

## COMPARACION ENTRE LAS TECNICAS DE NEUTRALIZACION EN RATON Y E.L.I.S.A. PARA DETERMINAR LA POTENCIA DEL ANTI-VENENO CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS

MARIA CRISTINA FORERO CH.,\* MOISES WASSERMAN.\*\*

Las técnicas de neutralización en ratón y ELISA se compararon como métodos para determinar la potencia del antiveneno *Crotalus durissus terrificus*. Informes en la literatura (3), (12), (13), sugerían la posibilidad de cambiar la técnica in vivo muy costosa por la técnica in vitro.

Se utilizaron antivenenos procesados (Gamma-globulinas purificadas) y no procesados. No se encontró correlación entre los títulos de neutralización y las lecturas de absorvancia obtenidas por ELISA para ninguna de las muestras. La falta de correlación se debe probablemente a que las técnicas miden dos poblaciones de anticuerpos diferentes. Mientras que con ELISA se miden anticuerpos contra todos los antígenos del veneno, con la técnica de neutralización solo se miden anticuerpos contra la fracción letal.

Se sugiere verificar nuevamente la correlación entre las dos técnicas usando como antígeno para ELISA la neurotoxina purificada. No se recomienda, en contra a lo afirmado por otros autores (3), el empleo de la técnica de ELISA usando veneno total como antígeno, para determinar la potencia del antiveneno *Crotalus durissus terrificus*.

### INTRODUCCION

Las serpientes venenosas en Colombia pertenecen a los géneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus* y *Pelamis*.

Los accidentes por envenenamiento ofídico, en el país son causados por el género *Bothrops* en más del 90% y por los géneros *Crotalus* y *Micrurus* (1). Del género *Crotalus* se conoce en el país únicamente una especie *Crotalus durissus terrificus*, que se distribuye en regiones áridas y semiáridas de la Costa Atlántica, Valle del Magdalena hasta el sur del Huila y los Llanos Orientales (2).

En la obtención de antivenenos se emplean caballos que se inoculan con cantidades crecientes de veneno, hasta alcanzar un nivel adecuado de anticuerpos. Este varía según la respuesta individual de cada animal al antígeno.

Para determinar la potencia de antivenenos se emplea tradicionalmente la técnica de neutralización en ratón, pero debido a los altos costos que implica el ensayo, por el empleo de gran cantidad de animales, se busca un método in vitro que presente precisión comparable a la técnica in vivo para reemplazarla. Para tal fin se decidió probar la técnica de ELISA indirecta.

\* Bacterióloga, MSc, Grupo de Sueros, Sección de Producción. Instituto Nacional de Salud. Apartado Aéreo 80080, Bogotá.

\*\* Jefe, Grupo de Bioquímica. Sección Diagnóstico, Investigación y Referencia. Instituto Nacional de Salud.

**Un estudio similar al presente fue realizado** por Theakston y col (3) quienes encuentran buena correlación al comparar neutralización en ratón con pruebas de ELISA indirecto, utilizando como muestras antivenenos preparados contra venenos de algunas serpientes de importancia médica en Africa.

## MATERIALES Y METODOS

### Veneno

Se escogieron ejemplares de la especie *Crotalus d.t.* representantes del territorio Colombiano y se desvenenaron. El veneno se liofilizó y se guardó en oscuridad y al vacío. La toxicidad se determinó por el método de Spaerman-Kärber (4) y se encontró que la DL<sub>50</sub> era de 1.02 µg de veneno I.P. en ratón suizo de 16 a 18 grs. (límites de confianza de 95%).

### Antiveneno

Se colectaron 71 muestras en diferentes etapas de inoculación de los caballos empleados en la producción comercial del suero antiofídico polivalente, inoculados con veneno de *Bothrops* y *Crotalus*. Estas muestras que no recibieron ningún tratamiento para su purificación se denominaron sueros no procesados.

Se utilizaron además 17 lotes de mezclas de sueros de caballos inoculados en la forma citada anteriormente, cuyas Gammaglobulinas fueron purificadas por precipitación con sulfato de amonio (5). Estos se llamaron sueros procesados.

### Técnica de Neutralización en Ratón

Se empleó la técnica recomendada por la OMS (5), en que se mezcla una cantidad fija de veneno con cantidades variables de antiveneno. Después de 30 minutos de incubación a 37°C., cada dilución se inyecta intraperitoneal a cuatro ratones suizos (de cualquier sexo), de 16 a 18 grms. y se observan por 48 horas. El título de neutralización lo da la última dilución que protege de la muerte a la totalidad de los ratones inoculados. La potencia se informa como la cantidad de veneno neutralizado por ml. de antiveneno.

