

ARTÍCULO CIENTÍFICO

**PRODUCTIVIDAD ANTIOFÍDICA DE EQUINOS DESTINADOS A LA INDUSTRIA
INMUNOBIOLÓGICA EN COSTA RICA**

David Mora Valverde¹, Tony Lai Jwo², Ricardo Estrada Umaña³

RESUMEN

En la producción de sueros antiofídicos existe una gran variabilidad individual en el desarrollo de la respuesta inmune de cada caballo, por lo tanto es fundamental llevar un seguimiento preciso e individualizado de su calidad productiva. Desde un eje de ingeniería de la calidad, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el desempeño histórico de caballos productores de plasma en una operación equina destinada a la producción de sueros, distinguiendo si existen diferencias significativas en la calidad productiva del caballo según los perfiles de inoculación y los esquemas de inmunización utilizados en cada caso. Posterior a esto se propuso y validó el uso de un nuevo indicador que identificase de manera más adecuada el potencial individual del caballo para adaptarse de mejor manera a las demandas farmacológicas y que facilitase la toma de decisiones en éste tipo de operación. Utilizando este indicador, se evaluaron las diferencias entre perfiles de inoculación polivalente, sin encontrarse diferencias significativas, lo cual permite uniformar el criterio de evaluación del potencial productivo del caballo, independientemente de su perfil de inoculación. El uso del indicador propuesto “Volumen efectivo de plasma (VEP)” arroja datos prácticos para la toma de decisiones y el control de calidad en operaciones equinas dedicadas a la producción de suero.

Palabras clave: antiofídico, equinos, inmunobiológicos, control de calidad, producción de suero

¹ Estación Experimental Alfredo Volio Mata. Universidad de Costa Rica

² Farmacéutico. Máster en Ingeniería Industrial. Universidad de Costa Rica

³Instituto Clodomiro Picado. Universidad de Costa Rica

Autores para correspondencia: david.mora@ucr.ac.cr, tonylaijwo@gmail.com, ricardoe1957@gmail.com

Recibido: 4 febrero 2014 Aceptado: 17 marzo 2014

ABSTRACT

Antiophidic Productivity of Equines destined to the immunobiologicals industry in Costa Rica. There is a big individual variability in the development of the immune response of each horse in the production of antsnake serums. For this reason is very important to have an individual track of each animal. From an axis of quality engineering, the objective of this paper is to evaluate the performance in plasma-producing horses of an equine farm dedicated to serum production, searching for significant differences in the productive quality of the horse according to the immunization schedules used in each case. Furthermore, the practical utility of an indicator capable of identifying the individual potential of each horse according to the pharmacological specifications so it can ease the decision-making process in this kind of industry was analyzed. By using this indicator, we tested the presence of significant statistical differences between immunization schedules for polyvalent producers, finding no differences, which could let use uniform criteria to evaluate the productive potential of the horse. The indicator Plasma Effective Volume (PEV) could give practical information for classifying horses and making decisions for industrial and quality control processes in equine serum production farms.

Keywords: Horses, serum production, equine operations, quality control, antiophidic

INTRODUCCIÓN

La producción de sueros para contrarrestar las consecuencias de eventos ofídicos ha demandado décadas de investigaciones en el campo inmunológico humano y veterinario. Los avances logrados han permitido establecer protocolos altamente eficientes a la hora de crear soluciones de tratamiento de picaduras de serpientes (Bolaños et al., 1980). De igual forma, la relevancia de los envenenamientos ofídicos en el ámbito de la salud pública latinoamericana, aunada a la fascinación que provoca la complejidad bioquímica y farmacológica de los venenos de serpientes, ha motivado un gran interés científico en América Latina alrededor de este tema (Gutiérrez, 2002). En Costa Rica el Instituto Clodomiro Picado ha llevado la batuta en esta temática desde el año de su creación en 1970 (Gutiérrez et al., 2009) con lo cual mantiene su

vigencia y liderazgo en el campo de la investigación y la producción de sueros antiofídicos.

