

---

# Análisis inmunoenzimático (ELISA) para determinar niveles de IgG anti *Bothrops atrox* en accidente ofídico\*

SADOH MOLINA, LUZ E. POSADA,  
RAFAEL OTERO, JOHN J. ESTRADA

---

Se desarrolló un método de Inmunización de conejos con veneno de *Bothrops atrox* con el fin de preparar antisueros y estandarizar un inmunoanálisis (ELISA) para medir niveles de IgG en pacientes con accidente ofídico. La respuesta inmune de los conejos se siguió por inmunodifusión en doble dimensión (Ouchterlony) e Inmunoelectroforesis, demostrando la presencia de bandas nítidas desde el día 60 y en todas las sangrías posteriores; se comprobó que hay variabilidad individual en su respuesta inmune. El ELISA para detección de IgG humana anti *B. atrox* en los Indígenas del Chocó fue una prueba simple y sensible (83.3%) pero inespecífica por las reacciones cruzadas en individuos que habían sufrido accidentes por *B. nasutus*. La técnica para detectar IgG equina anti *B. atrox* en pacientes tratados con antiveneno fue también simple y muy sensible.

**PALABRAS CLAVE**  
**ACCIDENTE OFIDICO**  
**BOTHROPS ATROX**

---

## INTRODUCCION

**E**n la zona noroccidental de Colombia, correspondiente a los Departamentos de An-

---

DOCTOR SADOH MOLINA, Profesor Titular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. LICENCIADA LUZ E. POSADA, Profesora Titular, Sección de Inmunología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. DOCTOR RAFAEL OTERO, Profesor Titular, Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Director del Proyecto de Ofidismo en Antioquia y Chocó. DOCTOR JOHN J. ESTRADA, Profesor Asociado, Sección de Inmunología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. Todos de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Investigación financiada por la Universidad de Antioquia, Colciencias y los Servicios Seccionales de Salud de Antioquia y Chocó.

tioquia y Chocó, ocurren anualmente entre 500 y 550 mordeduras por serpientes, con una letalidad del 5%. La frecuencia de secuelas es del 6% (1). El problema se agrava por la abundancia de estos reptiles, la variada geografía con predominio del bosque húmedo tropical y subtropical, el curanderismo y la carencia de recursos en zonas alejadas. Serpientes de la subfamilia Crotalinae, principalmente del género *Bothrops*, son responsables de la mayoría de los accidentes; entre ellas: *B. atrox* (mapaná, equis), *B. nasutus* (patoco, patoquilla, veinticuatro), *B. punctatus* (rabo de chucha), *B. schlegelii* (cabeza de candado) y *Lachesis muta* (verrugoso) (2-6).

Cuando Calmette produjo, a finales del siglo XIX, el primer antiveneno, se demostró la capacidad antigénica de los venenos de serpiente (7,8). En 1957 Muelling y colaboradores lograron detectar por inmunodifusión (ID) el veneno de la cobra real (*Ophiophagus hannah*) en un homogenizado de tejidos de una víctima de su mordedura. Desde entonces se ha trabajado en desarrollar pruebas simples y rápidas para detectar antígenos y anticuerpos en los tejidos, la sangre y otros líquidos orgánicos y para aplicarlas al diagnóstico seroepidemiológico del envenenamiento pasado (9-11). El método más utilizado en la actualidad es el ELISA que permite estudiar la prevalencia del accidente ofídico en comunidades rurales de países tropicales (9,11-15).

En Colombia hay un vasto campo por explorar en este tema; las publicaciones sobre inmunización experimental con venenos son fragmentarias y se refieren en su mayoría a otras regiones del mundo (8,16-18).

Este trabajo tuvo como objetivo estandarizar un inmunoensayo (ELISA) para medir anticuerpos circulantes (IgG) contra veneno de *B. atrox* en conejos inmunizados con él y en indígenas del Chocó que sufrieron mordeduras en el pasado. Así mismo estandarizar un ELISA para medir niveles de IgG equina anti *B. atrox* durante el tratamiento con el antiveneno con el fin de evaluar en el futuro la respuesta terapéutica.

