

	Departamento de Desarrollo de Nuevos Productos Informe de Resultados de pruebas in vitro / in vivo	Clave : S/ clave Página 1 de 3
---	--	---

Fecha **6 de enero de 2014**

Título **Concentración de inmunoglobulinas específicas contra el virus
del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo (PRRS)**

Resumen.

Se llevó a cabo un método de concentración de inmunoglobulinas utilizando polietilenglicol grado 8000 y centrifugación en los graneles de InmunoPRRS con la finalidad de incrementar los títulos para el virus de PRRS y disminuir la dosis de aplicación en los animales.

Las inmunoglobulinas se procesaron de forma normal hasta la obtención de la fase acuosa deslipidizada con Ftalato de Hidroxipropilmetilcelulosa, posteriormente se adicionó propilenglicol en polvo para precipitar las IgY y centrifugar a velocidades de 4500 por 30 minutos. La pastilla resultante se resuspendió en una décima del volumen original con solución salina. Los títulos fueron medidos por la prueba de microneutralización en cultivos de células Marc 145. Los resultados muestran un incremento de al menos 1.5 log 2 en los títulos de las inmunoglobulinas concentradas con respecto a las inmunoglobulinas no concentradas.

Se concluye que el proceso de concentración permite obtener una mayor cantidad de IgY contra el virus de PRRS y con esto disminuir la dosis de aplicación en los animales.

Materiales y métodos.

1. Inmunoglobulinas contra PRRS normales (sin concentrar)
2. Polietilenglicol 8000 polvo
3. Agitador magnético
4. Barra para agitador magnético
5. Vaso de precipitados de 5 litros
6. Centrifuga refrigerada Beckman Modelo Allegra X-22R
7. Tubos de centrifuga de 50 mL Corning
8. PBS 1x pH 7.0 estéril

Procedimiento

1. Colocar 5 litros de Inmunoglobulinas contra PRRS deslipidizadas con HPMCP
2. Agregar una barra magnética y colocarlos en un agitador magnético
3. Pesar 500 g de Polietilenglicol 800 y agregarlos a las inmunoglobulinas poco a poco
4. Agitar hasta disolución completa del polietilenglicol
5. Colocar las inmunoglobulinas a 4 °C por toda la noche
6. Agitar por unos 20 minutos
7. Transferir las solución a vasos de centrifuga y centrifugar a 3500 rpm por 30 minutos a 15 °C
8. Eliminar el sobrenadante y reconstituir la pastilla en el 10 % del volumen original (500 mL) con PBS 1X
9. Filtrar por membrana de 0.45 nm y envasar

	Departamento de Desarrollo de Nuevos Productos Informe de Resultados de pruebas in vitro / in vivo	Clave : S/ clave Página 2 de 3
---	--	--

10. Tomar una muestra para control de calidad (pureza, titulación en células Marc 145)

Resultados

La disolución del polietilenglicol es un poco tardada y para mejorar el proceso de preferencia atemperar las inmunoglobulinas unos 45 minutos antes de la adición del reactivo. De igual forma la reconstitución de la pastilla después de la precipitación de las proteínas con el propilenglicol es difícil por lo que hay que usar el PBS ligeramente caliente (entre 18-20 °C) para una buena disolución.

Después de la concentración de las inmunoglobulinas, no se observó ninguna contaminación bacteriana, por lo que la prueba de pureza fue satisfactoria.

La determinación de título de anticuerpos contra PRRS, se realizó en células Marc 145 y dejando 5 días de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, la lectura final se realizó tiñendo las placas con cristal violeta y usando un microscopio invertido, se compararon los títulos con las inmunoglobulinas sin concentrar.

Las inmunoglobulinas sin concentrar mostraron títulos de 80 por cada 0.05 mL que es la cantidad que se emplea en la prueba de neutralización, lo que quiere decir que por cada mL se tiene un título de 1600 y si se considera una dosis de 5 mL se tiene un título de 8000. La concentración de inmunoglobulinas dio como resultado un título de 403 por cada 0.05 mL por lo que por cada mL se tiene 8060 y considerando la misma dosis de 5 mL se tiene un título de 40,300; lo que representa un incremento de 5 veces más de anticuerpos en el producto concentrado.

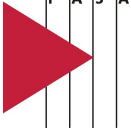
DISCUSIÓN

Desde hace varios años se cuenta con un producto para el tratamiento de cerdos afectados por el Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo (PRRS) el cual es a base de inmunoglobulinas específicas obtenidas de la yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas contra el PRRS.

Comercialmente el producto denominado InmunoPRRS se recomendaba para aplicarse 5 mL por vía intramuscular.

Se planteó la necesidad de hacer mejoras al producto y una de ellas fue encaminada a la concentración de las inmunoglobulinas, para obtener una mayor cantidad de anticuerpos y ver la posibilidad de disminuir la dosis de aplicación en los animales, con la finalidad de no causar mucho daño al animal y ser una dosis más manejable a nivel de campo.

El proceso de concentrado permitió un incremento considerable de anticuerpos contra PRRS de 5 veces más comparado con las inmunoglobulinas sin concentrar. Esta mejora va a permitir disminuir la dosis de 5 mL a 1 ó 3 mL dependiendo de las condiciones y el tipo de animal a tratar.

	Departamento de Desarrollo de Nuevos Productos Informe de Resultados de pruebas in vitro / in vivo	Clave : S/ clave Página 3 de 3
---	--	--

OBSERVACIONES.

Ninguna

CONCLUSIONES

El método de concentración con polietilenglicol permite un incremento de al menos 5 veces más la cantidad de anticuerpos contra el PRRS y se puede disminuir la dosis de aplicación de 1 a 3 mL por animal.

*

Responsable

QFB Andrés Morales Garzón
Jefe de Investigación