Numerosos han sido los trabajos desarrollados con vistas a la obtención de sueros hiperinmunes en animales, siendo los equinos los más utilizados con estos fines (Espino, 2012). Dentro del sistema de producción de sueros equinos son diversas las investigaciones que se dirigen a mejorar los procesos fisiológicos y bioquímicos en esta importante misión, entre ellos las pruebas con coadyuvantes alternativos que mejoran la liberación y asimilación del veneno dentro del caballo con miras para reducir los efectos negativos de las inoculaciones (Estrada, 2012 comunicación personal; Miranda et al., 2006) y aumentar la cantidad de anticuerpos en los sueros y la calidad de estos (Salas, 2011; Estrada et al., 1989).

De igual forma ha existido un gran desarrollo en el estudio de la capacidad neutralizante de los antivenenos, asociado con el desarrollo de técnicas de laboratorio que han permitido el análisis de los métodos de neutralización de efectos farmacológicos y enzimáticos específicos (Gutiérrez et al., 2009; Arencibia, 2009; López, Ortega, y Atilano, 1998; Leborde, Sevcec y Legnani, 1989; Vargas, 2006; Pino, 1994). Esta plataforma metodológica ha permitido evaluar, de manera rigurosa y detallada, la capacidad neutralizante de los antivenenos producidos en los diferentes países de la región.

Sin que ello represente mayores alteraciones clínicas generadas durante el proceso (Angulo et al., 1997), la sangría de producción equina utiliza ciertos indicadores clave para establecer que un grupo de caballos haya desarrollado un título satisfactorio de anticuerpos neutralizantes donde actualmente se refleja una gran variabilidad individual en el desarrollo de la respuesta inmune de cada caballo, por lo que es fundamental llevar un seguimiento continuo sobre los mismos (Estrada et al., 1989).

Dentro del trato individual como unidad de producción de suero, el sistema clave que evalúa el desempeño del caballo en su ciclo de vida yace en la cuantificación de los siguientes tres indicadores; 1. La capacidad de neutralización ó Título neutralizante (TN) del suero que se le extrae según el perfil de inoculación (tipo(s) de serpiente), 2. El nivel de hematocrito de ese suero y 3. Su volumen de producción total. Estos tres indicadores hacen que, en conjunto, se evalúe la calidad de cada individuo sin que necesariamente se conozcan sus interacciones.

Bajo la medición del Título Neutralizante (TN), el título mínimo aceptable de calidad es de 3 mg de veneno de *Bothrops asper* neutralizados por cada mililitro de suero, pero en la práctica y por razones naturales los caballos no ofrecen un comportamiento con estas características. Se

observan caballos que superan con creces este título así como otros que ofrecen un perfil reducido. De igual manera se observa este comportamiento para los indicadores de Hematocrito y volumen de suero. Con la combinación de sueros producto de las sangrías se establece una concentración promedio de lotes productivos con la cual se desarrollan los sueros en planta. Una vez conocida esta concentración global, el fraccionamiento posterior del plasma equino se lleva a cabo mediante diferentes procesos biotecnológicos con la finalidad de preparar el producto final.

Debido a la creciente demanda y al indiscutible interés socio-sanitario de esta actividad, la industrialización de sueros antiofídicos ha perseguido una mejora operativa que conlleva a la reducción de costos donde a mayor demanda de sueros mayor será el requerimiento de tierra cultivable para su producción, la cual debido a su alto costo eventualmente puede hacer que su fabricación se torne menos accesible económicamente, principalmente en un país como Costa Rica donde la frontera agrícola ha sido alcanzada desde hace más de una década. De aquí que es necesario integrar activamente a la cadena de producción de sueros el desarrollo científico tecnológico de todos los procesos de las diferentes unidades de producción que la componen.

El objetivo del presente trabajo fue investigar el desempeño de caballos productores de plasma en una operación equina destinada a la producción de sueros, descubriendo si existen diferencias significativas en la calidad y productividad del caballo según los perfiles de inoculación. De igual manera se propone y valida el uso de un nuevo indicador que identifique y manifieste cuantitativamente el potencial individual del caballo para adaptarse de mejor manera a las demandas farmacológicas, facilitando la escogencia de caballos por su perfil mejorando la toma de decisiones en este tipo de operación.