## MATERIALES Y METODOS

### OBTENCION DEL VENENO

Se obtuvo el veneno mediante ordeño manual de las glándulas ponzoñosas de numerosos ejemplares

de *B. atrox* recolectados en áreas endémicas de Antioquia y Chocó. Se centrifugó a 3.000 rpm por 10 minutos y se liofilizó el sobrenadante durante 48 horas después de lo cual se lo congeló a -23°C hasta el momento de usarlo.

### OBTENCION DEL ANTISUERO DE CONEJO

Dos conejas de la raza Nueva Zelandia fueron inoculadas en el dorso por vía subcutánea, con dosis de 500 µg de veneno de *B. atrox*, diluido en solución salina isotónica y adyuvante incompleto de Freund. Los días 1, 30, 60, 115 y 215 se aplicaron las inyecciones y se hicieron sangrías de prueba; éstas últimas se hicieron, además, los días 70, 125 y 225 del ciclo de inmunización. Los sueros se preservaron por adición de thimerosal al 0,1% (10 µl/ml) y se guardaron hasta su uso, en alícuotas, a -23°C.

La respuesta inmune se siguió por ID en doble dimensión (Ouchterlony) y por inmunoelectroforesis (IEF) utilizando una mezcla de los sueros de las dos conejas, sin diluir, y concentraciones variables del veneno desde 5 hasta 20 mg/ml y agarosa (Sigma) al 1% como medio de soporte. Se siguieron con algunas modificaciones los métodos de Kochwa y Gutiérrez (8,19). Las sangrías de producción de 20 - 30 ml se efectuaron los días 75, 130 y 230 si en las de prueba se apreciaban bandas por ID o IEF.

Los niveles de producción de IgG específica se siguieron también por medio de una prueba de ELISA, individualizando el estudio de la respuesta de cada coneja.

### ELISA PARA IgG DE CONEJO ANTI *B. ATROX*

Las pruebas de ELISA se realizaron siguiendo con algunas modificaciones el método descrito por Estrada y Kuhn (20). Para determinar las cantidades adecuadas de antígeno, primer anticuerpo y segundo anticuerpo se hizo titulación en caja. En platos de poliestireno (Nunc A/S Kamstrup, Dinamarca), tratados previamente con hidrobromuro de poli-D-lisina y glutaraldehído, se incubó la cantidad óptima de veneno (6 µg/ml); después de lavarlos se trataron con borohidrato de sodio y se guardaron a -23°C hasta el momento de usarlos. Las diluciones del primer anticuerpo (antisuero de conejo) y del segundo (IgG de cabra anti IgG de conejo marcada con peroxidasa) se hicieron en DPBS (Dulbecco's Phosphate

Buffered Saline) pH 7.4 con 3% de albúmina de suero bovino y 0.05% de Tween 20 (Sigma).

La reacción enzima-sustrato se llevó a cabo durante 10 minutos a 37°C después de lo cual se detuvo con una solución que contenía 0.3 M de ácido ortofosfórico y 0.01 M de HCl. La absorbancia se determinó a 490 nm.

### ELISA PARA IgG HUMANA ANTI *B. ATROX* EN INDIGENAS DEL CHOCO

Se eligieron tres comunidades indígenas; dos de ellas (La Lerma y Mataré) ubicadas en la provincia del San Juan (Noanamá), pertenecientes al grupo étnico Waunana; la tercera, del grupo Emberá, se encuentra río Valle arriba, quebrada Pozamansa (Bahía Solano).

