

ARTÍCULOS ORIGINALES

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "FÉLIX PIFANO" DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Diseño de una prueba de aglutinación en látex, para detectar venenos de serpientes Viperidae en sueros de pacientes

Lic. Viviana Lión,¹ Lic. Adriana Rojas¹ y Dr. Alexis Rodríguez-Acosta²

RESUMEN

Se diseñó esta prueba de aglutinación en látex como herramienta en el diagnóstico de los accidentes ofídicos. El desarrollo de ensayos específicos para identificar en sueros humanos, venenos de las serpientes más comunes en Venezuela, puede contribuir en el mejoramiento del diagnóstico de estos accidentes ocasionados por las serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* y en el control del suero antiofídico para el tratamiento de forma inmediata y adecuada. Los resultados obtenidos revelan una sensibilidad de 167 mg/mL y buena especificidad, rapidez (10 min) y sencillez, porque puede ser realizado por personal con un entrenamiento básico y solo se requiere de un microscopio. Todas estas razones indican el potencial de esta técnica, se requiere complementar los resultados con estudios de los diferentes factores que intervienen en la elaboración del reactivo de látex y permitan mejorar su calidad; y entre esas modificaciones se sugiere mejorar la detección de menores cantidades de veneno, probar el reconocimiento de las partículas de látex sensibilizadas con inmunoglobulinas específicas contra el veneno de *Bothrops* y *Crotalus* al enfrentarlo con veneno de serpientes del género *Crotalus*, y reproducir la prueba al nivel clínico mediante sueros de pacientes que han sido víctimas de un accidente ofídico.

DeCS: VENENOS DE SERPIENTE/ envenenamiento; TEST DE FIJACION DE LATEX/ métodos; ANTIVENENOS.

En el mundo existen 2 700 especies de serpientes, de las que se señalan 200 como venenosas. En Venezuela, hay 8 familias con más de 150 especies, de las que alrededor de 25 son venenosas. La mayoría de los accidentes ocasionados por serpientes venenosas en Venezuela son producidos por aproximadamente 15 especies de los géneros: *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Porthidium*, 4 especies de *Crotalus*, una especie de *Lachesis* y unas 11 especies de *Micrurus*.¹

De acuerdo con los datos recientes, la morbilidad anual en Venezuela, por envenenamiento ofídico, fue de 4 000 casos para el año 1997. Sin embargo, el número de accidentes tiene un subregistro cuya cuantía se ignora, debido a que no todos los accidentes ofídicos son reportados.²

Aproximadamente 80 % de los envenenamientos en Venezuela son causados por el género *Bothrops*, siendo la serpiente predominante *Bothrops colombiensis*, la cual está ampliamente distribuida en el territorio nacional.³

¹ Licenciada en Bioanálisis.

² Profesor Titular.

Venezuela llegó a ocupar uno de los primeros lugares en el mundo en cuanto a mortalidad por mordeduras de ofidios venenosos; sin embargo, según los datos reportados, ha habido un notable descenso de las muertes por envenenamiento, debido a diversos factores, como el desarrollo de vialidad en zonas de alto riesgo, que permiten un acceso más rápido a los centros de atención médica, así como también al incremento en el número de ambulatorios rurales en estas zonas.⁴ Además, la mortalidad por accidentes ofídicos ha disminuido debido a la mayor disponibilidad del suero antiofídico, por su producción en el país y el amplio conocimiento de los médicos rurales, en cuanto al diagnóstico y tratamiento de estos envenenamientos.