METODOLOGÍA

La investigación fue desarrollada entre los meses de Enero hasta junio del 2012 y se utilizaron los datos históricos productivos de tres años (2009 al 2011) del haras del Instituto Clodomiro Picado en el Cantón de Vásquez de Coronado en San José, Costa Rica. Este grupo de equinos está destinado exclusivamente a la generación de plasma para la posterior obtención de sueros antiofídicos. Los caballos son mantenidos en una operación donde son sujetos de pastoreo rotacional. Se les extrae su sangre (sangría) bajo protocolos de inocuidad sanitaria entre tres y cuatro veces por año, con refuerzos de venenos entre cada sangría

(Bolaños y Cerdas, 1980). Para el presente estudio, cada dato almacenado de sangría correspondió al resultado final de un protocolo estandarizado (Angulo et al., 1997) de tres días de extracción. Se analizaron los datos de cuatro años de un haras compuesto por 60 animales en promedio. Se obviaron los datos de sangrías incompletas u otro tipo de evento circunstancial que no le permitiese al caballo cumplir cabalmente con todo el proceso de sangría. Ello demandó que su estado sanitario y nutricional debió ser excelente.¹

Evaluación preliminar de interacciones. La fase inicial del estudio fue definir bajo qué indicador (variable de salida) se debía coleccionar los datos de tal manera que este indicador permitiese desarrollar un muestreo con el cual se pudiese implementar los estadígrafos adecuados que caracterizaran el desempeño de cada animal en comparación con otros. Entre los principales requisitos para el establecimiento de este indicador fue que éste fuese de fácil extracción e interpretación para su posterior implementación en programas de mejora continua de la operación. Primeramente se optó por evaluar si existe algún tipo de correlación entre las tres características que se evalúan actualmente en los caballos. A los animales se les evalúa su calidad a través de tres indicadores independientes entre sí. Por tanto, se evaluó de manera exploratoria la correlación entre las variables rendimiento de suero (**RS**) (volumen de suero/volumen de sangre), hematocrito (**HTO**) y título neutralizante (**TN**). También de manera exploratoria se comparó la distribución independiente de los datos de **RS** y **TN** versus la combinación entre ambos indicadores mostrada con el indicador propuesto **VEP**, detallado a continuación:

$$\mathbf{VEP = TN \times VP}$$

Donde:

VEP: Representa el volumen efectivo de plasma, expresado en litros (l)

TN: Título neutralizante (representa una equivalencia al estándar de neutralización del suero procesado en planta). Es una relación entre el requerimiento del proceso industrial y lo que ofrece el caballo.

VP: Volumen de plasma obtenido de cada sangría, representado en mililitros el rendimiento

¹ DMV Ricardo Estrada, comunicación personal

efectivo a partir de sangre, de la materia prima para producción (suero).

Dado que fue necesario tener un indicador que permitiese evaluar a cualquier caballo de la explotación, se evaluaron las interacciones entre los datos de VEP de dos diferentes grupos de inóculo. Dado que en la explotación se manejan grupos de caballos que se inoculan con concentraciones diferentes de venenos de serpiente, con los datos se desarrolló un análisis para definir si existen diferencias significativas entre el VEP de los caballos que pertenecen a perfiles diferentes de Inoculación (**PI**). Ello con el objetivo de evaluar si es necesario fraccionar los indicadores productivos por grupo ó bien utilizarlos como una misma fuente de datos de producción. Para esto se evaluó el desempeño de 40 animales con 3 sangrías registradas cada uno, para un total de 120 sangrías provenientes de los animales pertenecientes a los grupos Polivalente 1 (PO-1) y Polivalente 2 (PO-2), los cuales representaron el 75% del haras.

Análisis estadísticos. Análisis Exploratorio. Para el estudio de correlación entre los indicadores independientes que actualmente son utilizadas como criterio de calidad se extrajo el coeficiente de Pearson, utilizando el programa MegaStat versión 2007. Para la evaluación de diferencias poblacionales entre los grupos de datos se comparó su dispersión mediante la función *Box Whisker* y *Normality Test* del programa estadístico QI Macros Versión 2009.

