción de anticuerpos IgG en los esquemas inmunización PAB1, PAB2 o PAB3.

La comparación entre los valores obtenidos en los días 20 y 16 de un mismo esquema de inmunización, tiene la intención de proponer, que se recorra la fecha de la primera plasmaféresis del día 20 al día 16. Esta medida reduciría los tiempos en la producción de plasmas hiperinmunes. Se eligió el día 16 debido a que es el punto de la cinética donde se observa los mayores niveles de anticuerpos (Figura 25) detectados por la técnica de ELISA. Se empleó la Prueba de Hipótesis descrita anteriormente para comprobar la existencia de diferencias en las absorbancias (cantidad de anticuerpos detectados por ELISA) entre los días 20 y 16. Por lo que la Hipótesis nula y la Hipótesis alterna quedan de la siguiente manera:

Hipótesis nula (H_0): No hay diferencia en la cantidad de anticuerpos IgG antiveneno de alacrán entre el día 20 y el día 16 del esquema en estudio (PAB1, PAB2 o PAB3) con una confianza del 95%. $H_0: \mu_1 = \mu_2$

Hipótesis alterna (H_i): Hay diferencia en la cantidad de anticuerpos IgG antiveneno de alacrán entre el día 20 y el día 16 del esquema en estudio (PAB1, PAB2 o PAB3) con una confianza del 95%. $H_i: \mu_1 \neq \mu_2$



Días comparados (20 vs 16)	Prueba de Fisher	Grados de libertad ($n_1 + n_2 - 2$)	t calculada (t_c)	$t_{0.05/2, gl}$ ($t_{\alpha/2, gl}$)	$-t_{0.05/2, gl}$ ($-t_{\alpha/2, gl}$)	Región de rechazo de la H_0 ($t_c > t_{\alpha/2}$ o $t_c < -t_{\alpha/2}$)
Esquema PAB1	0.305	10	0.112	2.23	-2.23	No se rechaza
Esquema PAB2	0.458	12	-0.334	2.18	-2.18	No se rechaza
Esquema PAB3	0.415	12	0.605	2.18	-2.18	No se rechaza

Figura 29. Comparación gráfica y estadística de los resultados promedio de las absorbancias a 492 nm entre los días 20 y 16 de los esquemas en estudio (PAB1, PAB2 o PAB3).

La tabla de la figura 29 resume los resultados de la prueba de Fisher indicando que la variación de los datos entre los grupos de comparación (día 20 y 16) es la misma ya que los resultados son mayores de 0.05; también se muestran los resultados obtenidos de la t calculada (t_c) observándose que todos ellos son menores que el valor de $t_{\alpha/2}$, por lo que la Hipótesis nula no se rechaza y se puede concluir que no existe diferencia significativa en la cantidad de anticuerpos IgG contra VPA entre los días 20 y 16 de cada uno de los esquemas con una 95% de confianza.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la producción de antivenenos, es de suma importancia el esquema de inmunización de los equinos para producir una alta concentración de anticuerpos y que se mantenga respecto al tiempo (WHO, 2010), pero la inoculación de veneno crudo es normalmente mal tolerado por el animal (Chippaux, 1997).

Para la producción de altos títulos de anticuerpos se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- El inmunógeno (antígenos del veneno) y el esquema de inmunización.
- La cantidad de dosis, la selección de los adyuvantes y los sitios de inmunización.
- Los programas de sangría (plasmaféresis).

Todos estos puntos deben ser considerados para que se logre generar una adecuada respuesta inmune así como una alta producción de plasma hiperinmune mientras que se asegure la salud e integridad del animal.(WHO, 2010).

El desarrollo del protocolo de inmunización depende de la toxicidad y de la inmunogenicidad del veneno, así como del modelo animal utilizado y de la calidad de la respuesta inmune de dicho animal. El número de dosis óptimas para la inmunización son generalmente obtenidas por ensayo y error hasta obtener un título de anticuerpos deseado (WHO, 2010; Chippaux, 1997; Chippeaux 1991). El diseño de nuevos esquemas de inmunización, el perfil farmacocinético y la estabilidad de las moléculas que constituyen los principios activos de los antivenenos, así como la cantidad de inmunoglobulinas presentes en los plasmas animales durante el proceso de manufactura son la preocupación permanente de la industria dedicada a la producción de antídotos contra el veneno de animales ponzoñosos (WHO, 2010).

La calidad y cantidad del plasma obtenido de los equinos de producción depende estrechamente del estado de salud de los mismos, por tal motivo este estudio se realizó previamente, con la finalidad de evaluar si son aptos y ser considerados en el programa de producción de sueros hiperinmunes.

El monitoreo del estado de salud de los equinos consiste en realizar la inspección física de cada uno, haciendo énfasis en la actitud del animal, el estado de carnes, expresión de los ojos, integridad de la piel y el estado del pelaje, los cuales son evaluados por personal veterinario capacitado. Otros puntos a considerar son el hematocrito y la ausencia de anticuerpos contra

anemia infecciosa equina. Los resultados obtenidos de la evaluación del estado de salud nos indicaron que los 21 equinos contemplados para el estudio, cumplieron con los atributos necesarios para ser considerados en los esquemas de inmunización de refuerzo.

Cabe mencionar que estos 21 equinos evaluados corresponden al grupo “IV Alacrán” y son equinos que se emplean únicamente para la producción de faboterápicos en BIRMEX. Los equinos fueron divididos en tres grupos denominados PAB1, PAB2 y PAB3, conformando grupos de siete equinos (ver Tabla 3).

En la Tabla 3 se resume la información de los tres esquemas de inoculación que fueron aplicados, usando como antígeno, el veneno polivalente de alacrán lote VPA0903 en dosis crecientes. La diferencia entre ellos es la cantidad de inóculos recibidos, siendo el esquema PAB1 el programa con mayor número de inóculos con cinco.

Durante la aplicación de los esquemas de inmunización, el equino identificado con el número 7 correspondiente al grupo PAB1, no completó el esquema ya que después de la tercera inoculación, presentó un cuadro de hipersensibilidad cutánea y por su seguridad se decidió retirarlo del estudio, por tanto el esquema actual PAB1 se manejó con una $n= 6$ equinos. Los restantes veinte equinos completaron los esquemas de inmunización y concluyeron el estudio hasta los 40 días posteriores a la primera inoculación, por lo que los grupos PAB2 y PAB3 tienen una $n= 7$ equinos.

Como se indica en la Tabla 4, a todos los equinos que aprobaron el monitoreo del estado de salud, se les tomaron muestras de sangre antes de la primera inoculación (día -5) y después de la tercera plasmaféresis (día 24) para evaluar el hemograma y perfil bioquímico clínico con el fin de investigar si los equinos presentan alteraciones o patologías durante las etapas de inoculación y los procesos de plasmaféresis.

Las muestras de sangre obtenida de los equinos durante la realización del estado de salud (día -5) se utilizaron para establecer el estado basal del hemograma (Tabla I del Anexo 5,) y del perfil bioquímico (Tabla I del Anexo 6). Con respecto al hemograma, los resultados por equino en el hematocrito, la hemoglobina, la concentración de eritrocitos, el volumen globular medio (VGM), la concentración globular media de hemoglobina (CGMH) y el contenido de fibrinógeno, fueron comparados contra las unidades de referencia para cada parámetro, encontrando que todos los equinos estaban dentro de los valores normales y no se encontraban cursando algún cuadro de anemia o alguna otra patología asociada.

Con respecto a los resultados del hemograma (Tabla II del Anexo 5) y perfil bioquímico clínico (Tabla II del Anexo 6) obtenidos posterior a los procesos de inmunización y plasmaféresis (día 24), tienen el fin de evaluar las alteraciones que pudieran haberse presentado por efecto de la inoculación de los venenos y de las cosechas continuas de plasma (plasmaféresis), en las cuales fueron obtenidos de 6 a 8 litros de sangre durante los días 20, 21 y 22 con el consecuente retorno del paquete celular, observándose los siguientes resultados en el Hemograma equino (Anexo 5):

Se visualiza que los resultados del hematocrito (Figura 17 o Figura I del Anexo 5) están dentro de los valores de referencia, pero con una ligera disminución sin que sea esta significativa entre los valores basales (día -5) y el después (día 24) ya que los valores calculados de t fueron mayores de 0.05. Este mismo efecto se observó con los datos obtenidos de la hemoglobina y la concentración de eritrocitos (Figuras II y III del Anexo 5). La disminución de estos valores en el día 24 son debidos a los constantes procesos de plasmaféresis realizados, sin embargo estas disminuciones no son significativas con una confianza del 95%, además los valores obtenidos no comprometen el estado de salud del equino toda vez que no rebasan el límite inferior de los valores de referencia.

Por otro lado, la CGMH disminuyó ligeramente con respecto a los niveles basales, toda vez que la hemoglobina disminuyó en mayor proporción que el hematocrito, sin significar o tipificar a esta disminución en algún tipo de anemia. Cabe mencionar que conforme a los resultados de t obtenidos no existe diferencia significativa entre los valores basales (antes) y el de los valores obtenidos a los 24 días (después) con una confianza del 95% (Figura V del Anexo 5).

Con respecto al contenido de fibrinógeno en la sangre (Figura VI del Anexo 5), éste aumentó ligeramente, esto era de esperarse ya que no se ha reportado acción coagulante atribuible a enzimas presentes en el veneno de alacrán, lo que si se observa con el veneno de serpientes. El veneno de alacrán presenta principalmente acción neurotóxica más que acción necrótica y coagulante (Domingos, 2007). En general, los valores basales y los valores obtenidos después de las plasmaféresis se encuentran dentro de las concentraciones normales de referencia. Las diferencias observadas entre los valores promedio no son significativas con una confianza del 95%. Por otro lado, también se realizó el análisis comparativo de los resultados basales con respecto al día 24 utilizando la prueba de Fisher, observándose que la variabilidad de los resultados entre los grupos es la misma, ya que los valores obtenidos fueron mayores de 0.05 (Tabla 7, Figuras I a la VI del Anexo 5).

Por otro lado, analizando los resultados basales del Perfil Bioquímico (Tabla I del Anexo 6), se observa que los valores de urea rebasan por poco los valores de especificación y que estos disminuyen comparados con el día 24. Cabe mencionar que estas diferencias no son significativas en los grupos de equinos que recibieron el esquema PAB1 y PAB3 (Figura I del Anexo 6), pero sí es una disminución significativa para el grupo PAB2 con un 95% de confianza. Esto puede deberse a las constantes plasmaféresis que se le realizaron a los equinos, aun así el valor obtenido no rebasa el límite inferior de referencia.

Con respecto a las bilirrubinas totales (Figura II del Anexo 6), los resultados basales obtenidos y los del día 24, caen dentro de los valores de referencia pero se observa una tendencia a disminuir sin valor significativo, esto probablemente sea debido a las plasmaféresis realizadas. Lo que también nos indica es que no existe un daño hepático en los equinos. Este mismo efecto se observa con los niveles de creatinina-cinasa (CK), en donde los valores obtenidos muestran que están dentro del valor de referencia y que existe disminución en el día 24, con la diferencia de que en el grupo de equinos del esquema PAB3 existe diferencia significativa (Figura III del Anexo 6). Esta enzima (CK) nos indica un daño muscular si se encuentra elevada y como se mencionó anteriormente, el veneno de alacrán no se ha reportado que produzca necrosis tisular por lo que es de esperar que los niveles de CK no se eleven.

En el caso de las proteínas totales (Figura IV del Anexo 6) se observa que los niveles basales están dentro de los valores de referencia y estos aumentan con diferencia significativa al 95% en los equinos que recibieron los esquemas PAB1 y PAB2, este aumento es de esperarse por la estimulación del sistema inmune con la inoculación del veneno que provoca el aumento de inmunoglobulinas. Este fenómeno se ve claro en las Figuras 18 y VI del Anexo 6, en donde el valor promedio de la concentración de globulinas séricas se ve incrementada significativamente con un 95% de confianza en los sueros de los equinos de los tres esquemas (PAB1, PAB2 y PAB3), de 30 g/L aumentaron hasta más de 50 g/L aproximadamente. Esto nos indica que muy probablemente el esquema actual (PAB1) y los esquemas de inmunización a comparar (PAB2 y PAB3) funcionaron adecuadamente para estimular la producción de anticuerpos.

En la Figura VI del Anexo 6 se muestran los niveles de albúmina sérica, observándose que se encuentran por debajo de los límites normales de referencia para casi el 100% de los equinos. Los valores bajos de albúmina son compensados por los altos niveles de globulinas presentes en el plasma, ya que los equinos presentaron niveles de globulinas de más de 50 g/L en promedio, los cuales son concentraciones mayores al nivel superior de referencia, el cual establece que el máximo valor es de 35 g/L. Estas alteraciones son resultado del desequilibrio que se produce en

las proteínas plasmáticas, ya que al incrementarse los niveles de anticuerpos (globulinas) por los procesos de hiperinmunización a los que son sometidos, el sistema homeostático de los equinos tienden a disminuir la concentración de albúmina para equilibrarse (Medway, 1990).

Con respecto a los valores de la concentración de calcio en sangre (Figura VII del Anexo 6) se observa que no hay alteraciones debido a las inoculaciones del veneno de alacrán y a las tres plasmaféresis realizadas, lo que representa que no existen problemas asociados a daño muscular o disminución de la masa muscular.

En conclusión, los hallazgos encontrados en el perfil bioquímico equino nos indican que posiblemente existan trastornos renales debido a que se encontró una ligera elevación de los niveles de urea sin que sea significativa. La elevación de los niveles de urea es posiblemente debido a la excesiva destrucción de proteínas como ocurre en estados de toxicidad o sépsis extensa (Medway, 1990) propias de la actividad de producción a la que son sometidos dichos equinos. Los niveles de globulinas séricas posteriores a los procesos de inmunización, se ven incrementados significativamente con un 95% de confianza en los equinos de los tres esquemas estudiados, consecuencia del incremento en la síntesis de anticuerpos como respuesta a la presencia de los venenos inoculados. Los niveles de albúmina sufrieron una disminución de los niveles basales como respuesta al aumento de las globulinas y tratar de compensar la relación albúmina/globulina.

Los resultados anteriores nos sirvieron para valorar el estado general de salud de los animales, pero falta saber cómo está reaccionando su sistema inmune al recibir los diferentes números de dosis de veneno con respecto a la producción de anticuerpos específicos, por lo que se empleó la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA indirecta) para la construcción de las cinéticas de producción de anticuerpos IgG específicos contra VPA presentes en los plasmas de equinos de los diferentes esquemas de inmunización en estudio (PAB1, PAB2 y PAB3).

Cabe mencionar que a pesar de que existen estudios donde correlacionan los títulos de anticuerpos obtenidos por la prueba de ELISA con los obtenidos con la prueba de oro llamada Dosis Protectora al 50% (DP₅₀), no es el objetivo de este trabajo sustituir la prueba de potencia por la prueba de ELISA, sino que ésta prueba nos servirá para darnos una idea general del comportamiento de la producción de anticuerpos al ser estimulado los equinos y por lo tanto, la prueba de ELISA se propone ser utilizada en BIRMEX sólo como una prueba del Control de Proceso.

Para la determinación de anticuerpos por la técnica de ELISA, primeramente se realizó las determinaciones de la concentración proteica del lote de veneno polivalente de alacrán VPA0903. Este lote de veneno se eligió como antígeno para el recubrimiento o sensibilización de las placas de ELISA debido a que fue el mismo lote empleado para la inmunización de los equinos. Los resultados mostraron que el lote VPA0903 presenta una concentración proteica de 7.08 mg/mL de veneno (Figura 19).

Posteriormente se llevó a cabo la estandarización de la técnica, para ello, se ensayaron diferentes concentraciones de antígeno (0.1, 0.5 y 1.0 μg) para la sensibilización de la placa (Figura 20). Se eligió manejar la concentración de 0.5 μg debido a que se observó un cambio drástico en el valor de la absorbancia en comparación al usar 0.1 μg por pozo. Al observar la gráfica de la Figura 20, parece ser que después de 0.5 μg se llega a una meseta, por lo que emplear una mayor concentración de proteína no incrementa en gran medida los valores de absorbancia. Es por esta razón que se decide utilizar la concentración de 0.5 μg para la sensibilización de los pozos de la placa de ELISA.

En la Figura 21 se muestra los ensayos que se realizaron para la selección de la dilución del primer y segundo anticuerpo a emplear, observándose que las diluciones que dan un valor de absorbancia de 1.0 tanto para el suero equino (primer anticuerpo) como para el conjugado anti-IgG equino (segundo anticuerpo) fueron las diluciones 1:8000. Se eligieron estas diluciones ya que queremos que nuestra cinética de producción de anticuerpos tenga un límite máximo de absorbancia de 1.0 aproximadamente con el fin de tener una mayor sensibilidad en el ensayo.

Conforme a los resultados de la estandarización de la técnica de ELISA se concluye que la concentración de VPA elegida para sensibilizar los pozos de las placas sea de 0.5 μg y que las diluciones a emplear del primer anticuerpo (suero equino antiveneno de alacrán) y segundo anticuerpo (anti-IgG de equino producido en cabra unido a peroxidasa de rábano) sean de 1:8000.

Se prosiguió a determinar las cinéticas de producción de anticuerpos IgG específica contra VPA por equino de cada uno de los esquemas en estudio (PAB1, PAB2 y PAB3), los resultados se muestran en las Figuras 22, 23 y 24 respectivamente. El promedio de las cinéticas de producción de anticuerpos por esquema de inmunización se muestran en la Figura 25. Cabe mencionar que la cinética de producción del esquema de inmunización actual PAB1 (5 inóculos), fue obtenida promediando los valores obtenidos de la absorbancia de 6 equinos debido a que un caballo de este grupo presentó reacción de hipersensibilidad cutánea después de aplicar el tercer inóculo por

lo que no completó el esquema de 5 inóculos. Con respecto a las cinéticas de los esquemas PAB2 y PAB3, fueron obtenidas promediando el valor de los 7 equinos pertenecientes a cada grupo.