### Conjugados enzimáticos

Se prepararon dos tipos de conjugados anticuerpo-enzima para lo cual se elaboraron dos tipos de anticuerpos: anti-Globulinas de caballo producido en conejo y anti-IgG de caballo preparado en cabra, en ambos casos ligados a la enzima fosfatasa alcalina.

**Anti-Globulinas de caballo:** Se separaron las globulinas de caballo con sulfato de amonio al 30% (6), se inoculó a conejo hasta obtener un título por doble inmunodifusión de Ouchterlony de 1:64 unidades precipitantes. El suero del animal se trató con sulfato de amonio al 22.8% (7) para la separación de las Gamma globulinas.

**Anti-IgG de caballo:** Se purificó IgG de caballo utilizando la técnica del ácido octanoico (8), combinada con cromatografía de intercambio iónico, empleando DEAE Sepharose Pharmacia Fine Chemicals (9).

La pureza se comprobó por inmunoelectroforesis. El anticuerpo así purificado se inoculó en cabra hasta obtener un título en unidades precipitantes de 1:128, de este suero de cabra se purificó la IgG en forma idéntica al fraccionamiento de IgG de caballo (8) y (9).

### Técnica de conjugación

En la preparación de los conjugados se utilizó la enzima fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co. type VII), con glutaraldehído como entrecruzador, empleando la técnica descrita por Voller y col. (10).

La totalidad de los antivenenos 17 procesados y 71 no procesados se trataron con el conjugado anti IgG.

Con el fin de conocer cual de los conjugados detectaba mayor cantidad de anticuerpos, se compararon los resultados de ELISA en 14 sueros no procesados empleando los dos reactivos.

### Prueba Inmunoenzimática

**Placas:** Se utilizaron placas de poliestireno (Dynatech M129A). **Veneno:** cada uno de los pozos fue llenado con 0.2 ml. de una

solución de veneno de *Crotalus d. t.* en buffer carbonato 0.05M pH: 9.6, en concentración de 500 ng/ml. para las pruebas con el conjugado anti-Globulinas y 100 ng/ml para las pruebas con el conjugado anti-IgG. Se incubó por 3 horas a temperatura ambiente, para permitir la adsorción del veneno a la placa. Se lavó 3 veces con agitación, 5 minutos cada vez empleando solución salina tampón fosfatos (PBS-fosfatos 9.5 mM, pH: 7.2 NaCl 150 mM) que contenía 0.05% de tween 20 (buffer de lavado). Antiveno: Utilizando buffer de lavado se hicieron diluciones dobles progresivas de los antivenenos procesados, de los no procesados y del suero negativo desde 1:200 a 1:6.400.

Cada una de estas diluciones se colocó en la placa en el lugar correspondiente, en volúmenes de 0.2 ml. Se incubaron por 3 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavó en forma similar a la anterior.

Se escogió la dilución 1:800 del antiveneno, por producir el mayor número de lecturas de absorbancia para los sueros no procesados hasta 0.5 y para los procesados entre 0.6-1.2. A cada una de las lecturas de los antivenenos se restó la lectura correspondiente a la dilución equivalente del suero control negativo.

El conjugado anti-Globulinas se agregó en dilución 1:450 y el conjugado anti-IgG en dilución 1:400. Las diluciones se hicieron en buffer de lavado. Se agregó 0.2 ml. por pozo, se incubó 16 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente y se lavó en forma similar a la anterior.

Sustrato: Como sustrato se usó paranitrofenil fosfato (sigma), en concentración de 1mg/ml en buffer de dietanolamina al 10% pH. 9.8 con cloruro de magnesio  $5 \times 10^{-4}$  y azida de sodio 0.02%. El volumen agregado fue de 0.2 ml. por pozo. La reacción se dejó operar por 30 minutos, al término de los cuales se frenó mediante la adición de 0.05 ml. de NaOH 3 M y se leyó en un espectrofotómetro Beckman 110 a una longitud de onda de 405 nm.