El diagnóstico de los accidentes ofídicos, hasta ahora, se puede establecer por la identificación de la serpiente agresora, lo cual se logra apenas en 50 % de los casos por la descripción que hace el paciente y su comparación con fotos. Son pocos los pacientes que llevan la serpiente al hospital. Por métodos inmunológicos, basados en la determinación de antígenos circulantes (toxinas), en sangre total o en suero, para ellos se utilizan ensayos tipo ELISA. Por métodos clínicos, el cual es el más práctico y útil, permite la clasificación del envenenamiento según sus síntomas, aunque solo puede establecer su diagnóstico por género de serpientes, pero no por especies.⁵⁻⁸

Es importante destacar que en ocasiones puede haber mordeduras de serpientes venenosas sin que haya envenenamiento (mordedura seca).^{1,4}

En este trabajo se ha desarrollado una técnica novedosa para detectar la presencia del veneno en el suero de los pacientes mordidos por una serpiente y la posibilidad de pronosticar si fue causada por una Viperidae o por una no venenosa. Esto se debe establecer siempre, porque no se justifica el uso del suero antiofídico, sin una observación directa de síntomas notorios, ni la presencia del veneno en la sangre del individuo.

MÉTODOS

VENENOS

Veneno de serpientes “tigra mariposa” (*Bothrops venezuelensis*), mantenidas en el Laboratorio de Inmunología del Serpentario del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

ANTIVENENO

Suero antiofídico elaborado por el Centro de Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la UCV y plasma de equinos hiperinmunizados (anti-bothrópicos y anti-crotálicos), gentilmente donadas por el doctor Oswaldo Grillo del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

Para comprobar su especificidad las inmunoglobulinas del plasma de equinos hiperinmunizados y del suero antiofídico polivalente de la Facultad de Farmacia, fueron precipitadas con sulfato de amonio, estimada su concentración de proteínas por absorbancia a 280 nm y probadas en un ensayo de inmunodifusión doble de Outcherlony,⁹ usando como antígeno veneno de *Bothrops venezuelensis*. El resto fue liofilizado y mantenido a - 70 °C hasta su uso posterior.

INMUNODIFUSIÓN DOBLE DE OUTCHERLONY

Se prepararon las láminas de agar según técnica común⁹ y se procedió a evaluar la reactividad del veneno de *Bothrops venezuelensis*, contra el suero antiofídico polivalente (SAP). Se colocó el SAP en el pozo central (20 mL) y el veneno (1 mg/mL) en los pozos periféricos, disuelto en PBS 0,01 M pH 7,2 a diferentes diluciones, puro, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y 1/132.

Los plasmas hiperinmunes anti-bothrópico y anti-crotálico fueron ensayados de la misma manera.

DISEÑO DEL REACTIVO LÁTEX PARA EL ENSAYO DE AGLUTINACIÓN

Para obtener la suspensión de látex para el ensayo de aglutinación se requirió sensibilizar las partículas de látex con las inmunoglobulinas específicas contra el veneno de *Bothrops* y *Crotalus*, obtenidas a partir del plasma de equinos hiperinmunizados. Para ello se siguió un protocolo inicial de sensibilización de partículas de látex con anticuerpos para ensayos de captura de antígenos.¹⁰ Se realizaron diferentes modificaciones a este protocolo en cuanto a la concentración de inmunoglobulinas, concentración de látex y concentración de albúmina de suero bovino (proteína G en buffer glicina salino [BGS] – 200 mg/mL,

partículas de látex de poliestireno 1 % en BGS pH 8,2) con 3 % de sero-albúmina bovina, solución de inmunoglobulinas – 7 500 mg/500 mL – diluidas en BGS a 1:15, 1:25 y 1:35), hasta la obtención del reactivo que permitió observar los mejores resultados de aglutinación.

La solución de proteína G (1 mg/mL) se preparó con agua destilada que contenía 0,05 % Tiomersal. Luego se diluyó en BGS 0,1 M pH 8,2 que contenía 0,5 M NaCl con 0,05 % Tiomersal.

Se mezclaron volúmenes iguales (300 mL c/u) de la dilución de la proteína G con las partículas de látex de poliestireno de 0,33 μ m diluidas a las concentraciones requeridas en BGS (se diluyeron las partículas de látex 1 % tomando como referencia el ensayo realizado por Aguirre y otros).¹¹ Luego se completó con BGS hasta 1 mL. Se incubaron a temperatura ambiente por 2 h en agitador orbital, se centrifugó por 15 min a 15 000 rpm y se retiró el sobrenadante. Las partículas se lavaron 2 veces con 1 mL de BGS por centrifugación a 15 000 rpm x 15 min y sonicación a 100 vatios x 15 s. Los lavados se efectuaron con BGS, con concentraciones variables de BSA, para bloquear los sitios no cubiertos con la proteína G. En el último lavado se dejó incubando la suspensión por 1 h a temperatura ambiente con el BGS que contenía BSA. Luego se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se resuspendió con 600 mL de BGS.