En la Figura 25 se observa que el comportamiento de las cinéticas de producción de anticuerpos entre los tres esquemas son muy parecidas, los resultados muestran que la cantidad de anticuerpos IgG específicos contra VPA (valor de la absorbancia a 492nm) aumenta en el día 5 alcanzando a llegar a una meseta después del día 11 y se mantienen hasta el día 40 con una ligera disminución por el efecto producido por las cosechas de sangre (plasmaféresis) y la eliminación natural de anticuerpos, toda vez que la vida media de las IgG es de 21 a 23 días en sangre periférica y después de este tiempo comienza a disminuir de forma natural hasta retomar los niveles basales (Tizard, 2009).

Para determinar la existencia de diferencias en la producción de anticuerpos específicos contra VPA entre el esquema de inmunización actual (PAB1) frente a los esquemas a comparar (PAB2 y PAB3), se empleó la Prueba de Hipótesis para comparar dos medias poblaciones de muestras pequeñas e independientes, la cual se explicó detalladamente en el inciso e) del punto 8.3.3. En resumen, la hipótesis nula y la alternativa quedaron de la siguiente manera:

Hipótesis nula:

H_0 : No hay diferencia en la producción de anticuerpos IgG contra VPA entre el esquema actual (PAB1) y el propuesto (PAB2 ó PAB2) con una confianza del 95%.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

Hipótesis alterna:

H_i : Hay diferencia en la producción de anticuerpos IgG contra VPA entre el esquema actual (PAB1) y el propuesto (PAB2 o PAB2) con una confianza del 95%.

$$H_i: \mu_1 \neq \mu_2$$

Siendo la región de rechazo de H_0 :

Se rechaza H_0 si:

$$t_c > t_{\alpha/2} \text{ o } t_c < -t_{\alpha/2}$$

Para esta comparación entre esquemas se decidió utilizar los valores obtenidos en los días 20, 21, 22 y 26 ya que son los días cuando se realizaron las cosechas de sangre (plasmaféresis). En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos de la comparación entre el esquema de inmunización actual PAB1 y el esquema a comparar PAB2 en estos días, observándose que los resultados de t calculada (t_c) son menores al valor de $t_{\alpha/2}$ y son mayores que $-t_{\alpha/2}$ por lo que la

Hipótesis nula no se rechaza y se concluye que no existe diferencia significativa en la cantidad de anticuerpos IgG contra VPA entre el esquema actual PAB1 (5 inóculos) y el esquema a comparar PAB2 (4 inóculos) en los días 20, 21, 22 y 26 con un 95% de confianza.

Estos mismos resultados se obtuvieron al comparar los valores de las absorbancias entre los esquemas actual PAB1 y el PAB3 (3 inóculos) en los días 20, 21, 22 y 26 (Figura 27). Se determinó que los valores obtenidos de t_c son mucho menores que el valor de $t_{\alpha/2}$ y son mayores que $-t_{\alpha/2}$ por lo que también la Hipótesis nula no se rechaza y se puede decir que las cinéticas de producción de anticuerpos en los esquemas PAB1 (5 inóculos) y PAB3 (3 inóculos) no son diferentes estadísticamente en los días 20, 21, 22 y 26 con una confianza del 95%.

Con base a estos resultados se puede decir que la cantidad de anticuerpos IgG en los días cuando se realizan las plasmaféresis de los equinos, no existen diferencias entre el esquema de inmunización actual PAB1 y los esquemas a comparar (PAB2 y PAB3). Por lo que se puede considerar en el futuro, disminuir el número de aplicaciones de inóculo a los equinos en el esquema de refuerzo, con el fin de exponerlos menos a los efectos nocivos del veneno, sin que ésta medida afecte negativamente la producción del antiveneno de alacrán.

Otro resultado obtenido al analizar las cinéticas de producción de anticuerpos antiveneno polivalente de alacrán se muestra en la Figura 28. Se propuso realizar una cuarta plasmaféresis en el día 26 siempre y cuando el estado de salud del equino, la potencia de su suero (DP_{50}) y la concentración de anticuerpos presentes, fueran los adecuados. Los resultados de la potencia del suero para neutralizar el veneno y el estado de salud de los animales cumplieron con los requisitos. Con respecto a la concentración de anticuerpos IgG específicos, se decidió comparar los valores obtenidos en el día 22 (tercera plasmaféresis) con los del día 26 (cuarta plasmaféresis) en cada uno de los esquemas en estudio (Figura 27) observándose que no existen diferencias en los valores promedio de las absorbancia entre éstos días con un 95% de confianza ya que los valores de t_c fueron menores que el valor de $t_{\alpha/2}$ y fueron mayores que $-t_{\alpha/2}$, por lo que también la Hipótesis nula no se rechaza. Es decir que la cantidad de anticuerpos IgG específica contra veneno de alacrán son prácticamente la misma en el día 22 que en el día 26. Estos resultados nos muestran que se puede incrementar la producción de plasma hiperinmune realizando una cuarta plasmaféresis sin afectar el estado de salud del equino o afectar la calidad del biológico.

Finalmente, otro de los objetivos del estudio fue averiguar si las cosechas de sangre (plasmaféresis) se podrían realizar antes del día 20. Analizando las cinéticas de producción de anticuerpos observamos que puede ser posible. En la Figura 29 se muestran los resultados de la Prueba de hipótesis que compara los valores promedios de las absorbancias entre los días 20 (primera plasmaféresis) y el día 16 del esquema de refuerzo actual PAB1 y de los esquemas a comparar (PAB2 o PAB3). Como se observa en la gráfica de la Figura 29, el día 16 presenta un valor promedio de absorbancia ligeramente menor que en el día 20, pero esta diferencia no es significativa ya que nuevamente los valores de t_c son menores que el valor de $t_{\alpha/2}$ y son mayores que $-t_{\alpha/2}$ por lo que la Hipótesis nula no se rechaza y se concluye que la cantidad de anticuerpos IgG contra VPA encontrados en el día 20 no presentan diferencia significativa con respecto al día 16 con una confianza del 95%. Por lo que se propone, con evidencia estadística, que se puede recorrer la fecha de la primera cosecha de sangre (plasmaféresis) del día 20 al día 16, lo que reduciría tiempos en la producción de plasmas hiperinmunes de origen equino en BIRMEX.

X. CONCLUSIONES

1. Al analizar las cinéticas de la producción de anticuerpos IgG contra veneno polivalente de alacrán de los esquemas de inmunización actual (PAB1) y a comparar (PAB2 ó PAB3), no se encontraron diferencias significativas entre ellos con una confianza del 95%.
2. La aplicación de 3 o 4 inóculos en el esquema de inmunización de refuerzo, producen una respuesta de anticuerpos IgG contra veneno polivalente de alacrán similar que al emplear 5 inóculos.
3. El monitoreo del estado de salud de los equinos junto con los resultados de la cinética de producción de anticuerpos IgG contra veneno polivalente de alacrán, demostraron que una cuarta plasmaféresis no afecta la integridad de los equinos e incrementa hasta un 33% la producción de sueros hiperinmunes.
4. Con los resultados obtenidos de las cinéticas de producción de anticuerpos, se propone un cambio en el día de la primera plasmaféresis, el cual puede ser entre el día 16 y 20 del esquema de refuerzo, con el fin de disminuir los tiempos de producción de plasma hiperinmune de origen equino.

XI. TRABAJOS A FUTURO Y PERSPECTIVAS

1. Estos resultados serán aplicados en BIRMEX en los procesos de producción de plasma hiperinmune contra VPA que se realiza en la Gerencia de Sueros a través de la Unidad de Producción de Plasmas Hiperinmunes de Tecámac.
2. Por su rapidez y bajo costo, la técnica de ELISA indirecta estandarizada en este proyecto, será utilizada como prueba de Control del Proceso para verificar la consistencia en la producción de anticuerpos antiveneno de alacrán en equinos.
3. Se propone que la determinación del perfil bioquímico y el hemograma equino se realice rutinariamente en la Unidad de Producción de Plasmas Hiperinmunes de Tecámac, con la finalidad de tener un mejor control del estado de salud de los animales de producción y un expediente clínico más completo por cada equino.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Prueba biológica para determinar la dosis protectora al 50% (DP₅₀) de los suero hiperinmunes (FEUM, 2011).

Se describe la prueba que se utilizó como parte del control del proceso en la etapa de sangría de prueba según la Tabla 4, con el fin de dictaminar si se puede llevar a cabo la plasmaféresis.

El ensayo se realizará en grupos de ratones a los que se les aplica una mezcla veneno-antiveneno conteniendo una cantidad letal para los ratones y diferentes diluciones del suero. La potencia se determinará por el método de *Spearman y Kärber* de acuerdo a la metodología descrita en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

a) Determinación de la Dosis Letal al 50% (DL₅₀) del veneno polivalente de alacrán.

- Cada uno de los venenos se diluye a un título de 12 DL₅₀ mediante la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

C₁: Título del veneno obtenido durante la última sangría de prueba

V₁: Volumen de veneno que se requiere para realizar la dilución

C₂: Título de veneno diluido a 12 DL₅₀

V₂: Volumen final de la dilución. Este volumen dependerá del número de equinos que conforman el grupo. A esta dilución se le denomina como **SOLUCIÓN A**.

La dilución se prepara en condiciones asépticas y se realizan las diluciones enlistadas en la Tabla I, utilizando los volúmenes de veneno y solución salina aquí señalados.

Tabla I. Diluciones y volúmenes para la determinación de la DL₅₀ del veneno polivalente de alacrán.

Dilución	Volumen de la Solución A (mL)	Volumen de la Solución Salina (mL)
1:3.06	2	4.12
1:4.28	1	3.28
1:6.00	1	5
1:8.40	1	7.4
1:11.74	1	10.76

- Inoculación de ratones:

Los animales destinados para la prueba deben tener un peso entre 18 a 20 gramos, cada caja debe ser marcada con el nombre de la prueba, la fracción y la dilución.

Los ratones son inoculados con 0.5 mL en la vena caudal procurando que el volumen se inyecte en un tiempo máximo de 15 segundos hasta completar 6 ratones por dilución. Se debe observar el efecto a las 24 horas posteriores a la inyección, anotando el número de sobrevivientes y muertos.

➤ Interpretación de resultados:

Se calculan los porcentajes de mortalidad considerando que 6 ratones muertos representan el 100% de la mortalidad, la DL_{50} del veneno se calcula por el método no paramétrico de *Sperman y Kärber*.

b) Determinación de la Dosis Protectora al 50% (DP_{50}).

- Centrifugar los tubos que contienen la sangre del equino sin anticoagulante a 3000 r.p.m. durante 15 minutos y separar el suero.
- Colocar en una charola desinfectada una serie de 3 frascos esterilizados por cada suero de caballo a probar (Figura I). Los frascos deben estar rotulados con el número de identificación del caballo y la dilución del suero a probar.

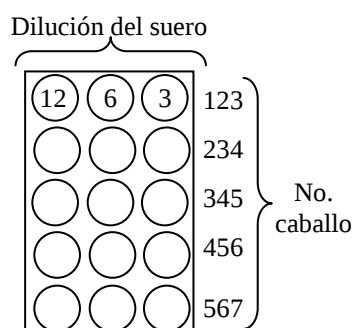


Figura I. Ubicación de frascos dentro de la charola

- En condiciones asépticas realizar las siguientes diluciones con el suero de cada uno de los equinos, colocando en cada frasco los volúmenes indicados en la Tabla II:

Tabla II. Diluciones y volúmenes para la determinación de la DP_{50} del suero equino hiperinmune.

Dilución	Volumen de suero de cada caballo (mL)	Volumen de solución salina (mL)
1:3	1.0	2
1:6	0.5	2.5
1:12	0.5	5.5

- Colocar otra charola con otra serie de frascos marcados con los mismos datos descritos en el párrafo anterior y situarlos en posición opuesta a la primera charola (Figura II).
- En condiciones de esterilidad y con ayuda de una micropipeta transfiera 2 mL de las diluciones anteriores y deposítelos en el frasco correspondiente de la charola No. 2 conforme a la Figura II.
- Retire del área de trabajo la charola 1.
- Adicionar en condiciones asépticas, 2 mL de la solución A (veneno de alacrán) recién preparada a cada frasco de dilución de la charola No. 2.
- Tapar los frascos de dilución con un tapón de hule de clorobutilo estériles.

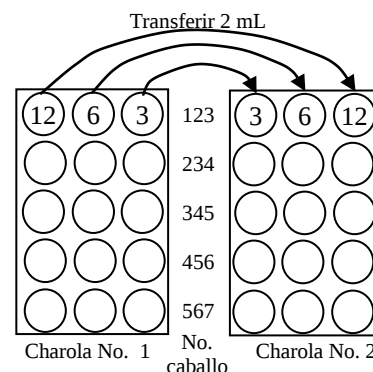


Figura II. Trasferencia de diluciones a la charola No. 2

- Incubar los frascos, los cuales contienen la mezcla suero-veneno (dilución del suero de equino- Solución A) durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad.
- Trasladar el material hacia el área de bioterio.
- Inocular ratones para la determinación de la DP_{50} por vía caudal (ver adelante).
- Marcar seis ratones por cada dilución de la siguiente manera:

Dilución del suero equino	Zona de marcaje del ratón	
1:3	Blanco (sin marca)	
1:6	Cola	
1:12	Lomo	

- Inocular 6 ratones macho de 18 a 20 gramos de peso, en la vena caudal con 0.5 mL de cada una las diluciones presentes, procurando que el volumen se inyecte en un tiempo máximo de 15 segundos. Considerar que por cada suero de equino, se debe contar con 18 ratones inoculados (6 cabeza, 6 cola y 6 blanco). Ver Figuras III, IV y V.
- Colocar los 18 ratones en dos cajas (procurando que no haya más de 10 ratones por caja) y anotar los siguientes datos: Nombre del veneno, número de caballo, fecha de inoculación. Ver Figura VI.
- Observar el efecto protector del suero a las 24 horas posteriores a la inyección.
- Registre el número de sobrevivientes y muertos para cada una de las fracciones.
- Calcular el título de los anticuerpos neutralizantes presentes en el suero de los equinos, multiplicando la dilución del suero en donde se tienen el 50% de sobrevivencia por el valor de la DL50 calculada.



Figura III. Diluciones del veneno con el suero de equino.



Figura IV. Preparación de inóculo.



Figura V. Inoculación por vía caudal.



Figura VI. Observación de los ratones durante 24 horas.

Anexo 2. Metodología de la cosecha de sangre (plasmaféresis).

a) Plasmaféresis.

En cuanto el médico veterinario toma conocimiento del número de caballo que ingresó a la sala de sangría, debe tomar una “bolsa de sangría” e identificarla con el número de cada uno de los caballos. Posteriormente la bolsa se coloca sobre la mesa lateral de acero inoxidable del cajón de sangría y se aplica un torniquete en el tercio caudal del cuello del caballo con el fin de congestionar la vena yugular. Se desinfecta el sitio de punción y se anestesia el sitio donde se va a realizar la canalización utilizando lidocaína al 2% por vía subcutánea (Figura I).



Figura I. Anestesia local

Se canaliza la vena yugular con la aguja estéril del sistema *Hypo-Sys*, que en su extremo de acoplamiento tiene una manguera que conduce a una bolsa de plástico estéril aforada, de 8 litros de capacidad identificada con el número de equino, que en su interior tiene 0.4 litros de anticoagulante (Figura II). Conforme se obtenga la sangre se debe agitar suave y continuamente la bolsa para homogeneizar el anticoagulante con la sangre extraída (Figura III).



Figura II. Canalización del equino en la vena yugular



Figura III. Homogenización de la sangre con el anticoagulante

A continuación se retira el torniquete una vez que se ha obtenido el volumen requerido para cada equino (entre 6 a 8 litros de sangre). La cantidad de sangre obtenida por equino depende de la talla, condición física, actitud y número de plasmaféresis a las que haya sido sometido el caballo. Se retira la aguja y se coloca una pinza hemostática en la piel donde se realizó la punción venosa, así como la aplicación de una solución antiséptica en aerosol. Las bolsas con sangre son colgadas en rieles, sobre una mesa de trabajo y se deja en reposo para permitir la sedimentación natural de los componentes sanguíneos: líquidos (plasma) y sólido (paquete celular) por un periodo mínimo de tres horas (Figura IV).



Figura IV. Sedimentación de los componentes sanguíneos por un periodo mínimo de tres horas.

Posteriormente se separa el plasma del paquete celular mediante el uso de prensas como se aprecia en las Figuras V, VI y VII.



Figura V. Sanitización de las bolsas plasmaféresis.

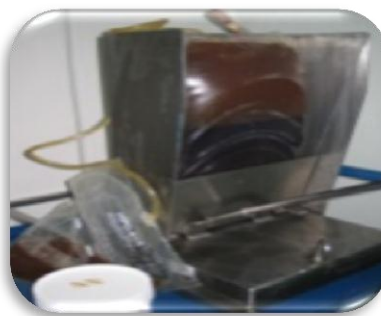


Figura VI. Prensado de las bolsas de plasmaféresis para su separación.



Figura VII. Paquete celular y plasma hiperinmune en bolsas independientes.

Dentro del área aséptica se lleva a cabo la transferencia del plasma del equino en garrafones estériles, a los que se les agrega conservadores para su traslado a la Gerencia de Sueros del Instituto Nacional de Higiene (Figura VIII).