Controles: En todas las pruebas se colocaron como controles pozos de los cuales se fue suprimiendo sucesivamente uno solo de los reactivos. Como control negativo se colocó una mezcla de sueros obtenidos de 30 caballos normales que no habían sido inoculados con ningún tipo de veneno, en las mismas diluciones de los antivenenos.

## RESULTADOS

### *Neutralización en Ratón*

En los sueros no procesados los títulos variaron desde menos de 25 hasta 2.200  $\mu$ g. de veneno, neutralizado por ml. de antiveneno. Observando la distribución, se vió que el mayor número de muestras tuvo un título de 600  $\mu$ g de veneno neutralizado por ml. de antiveneno; la mitad de las muestras restantes mostraron títulos menores y la otra mitad presentaron títulos mayores. (Gráfica N°. 1a.). Para los sueros procesados se encontraron títulos de neutralización más altos que variaron de 600 a 1.200  $\mu$ g de veneno neutralizado por ml. de antiveneno (Gráfica N°. 2a.).

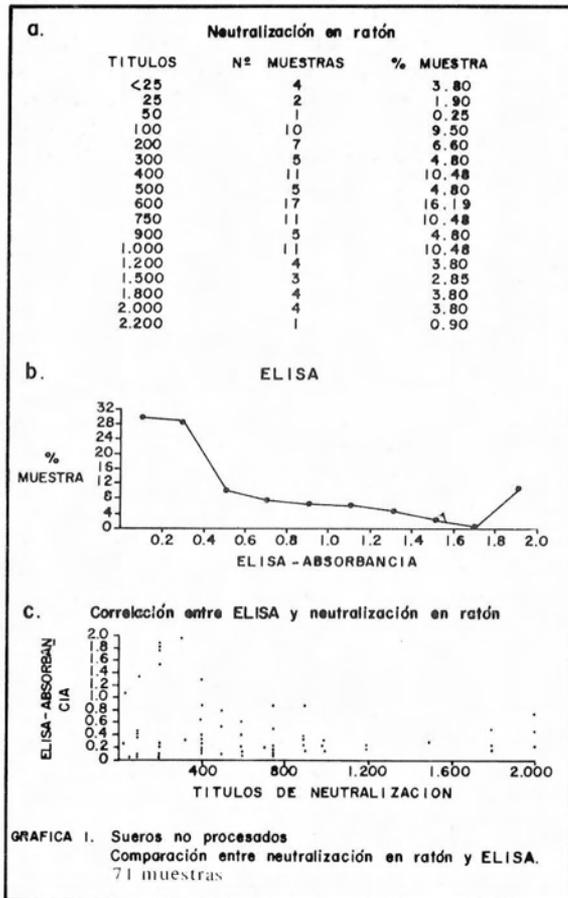
### *ELISA-Conjugado anti-IgG*

En los sueros no procesados aproximadamente la mitad de las 71 muestras presentaron lecturas de absorbancia que variaron hasta 0.4 para la dilución 1:800 (Gráfica No. 1b), mientras que todas las 17 muestras de sueros procesados mostraron lecturas de sueros procesados mostraron lecturas de absorbancia mayores; aproximadamente las dos terceras partes presentaron lecturas entre 0.6 y 1.2 para la dilución 1:800 (Gráfica 2b).

### *ELISA - Conjugado anti-Globulinas*

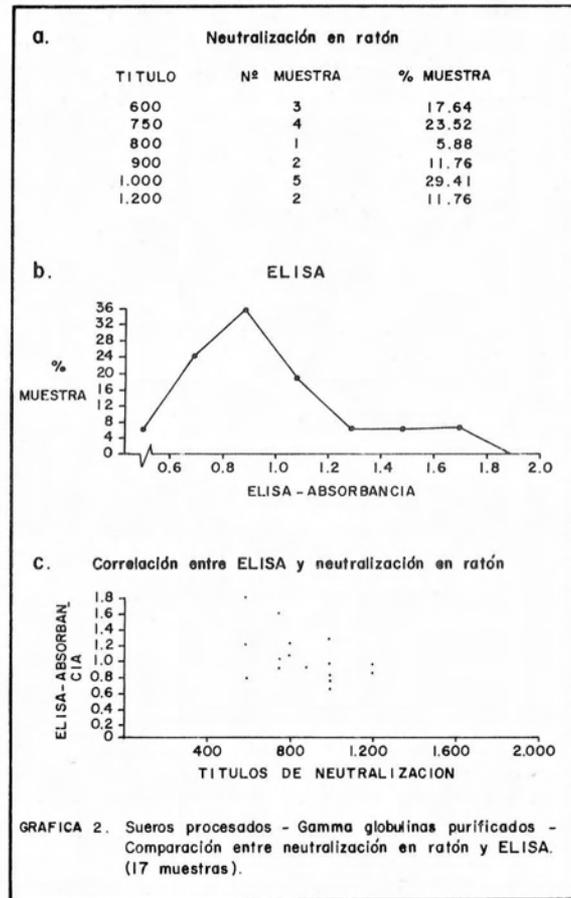
Para comparar la eficiencia de los dos conjugados se empleó el test de student para determinar la diferencia de medidas de absorbancia obtenidas usando los dos reactivos. No se encontró diferencia estadísticamente significativa empleando como antivenenos 14 muestras no procesadas.