Se obtuvieron muestras de 5 ml de sangre a 13 indígenas que dijeron haber sido mordidos alguna vez por *B. atrox* o *B. nasutus* (7) y a 14 (grupo control) que no habían tenido accidentes ofídicos. Sus edades estaban entre 12 y 65 años y el tiempo transcurrido entre la mordedura y la muestra variaba de 2 meses a 30 años según el relato de los indígenas. Un tercer grupo de 8 personas adultas, sanas, de Medellín, que nunca habían sido mordidas por una

serpiente, sirvió como control de área no endémica. Las muestras de suero se conservaron y procesaron como ya se describió y el ELISA se realizó, salvo pequeñas variaciones, como el de los sueros de las conejas.

### ELISA PARA IgG EQUINA ANTI *B. ATROX* EN PACIENTES TRATADOS CON ANTIVENENO

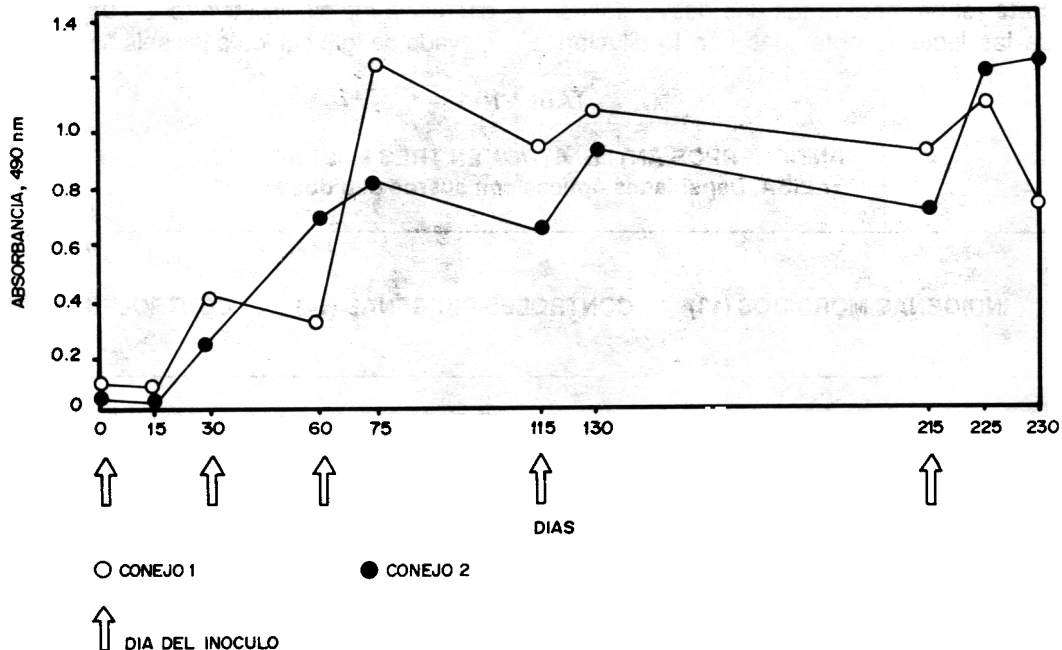
Se seleccionó el Hospital Regional de Urabá (Apartadó) por ser la zona de mayor número de accidentes ofídicos del Departamento de Antioquia (5). A 13 pacientes que tenían menos de 72 horas de haber sido mordidos por *B. atrox* y que previamente no habían recibido antiveneno se les tomaron muestras de 3 ml de sangre en el momento del ingreso (suero control) y 6 horas después de aplicado un antiveneno de origen equino (suero problema). La conservación y el proceso de los sueros fueron similares a los ya descritos.

### ANALISIS ESTADISTICO

Se realizaron cálculos de promedios, desviaciones estándar y pruebas de hipótesis (chi cuadrado,

FIGURA N° 1

### DETECCION POR ELISA DE IgG. ANTI-*BOTHRUPS ATROX* EN CONEJOS INMUNIZADOS



T de Student) por medio del programa computarizado STATGRAPHICS versión 2.6. La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN) se obtuvieron según las recomendaciones de la OPS/OMS.