Figura VIII. Transferencia del plasma del equino a garrafones estériles.

b) Retorno del paquete celular a los equinos.

Los paquetes celulares de cada equino son re-suspendidos bajo modulo de flujo laminar con un litro de solución salina isotónica estéril para su posterior transfusión a los equinos (Figura IX).



Figura IX. Adición de solución salina isotónica estéril al paquete celular.

Se prosigue a trasladar el mismo grupo de equinos del corral de estadía a la manga de manejo, colocando a cada caballo una gamarra para sujetarlos y se pasan a la sala de sangría. El médico veterinario debe seleccionar la bolsa de sangría que se identificó con el número del equino y que contiene el paquete globular que corresponde a dicho animal. Se sujeta al caballo mediante el cabestro de la gamarra, a un cajón individual donde permanece prácticamente inmóvil y se aplica un torniquete en el tercio caudal del cuello del caballo con el fin de congestionar la vena yugular. Se procede a realizar la asepsia en el surco de la vena yugular y se anestesia la región mediante infiltración por vía subcutánea de 1 ml de lidocaína al 2%.

Posteriormente se procede a puncionar el vaso sanguíneo con la aguja del equipo preparado y esperar a que se llene totalmente la manguera con la sangre del caballo, se coloca la bolsa con el

paquete celular en un gancho elevado y se afloja el torniquete y se espera de 15 a 30 minutos para que, por gravedad, se incorpore el paquete celular al torrente sanguíneo del caballo (Figura X). Una vez que el total del paquete celular ha sido trasfundido, se retira la aguja y se coloca una pinza hemostática en la piel donde se realizó la punción venosa (Figura XI).



Figura X. Reincorporación del paquete celular.



Figura XI. Colocación de pinza hemostática en la piel donde se realizó la punción venosa.

Finalmente se aplica solución antiséptica en el sitio de punción y se retira la pinza hemostática una vez que se asegure que no exista hemorragia. Se realiza el mismo proceso para los restantes caballos, una vez concluido se traslada al grupo completo de caballos a su corral de estadía. Se realizan observaciones de los equinos para identificar si se presenta alguna reacción adversa en alguno de ellos posterior al regreso del paquete celular y brindarle la atención médica necesaria.

Anexo 3. Preparación de reactivos para la técnica de ELISA indirecta.

REGULADOR DE CARBONATOS pH 9.3	
NaCO ₃	3.5 g
NaHCO ₃	5.6 g
Aforar con H ₂ O a 100 mL	

REGULADOR DE LAVADO PBS-TWEEN₂₀ 0.05%	
Tween ₂₀	0.5 mL
PBS 10mM aforar a	1000 mL

PBS-LECHE 5%	
PBS-NaCl (0.85%)	95 mL
Leche descremada	5 gr

REGULADOR DE CITRATOS AL 0.1M pH 5.6	
Citrato de sodio	2.9 g
Acido cítrico monohidratado	0.4 g
Aforar con H ₂ O a 100 mL	

SOLUCIÓN DE REVELADO	
Regulador de citratos	6 mL
H ₂ O ₂ al 30%	25 µL
o-fenilendiamina	5 mg

ACIDO SULFURICO 8N (para detener la reacción enzimática)	
Acido sulfúrico	6 mL
Aforar con H ₂ O a 100 mL	

Anexo 4. Cinética de producción de anticuerpos por ELISA indirecta.

Por cada día de determinación, se utilizaron dos placas de poliestireno para microtitulación (Nunc-Immunsorb F96) y se manejaron las catorce muestras de suero (-5, 0, 3, 5, 7, 11, 16, 20, 21, 22, 24, 26, 33 y 40) de cuatro equinos diferentes (E_n , E_{n+1} , E_{n+2} y E_{n+3}) pertenecientes al esquema de inmunización PAB-X (PAB1, PAB2 o PAB3).

1. Sensibilizar dos placas de poliestireno de fondo plano con 100 μ L de la dilución preparada a 0.5 μ g/pozo de antígeno (veneno polivalente de alacrán lote VPA-0903) en solución reguladora de carbonatos 0.2 M, pH 9.3 (está solución se prepara en el momento de su uso). Adicionar 100 μ L de PBS-Leche descremada al 5% (Svelty, Nestlé) a los pozos que servirán como testigo negativo (**control S/Ag**) y 100 μ L de una dilución preparada de veneno de serpiente a 0.5 μ g/pozo a los pozos que servirán como control de especificidad (Figura I).
2. Pre-incubar la placa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 1 hora.
3. Incubar la placa de 2 a 8°C por 22 a 24 horas para permitir la adsorción del antígeno a la fase sólida.
4. El mismo día de la sensibilización de las placas, preparar las diluciones 1:8000 de las catorce muestras de sueros equinos con PBS-Tween al 0.05%, pH 7.4, y guardarlas en refrigeración entre 2 a 8°C para el siguiente día.
5. Después de la incubación de las placas, eliminar las soluciones de los pozos empleando el lavador de placas TECAM, Hydroflex.
6. Lavarlos pozos con 300 μ L de PBS-Tween al 0.05%, pH 7.4: Dejar los pozos con el amortiguador de lavado por 1 minuto en agitación y al cabo de este tiempo, eliminar la solución como en el punto 5. Repetir este proceso 3 veces más (el programa destinado en el lavador de placas para este proceso es llamado PVA-82).
7. Agregar 200 μ L de PBS-Leche descremada al 5% a todos los pozos para recubrir los sitios a los que no se adsorbió el antígeno (bloqueo). Utilizar la solución de PBS-Leche preparado el día anterior.
8. Incubar las placas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 1 hora.
9. Repetir los pasos 5 y 6.
10. Adicionar 100 μ L de la dilución 1:8000 de los sueros de equino problema (primer anticuerpo) a los pozos según correspondan (Figura I). Se manejan dos equinos por placa.

- Adicionar 100 µL de PBS-Leche a los pozos testigo negativo sin anticuerpo (**S/Suero**).
 - A los pozos marcados como testigo de suero negativo (**C. Negativo**), adicionar 100 µL de suero equino antiviperino a una dilución 1:8000.
 - Con respecto a los pozos indicados como testigo de suero positivo (**C. Positivo**) y a los testigos sin antígeno (**control S/Ag**), adicionar 100 µL de la dilución 1:8000 del día 20 del equino número 6 perteneciente al esquema actual PAB1 (el suero de este equino fue uno de los utilizados para la estandarización del método).
11. Incubar las placas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 90 minutos para permitir la reacción antígeno-anticuerpo.
 12. Repetir los pasos 5 y 6.
 13. Adicionar 100 µL de la dilución 1:8000 del conjugados anti-IgG de caballo elaborada en cabra acoplado a peroxidasa marca Sigma, catálogo A9292 (segundo anticuerpo) en PBS-Leche al 5%, a todos los pozos excepto a los que sirven como testigos sin conjugado (**S/Conj**), los cuales se les adiciona 100 µL de PBS-Leche al 5%.
 14. Incubar las placas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 1 hora.
 15. Repetir dos veces los pasos 5 y 6.
 16. Adicionar 100 µL de la solución de revelado recién preparada en regulador de citratos al 0.1 M, pH 5.6 (Anexo 3).
 17. Incubar las placas en la oscuridad por 20 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
 18. Detener la reacción enzimática adicionando a cada pozo 20 µL de H_2SO_4 8N.
 19. Realizar las lecturas de Absorbancia del color desarrollado con el lector de ELISA (TECAM, Sunrise), usando una longitud de onda de 492 nm.

Tabla I. Testigos utilizados para validar los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA.

TESTIGO	CONTENIDO
Testigo positivo (C. Positivo)	Veneno polivalente de alacrán + Suero positivo (día 20 del equino 6 del esquema PAB1) + Conjugado.
Testigo negativo (C. Negativo)	Veneno polivalente de alacrán + Suero antiviperino + Conjugado.
Testigo negativo de especificidad (Veneno de serpiente)	Veneno de serpiente (<i>Crotalus</i>) + Suero positivo (día 20 del equino 6 del esquema PAB1) + Conjugado.
Testigo negativo sin antígeno (S/Ag)	Suero positivo (día 20 del equino 6 del esquema PAB1) + Conjugado.
Testigo negativo sin suero (S/Suero)	Veneno polivalente de alacrán + Conjugado.
Testigo negativo sin conjugado (S/Conj)	Veneno polivalente de alacrán + Suero positivo (día 20 del equino 6 del esquema PAB1).

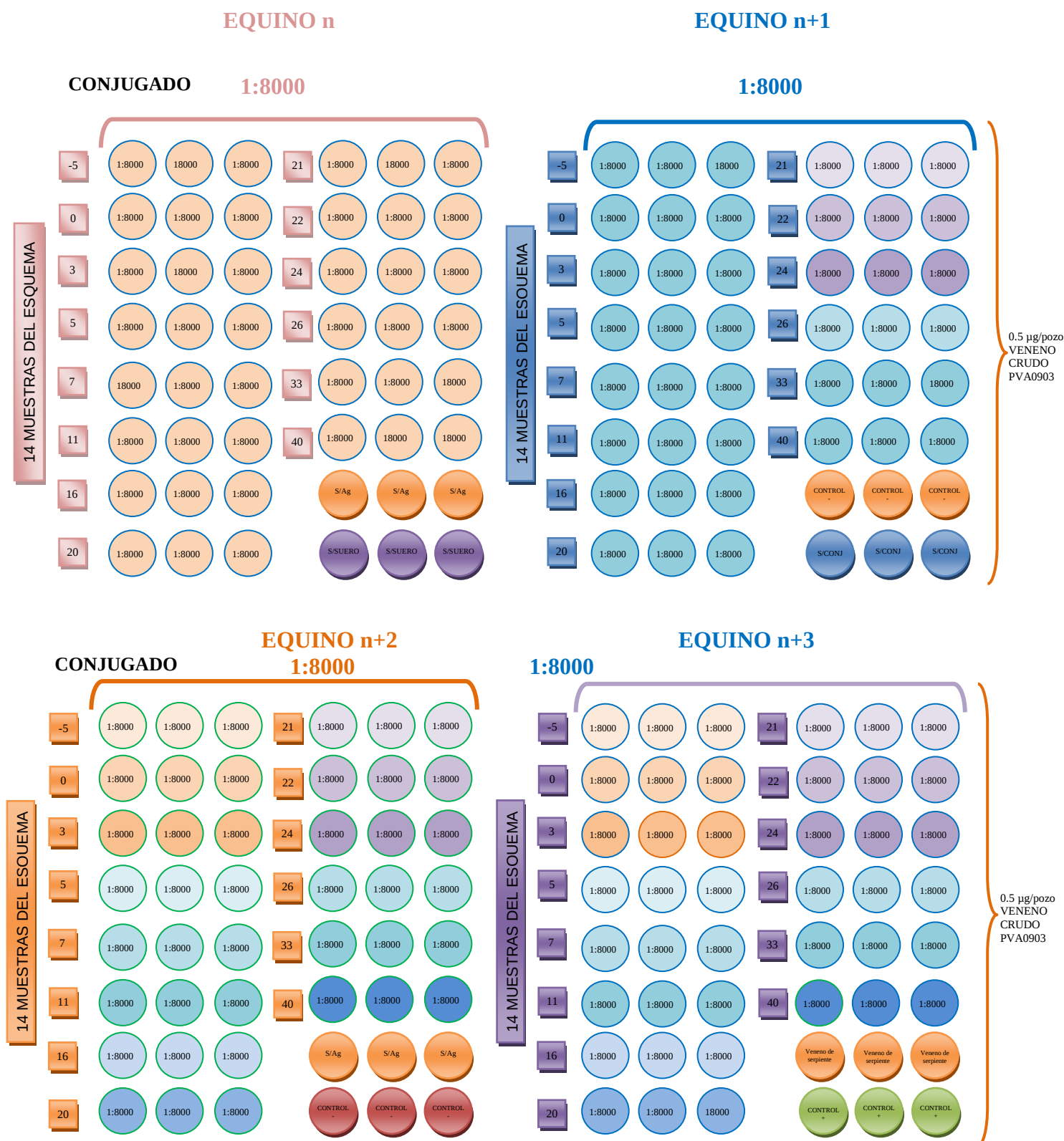


Figura I. Distribución de los sueros de equinos y sus testigos en dos placas de poliestireno de 96 pozos. En total se muestra la distribución de catorce sueros de cuatro equinos diferentes y los testigos de la prueba.

Anexo 5. Resultados y análisis estadístico del Hemograma equino.

Tabla I. Resultados del Hemograma equino a los cinco días antes del inicio de las inoculaciones.

HEMOGRAMA EQUINO

Caballos productores de sueros hiperinmunes.

Evaluación de control.

Muestra tomada a los **5 días** antes de la inoculación.

ANALITO	UNIDADES	REFERENCIA	EQUINOS DEL ESQUEMA ACTUAL (PAB1)								EQUINOS DEL ESQUEMA A COMPARAR PAB2								EQUINOS DEL ESQUEMA A COMPARAR PAB3							
			1	2	3	4	5	6	7*	Promedio n=6	8	9	10	11	12	13	14	Promedio n=7	15	16	17	18	19	20	21	Promedio n=7
HEMATOCRITO	L/L	0.32-0.52	0.42	0.44	0.41	0.36	0.46	0.38	0.46	0.412	0.42	0.5	0.48	0.52	0.45	0.42	0.29	0.440	0.45	0.4	0.5	0.54	0.4	0.43	0.45	0.453
HEMOGLOBINA	g/L	111-190	150	161	148	126	166	130	162	146.8	151	178	159	179	154	148	116	155.0	151	132	171	191	128	138	146	151.0
ERITROCITOS	X10 ¹² /L	6.5-12.5	9.2	9.8	8.9	8	9.3	8.1	9.6	8.88	9.4	10.4	10	11.3	9.8	9.3	7.3	9.64	10.1	8.8	11	12.7	9.1	9.2	9.6	10.07
VGM	fL	34-58	46	45	46	45	49	47	48	46.3	45	48	48	46	46	45	46	46.3	45	45	45	43	44	47	47	45.1
CGMH	g/L	310-370	357	366	361	350	361	342	352	356.2	360	356	341	334	342	352	331	345.1	332	330	342	354	320	321	324	331.9
PROTEINAS	g/L	60-80	68	64	68	66	70	71	70	67.8	70	72	80	76	64	64	65	70.1	68	64	70	70	70	66	70	68.3
FIBRINOGENO	g/L	<5	1	2	2	3	2	3	2	2.2	2	2	2	5	2	1	1	2.1	2	2	2	2	1	1	2	1.7
LEUCOCITOS	X10 ⁹ /L	5.5-14.5	10.7	10.7	10.5	9.9	9.6	7.4	10.5	9.80	11.1	18.9	12.5	17.6	11	11.5	4.4	12.43	9.3	9.9	13.3	8.6	10.1	6	7.6	9.26
PLAQUETAS	X10 ⁹ /L	100-600	352	164	240	312	212	248	208	254.7	188	192	ADECU ADAS	288	300	188	ADECU ADAS	202.7	287	ADECU ADAS	ADECU ADAS	368	316	216	248	287.0
NEUTROFILOS	X10 ⁹ /L	2.7-7.6	4.8	3.4	4	3.9	4.5	4.8	5	4.23	5.7	12.5	7.6	10.7	4.4	7	3.2	7.30	5.4	3.9	8.5	5.4	6.2	4.4	3.8	5.37
BANDAS	X10 ⁹ /L	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.1	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
LINFOCITOS	X10 ⁹ /L	1.5-7.5	5.4	7.1	6.2	5.7	4.8	2.4	4.9	5.27	5	5.1	4.8	6.7	5.9	4.4	0.9	4.69	3.0	5.7	4.1	2.8	0.4	1.4	3.3	2.96
MONOCITOS	X10 ⁹ /L	0-0.8	0.3	0	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4	0.13	0.2	0.9	0	0.7	0.3	0	0	0.30	0.3	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3	0.27
EOSINOFILOS	X10 ⁹ /L	0-0.9	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.13	0.1	0.2	0.1	0	0.4	0.1	0.2	0.16	0.1	0.1	0.4	0	0	0	0.2	0.11
BASOFILOS	X10 ⁹ /L	0-0.2	0	0	0.1	0.1	0	0	0.1	0.03	0	0.2	0	0	0	0	0.1	0.04	0	0	0	0	0	0	0	0.00
MORF. ERITROCITOS	----	NORMAL	NORMAL							NORMAL	NORMAL							NORMAL	NORMAL							NORMAL

Nota: La evaluación fue realizada por proveedor externo certificado (EXPERTO, profesionales en patología clínica veterinaria).

*El equino número 7 no se consideró en el análisis estadístico debido a que no completó el esquema de inoculación por presentar reacción de hipersensibilidad cutánea.

Tabla II. Resultados del Hemograma equino a los veinticuatro días después de la primera inoculación.