No se observó correlación entre ELISA y neutralización en ratón. Gráficas 1c y 2c.



- Se determinaron los títulos de Neutralización en Ratón- $\mu\text{g}$  de veneno de *Crotalus durissus terrificus* neutralizado por ml de antiveneno sin purificar.
- Se determinaron los títulos alcanzados en ELISA para las muestras de antiveneno sin purificar a dilución 1: 800 corregidas con el control negativo en esa misma dilución.
- Para la comparación entre las dos técnicas se graficó para cada una de las muestras el título de neutralización contra la absorbancia respectiva obtenida en ELISA.

Un ejemplo del tratamiento estadístico que se les dió a todas las muestras para determinar el coeficiente de correlación, se muestra en la tabla N°. 1 en que se ven los 5 modelos de regresión probados: lineal, exponencial ( $\ln x$  o  $\ln y$ ), geométrica ( $\ln x$  y  $\ln y$ ) e inversa ( $1/x$ ). En todos los casos los resultados fueron similares, no se encontró correlación con ninguna



- Se determinaron los títulos de Neutralización en Ratón- $\mu\text{g}$  de veneno de *Crotalus durissus terrificus* neutralizado por ml de antiveneno purificado.
- Se determinaron los títulos alcanzados en ELISA por las muestras de antiveneno purificado a dilución 1:800 corregidas con el control negativo en esa misma dilución.
- Para la comparación entre las dos técnicas se graficó para cada una de las muestras el título de neutralización contra la absorbancia respectiva obtenida en ELISA.

de las muestras cuando se empleó el conjugado anti-IgG de caballo enzima (sueros no procesados  $r=0.169$ ;  $r^2=0.028$ ; procesados  $r=0.51$ ;  $r^2 = 0.26$ ), tampoco se encontró correlación cuando se usó el conjugado anti-Globulinas (sueros no procesados  $r=0.185$ ;  $r^2 = 0.042$ ). En todos los casos se estableció un nivel de significancia  $\alpha=0.1$ .

Tabla No. 1. Pruebas de hipótesis del coeficiente de correlación (r) para diferentes modelos de regresión. Estudio estadístico de 71 muestras de sueros sin purificar.

MODELOS	r	r <sup>2</sup>	t <sub>c</sub>	t <sub>t</sub>
1. LINEAL $Y = \beta_0 + \beta_1 x$	-0.169	0.0286	-1.435	1.66
2. EXPONENCIAL				
a. $\ln \hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x$	-0.0562	0.0032	-0.471	1.66
b. $\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 \ln x$	-0.142	0.0202	-1.200	1.66
3. GEOMETRICA $\ln \hat{y} = \beta_0 + \beta_1 \ln x$	-0.048	0.0023	-0.402	1.66
4. INVERSA $\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 / x$	0.126	0.0159	1.063	1.66

r = Coeficiente de correlación.

r<sup>2</sup> = Coeficiente de determinación o o/o de variación explicado por el modelo.

t<sub>t</sub> = t<sub>0.9</sub> (69) = ± 1.66 (valor tabulado).

$$t_c = \frac{n - 2}{(1 - r)} \times r$$

Nivel de significancia  $\alpha = 0.1$

Se estudió también si había cierta correlación únicamente para títulos altos o para títulos bajos pero no se encontró.

#### DISCUSION

No se encontró correlación entre los métodos de neutralización en ratón y de ELISA para determinar la potencia del antiveneno *Crotalus d.t.* En la prueba de neutralización en ratón los anticuerpos que se miden son los que protegen de la muerte a los animales inoculados, es decir los que neutralizan la fracción letal, mientras que los determinados por ELISA, son dirigidos contra todas las proteínas del veneno debido a que se empleó veneno total como antígeno.