El complejo proteína G-partícula de látex resultante, se acopló a diferentes concentraciones de inmunoglobulinas de caballos anti-venenos de *Bothrops* y *Crotalus*. Se mezclaron a volúmenes iguales (300 mL c/u) de suero inmune diluido en BGS y las partículas de látex suspendidas. Se incubaron a temperatura ambiente por 2 h y luego 48 h con agitación suave a 5° C. Finalmente, se lavaron 2 veces con BGS bajo las condiciones anteriores de centrifugación y sonicación y por último, se resuspendieron en BGS y se guardaron a 5 °C hasta su uso.

Comprobación que las partículas de látex sensibilizadas con las inmunoglobulinas específicas contra el veneno de Bothrops y Crotalus, aglutinan en presencia del veneno de Bothrops venezuelensis y determinar la sensibilidad de la prueba

Este ensayo permitió evidenciar que la suspensión de látex sensibilizado con las

inmunoglobulinas de caballos anti-*Bothrops/Crotalus*, aglutinaba en presencia de concentraciones variables de veneno de *Bothrops venezuelensis*. El reactivo fue probado con controles negativos (sueros de caballo sin veneno de serpientes).

Se mezclaron los sueros con dosis decrecientes de veneno bothrópico, comenzando con 5 000 mg/mL de veneno. La reactividad del ensayo se obtuvo probando el reactivo de látex con las diferentes concentraciones de veneno en los sueros.

La sensibilidad de la prueba se determinó enfrentando las partículas de látex sensibilizadas con los sueros que contienen concentraciones decrecientes conocidas de veneno de *Bothrops venezuelensis*, hasta hallar la mínima concentración donde se pudo detectar aglutinación.

Para el ensayo de aglutinación, se colocaron en láminas de vidrio 10 μ L de las partículas de látex sensibilizadas con las inmunoglobulinas contra el veneno de *Bothrops* y *Crotalus* y 10 μ L de suero que contenía una cantidad de veneno conocida, se mezclaron con ligeros movimientos de rotación para mejorar la interacción de los reactivos y se incubó en cámara húmeda. Se leyó a los 5-10 min en microscopio óptico con objetivo de 10x.

Para probar su especificidad, se utilizaron venenos de diferentes especies de animales como abejas (*Apis mellifera*), escorpión (*Tityus caripitenses*), que pueden ser confundidos con los accidentes ofídicos.

Para el ensayo de aglutinación, se colocaron en láminas de vidrio 10 μ L de la partículas de látex sensibilizadas con las inmunoglobulinas contra el veneno de *Bothrops* y *Crotalus* y 10 μ L de veneno de abeja o escorpión diluidos en suero humano a 1 mg/mL y 0,5 mg/mL, respectivamente; se mezclaron con ligeros movimientos de rotación para mejorar la interacción de los reactivos e incubaron en cámara húmeda. Se leyeron a los 5-10 min en microscopio óptico con objetivo de 10x.

RESULTADOS

Especificidad de las inmunoglobulinas presentes en el plasma de equinos hiperinmunizados con venenos de *Bothrops* y *Crotalus*

Durante el proceso de precipitación de las inmunoglobulinas contenidas en el plasma de los

equinos hiperinmunizados con el veneno de *Bothrops* y *Crotalus*, se obtuvo una concentración de 17,9 mg/mL. La estimación de este contenido proteico se realizó espectrofotométricamente asumiendo que una unidad de absorbancia por cm^3 , a una longitud de onda de 280 nm, una densidad óptica de 1,0 (en una celda de 1 cm), es equivalente a una concentración de fracción de gammaglobulinas (FdG) de 0,74 mg/mL.⁹

$$\text{FdG} = \text{DO} \times 0,74 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Absorbancia de la muestra a 280 nm: } 1,215$$

$$\text{Dilución: } 1/20$$

$$\text{FdG} = 1,215 \times 0,74 \text{ mg/mL} \times 20$$

$$\text{FdG} = 17,9 \text{ mg/mL}$$

INMUNODIFUSIÓN DOBLE (OUTCHERLONY)