HEMOGRAMA EQUINO

Caballos productores de sueros hiperinmunes

Evaluación de control

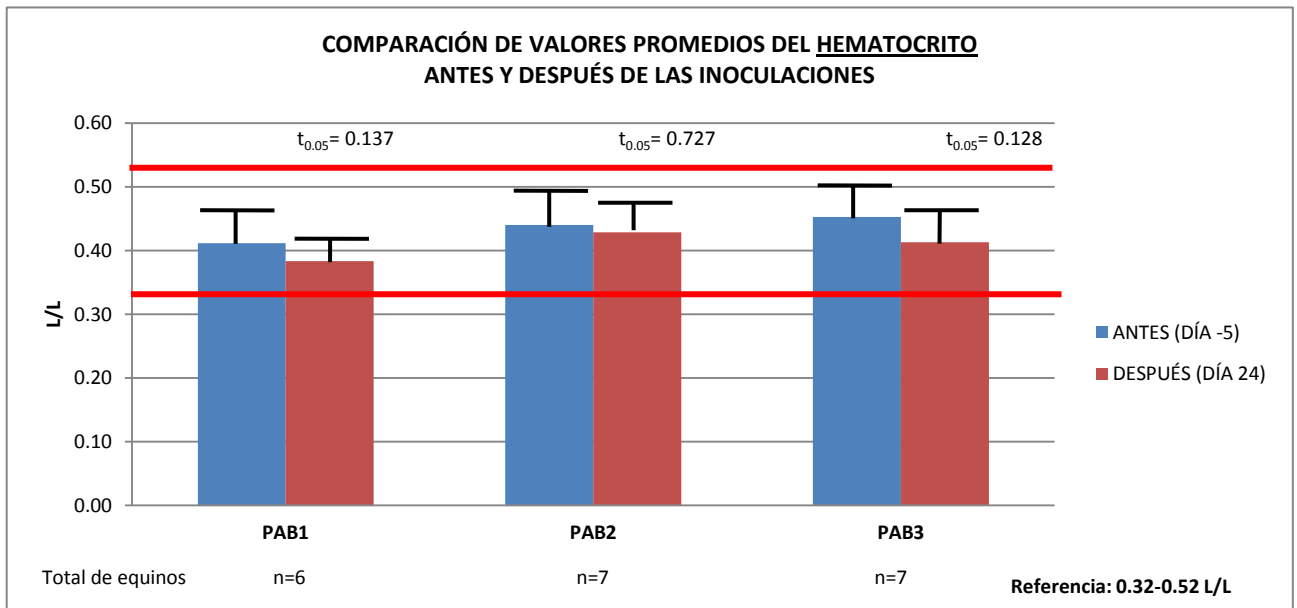
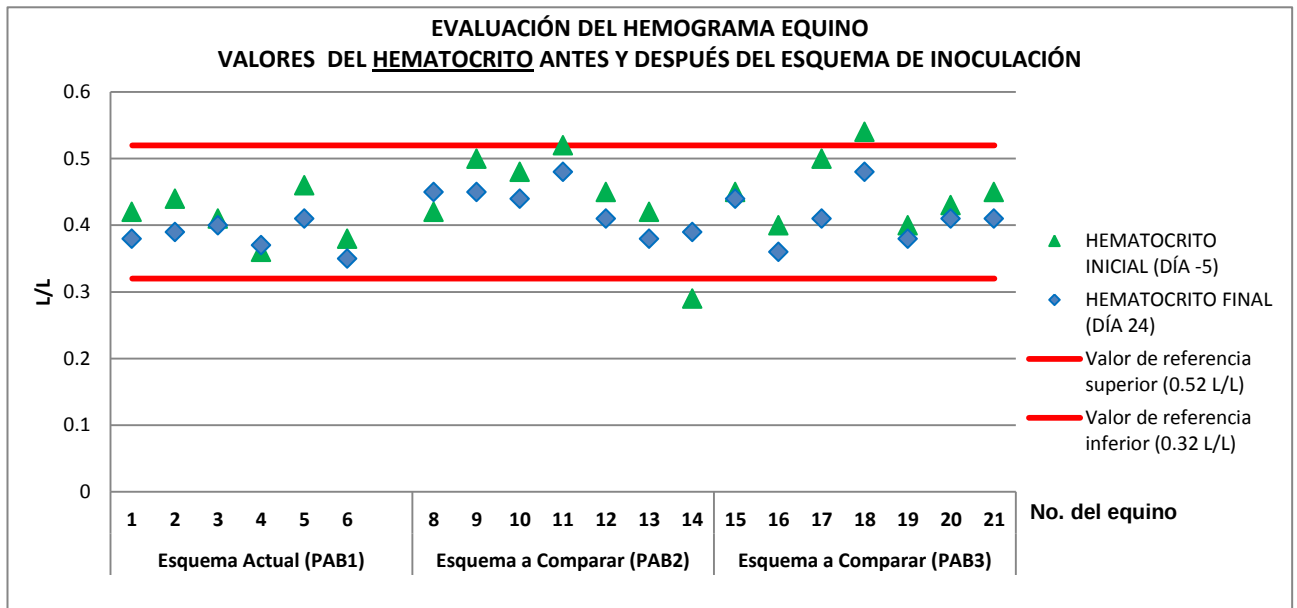
Muestra tomada en el **día 24 después** de la primera inoculación

ANALITO	UNIDADES	REFERENCIA	EQUINOS DEL ESQUEMA ACTUAL (PAB1)								EQUINOS DEL ESQUEMA A COMPARAR PAB2								EQUINOS DEL ESQUEMA A COMPARAR PAB3							
			1	2	3	4	5	6	7*	Promedio n=6	8	9	10	11	12	13	14	Promedio n=7	15	16	17	18	19	20	21	Promedio n=7
HEMATOCRITO	L/L	0.32-0.52	0.38	0.39	0.4	0.37	0.41	0.35	0.4	0.383	0.45	0.45	0.44	0.48	0.41	0.38	0.39	0.429	0.44	0.36	0.41	0.48	0.38	0.41	0.41	0.413
HEMOGLOBINA	g/L	111-190	129	138	142	128	145	118	140	133.3	155	149	152	162	138	130	136	146.0	146	124	139	166	129	136	135	139.3
ERITROCITOS	X10 ¹² /L	6.5-12.5	8	8.5	8.8	8.3	9	7.4	8.7	8.33	10.1	9.3	9.5	10.4	9.2	8.6	8.6	9.39	9.7	8	9.1	10.7	8.6	8.9	8.8	9.11
VGM	fL	34-58	48	46	45	45	46	47	46	46.2	45	48	46	46	45	44	45	45.6	45	45	45	45	44	46	47	45.3
CGMH	g/L	310-370	339	354	355	346	354	337	350	347.5	344	331	345	338	337	342	349	340.9	332	344	339	346	339	332	329	337.3
PROTEINAS	g/L	60-80	72	82	84	80	78	102	82	83.0	80	76	90	76	83	82	83	81.4	88	80	76	76	66	68	70	74.9
FIBRINOGENO	g/L	<5	1	2	2	4	2	2	4	2.2	2	2	2	2	3	4	1	2.3	4	2	1	2	2	2	2	2.1
LEUCOCITOS	X10 ⁹ /L	5.5-14.5	12.6	13.1	14.1	11.2	10	11.2	16.8	12.03	12.9	16.3	18.9	13.4	12.4	20.6	11.4	15.13	9.6	14	13.6	12	13.9	7.6	8.7	11.34
PLAQUETAS	X10 ⁹ /L	100-600	248	160	228	392	212	272	140	252.0	188	112	140	168	188	172	208	168.0	164	200	144	180	112	124	130	150.6
NEUTROFILOS	X10 ⁹ /L	2.7-7.6	7.4	8.9	9.6	5.1	5.1	8.8	11.2	7.48	5.1	10.6	12.3	8.7	7.6	16.9	6.9	9.73	5.9	9	9.7	7.9	9.6	5.6	4.9	7.51
BANDAS	X10 ⁹ /L	0	0	0.1	0	0	0	0	0.3	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
LINFOCITOS	X10 ⁹ /L	1.5-7.5	5	4.1	4.4	5.3	4.9	2.1	4.2	4.30	6.8	5.1	6	4.1	4.6	2.7	4.4	4.81	2.6	4.8	3.7	3.8	4	1.8	3.5	3.46
MONOCITOS	X10 ⁹ /L	0-0.8	0.1	0	0.1	0.6	0	0.2	0.7	0.17	0.4	0.6	0.2	0.1	0.2	0.6	0.1	0.31	0.8	0.2	0.1	0.1	0	0.1	0	0.19
EOSINOFILOS	X10 ⁹ /L	0-0.9	0.1	0	0	0.1	0	0.1	0.2	0.05	0.5	0	0.4	0.5	0	0.2	0	0.23	0.3	0	0.1	0.2	0.3	0.1	0.3	0.19
BASOFILOS	X10 ⁹ /L	0-0.2	0	0	0	0.1	0	0	0.2	0.02	0.1	0	0	0	0	0.2	0	0.04	0	0	0	0	0	0	0	0.00
MORF. ERITROCITOS	----	NORMAL	NORMAL							NORMAL	NORMAL							NORMAL	NORMAL							NORMAL

PARAMETROS DE IMPORTANCIA	ESQUEMA ACTUAL	ESQUEMA A COMPARAR 1	ESQUEMA A COMPARAR
---------------------------	----------------	----------------------	--------------------

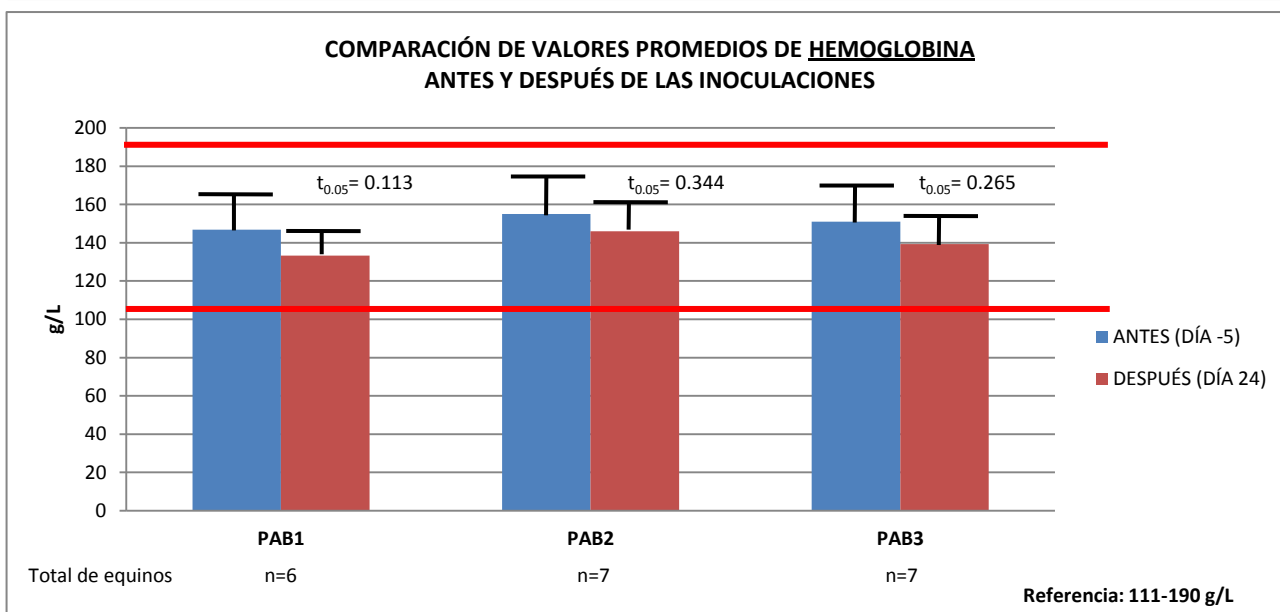
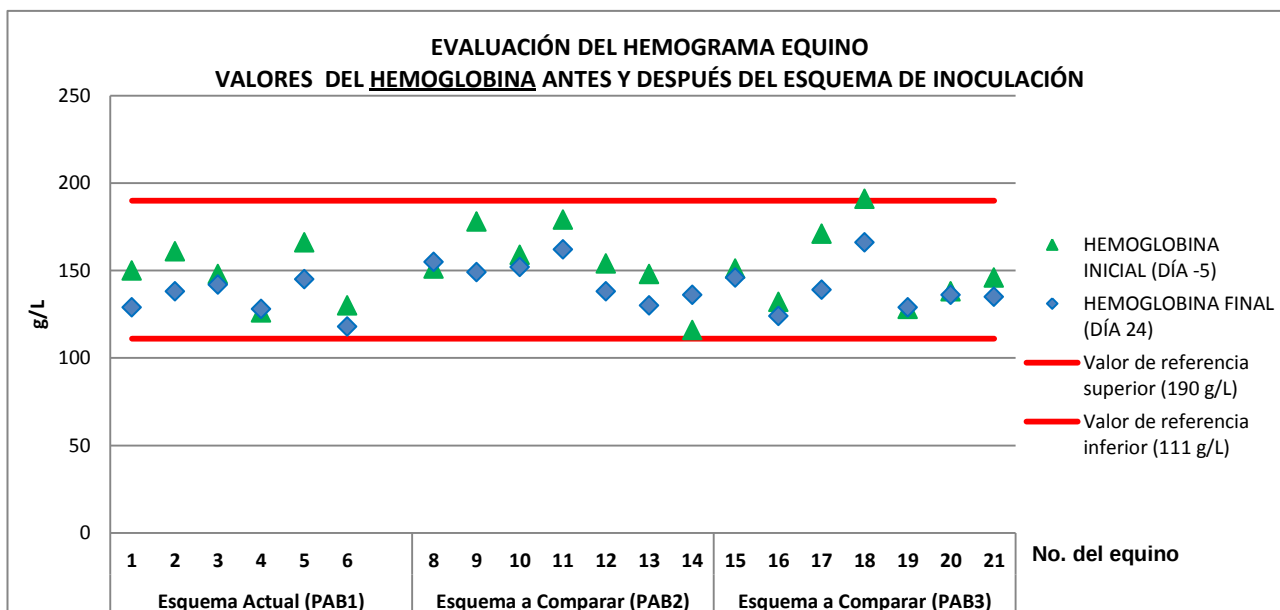
Nota: La evaluación fue realizada por proveedor externo certificado (EXPERTO, profesionales en patología clínica veterinaria).

*El equino número 7 no se considera en el análisis estadístico debido a que no completó el esquema de inoculación por presentar reacción de hipersensibilidad cutánea después de la tercera inoculación.



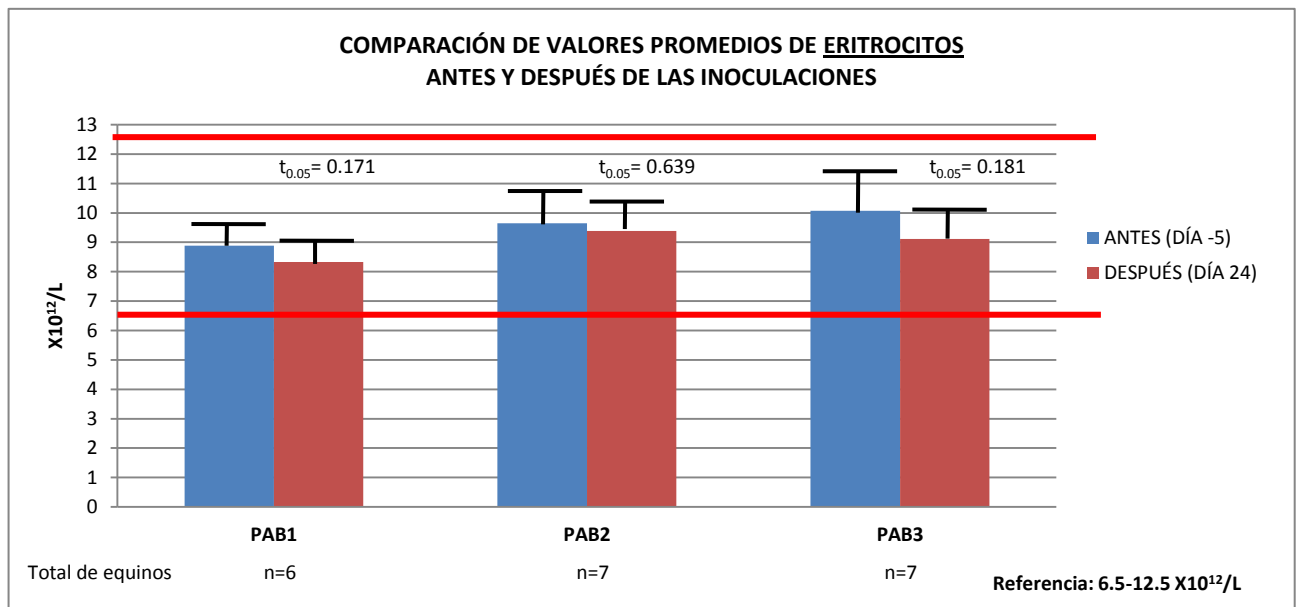
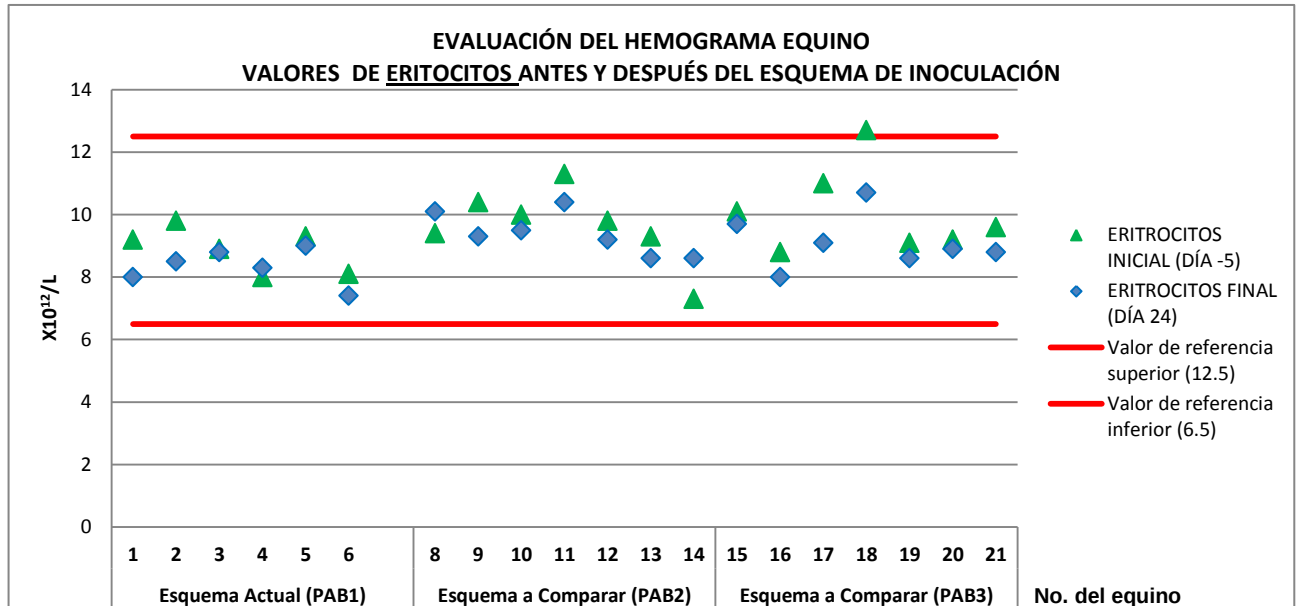
Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	0.130	0.137
PAB2	0.064	0.727
PAB3	0.258	0.128

Figura I. Análisis gráfico y estadístico de los resultados del **hematocrito** equino a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y *t* de Student obtenidos al comparar los datos del **hematocrito** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio, mostrando que no existen diferencias significativas de los valores promedios obtenidos entre el día -5 y el día 24.