Diseño experimental para la evaluación de las diferencias entre perfiles de inoculación: Para evaluar las diferencias entre los datos de grupos polivalentes diferentes se efectuó una prueba de hipótesis mediante poblaciones pareadas. Posteriormente se aplicó un análisis de tipo Anova de dos vías utilizando la función *Two ways Anova* del programa MegaStat versión 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis exploratorio previo. En la Figura 1 puede observarse la correlación entre las variables de HTO y Rendimiento de suero (RS). Esta permite concluir que a pesar de tener una correlación negativa débil, su valor es reducido ($R^2=0,154$) lo cual permite inferir que, para objetivos de evaluación de calidad, la correlación obtenida entre ambos indicadores no manifiesta una tendencia contundente que permita integrarlos como mecanismo de toma de decisión bajo criterios de calidad estandarizados.

También fue requerido establecer los valores de correlación entre otras variables actualmente utilizadas. La Figura 2 muestra que tampoco existe correlación ($R^2 = 0,041$) entre el rendimiento del plasma con los valores de título de cada caballo.

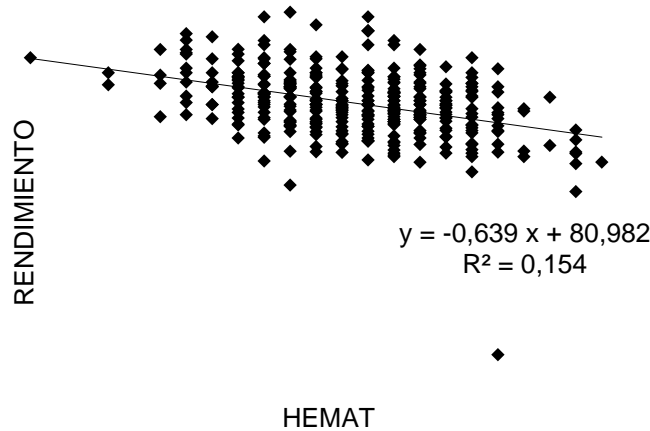


Figura 1. Gráfico de correlación entre los valores por caballo de hematocrito y el rendimiento del plasma.

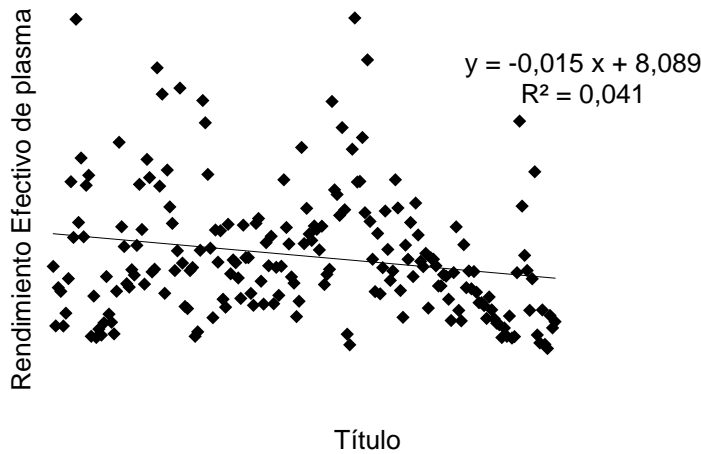


Figura 2. Gráfico de correlación entre los valores de rendimiento efectivo y título.

Analizando estadísticamente los datos que se usan actualmente, se observa que, tanto en los

valores de RS (sin tomar en cuenta el dato de título) como en los valores de TN, las variables de salida no persiguen un comportamiento normal, ni como poblaciones independientes, lo cual genera datos de variabilidad muy altos que no facilitan bajo esta perspectiva la toma de decisiones dentro de la operación. Estableciendo el análisis de los caballos bajo la perspectiva de Volumen Efectivo de Producción (VEP) se observan resultados que permiten un comportamiento **normal** que se adecúa más a la teoría del control ingenieril de la calidad. **(Figura 4).**

Aplicando el uso del indicador VEP, la Figura 3 muestra los rangos del mismo entre dos diferentes grupos productivos (PO1 y PO2). Esto sugiere que no es posible comparar ambas poblaciones o tratarlas de manera diferenciada a la hora de usar este indicador.