En la demostración de la especificidad de las inmunoglobulinas purificadas frente a su antígeno correspondiente (veneno) y la reactividad del veneno de *Bothrops venezuelensis*, mediante el método de inmunodifusión doble se demostró que el suero antiofídico polivalente (SAOP) produjo bandas de precipitación hasta la dilución 1/4 del veneno (1 mg/mL).

Al enfrentar las inmunoglobulinas presentes en el plasma equino hiperinmune anti-*Bothrops/Crotalus* purificado, con las diferentes diluciones de veneno de *Bothrops venezuelensis*, se obtuvieron bandas de precipitación hasta la dilución 1/16.

DISEÑO DEL REACTIVO LÁTEX PARA EL ENSAYO DE AGLUTINACIÓN

Para obtener el reactivo de látex sensibilizado con las inmunoglobulinas específicas contra los venenos de *Bothrops* y *Crotalus*, fue necesario hacer algunas modificaciones al protocolo.¹⁰

Considerando los resultados obtenidos en una de las variantes, con la diferenciación de la concentración de inmunoglobulinas, la prueba fue realizada con una dilución 1:25 a partir de una solución de inmunoglobulinas (7 500 mg/500 mL), dando aglutinación positiva hasta una concentración 1 000 mg/mL de veneno (tabla 1). Se eligieron estas condiciones para realizar las reacciones de aglutinación, donde se evaluó la sensibilidad y especificidad del reactivo.

Reacción de aglutinación de las partículas de látex sensibilizadas con las inmunoglobulinas específicas

TABLA 1. Ensayo de látex sensibilizado con IgS a dilución de 1:25 en presencia de sueros envenenados con diferentes concentraciones de veneno de *Bothrops venezuelensis*

Pruebas	Reacción de aglutinación
10 mL reactivo de látex sensibilizado (Igs diluidas 1:25)	Negativa (-)
10 mL de BGS + 10 mL reactivo de látex sensibilizado (Igs diluidas 1:25)	Negativa (-)
10 mL suero sin veneno + 10 mL reactivo de látex sensibilizado (Igs diluidas 1:25)	Negativa(-)
10 mL suero con veneno (5 000 mg/mL) + 10 mL reactivo de látex sensibilizado (Igs diluidas 1:25)	Positiva (+)
10 mL suero con veneno (2 500 mg/mL) + 10 mL reactivo de látex sensibilizado (Igs diluidas 1:25)	Positiva (+)
10 mL suero con veneno (1 000 mg/mL) + 10 mL reactivo de látex sensibilizado (Igs diluidas 1:25)	Positiva (+)

contra el veneno de *Bothrops* y *Crotalus*, en presencia de sueros envenenados experimentalmente con concentraciones decrecientes del veneno de *Bothrops venezuelensis*

El grado de aglutinación fue valorado para fines experimentales como alto, moderado y bajo, considerándose la aglutinación alta con 3 signos positivos (+++), la aglutinación moderada con 2 signos positivos (++) y la aglutinación baja con 1 signo positivo (+). A partir de la concentración de veneno de *Bothrops venezuelensis* de 5 000 mg/mL se realizaron varias diluciones con suero humano enfrentándolo con el reactivo obtenido en el ensayo anterior de afinamiento de la aglutinación y los resultados pueden verse en la tabla 2.

Se observó aglutinación hasta la dilución 1:30, a partir de una concentración de veneno de *Bothrops venezuelensis* de 5 000 mg/mL, lo que significa que el límite de detección mínima de la prueba fue de 167 mg/mL.