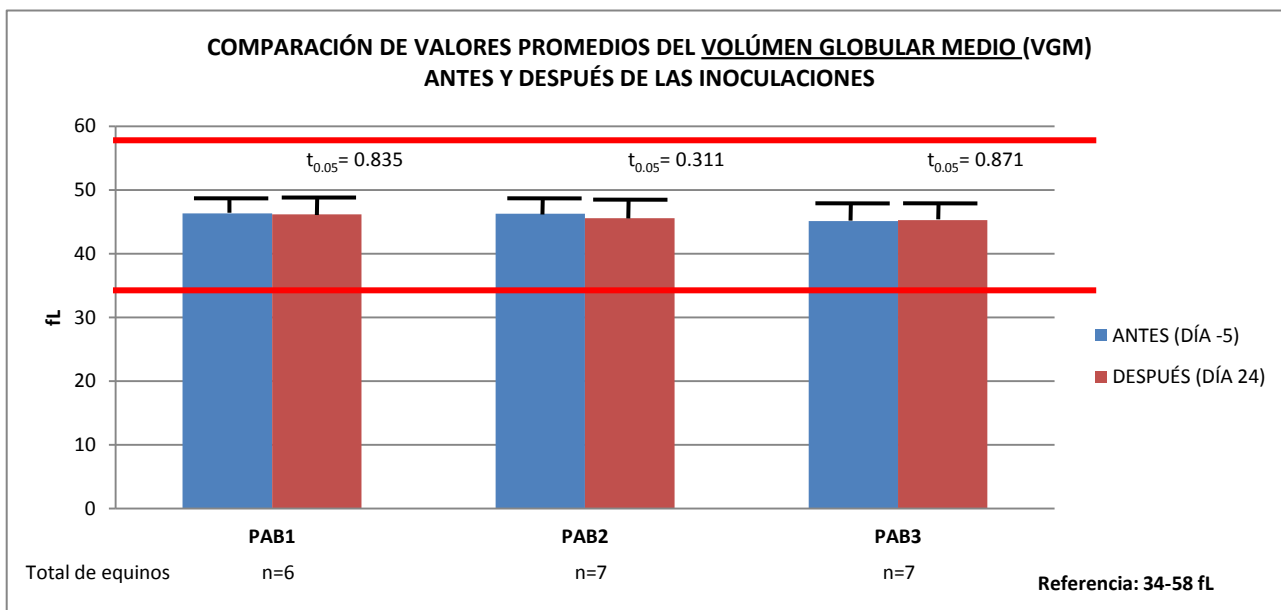
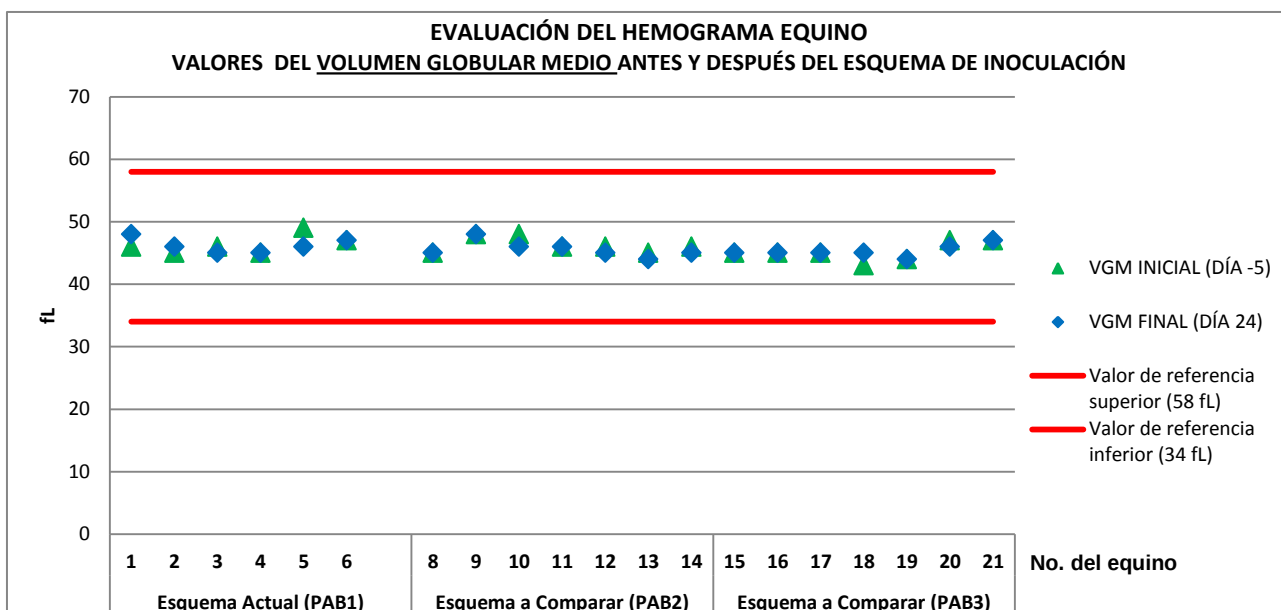
Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	0.167	0.113
PAB2	0.082	0.344
PAB3	0.123	0.265

Figura II. Análisis gráfico y estadístico de los resultados de **hemoglobina** equino a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y t de Student obtenidos al comparar los datos de la **hemoglobina** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio, mostrando que no existen diferencias significativas de los valores promedios obtenidos entre el día -5 y el día 24.



Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	0.334	0.171
PAB2	0.090	0.639
PAB3	0.144	0.181

Figura III. Análisis gráfico y estadístico de los resultados de la concentración de **eritrocitos** equino a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y *t* de Student obtenidos al comparar las concentraciones de **eritrocitos** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio, mostrando que no existen diferencias significativas de los valores promedios obtenidos entre el día -5 y el día 24.



Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	0.296	0.835
PAB2	0.486	0.311
PAB3	0.159	0.871

Figura IV. Análisis gráfico y estadístico de los resultados del **volumen globular medio (VGM)** equino a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y t de Student obtenidos al comparar los datos del VGM antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio, mostrando que no existen diferencias significativas de los valores promedios obtenidos entre el día -5 y el día 24.

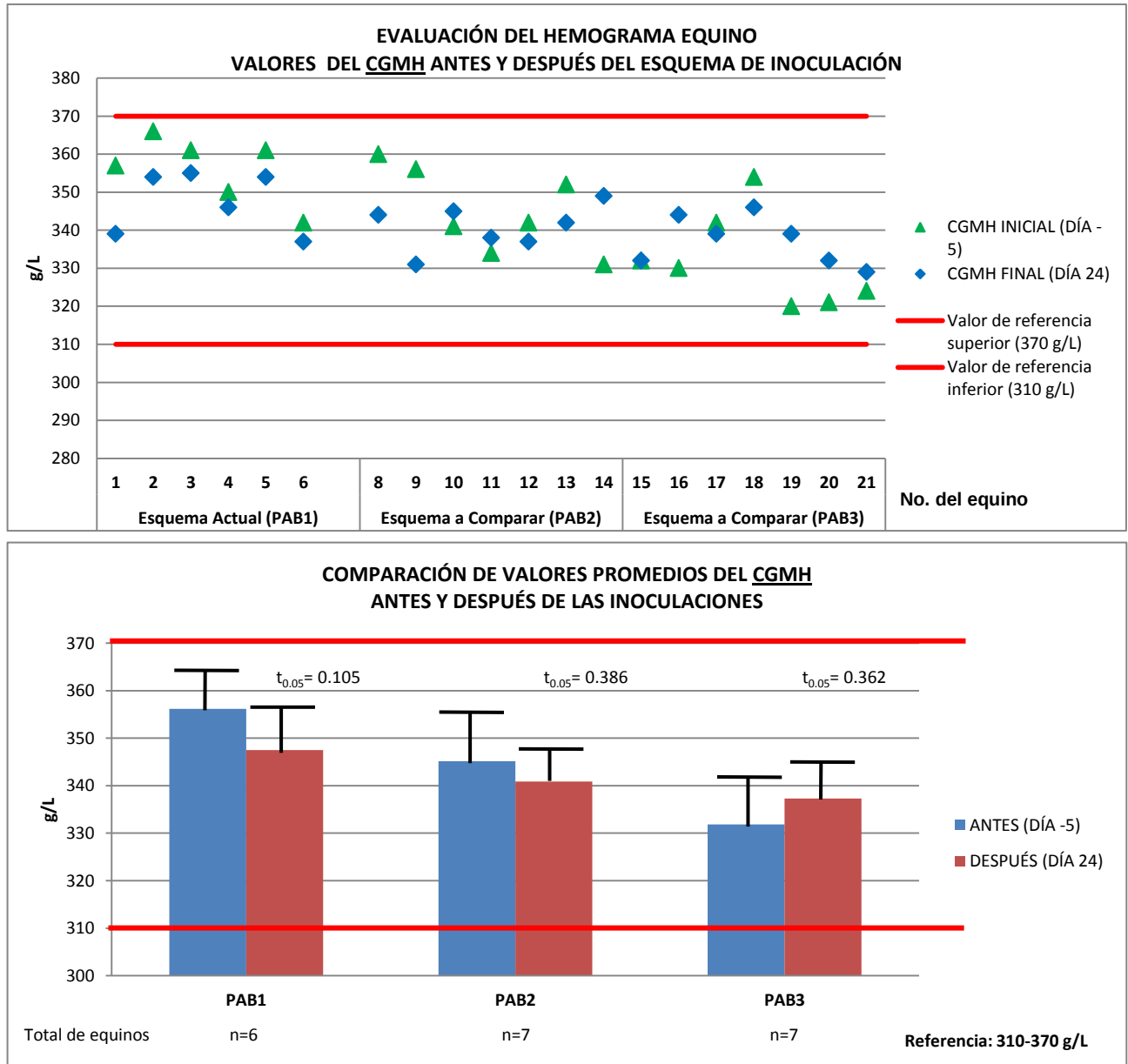
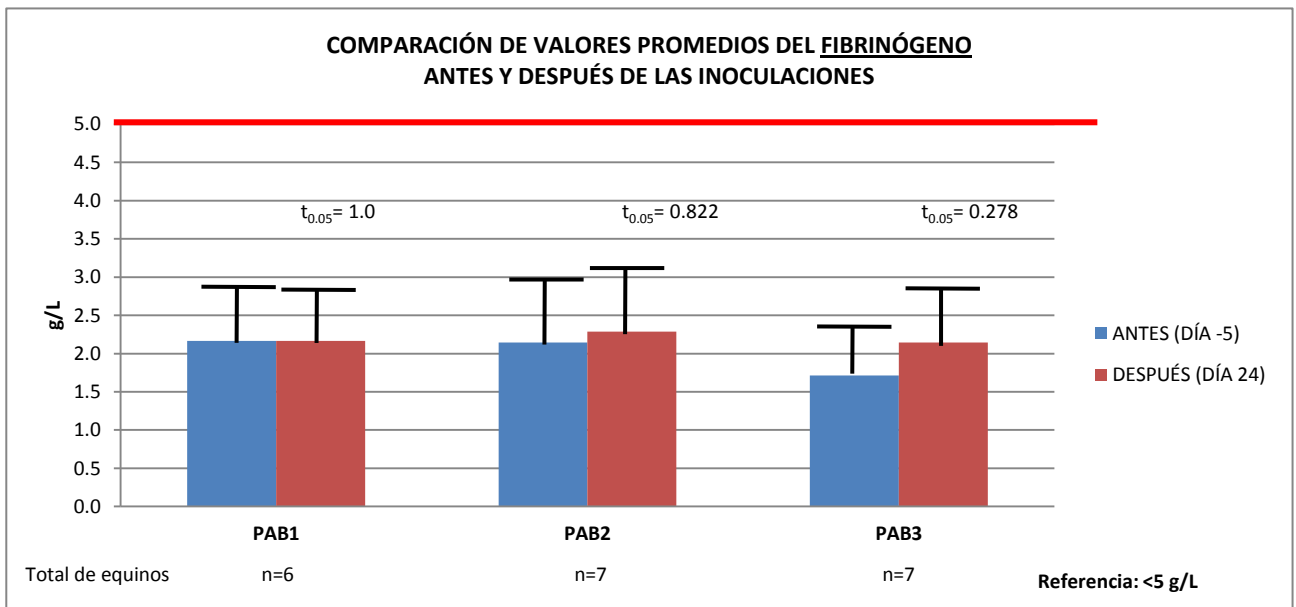
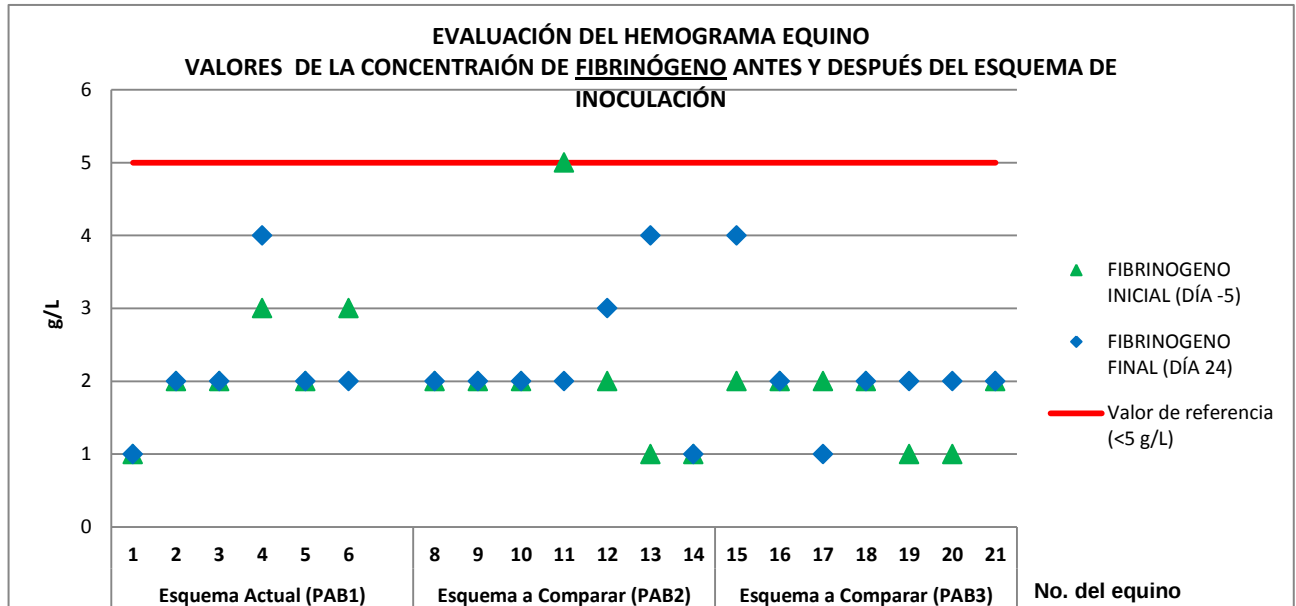


Figura V. Análisis gráfico y estadístico de los resultados de la **concentración hemoglobina globular media (CGMH)** equino a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y *t* de Student obtenidos al comparar los datos del **CGMH** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio, mostrando que no existen diferencias significativas de los valores promedios obtenidos entre el día -5 y el día 24.



Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	0.286	1.000
PAB2	0.210	0.822
PAB3	0.081	0.278

Figura VI. Análisis gráfico y estadístico de los resultados de la concentración de **fibrinógeno** equino a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y *t* de Student obtenidos al comparar los datos de la concentración de **fibrinógeno** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio, mostrando que no existen diferencias significativas de los valores promedios obtenidos entre el día -5 y el día 24.

Anexo 6. Resultados y análisis estadístico del Perfil Bioquímico equino

Tabla I. Resultados del Perfil Bioquímico equino a los cinco días antes del inicio de las inoculaciones.