Aunque la fracción letal del veneno en estudio constituye las dos terceras partes (11), esta no es altamente inmunogénica. Se ha podido observar en nuestro laboratorio que para producir un antiveneno de potencia aceptable, se necesita inyectar mayor cantidad de veneno de *Crotalus d.t.* que de

Bothrops. Por tanto se cree que a pesar de que las fracciones no letales estén en menor proporción éstas induzcan una más alta concentración de anticuerpos que seguramente interfieran en pruebas de ELISA.

Estos resultados contradicen a los de Theakston y col (3) quienes encontraron para antivenenos no purificados de *Bitis arietans* y *Echis carinatus* un coeficiente de correlación r=0.97 y con antivenenos purificados *Echis carinatus* r=0.92.

Sugerimos la purificación de la crotoxina, neurotoxina responsable de la muerte (11), para detectar solamente anticuerpos dirigidos contra ésta en la técnica de ELISA, asimismo, sería conveniente usarla en la inmunización de caballos para mejorar títulos y especificidad.

De acuerdo a los resultados del presente trabajo se recomienda el empleo del conjugado anti-Globulinas de caballo fosfatasa alcalina por su costo menor y resultados similares a los encontrados cuando se usó anti-IgG de caballo-fosfatasa alcalina.

#### SUMMARY

Reports in the literature (3, 12, 13) suggest that it is feasible to replace with an ELISA test, the more cumbersome and expensive method of in-vivo neutralization for the assessment of the potency of antivenoms.

In this paper we compare both methods for the antivenom *Crotalus durissus terrificus*. We used purified Gamma-globulins and complete sera, and with neither was found any correlation between the methods tested. A plausible explanation is that while the in-vivo neutralization test is measuring antitoxin antibodies the ELISA test is measuring total antibodies. We suggest to verify the correlation using pure toxin as the antigen for ELISA.

We do not recommend at this stage, contrary to other authors suggestions (3), the use of ELISA for assessment of titers of antivenom *Crotalus durissus terrificus*.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al doctor Juan Manuel Rengifo por la identificación de las serpientes, al doctor Vladimir Corredor por los cálculos de la DL<sub>50</sub> del veneno y a los doctores Diana Estupiñan y Pedro Perdomo por los análisis estadísticos.

### BIBLIOGRAFIA

1. Historias clínicas de casos de mordeduras de serpientes recopiladas en el Instituto Nacional de Salud, desde 1980.
2. Rengifo R., J.M. Systematics and distribution of Crotalid Snakes in Colombia. (Tesis: Master of Science. Univ. Kansas), 1979.
3. Theakston, R.D.G. and Reid, H.A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon*, 1979, 17:511.
4. WHO Geneva. Progress in the characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms. 1981, Offset publication No. 58.
5. OPS/OMS. Manual de Procedimientos: Producción y pruebas de control en la preparación de antisueros diftérico, tetánico, botulínico, antivenenos y de la Gangrena Gaseosa. 1977.
6. Herbert, G.A.; Pittman, B. et al. The preparation and physicochemical characterization of fluorescent antibody reagents. U.S. Department of Health, Education, and Welfare. Public Health Service. Health Services and Mental Health Administration. Center for Disease Control. Laboratory Division. Atlanta, Georgia. p. 41.
7. Kindall, F.E. fractionation of serum proteins by ammonium sulfato. *J. Clin. Invest.* 1932, 16: 921.
8. Steinbuch, M. and Audram, R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* (Paris). 1969, 134: 279.
9. D.E.A.E.- Sepharose C.L. 68, C.M. Sepharose C.L. 6B ion exchange chromatography, Pharmacia Fine Chemicals. Rohmsilud, Uppsala. 1977. p. 2.
10. Voller, A., Bidwell, D.E. et al. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. *Bull. World Health Organ.* 1976, 53: 55.
11. Houssay, B.A., Pave, S. Action curarisante des venins des serpents chez la grenouille. *C.R. Soc. Biol.* (Paris) 1922, 87: 821.
12. Theakston, R.D.G., Morrison, J.M. et al. ELISA and snake venom research. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 1977, 71 (2): 117.
13. Theakston, R.D.G. The application of immunoassay techniques including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. *Toxicon*, 1983, 21 (3): 341.