## RESULTADOS

### RESPUESTA INMUNE DE LAS CONEJAS

El seguimiento de la respuesta inmune de las conejas se hizo a partir del día 60 y reveló bandas en todas las muestras de suero examinadas (días 60, 70, 75, 115, 125, 130, 215, 225 y 230) lo que indica una producción sostenida de anticuerpos a partir del día 60 del esquema de inmunización. La Figura N° 1 muestra que la cinética de la producción de anticuerpos IgG contra el veneno de *B. atrox* fue diferente en cada una de las conejas pero que en ambas se lograron niveles altos después del día 60 (segunda dosis). La disminución de los niveles fue más rápida después de la segunda que después de la tercera dosis; se mantuvieron niveles altos durante los 100 días transcurridos entre ésta y la cuarta.

### IgG HUMANA ANTI *B. ATROX*

En la Tabla N° 1 se observan las densidades ópticas de los tres grupos: utilizando 0.28 como punto de corte (el promedio más dos desviaciones estándar de las lecturas obtenidas con la dilución

1:20 de los sueros, en cualquiera de los grupos de control), 9 de los 13 indígenas con historia de mordedura y ninguno de los controles dieron resultados positivos. Se trabajó también con el punto de corte 0.15 (promedio más dos desviaciones estándar con la dilución 1:80 de los sueros control de Medellín) pero se halló que con ella desaparecían las diferencias significativas entre los indígenas mordidos y los controles. Por ello se concluyó que la dilución 1:20 y el grupo control de indígenas no mordidos eran los más adecuados para los propósitos del estudio. Cinco de los seis indígenas mordidos por *B. atrox* dieron títulos positivos para IgG anti *B. atrox*, uno de ellos 30 años después del accidente. En esas condiciones la sensibilidad de la prueba fue 83.3%, su especificidad 81%, el VPP 55.6% y el VPN 94.4%. También dieron resultado positivo cuatro de los siete indígenas mordidos por *B. nasutus*.

### IgG EQUINA ANTI *B. ATROX* EN PACIENTES TRATADOS CON ANTIVENENO

En la Tabla N° 2 puede apreciarse que, antes de iniciar el tratamiento con antiveneno, el promedio más dos desviaciones estándar de las densidades ópticas de los trece pacientes fue 0.08. En contraste, las muestras obtenidas seis horas después del tratamiento (sólo se logró en siete pacientes) tenían lecturas promedio de 0.43 con desviación estándar de 0.12. La diferencia fue significativa ( $p < 0.05$ ) e indica un título elevado de IgG equina a las seis horas.

TABLA N° 1

#### ANTICUERPOS ANTI *B. ATROX* EN TRES POBLACIONES (ELISA. Densidades ópticas con sueros diluidos al 1:20)

DENSIDAD OPTICA	INDIGENAS MORDIDOS (13)	CONTROLES INDIGENAS (14)	CONTROLES DE MEDELLIN (8)
LIMITES	0.20-0.53	0.17-0.27	0.11-0.25
MEDIANA	0.33	0.21	0.19
PROMEDIO	0.33	0.22	0.18
D.S	0.11	0.03	50.0

## DISCUSION

El método utilizado para inmunizar las conejas con veneno de *B. atrox* permitió obtener niveles altos de IgG específica y la respuesta se mantuvo después de la segunda dosis de antígeno, utilizado siempre en pequeñas cantidades, por la misma vía y con el mismo adyuvante. No hubo reacciones secundarias. Se notó variabilidad en la respuesta individual tal como sucede con los caballos cuando se produce antiveneno (18). Por ello se requiere individualizar el monitoreo de la respuesta de los animales que se utilicen para producir antivenenos con fines experimentales o terapéuticos.

tados en función del tiempo tienen que ser valorados con suma cautela.