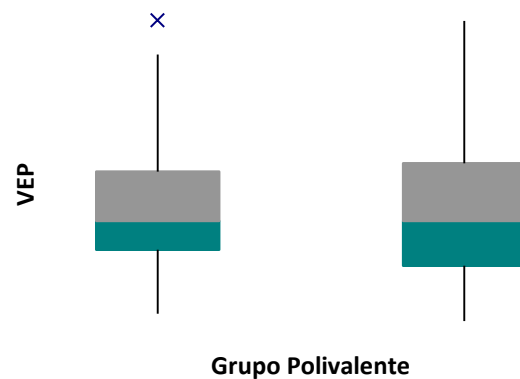


Figura 3. Distribución de valores de VEP entre grupos polivalentes.

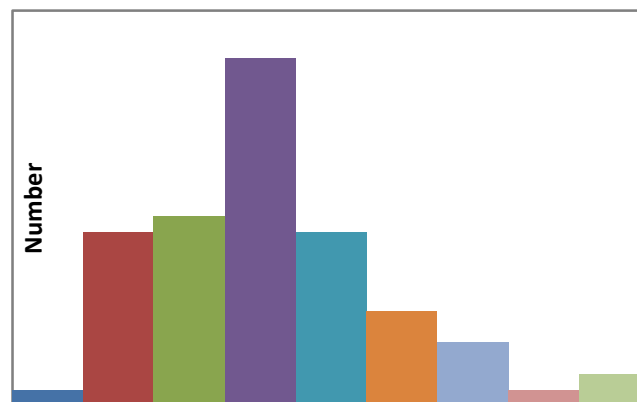


Figura 4. Distribución de datos muestrales de VEP de Grupos Polivalente 1 y 2 ($p= 0.034$)

Para el experimento de evaluación de diferencias entre VEP entre grupos PO1 y PO2, los valores de p obtenidos (Cuadro 1) muestran que no existen diferencias significativas entre grupos polivalentes 1 y 2 permitiendo que todos los animales puedan ser valorados con el indicador propuesto. Estos datos presentan una base con la cual se espera facilitar el control de calidad productiva de los equinos a la hora de establecer rangos de productividad mínima según las necesidades de la operación.

Cuadro 1. Resultados del análisis de varianza entre grupos

ANOVA tabla

<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Factor 1	321.583	15	21.4389	4.00	.000482
Factor 2	4.023	1	4.0227	0.75	.3926
Interacción	324.854	15	21.6569	4.04	.000442
Error	171.371	32	5.3554		
Total	821.831	63			

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La variable Título Neutralizante (TN), integrada al porcentaje de rendimiento del suero en cada sangría, puede generar un dato de efectividad real de suero, por tanto, del animal, que refleje así las cualidades productivas del mismo, permitiendo mayor comparación entre semovientes.

Debido a que los animales investigados pertenecen a una amplia diversidad de grupos raciales, no es posible determinar influencias fenotípicas predictivas sobre su desempeño, no obstante en relación a factores como la edad y el estado nutricional se recomienda efectuar estudios de su influencia.

Bajo la coyuntura expuesta, para atender el crecimiento de la demanda de sueros equinos así como facilitar los procesos de mejora continua se deben establecer protocolos de pruebas periódicas de VEP para mejorar la cantidad de animales mantenidos bajo criterios mínimos de

productividad. Esto sugiere que algunos caballos de bajo VEP podrían ser sustituidos por caballos de alto VEP. Ello nuevamente arroja la necesidad del desarrollo de nuevas investigaciones ya que debido a que la relación actual se estudió en base a plasma total producido por sangría y dada la baja cantidad anual de sangrías por caballo, para poder llegar a determinar en el futuro que determinados caballos son de alto o bajo rendimiento, se requeriría de un aproximado de un año y medio (3 a 6 sangrías) para tener datos suficientes para tomar decisiones, lo cual puede ser contraproducente para efectos operativos. Por eso se propone efectuar un estudio aplicado de análisis exploratorio que defina la cantidad de extracciones mínimas muestrales para pronosticar el potencial valor de VEP en un lapso corto de tiempo.