ESPECIFICIDAD DEL REACTIVO

Al enfrentar las partículas de látex sensibilizadas con inmunoglobulinas contra el veneno de las serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* para probar su especificidad ante los venenos de

TABLA 2. Reacción de aglutinación del reactivo de látex frente a diferentes concentraciones de veneno de *Bothrops venezuelensis*

Dilución del veneno	Concentración de veneno (mg/mL)	Grado de aglutinación
5 000 mg/mL		
1:2	2 500	+++
1:2.5	2 000	+++
1:3.5	1 429	+++
1:5	1 000	++
1:6	833	++
1:8	625	++
1:10	500	++
1:12	417	++
1:16	313	+
1:20	250	+
1:25	200	+
1:30	167	+
1:35	143	-
1:40	12	-

escorpión (*Tityus caripitenses*) y abeja (*Apis mellifera*) diluidos en suero humano a 0,5 mg/mL y 1 mg/mL, respectivamente, se pueden observar los resultados obtenidos por triplicado en la tabla 3.

TABLA 3. Especificidad del reactivo de látex frente al veneno de escorpión (*Tityus caripitensis*) y abeja (*Apis mellifera*) diluidos en suero humano

Pruebas	Reacción de aglutinación
10 mL de veneno de escorpión (0,5 mg/mL) + 10 mL reactivo de látex sensibilizado	Negativa
10 mL de veneno de abeja (1 mg/mL) + 10 mL reactivo de látex sensibilizado	Negativa

RESULTADOS GRÁFICOS DE AGLUTINACIÓN

Los diferentes resultados de aglutinación obtenidos con el reactivo de látex sensibilizado con las Igs contra el veneno de serpientes del género *Bothrops* y *Crotalus* (1:25), al enfrentarlo con el control negativo y controles positivos de aglutinación, pueden observarse en la figura.

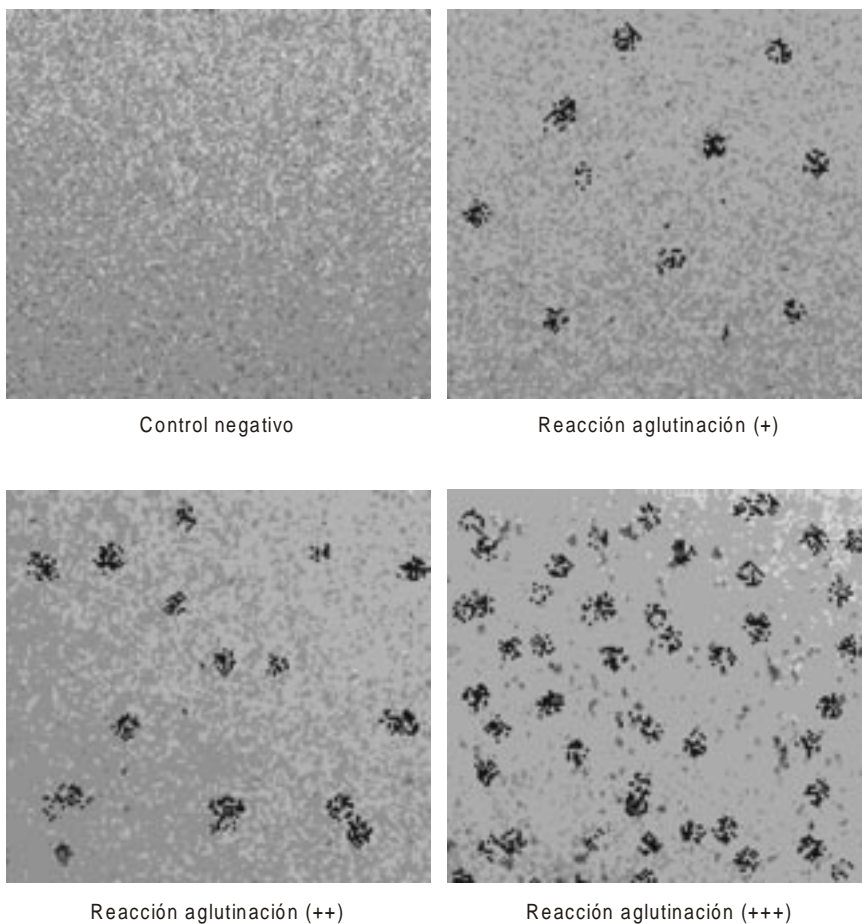


Fig. Aglutinaciones bajas (+), moderadas (++) y altas (+++) observadas en los ensayos experimentales con el reactivo de látex sensibilizado con Igs anti-*Bothrops/Crotalus* y sueros envenenados con veneno de *B. venezuelensis*, con su correspondiente control negativo.