Es un hecho conocido que las especies de serpientes del mismo género comparten similitudes antigénicas y, por consiguiente, dan reacciones cruzadas en las pruebas inmunológicas (15) lo que afectó la especificidad de la prueba (81%); si se hubieran excluido los sueros de indígenas con mordeduras antiguas por *B. nasutus* la especificidad y el VPP habrían sido del 100% con el suero diluido al 1:20. El VPN fue muy alto (94.4%) lo que le da gran valor para estudios seroepidemiológicos de mordedura por serpientes en poblaciones rurales de países tropicales: un resultado negativo indica, con alta

TABLA N° 2

IgG EQUINA ANTI *B. ATROX* EN PACIENTES TRATADOS CON ANTIVENENO EQUINO POLIVALENTE  
(Suero diluido al 1:320)

DENSIDAD OPTICA	PRETRATAMIENTO (13)	POSTRATAMIENTO (7)
LIMITES	0 - 0.	0.28 - 0.60
MEDIANA	0.01	0.45
PROMEDIO	0.02	0.43
D.S.	0.03	0.12

El estudio de los anticuerpos IgG contra el veneno de *B. atrox* en los indígenas estuvo limitado por el bajo número de muestras logrado; esto se explica por razones culturales: los indígenas de estas comunidades relacionan la impotencia sexual con la extracción de sangre. No obstante consideramos buena la sensibilidad de la prueba (83.3%) para detectar IgG en accidente antiguo por *B. atrox*; sería aconsejable hacer estudios seroepidemiológicos futuros con mayor número de muestras.

No sorprende el hecho de que un indígena haya tenido títulos positivos 30 años después del accidente porque Theakston y colaboradores habían descrito una situación similar hasta 40 años después del accidente en indígenas Waorani del Ecuador y en tribus de Nigeria (15,16,22). Sin embargo, el concepto de "años transcurridos" es tan difícil de precisar entre nuestros indígenas que estos resul-

probabilidad, que la persona no ha sido mordida en el pasado por *B. atrox*.

La técnica de ELISA estandarizada para medir niveles de IgG equina anti *B. atrox* también es sencilla y muy sensible; por ello permitirá en un futuro próximo ser aplicada para seguir el curso del envenenamiento, evaluar la respuesta terapéutica al antiveneno y hacer un enfoque más científico del manejo del accidente ofídico, como el que se ha realizado en otros países (11,13,14).

## AGRADECIMIENTOS

A las comunidades y los trabajadores de la salud de los Departamentos de Antioquia y Chocó; a los indígenas de Istmina y Bahía Solano y a los pacientes de Apartadó, gracias a cuya colaboración pudo efectuarse el estudio. A los estudiantes de la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad

de Antioquia que rotaron por el Serpentario y al Biólogo Ferney Montoya por su colaboración en el laboratorio; a Claudia Patricia López y Olga Patricia García por el trabajo mecanográfico.

---

## SUMMARY

### IMMUNOENZYMATIC DETERMINATION OF IgG ANTI *BOTHROPS ATROX* LEVELS AFTER SNAKE BITES

We developed an immunization method for the production of rabbit antisera against *Bothrops atrox* venoms. An enzyme-linked assay (ELISA) was standardized in order to measure IgG levels after snake bites. The immune response of rabbits, as determined by Ouchterlony and immunoelectrophoresis techniques, revealed bands of precipitation from the sixth day on. Individual variability in the immune response of rabbits was demonstrated. For the measurement of IgG levels in Indians from the Department of Chocó (Colombia), ELISA proved to be a sensitive (83.3%) and simple but not a specific procedure, since there were cross-reactions in those previously bitten by *B. nasutus*. ELISA was also simple and sensitive (100%) for the determination of equine anti *B. atrox* IgG antibodies in patients treated with antivenom.