PERFIL BIOQUÍMICO EQUINO

Caballos productores de sueros hiperinmunes

Evaluación de control

Muestra tomada a los **5 días antes** de la inoculación

ANALITO	UNIDADES	REFERENCIA	EQUINOS DEL ESQUEMA ACTUAL (PAB1)								EQUINOS DEL ESQUEMA A COMPARAR PAB2								EQUINOS DEL ESQUEMA A COMPARAR PAB3							
			1	2	3	4	5	6	*7	Promedio n=6	8	9	10	11	12	13	14	Promedio n=7	15	16	17	18	19	20	21	Promedio n=7
GLUCOSA	mmol/L	3.4-6.2	5.16	5.55	5.33	4.83	4.7	5.48	4.53	5.175	4.63	4.99	5.32	4.71	4.64	4.32	5.37	4.854	5.27	4.42	5.19	5.29	5.04	5.47	6.19	5.267
UREA	mmol/L	4.1-7.2	8.1	8.2	7.2	7.6	8.4	6.7	10.7	7.70	8.2	12.2	5.5	8.9	9.2	9	10.8	9.11	7.8	8.7	6.1	8.1	7.1	9.4	7.4	7.80
CREATININA	μmol/L	<156	97	120	100	112	105	83	110	102.8	97	87	102	107	109	104	110	102.3	112	100	94	127	115	129	109	112.3
CREAT/UREA	calculado	34-58	11.98	14.63	13.89	14.74	12.5	12.39	10.28	13.355	11.83	7.13	18.55	12.02	11.85	11.56	10.19	11.876	14.54	11.49	15.41	15.68	16.2	13.72	14.73	14.539
BILIRRUBINA T	μmol/L	<54	23.4	33.3	28.7	36.4	29.6	33.3	38.5	30.78	36.3	57.8	43.1	54.5	22.7	31.5	38.1	40.57	45	40.5	52.5	47	67.5	35.9	26.8	45.03
AST	U/L	<450	149	256	173	205	292	180	203	209.2	198	162	91	216	338	252	296	221.9	232	203	235	277	272	184	222	232.1
CK	U/L	<425	147	326	227	222	317	150	287	231.5	172	236	164	170	374	334	208	236.9	225	237	223	259	219	142	268	224.7
PROTEINAS T	g/L	53-71	66	62	64	62	66	69	68	64.8	67	68	77	72	61	62	64	67.3	66	62	66	68	67	64	67	65.7
ALBUMINA	g/L	31-39	28	29	30	27	30	28	30	28.7	30	30	31	27	30	29	27	29.1	29	31	30	30	30	28	28	29.4
GLOBULINAS	g/L	20-35	38	33	34	35	36	41	38	36.2	37	38	46	45	31	33	37	38.1	36	31	36	38	37	36	39	36.1
RELACION A/G	calculado	0.89-1.65	0.7	0.9	0.88	0.8	0.8	0.68	0.79	0.793	0.81	0.8	0.67	0.6	0.97	0.88	0.73	0.780	0.82	1	0.8	0.8	0.8	0.78	0.72	0.817
CALCIO	mmol/L	2.79-3.22	3.11	3.14	2.84	2.88	2.95	3.01	3.06	2.988	3.15	2.91	3.02	3.04	2.98	2.92	2.92	2.991	2.9	3.08	2.9	2.95	2.86	3.07	2.97	2.961
FOSFORO I	mmol/L	0.77-1.67	1.4	1.2	1.5	1.3	1.2	0.9	1.4	1.25	1	1	1.1	1.1	1.3	1.3	1.3	1.16	1.2	1.3	1.4	1.1	1.3	1.2	1	1.21
Ca/P	calculado		2.22	2.62	1.89	2.22	2.46	3.34	2.19	2.458	3.15	2.91	2.75	2.76	2.29	2.25	2.25	2.623	2.48	2.37	2.07	2.68	2.2	2.56	2.97	2.476
Na+	mmol/L	132-141	135.6	136.9	135.3	134.3	135.6	136	133.9	135.62	134.5	134.9	135.1	134.7	136.7	135.4	135.1	135.20	135.3	134.2	134.5	134.4	137.2	135	136.6	135.31
k+	mmol/L	3.36-4.99	3.46	4.07	4.1	4.19	4.16	3.84	4.09	3.970	3.75	3.97	3.79	4.11	4.58	3.81	4.07	4.011	3.92	3.86	3.95	4.22	3.55	4.02	3.9	3.917
Cl-	mmol/L	98-105	100.6	101.2	100.4	98	98.8	98	96.2	99.50	99	100.3	98	96	102	98.5	99.1	98.99	99.4	99.5	98.8	98.3	101.6	98	100.2	99.40
BICARBONATO	mmol/L	27-34	21	21	22	21	23	23	22	21.8	19	19	20	23	20	14	23	19.7	21	19	20	21	22	20	23	20.9
AC.ORGANICOS	calculado	4 a 13	17.46	18.8	17	19.5	18	18.84	19.8	18.267	20.3	19.6	20.9	19.8	19.28	26.7	17.1	20.526	19.12	19.56	19.7	19.32	17.2	21	17.31	19.030

PARAMETROS DE IMPORTANCIA	ESQUEMA ACTUAL	ESQUEMA A COMPARAR 1	ESQUEMA A COMPARAR
---------------------------	----------------	----------------------	--------------------

Nota: La evaluación fue realizada por proveedor externo certificado (EXPERTO, profesionales en patología clínica veterinaria).

*El equino número 7 no se considera en el análisis estadístico debido a que no completó el esquema de inoculación por presentar reacción de hipersensibilidad cutánea.

Tabla II. Resultados del Perfil bioquímico equino a los veinticuatro días después de la primera inoculación.

PERFIL BIOQUÍMICO EQUINO

Caballos productores de sueros hiperinmunes

Evaluación de control

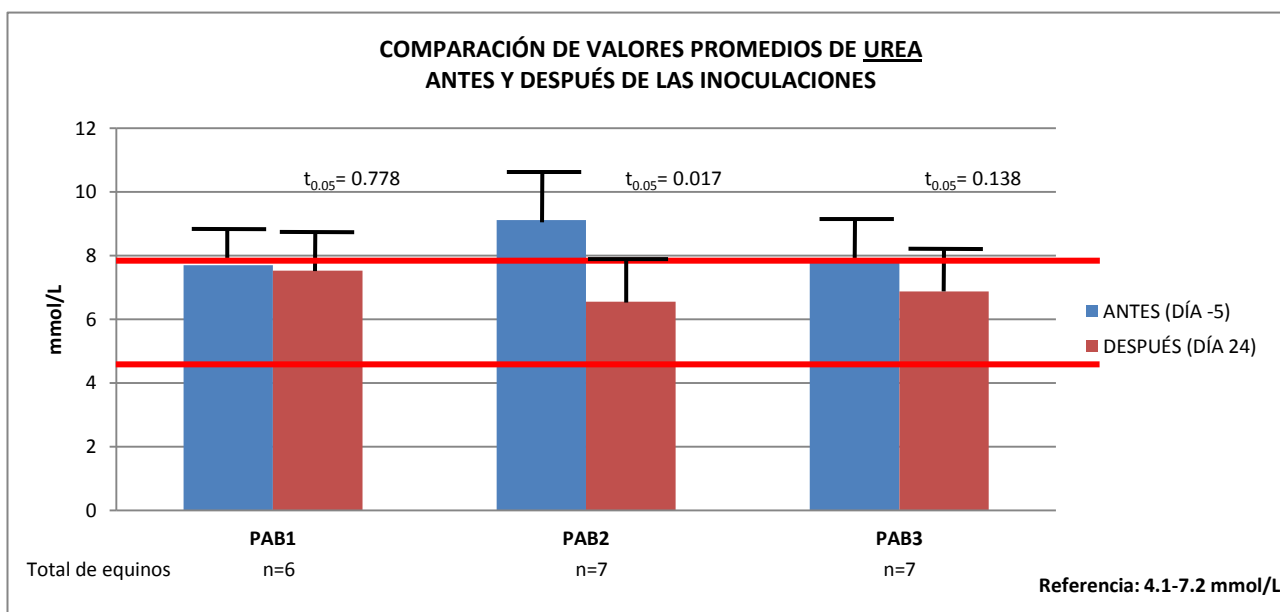
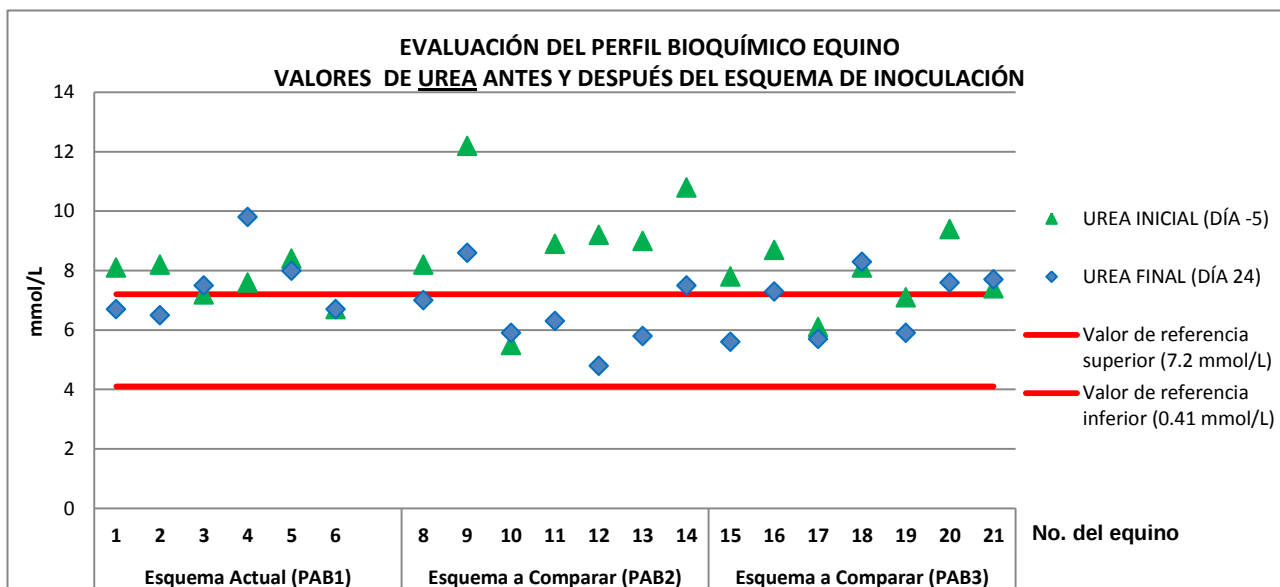
Muestra tomada en el **día 24 después** de la primera inoculación

ANALITO	UNIDADES	REFERENCIA	EQUINOS DEL ESQUEMA ACTUAL (PAB1)								EQUINOS DEL ESQUEMA A COMPARAR PAB2								EQUINOS DEL ESQUEMA A COMPARAR PAB3							
			1	2	3	4	5	6	*7	Promedio n=6	8	9	10	11	12	13	14	Promedio n=7	15	16	17	18	19	20	21	Promedio n=7
GLUCOSA	mmol/L	3.4-6.2	4.68	4.77	4.89	4.82	4.9	4.2	4.52	4.710	4.9	4.49	5.2	5.51	5.2	4.34	5.11	4.964	5.47	4.29	4.77	4.65	4.06	5.19	5.4	4.833
UREA	mmol/L	4.1-7.2	6.7	6.5	7.5	9.8	8	6.7	5.9	7.53	7	8.6	5.9	6.3	4.8	5.8	7.5	6.56	5.6	7.3	5.7	8.3	5.9	7.6	7.7	6.87
CREATININA	μmol/L	<156	76	80	85	202	79	63	82	97.5	77	72	76	91	75	80	82	79.0	72	79	83	91	81	112	103	88.7
CREAT/UREA	calculado	34-58	11.34	12.31	11.33	20.61	9.88	9.4	13.9	12.478	11	8.37	12.88	14.44	15.63	13.79	10.93	12.434	12.86	10.82	14.56	10.96	13.73	14.74	13.38	13.007
BILIRRUBINA T	μmol/L	<54	18.8	31.3	20.7	27.2	24.5	28.2	34.2	25.12	31.6	38.5	42.4	39.2	27.2	32.1	36.1	35.30	37.4	58.7	49.1	26.5	37.6	34.7	31.5	39.36
AST	U/L	<450	101	153	155	133	202	136	191	146.7	158	183	314	174	198	97	167	184.4	73	167	123	202	136	122	164	141.0
CK	U/L	<425	122	171	129	219	254	152	314	174.5	169	110	904	200	272	125	141	274.4	104	164	119	245	126	101	204	151.9
PROTEINAS T	g/L	53-71	68	78	80	76	72	98	76	78.7	76	72	86	72	80	76	80	77.4	84	76	72	72	61	64	66	70.7
ALBUMINA	g/L	31-39	23	27	26	22	35	20	26	25.5	27	23	28	23	22	23	20	23.7	21	26	23	25	25	23	25	24.0
GLOBULINAS	g/L	20-35	45	51	54	54	37	78	50	53.2	49	49	58	49	58	53	60	53.7	63	50	49	47	36	41	41	46.7
RELACION A/G	calculado	0.89-1.65	0.5	0.5	0.48	0.4	0.9	0.26	0.52	0.507	0.55	0.5	0.48	0.47	0.38	0.43	0.33	0.449	0.3	0.5	0.5	0.5	0.7	0.56	0.61	0.524
CALCIO	mmol/L	2.79-3.22	2.96	2.94	3.17	2.8	2.99	2.91	2.91	2.962	2.88	2.94	2.86	2.89	2.8	2.85	2.84	2.866	2.91	2.95	3.01	2.91	2.87	2.93	3.11	2.956
FOSFORO I	mmol/L	0.77-1.67	1.5	1.7	1.6	1.2	1.1	1	1.3	1.35	1.1	1.3	1.2	1.4	1.3	1.3	1.4	1.29	1.5	1.7	1.6	1.1	1.3	1	1.3	1.36
Ca/P	calculado		1.97	1.73	1.98	2.33	2.72	2.91	2.24	2.273	2.62	2.26	2.38	2.06	2.15	2.19	2.03	2.241	1.94	1.74	1.88	2.65	2.21	2.93	2.39	2.249
Na+	mmol/L	132-141	136.3	138.4	137.6	136.9	140.8	136	135.6	137.67	137.3	137.4	136	135.9	137.1	137.9	138.5	137.16	136.1	135.7	137.1	138	138	136.5	137.7	137.01
k+	mmol/L	3.36-4.99	3.45	4.02	4.22	4.08	3.8	3.9	3.79	3.912	4.17	3.77	4.16	4.31	4.08	3.7	3.63	3.974	4.27	3.99	3.37	4.14	3.61	3.93	4.07	3.911
Cl-	mmol/L	98-105	101.7	103.3	101.8	101.4	103.3	100.7	99	102.03	100.4	102.8	98	98	103	102.1	103.7	101.14	100.6	101	101.7	102.2	101.9	100.9	102.6	101.56
BICARBONATO	mmol/L	27-34	21	21	20	21	23	23	20	21.5	25	21	24	23	20	20	20	21.9	21	21	19	23	23	23	21	21.6
AC.ORGANICOS	calculado	4 a 13	17.05	18.1	20.02	18.6	18.3	16.2	20.4	18.045	16.1	17.4	18.2	19.2	18.2	19.5	18.4	18.143	18.8	17.69	20.1	16.94	16.7	16.5	18.17	17.843

PARAMETROS DE IMPORTANCIA	ESQUEMA ACTUAL	ESQUEMA A COMPARAR 1	ESQUEMA A COMPARAR
---------------------------	----------------	----------------------	--------------------

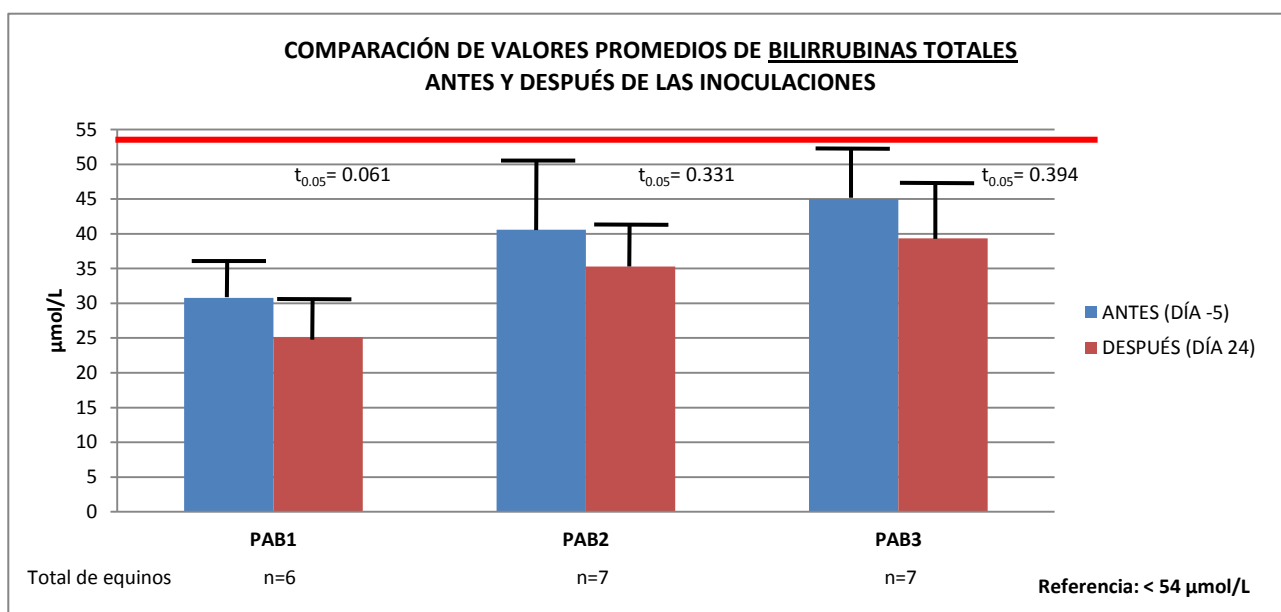
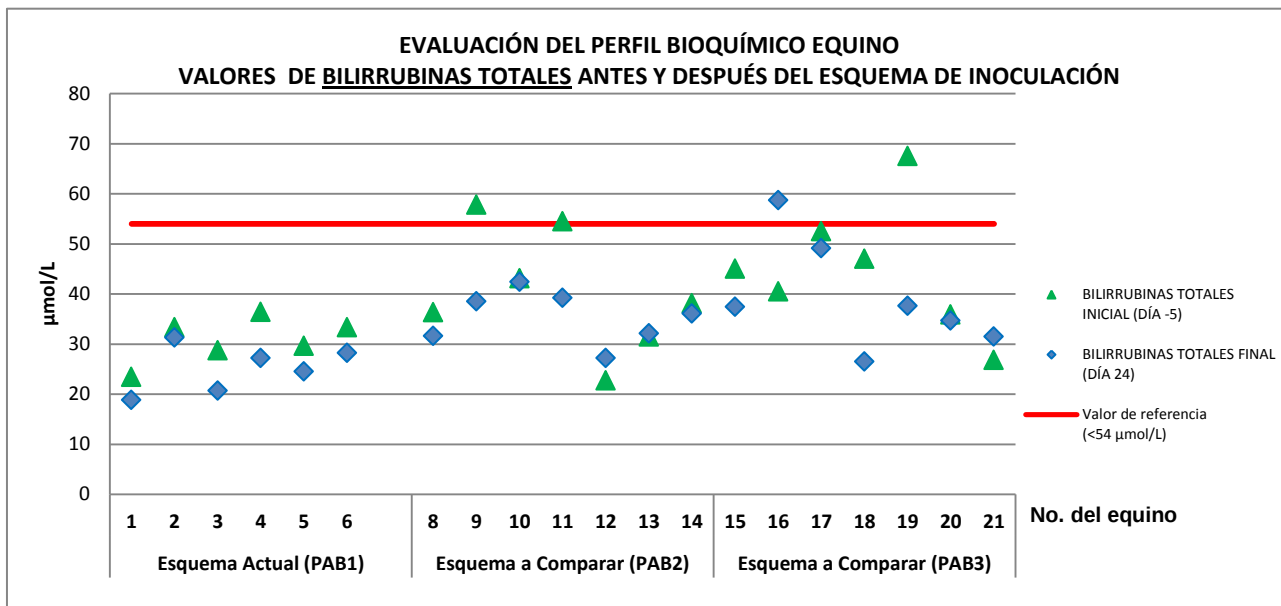
Nota: La evaluación fue realizada por proveedor externo certificado (EXPERTO, profesionales en patología clínica veterinaria).