DISCUSIÓN

Los accidentes ofídicos constituyen un problema de salud pública para los países en vías de desarrollo. Hasta ahora su diagnóstico se basa, casi exclusivamente en la identificación de la serpiente responsable del accidente y en el cuadro clínico que presenta la víctima.¹² Sin embargo, en muchos casos se desconoce si realmente hubo envenenamiento. De allí surgió la necesidad de diseñar una prueba sencilla que permitiera detectar la presencia de venenos de las serpientes más comunes en Venezuela, como son los *Bothrops* y *Crotalus* en el suero de los pacientes accidentados.

Los requerimientos ideales de un ensayo para detectar venenos incluyen altos niveles de sensibilidad, buena especificidad, rapidez en la obtención de los resultados reproducibles y fácil recolección de las muestras. Las pruebas de aglutinación en látex son ensayos ideales por ser simples, rápidas, económicas y de fácil interpretación, haciéndolas apropiadas para uso en medios rurales.

Para preparar un reactivo de aglutinación en látex es necesario considerar algunos factores que influyen en la adherencia del antígeno respectivo a las partículas de látex sensibilizadas: las inmunoglobulinas específicas contra el antígeno, las partículas de látex y la proteína G. Muchos de los reactivos de látex comerciales para otros diagnósticos, tienen fragmentos Fab, en vez de la IgG completa sobre la superficie de las partículas. Esto se debe a que la porción Fc puede causar aglutinación inespecífica.¹³ Por esta razón, en un principio se pensó en utilizar los fragmentos Fab₂ del suero antiofídico para sensibilizar las partículas, pero como la proteína G, es mediadora en la unión de las Igs y las partículas de látex y tiene afinidad específica por la porción Fc de las Igs, más no por la porción Fab ni por la albúmina, se solicitó la donación del plasma equino hiperinmunizado con venenos de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* al Centro de Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, para obtener Igs completas que no estuvieran tratadas con pepsina, conservando ambos fragmentos (Fab₂ y Fc). Por lo tanto, fue necesario el proceso de

purificación por precipitación salina y la cuantificación de la concentración de inmunoglobulinas en la solución.

La presencia de las inmunoglobulinas específicas fue comprobada con la prueba de inmunodifusión doble. Las inmunoglobulinas, presentes en el plasma equino reconocen el antígeno contra el cual fueron producidas, en este caso el veneno de *Bothrops venezuelensis*, observándose bandas de precipitación que alcanzaron hasta la alta dilución 1/16 del veneno (1 mg/mL). La calidad del veneno fue verificada con la reacción frente al suero antiofídico, observándose bandas de precipitación hasta la dilución 1/4 del veneno (1 mg/mL) de la serpiente *Bothrops venezuelensis*, lo que indicó que el veneno conservaba su reactividad.

Se realizaron varios ensayos para obtener el reactivo de látex sensibilizado, capaz de aglutinar en presencia de su antígeno. Se evaluaron cuáles fueron los posibles factores que no permitieron la captura del antígeno (veneno), por parte de las partículas de látex, considerándose 4 factores principales: la concentración de proteína G, la dilución de las partículas de látex, el porcentaje de BSA para los lavados y la concentración de las inmunoglobulinas.