---

## BIBLIOGRAFIA

1. OTERO R, OSORIO RG, VALDERRAMA R, et al. Ofidismo en Antioquia y Chocó (Etapa I). Estudio prospectivo sobre aspectos biológicos, toxinológicos, clínico-epidemiológicos y aplicación de métodos inmunoquímicos en diagnóstico y tratamiento (1988-1990). Informe final. Vol. I y II. Medellín, Universidad de Antioquia, Colciencias, Servicios Seccionales de Salud de Antioquia y Chocó; 192 p.
2. DUNN ER. Los géneros de anfibios y reptiles de Colombia. Tercera parte: Reptiles; orden de las serpientes. *Caldasia* 1943; 3: 155-224.
3. MEDEM F. El desarrollo de la herpetología en Colombia. *Rev Acad Col Cs Exact Fis Nat* 1968; 50: 149-199.
4. GUTIERREZ E. Ofidiofauna y ofidismo en Colombia. Primera parte. *Hosmil Méd* 1980; 1: 27-36.
5. ANGEL R. Serpientes de Colombia. Su relación con el hombre. Medellín: Secretaría de Educación y Cultura de Antioquia, 1987: 229 p.

6. OTERO R. Mordedura por serpientes. In: CORDOBA D. ed. *Toxicología*. 2a ed. Medellín: Vieco, 1991: 285-303.
7. BOLAÑOS R. Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica. San José: Universidad de Costa Rica, 1984: 136 p.
8. KOCHWA S, GITTER S, STRAUSS A, DEVRIES A, LEFKOWITZ M. Immunologic study of *Vipera xanthina palestinae* venom and preparation of potent antivenom in rabbits. *J Immunol* 1959; 82: 107-115.
9. THEAKSTON RDG. The application of immunoassay techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to snake venom research. *Toxicon* 1983; 21: 341-352.
10. SUTHERLAND SK, COULTER AR, BROAD AJ. Human snake bite victims: the successful detection of circulating snake venom by radioimmunoassay. *Med J Austr* 1975; 1: 27-29.
11. LABROUSSE H, NISHIKAWA AK, BON C, AVRAMEAS S. Development of a rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring venom antigens after an experimental snake bite. *Toxicon* 1988; 26: 1157-1167.
12. THEAKSTON RDG, REID HE. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon* 1979; 17: 511-515.
13. HO M, WARRELL DA, LOOAREESUWAN S, et al. Clinical significance of venom antigen levels in patients envenomed by the malayan viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 579-587.
14. VIRAVAN CH, VEERAVAN U, WARRELL MJ, THEAKSTON RDG, WARRELL DA. Elisa confirmation of acute and past envenoming by the monocellate thai cobra (*Naja kaouthia*). *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 173-181.
15. HO M, WARRELL MJ, WARRELL DA, BIDWELL D, VOLLER A. A critical reappraisal of the use of enzyme-linked immunosorbent assay in the study of snake bite. *Toxicon* 1986; 24: 211-221.
16. THEAKSTON RDG, LLOYD-JONES MJ, REID HA. Micro-elisa for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. *Lancet* 1977; 24: 639-641.
17. MIDDLEBROOK JL, KAISER II. Immunological relationships of phospholipase A2 neurotoxins from snake venoms. *Toxicon* 1989; 26: 965-977.
18. BARRAL-NETTO M, SCHRIEFERA, VINHAS V, ALMEIDA AR. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 1990; 28: 1053-1061.
19. GUTIERREZ JM, CHAVES F, ROJAS G, et al. Production of monovalent anti *Bothrops asper* antivenom: development of immune response in horses and neutralizing ability. *Rev Biol Trop* 1988; 36: 511-517.
20. ESTRADA JJ, KUHN RE. Immunochemical detection of antigens of larval *Taenia solium* and antilarval antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. *J Neurol Sci* 1985; 71: 39-48.
21. FESCINA RH, BELITZKY R, SIMINI F. Evaluación de los procedimientos diagnósticos. Centro Latinoamericano de Perinatología y Desarrollo Humano, OPS/OMS. Publicación Científica CLAP N° 999: 1-13.
22. THEAKSTON RDG, REID HA, LARRICK JW, KAPLAN J, YOST JA. Snake venom antibodies in Ecuadorian Indians. *J Trop Med Hyg* 1981; 84: 199-202.