*El equino número 7 no se considera en el análisis estadístico debido a que no completó el esquema de inoculación por presentar reacción de hipersensibilidad cutánea después de la tercera inoculación.



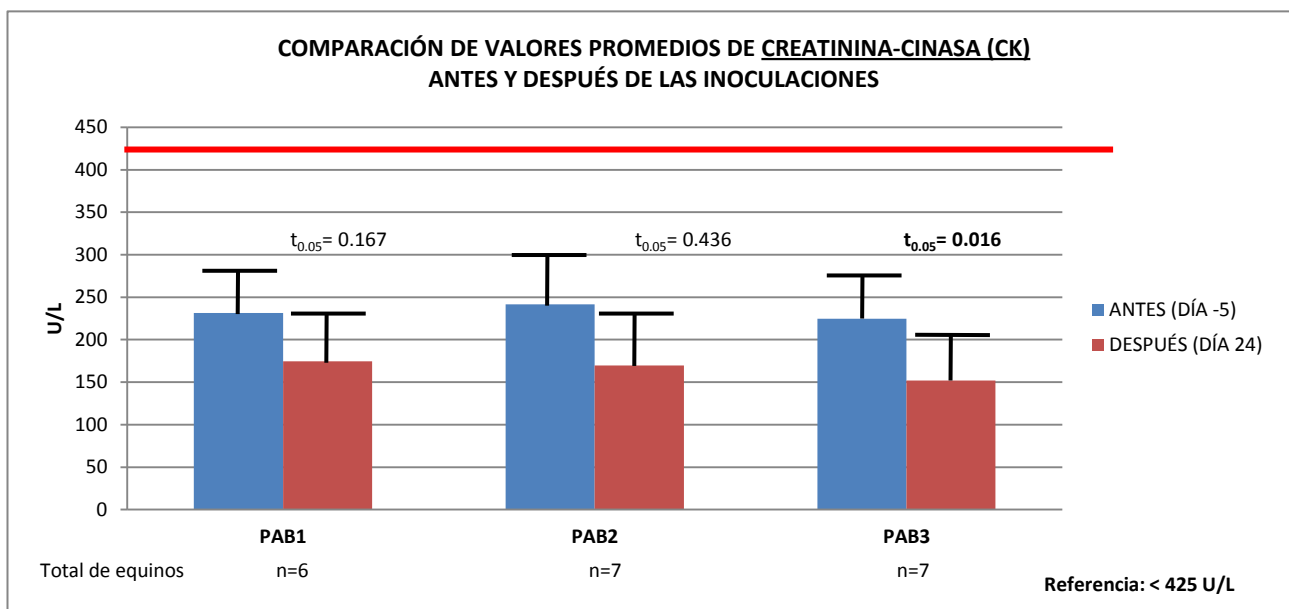
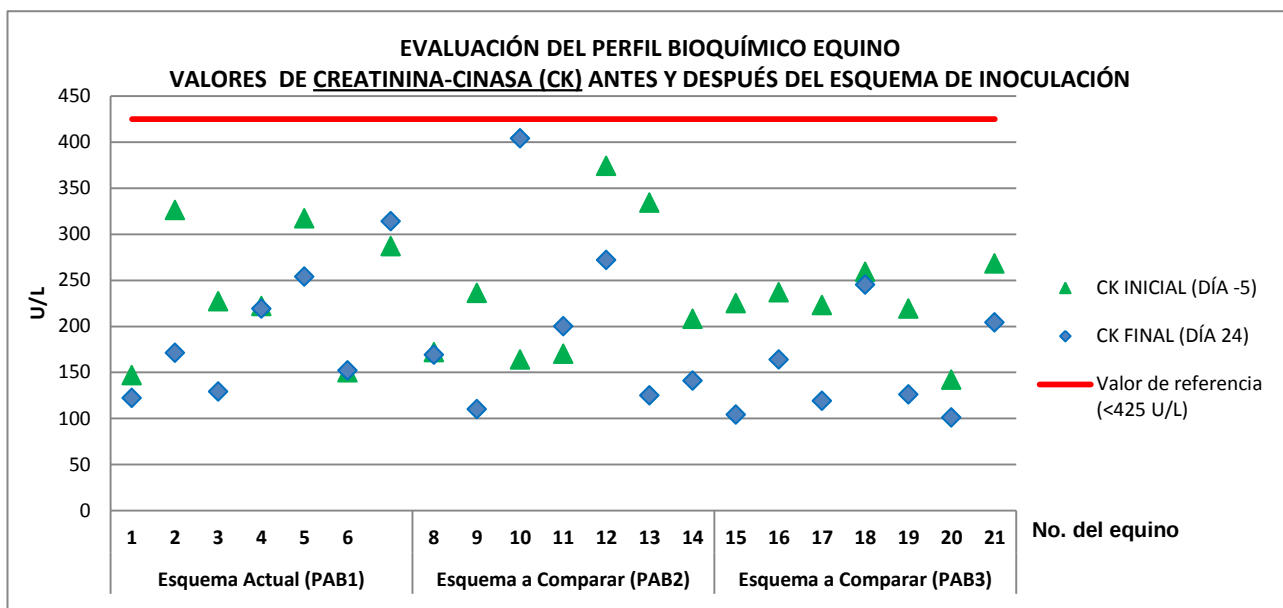
Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	0.092	0.778
PAB2	0.118	*0.017
PAB3	0.476	0.138

Figura I. Análisis gráfico y estadístico de los resultados de la concentración de **urea** en sangre equina a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y t de Student obtenidos al comparar los datos de la concentración de **urea** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio. *Valores < 0.05, existe diferencia estadística al 95% de confianza.



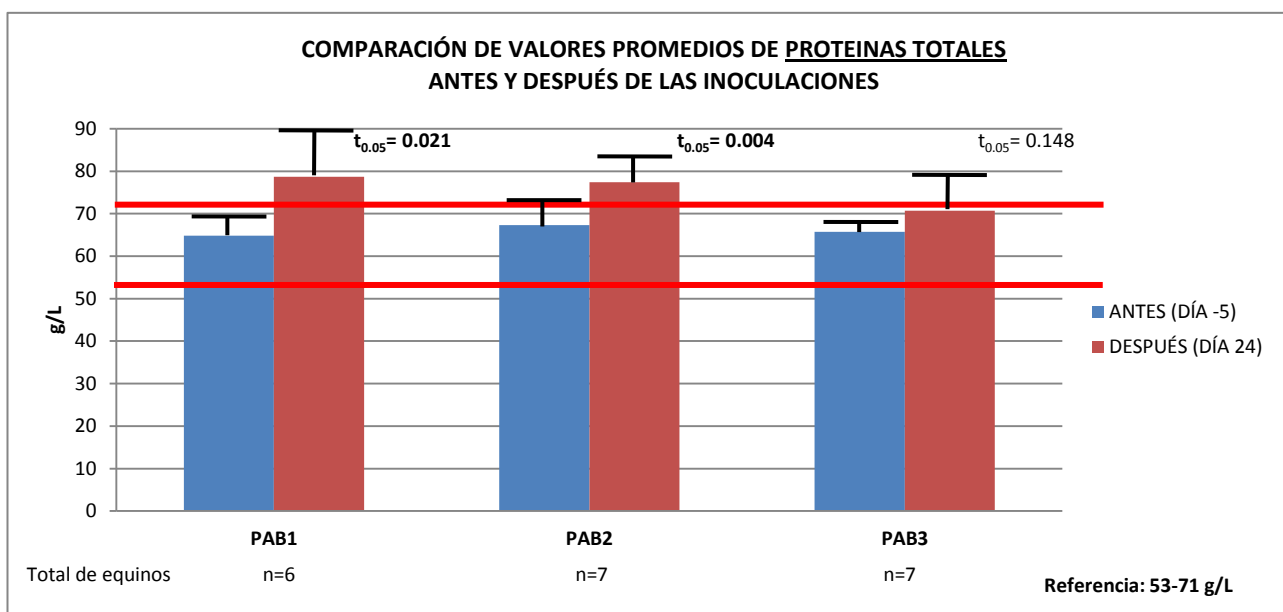
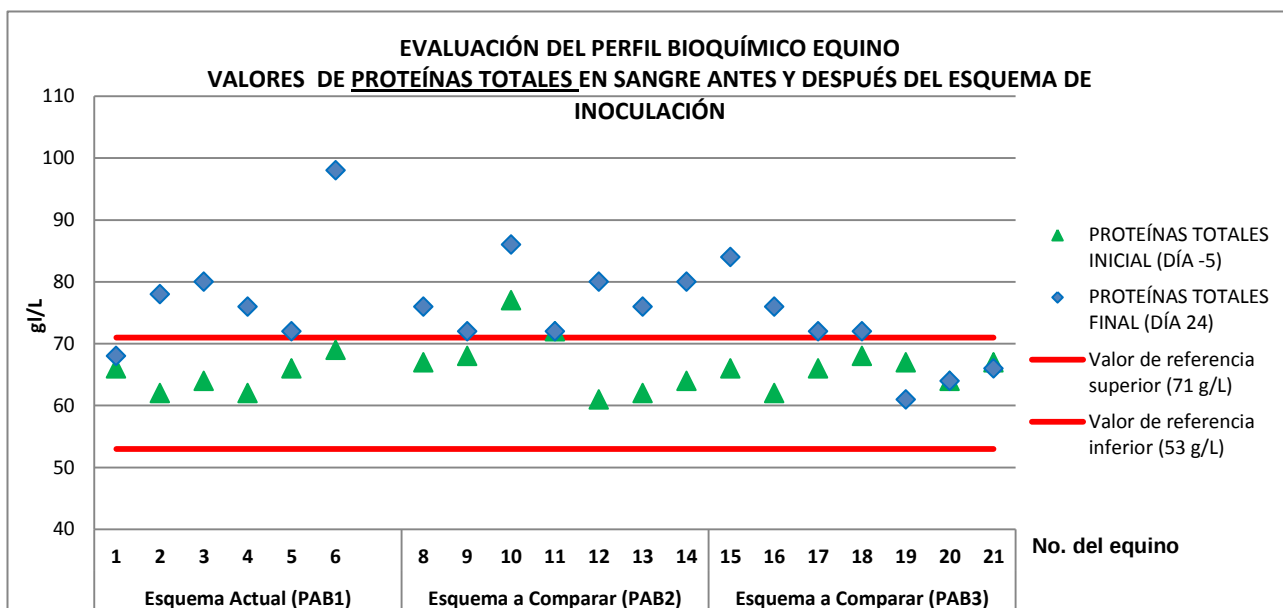
Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	0.471	0.061
PAB2	*0.028	0.331
PAB3	0.353	0.394

Figura II. Análisis gráfico de los resultados de la concentración de **bilirrubinas totales** en sangre equina a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y t de Student obtenidos al comparar los datos de la concentración de **bilirrubinas totales** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio. *La variación de los datos son diferentes entre los dos grupos de comparación, pero no existen diferencias significativas de los valores promedios obtenidos entre el día -5 y el día 24.



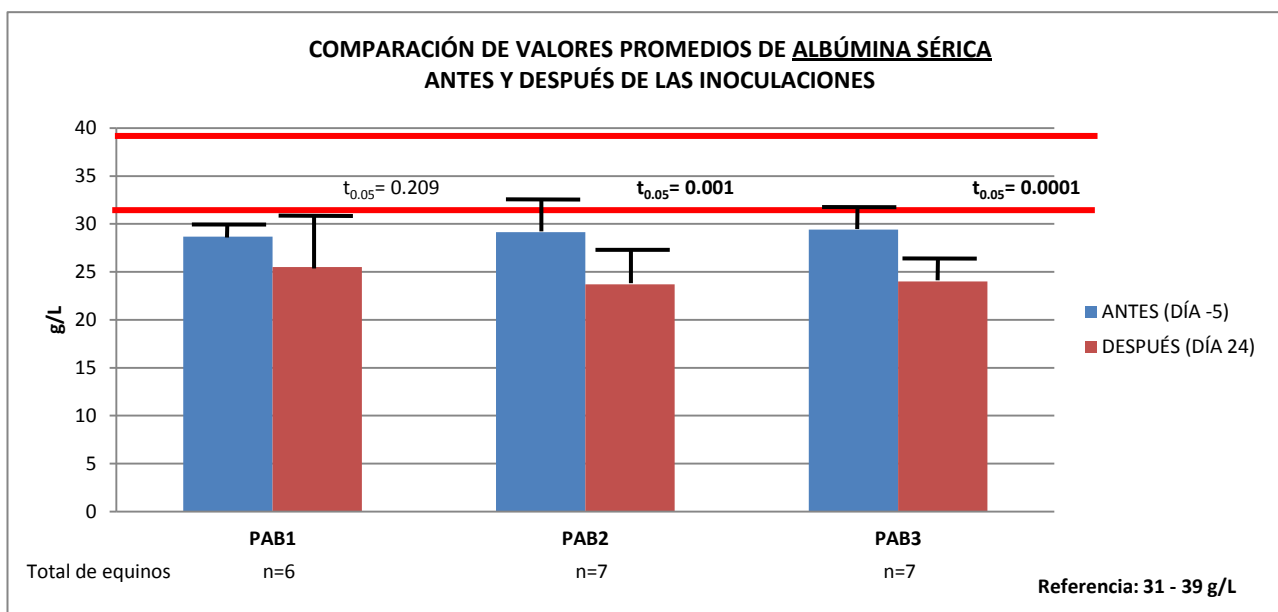
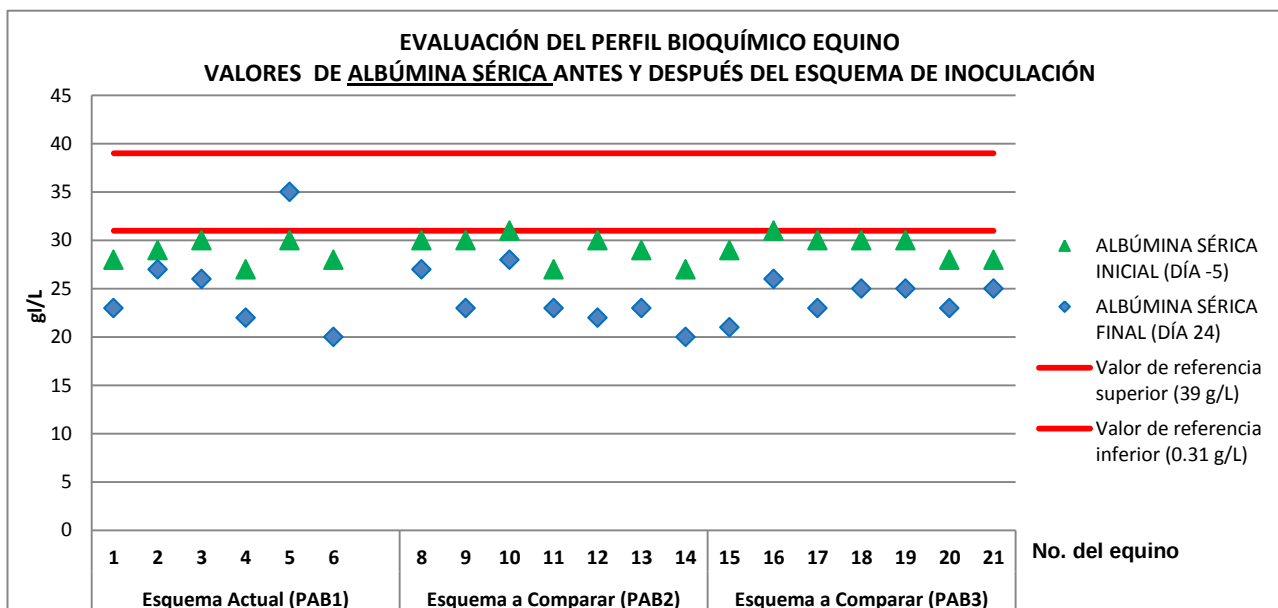
Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	0.202	0.167
PAB2	0.315	0.436
PAB3	0.246	*0.016

Figura III. Análisis gráfico de los resultados de la concentración de **creatinina-cinasa (CK)** en sangre equina a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y *t* de Student obtenidos al comparar los datos de la concentración de **CK** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio.*Valores < 0.05, existe diferencia estadística al 95% de confianza.