Se realizaron ciertas modificaciones: considerando el tamaño de las partículas de látex, se duplicó la concentración de la proteína G (200 mg/mL), para mejorar la adherencia de las Igs a las partículas de látex y el exceso de proteína G se pudo eliminar con los lavados. La proteína G tiene la característica de unir más eficientemente las IgG, que la proteína A, utilizada en otros ensayos, donde al cubrir las partículas con proteína A antes de ser sensibilizadas mejoraron la capacidad de detectar el antígeno.^{14,15}

Se ensayó con diferentes concentraciones de inmunoglobulinas para sensibilizar las partículas de látex, hasta hallar una concentración óptima. Siguiendo estas modificaciones se realizó un ensayo, donde las partículas de látex fueron sensibilizadas con Igs puras y con diluciones 1:20 y 1:50, donde no se observó aglutinación en presencia de veneno. Con la dilución 1:20 se logró ver aglutinación con el suero que contenía veneno,

pero se observó que autoaglutinaba con el BGS. Esta reacción de aglutinación con BGS podía deberse a la inestabilidad coloidal del sistema, lo cual se logró mejorar, aumentando la concentración de BSA en el BGS de lavado, porque la albúmina contribuye a la estabilidad coloidal y a evitar la precipitación.

En otro ensayo las partículas de látex fueron sensibilizadas con las inmunoglobulinas en una dilución 1:20 y lavados de BGS con 3 % de BSA, conservando la concentración de proteína G (200 mg/mL). Con estas modificaciones se pudo obtener aglutinación microscópica hasta la concentración de veneno de 2 500 mg/mL. Sin embargo, esta sensibilidad es limitada, así que se probaron varias concentraciones de inmunoglobulinas.

Con las Igs en una dilución 1:15, se observó aglutinación inespecífica al igual que con la dilución 1:35. Con las Igs dilución 1:25 se consiguió aglutinación microscópica al probarlo con el veneno de 1 000 mg/mL. Considerando los resultados obtenidos se enfrentó el reactivo de látex sensibilizado con Igs en dilución 1:25, con sueros humanos envenenados experimentalmente para ver su reactividad y conocer su sensibilidad.

Todas las reacciones de aglutinación se realizaron por triplicado y la mínima concentración de veneno que logró detectar el ensayo fue de 167 mg/mL.

De acuerdo con los resultados de especificidad, el reactivo reconoce el veneno de las serpientes del género *Bothrops*, y no presenta reacción cruzada con venenos de los géneros *Apis mellifera* ni de *Tityus caripitenses*; los cuales pueden producir una clínica que en algunos casos es similar a este envenenamiento. Queda para posteriores estudios probar el reactivo con venenos de serpientes del género *Crotalus*, que si bien, los accidentes por estas no se presentan con demasiada frecuencia, su clínica es muy severa. Además, se debe evaluar la especificidad con otros géneros de serpientes relacionadas (*Lachesis*, *Micrurus*), cuyos accidentes son rarísimos en el país.

Es importante tomar en cuenta el pH del reactivo, porque la unión de las partes Fab₂ y Fc de las inmunoglobulinas a la superficie de las partículas de látex, varían de acuerdo con el pH

del medio. El pH bajo al cual se realizó el reactivo (8,2), resultó ser adecuado, porque bajo esta condición la porción Fab está sobre su punto isoeléctrico (7,3), con lo cual aumenta la repulsión de cargas con la superficie de las partículas de látex, dejando el sitio antigénico libre para que pueda reaccionar con su antígeno (veneno). La adsorción de la porción Fc es menos pH dependiente que la de Fab, porque las principales fuerzas que actúan en la unión son hidrofóbicas.¹³

Otra condición importante de evaluar fue la concentración de electrólitos, las concentraciones muy altas o muy bajas pueden interferir en la reacción antígeno-anticuerpo, porque esta es una reacción de tipo iónica y puede ser afectada por los iones del medio.

Es necesario continuar haciendo modificaciones al reactivo para optimizar su calidad, lo cual permitirá detectar una mínima concentración de veneno en el suero de pacientes que han sido víctimas de accidente ofídico, y no hayan desarrollado una clínica evidente.¹⁶

Queda para futuros estudios probar el reactivo de látex al nivel clínico, con sueros de personas víctimas de accidentes ofídicos, porque esta prueba promete tener potencial para la detección de venenos de los géneros de serpientes venenosas más comunes en Venezuela, siendo muy útil en los medios rurales, por su sencillez, facilidad de interpretación y bajo costo.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Alfredo Noda y al doctor Oscar Noya, por su valiosa colaboración en el desarrollo de este trabajo.