En esta actividad de alta importancia científica y tecnológica, el caballo posee un papel preponderante donde debido a factores, entre ellos la alta demanda de sueros, se justifica que sea necesario hacer cada vez más eficientes los procesos que lo potencien como unidad de producción de materia prima de manera que se integre la búsqueda de eficiencia hacia toda la cadena pecuaria antiofídica. Por ello es de alta importancia que se ofrezca mayor atención académica sobre el proceso primario de creación y evaluación de la productividad de los caballos desde un enfoque ingenieril de su eficiencia donde se evalúe el impacto hacia la productividad de los factores de la producción animal (sanidad, nutrición, genética, manejo, etc.).

LITERATURA CITADA

- Angulo, Y., Estrada, R., Gutiérrez, J. (1997). Effects of bleeding in horses immunized with snake venoms for antivenom production. *Revista Biología Tropical* 45(3),1215-1221,1997
- Arencibia, D., Rosario, L. (2009). Métodos clásicos y alternativos en el ensayo de pirógenos. *Revista de toxicología en línea*. N23 oct 2009. Disponible en: <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=682>
- Bolaños, R., Cerdas, L. (1980). Producción y control de sueros antiofídicos en Costa Rica. *Boletín de la oficina sanitaria panamericana*. 88(3) ,193 y 194
- Espino, G. (2012). Los caballos y la producción de antivenenos. *Hypatia - Revista de Divulgación Científico – Tecnología del estado de Morelos*. Disponible en: <http://hypatia.morelos.gob.mx>

- Estrada, R., Gutiérrez, J., Alvarado, J., Robles, A., Ávila, C., González, N. (1989). Desarrollo de la respuesta de anticuerpos anti-fosfolipasa A, en caballos inoculados con veneno para la producción de suero antiofídico polivalente en Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 17-IV-1989.
- Gutiérrez, J., Lomonte, B., Rojas, G., Gené, J., Chaves, F., Estrada, R., Alvarado, J., Rojas, E., Robles, A. (2009). El Suero Antiofídico Polivalente producido en Costa Rica. BINASSS - Biblioteca Nacional de Salud y Seguridad. Identificador: 94568
- Gutiérrez, J. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev. biol.trop* [online], vol.50, n.2 [citado 2012-02-17], pp. 377-394. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442002000200002&lng=es&nrm=iso. ISSN 0034-7744.
- López, M., Ortega, C., Atilano, D. (1998). De la Peña A. Detección de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en equinos dedicados a la producción de sueros hiperinmunes. *Revista VetMex*, 29 (2)
- Leborde, H., Sevcec, C., Legnani, C. (1989) Preparación y ensayo de un antiveneno (inmunoglobulina antiofídica) liofilizado activo contra veneno de *Bothrops Neuwiedii* (yara). *Revista Médica Uruguay*, 5,20-27.
- Miranda, A., Sánchez, R., Góngora, W., Mulet, O. (2006). Obtención de sueros hiperinmunes de origen equino antitoxina tetánica, utilizando adyuvante oleoso. Centro de Inmunología y Biopreparados. Holguín. Disponible en: <http://www.cocmed.sld.cu/no103/n103ori8.htm>
- Montero, J., Trejos, M., Lomonte B. (Sin fecha). Efecto del suero antiofídico sobre la actividad hemolítica del complemento humano (in vitro) y de conejo (in vitro e in vivo). Instituto Clodomiro Picado. BINASSS - Biblioteca Nacional de Salud y Seguridad Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v10n1/art1.pdf>
- Pino, A. (1994). Producción de suero antiofídico en Uruguay. *Revista Médica Uruguay*; 10,147-154.
- Salas, O. (2011). Analizan novedosa técnica para preparar sueros antiofídicos. *Revista Crisol*. Universidad de Costa Rica. Suplemento Ciencia y Tecnología No.243. Febrero 2011. Disponible en: <http://www.odi.ucr.ac.cr/medios/documentos/suplemento-crisol/Crisol243.pdf>
- Vargas, M. (2006). Implementación de un método para la purificación de albúmina a partir de plasma equino. Instituto Clodomiro Picado, UCR. Disponible en: <http://bibliodigital.itcr.ac.cr/xmlui/handle/2238/438>