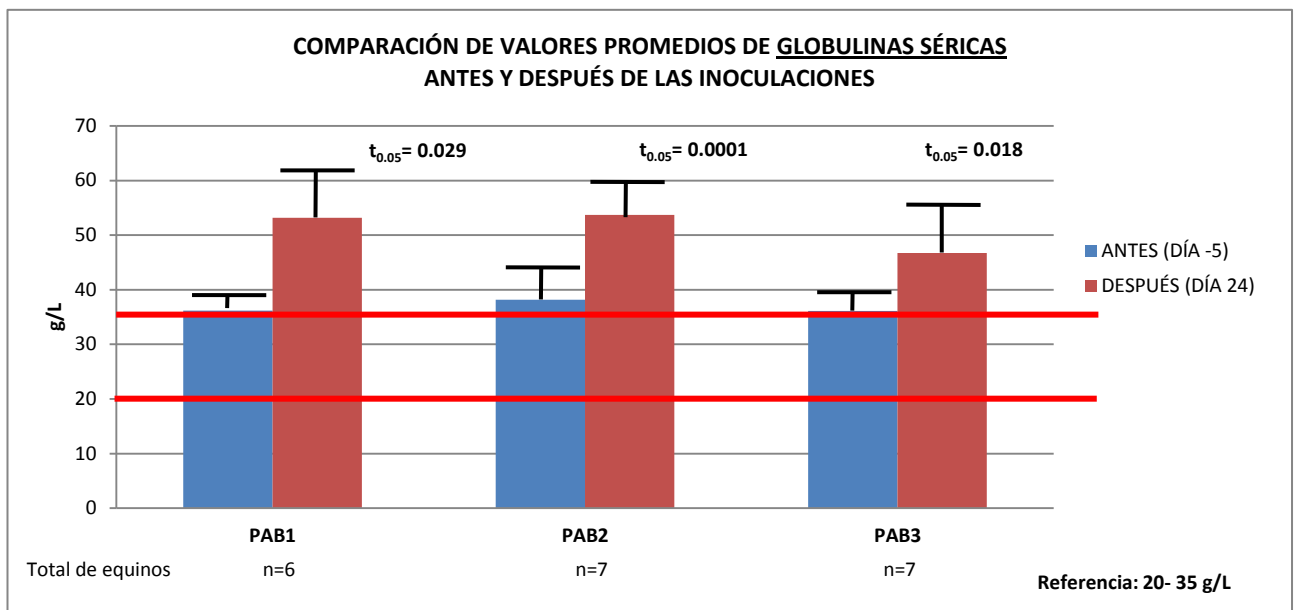
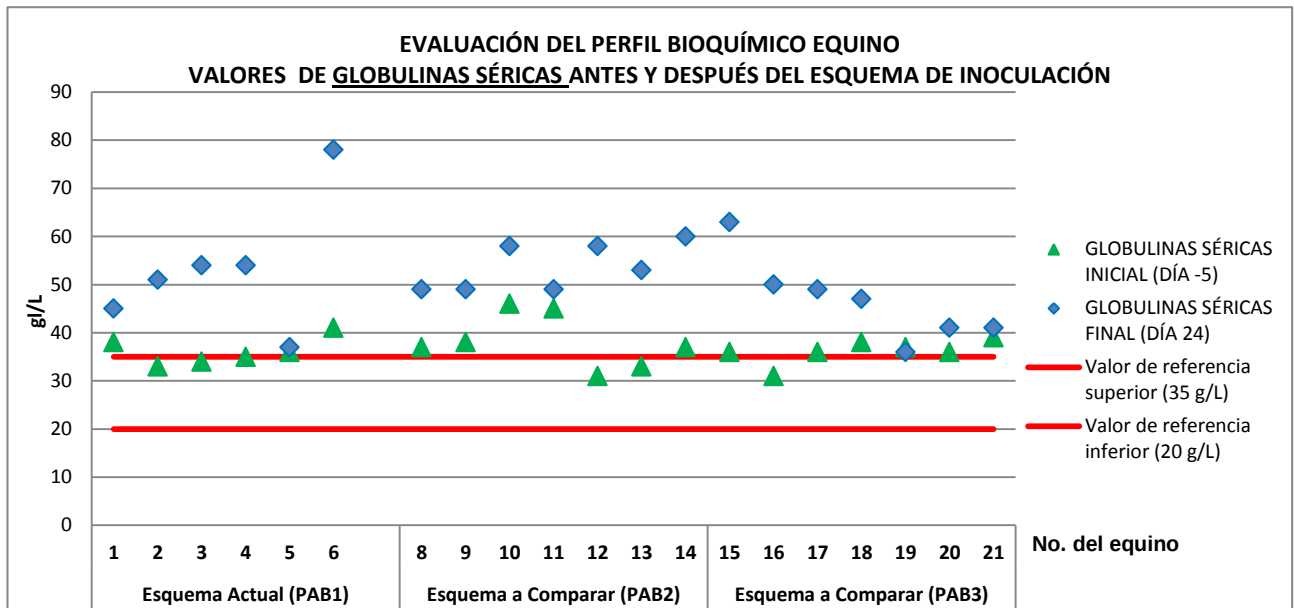
Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	*0.005	*0.021
PAB2	0.377	*0.004
PAB3	*0.002	0.148

Figura IV. Análisis gráfico de los resultados de la concentración de **proteínas totales** en sangre equina a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y *t* de Student obtenidos al comparar los datos de la concentración de **proteínas totales** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio, mostrando que existen diferencias significativas de los valores promedios obtenidos entre el día -5 y el día 24. *Valores < 0.05, existe diferencia estadística al 95% de confianza.



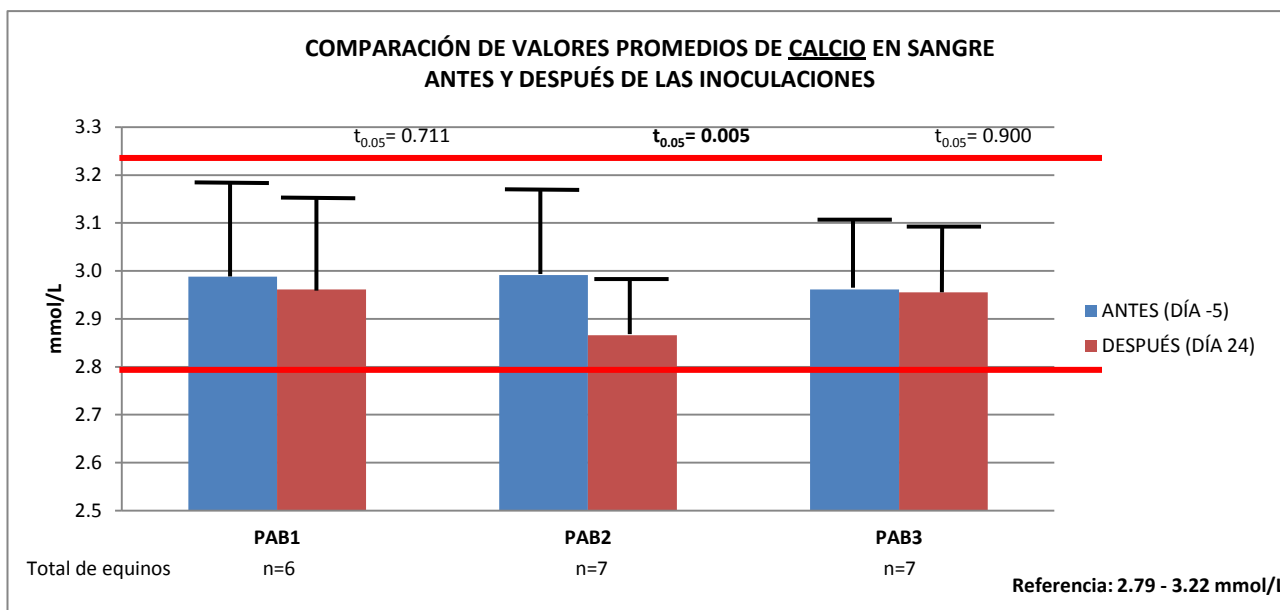
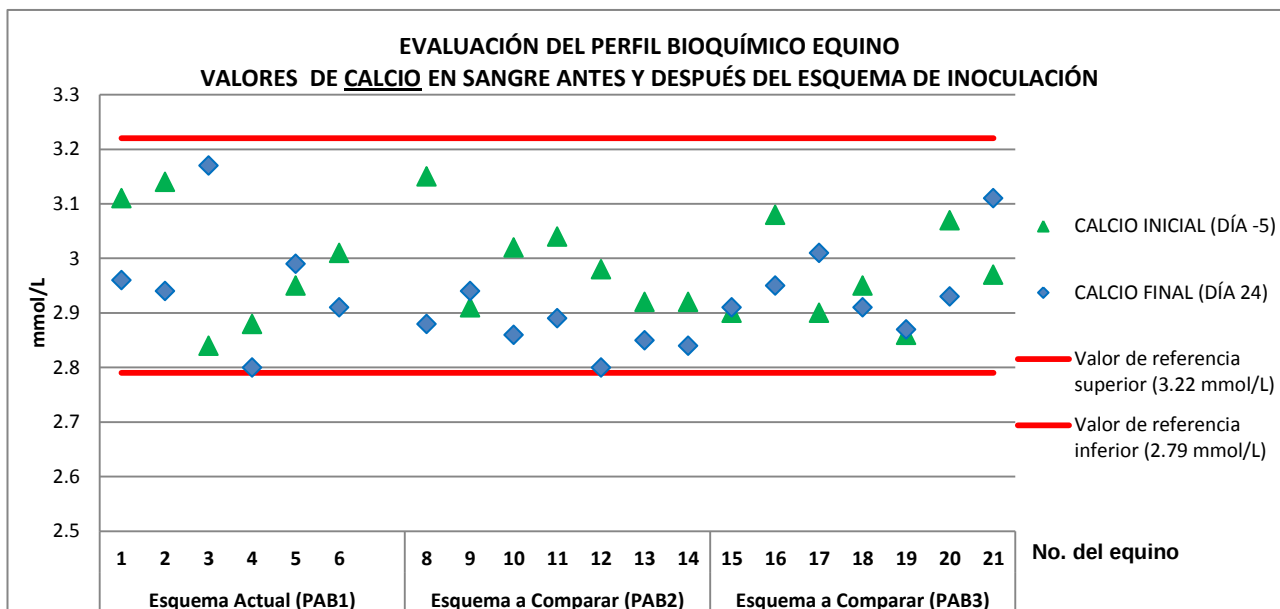
Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	*0.003	0.209
PAB2	0.092	*0.001
PAB3	0.163	*0.0001

Figura V. Análisis gráfico de los resultados de la concentración de **albúmina sérica** equina a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y t de Student obtenidos al comparar los datos de la concentración de **albúmina sérica** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio, mostrando que existen diferencias significativas de los valores promedios obtenidos entre el día -5 y el día 24. *Valores < 0.05, existe diferencia estadística al 95% de confianza.



Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	*0.002	*0.029
PAB2	0.373	*0.0001
PAB3	*0.004	*0.018

Figura VI. Análisis gráfico de los resultados de la concentración de **globulinas séricas** equina a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y t de Student obtenidos al comparar los datos de la concentración de **globulinas séricas** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio, mostrando que existen diferencias significativas de los valores promedios obtenidos entre el día -5 y el día 24. *Valores < 0.05, existe diferencia estadística al 95% de confianza.



Esquema	Prueba de Fisher	Prueba t de Student
PAB1	0.500	0.711
PAB2	0.061	*0.005
PAB3	0.445	0.900

Figura VII. Análisis gráfico de los resultados de la concentración de **calcio** en sangre equina a los 5 días antes y 24 días después de la primera inoculación. La primera gráfica muestra la distribución de los datos obtenidos por equino y la segunda gráfica se observa el valor promedio por esquema antes y después de las inoculaciones. La tabla resume los resultados de la prueba de Fisher y t de Student obtenidos al comparar los datos de la concentración de **calcio** antes y después de la aplicación de los esquemas en estudio. *Valores < 0.05, existe diferencia estadística al 95% de confianza.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Barraviera B, Sartoni A, Pereira da Silva MF, Kaneno R, Peracoli MTS. 1996. Use of an ELISA assay to evaluate venom, antivenom, IgG and IgM Human antibody levels in serum and cerebrospinal fluid from patients bitten by *Crotalus durissusterrificus* in Brazil. J Venom Anim. Toxins. 2(1): original paper.
- ✓ CENAVECE (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades). Dirección General de Epidemiología. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Anuarios de morbilidad epidemiológica. México 2010. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
- ✓ CENAVECE (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades). Programa de acción específico 2007-2012. Otras enfermedades Transmitidas por vector. México, 2008. <http://www.cenave.gob.mx/progaccion/ETV.pdf>
- ✓ Chippaux J.P., Goyffon M. 1997. Venoms, Antivenoms and Immunotherapy. Toxicon. 36(6):823-846.
- ✓ Chippaux, J.P. Goyffon, M. 1991. Production and use of snake antivenon. In Reptile Venoms and Toxins, ed. A.T.Tu, Vol 5, pp 529-555. M.Dekker. New York
- ✓ Dirección General de Epidemiología. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Boletín de las semanas epidemiológicas de la no. 1 a la no. 52. 2011. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010imagen/plantilla/indice-2011.htm>
- ✓ Domingos Possani L. 2005. El alacrán y su piquete. Dirección General de Divulgación de la Ciencia. 1ª edición, Universidad Nacional Autónoma de México http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_alacran.pdf
- ✓ Domingos Possani L. 2007. El estudio de los componentes del veneno de alacranes en el contexto de la biología molecular, la farmacología y la medicina. Libro 25º aniversario del Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM. Biotecnologia V14 CS3.indd 177-187. http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_16.pdf
- ✓ Engvall E.; Perlman P. 1971 "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay for IgG". *Immunochemistry*.8:871-874.
- ✓ Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2011. Decimal edición. MPB0900. Potencia de sueros antiponzoñosos: Vol 2: 2292-2294.

- ✓ Gutiérrez J.M., León G, Bumouf T. 2011. Antivenenoms for the treatment of Snakebite envenomings: The road ahead. Biologicals, doi:10.1016/j.biologics.2011.02.005
- ✓ Hoel P.G. 1974. Estadística Elemental. 3ª edición. Compañía Editorial Continental, S. A. México. 177-195, 311. p.p.
- ✓ Medway W, Prier JE, Wilkinson JS, Patología Clínica Veterinaria, editorial UTEHA, México, 1990.
- ✓ Morais JF, De Freitas MCW, Yamaguchi IK, Dos Santos MC, Dias Da Silva W. 2004. Snake antivenoms from hyperimmunized horses: comparison of the antivenom activity and biological properties of their whole IgG and F(ab')₂ fragments. Toxicon. 36:725-734.
- ✓ Morais V, Massaldi H. 2005. Effect of pepsin digestion on the antivenom activity of equine immunoglobulins. Toxicon. 46:876-882.
- ✓ Otero R. 2002. Seroterapia antivenosa, ventajas del uso de antivenenos del tipo IgG, F(ab')₂ o Fab en picaduras de escorpiones y mordeduras de serpientes. Pediatría. 37:1-20.
- ✓ Rojas EO. 2007. Inmunología de memoria. Interamericana. 2da. Edición. México.
- ✓ Rojas G, Jimenez JM, Gutiérrez JM. 1994. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma. Description of a simple procedure for antivenom production. Toxicon. 32:351-363.
- ✓ Sigma Technical bulletin. Bicinchoninic acid protein assay. Product code BCA and B9643. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/b9643bul.Par.0001.File.tmp/b9643bul.pdf>
- ✓ SINAVE. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2007. Alacranismo (primera de dos partes). Rev. Epidemiología. Núm. 1, Vol. 24, Semana 1 del 31 de diciembre al 06 de enero de 2007. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem01/pdf/edit0107.pdf>
- ✓ SINAVE. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2007b. Alacranismo (segunda y última parte). Rev. Epidemiología. Núm 2, Vol. 24, Semana 2 del 7 al 13 de enero de 2007. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem02/pdf/edit0207.pdf>
- ✓ Tay Z, Castillo AL, Julia ZJ, Romero CR, Velazco-Castejón O. 1982. Accidentes por mordedura de animales ponzoñosos. Rev. Fac. Med. Mex. 23(7):457-472.
- ✓ Theakston RDG, Reid HA. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bull. WHO. 61:949-956.

- ✓ Theakston RDG, Warrell D.A., Griffiths E. 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. 41:541-557.
- ✓ Tizard IR. Introducción a la inmunología veterinaria. Editorial ELSEVIER. España 2009
- ✓ Vega Franco L. 2007. Faboterapia ¿será éste el fin de la seroterapia?. *Rev. Mex Pediatría*. 72:59-60.
- ✓ World Health Organization. 2010. WHO guidelines for the production, control and regulation of antivenomimmunoglobulins. WHO Geneve.