SUMMARY

This latex agglutination test was designed as a tool in the diagnosis of the ophidic accidents. The development of specific trials to identify venoms from the most common snakes in Venezuela in human sera, could contribute to the improvement of the diagnosis of these accidents caused by snakes of the *Bothrops* and *Crotalus* genera, and in the control of the antiophidic serum for the treatment in an adequate and immediate way. The results obtained revealed a sensitivity of 167 mg/mL with good specificity, rapidity (10 minutes) and simplicity, since it can be accomplished by personnel with a basic training and only a microscope is necessary. All these reasons show the potential of this technique. It is required to complement the results with studies of the

different factors that take part in the making of the latex reagent and that allow to improve its quality. Among these modifications it is suggested to improve the detection of smaller quantities of venom, to prove the recognition of the specific immunoglobulin sensitized latex particles against the *Bothrops* and *Crotalus* venom, and to reproduce the test at the clinical level by using serum from patients that have been victims of ophidic accidents.

Subject headings: SNAKE VENOMS/poisoning; LATEX FIXATION TESTS/methods; ANTIVENOMS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rodríguez-Acosta A, Orihuela R, Mondolfi A. El accidente ofídico en Venezuela. Caracas: Venediciones;1998:1-106.
- Rodríguez-Acosta A, Uzcategui W, Azuaje R, Aguilar I, Girón M. Análisis clínico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del género *Bothrops* en Venezuela. Rev Cubana Med Trop 2000;52:90-4.
- Pifano F, Rodríguez-Acosta A. El envenenamiento ofídico en Venezuela. Tesis de la Cátedra de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela. Caracas, 1989:1-36.
- Daol L, Ramírez M. Emponzoñamiento animal en el Estado Lara, Venezuela. Barquisimeto: Publicaciones de la Fundación Dr. Luis Dao; 1997:3-25.
- Rodríguez-Acosta A, Uzcategui W, Azuaje R, Giron ME, Aguilar I. ELISA assays for the detection of *Bothrops lanceolatus* venom in envenomed patient plasmas. Roum Arch Microbiol Immunol 1998;57:271-8.
- Theakston RD. The application of immunoassay techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. Toxicon 1983;21:341-52.
- Theakston RDG, Lloyd-Jones MJ, Reid HA. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. The Lancet 1977;September 24.
- Theakston RD, Reid HA. Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. Toxicon 1979;17:511.
- Hudson L, Hay FC. Practical Immunology. England, London: Blackwell Scientific Publication; 1977:107-15.
- Noya O, Zerpa N, Wide A, Noda A. Desarrollo de técnicas de campo para la detección de anticuerpos y antigenemia de *Plasmodium falciparum*. Bol Dir Mal Saneam Amb 1997;37:27-35.
- Aguirre L, Muñoz M. Estandarización de un sistema de fijación de inmunoglobulinas a micropartículas de poliestireno carboximodificadas. Trabajo especial de grado. Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, UCV. Caracas, Venezuela, 2001:1-54.
- Otero R. Manual de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia; 1994:1-87.
- Kawaguchi H, Sakamoto K, Ohtsuka Y. Fundamental study on latex reagents for agglutination tests. Biomaterials 1989;10:225-9.
- Shimizu S, Tauki S, Arakawa A. Protein A-coated latex-linked test for detection of the denonucleosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. J Invert Pathol 1991;57:124-5.
- Baig M, Datta RK, Nataraju B, Samsom MV, Sivaprasad V. Protein-A linked latex antisera test for the detection of *Nosema bombycis naegeli* spores. J Invert Pathol 1992;60:312-3.
- Sánchez E, Galán J, Perez J, Rodríguez-Acosta A, Chase P. The efficacy of two antivenoms against the venom of North American snakes. Toxicon 2003;41:357-65.

Recibido: 12 de febrero de 2003. Aprobado: 16 de diciembre de 2003.

Dr. Alexis Rodríguez-Acosta. Apartado 47423, Caracas 1041, Venezuela. Correo electrónico: rodriguf@ucv.ve