ENSAYO INMUNOCROMATOGRÁFICO PARA DETECTAR VENENO DE ESCORPIÓN EN SANGRE. PARAMETROS QUE AFECTAN SU LÍMITE DE DETECCIÓN

SEUDÓNIMO: SCORPION

RESUMEN

El escorpionismo por *Tityus* en Venezuela es un problema de salud público que puede causar envenenamientos letales, especialmente en niños y ancianos. Las manifestaciones clínicas pueden ser locales que progresan o no a manifestaciones sistémicas graves. El clínico aplica el antídoto luego de observar los síntomas, ya que no cuenta con una herramienta que le permita saber si la víctima recibió veneno. Se determinaron los factores que influyen en el límite de detección de un ensayo inmunocromatográfico no competitivo tipo sándwich, para detectar veneno del escorpión *Tityus discrepans* (*Td*) en sangre. El tipo de anticuerpos, la conjugación de estos al oro coloidal, el pH óptimo de conjugación, la calidad y cantidad del anticuerpo de captura y las condiciones de inmovilización sobre la membrana de nitrocelulosa fueron factores determinantes para el éxito del ensayo. Los dispositivos de la prueba se diseñaron empleando IgG, IgY y $F(ab')_2$ neutralizantes del veneno. La tira diseñada con IgG de conejos fue la más sensible. Se demostró que un rango de pH entre 8,35 y 9,35 es el óptimo para conjugar 125 mL de oro coloidal de 40 nm con 0,5 µg de IgG de conejos anti-*Td*. Otros factores decisivos para el desarrollo de la prueba de diagnóstico fueron además el uso de una membrana de nitrocelulosa con flujo capilar de 180± 60 sec/4 cm, una concentración de 2 mg/mL del anticuerpo detector, con un volumen de aplicación de 2 µg/cm sobre la membrana. Se obtuvo un límite de detección visual ≥ 5 ng/mL de veneno en suero sanguíneo a los 20 minutos de aplicación de la muestra sobre la tira. Esta prueba es una herramienta nueva que facilitará el diagnóstico rápido del escorpionismo, en regiones de morbi-mortalidad por diferentes especies del género *Tityus*, tanto en Venezuela como en otros países del continente Americano.

Palabras clave: Accidente escorpiónico, *Tityus discrepans*, oro coloidal, ensayos inmunocromatográficos.

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY TO DETECT SCORPION VENOM IN BLOOD. PARAMETERS AFFECTING THE DETECTION LIMIT

SUMMARY

The scorpion´s envenoming by *Tityus* in Venezuela is a public health problem that can cause lethal poisoning, especially in children and elderly. Clinical manifestations of scorpion's accident may be local, and can progress or not to severe systemic manifestations. The clinician applies the antidote after observing the symptoms, due to the lack of a simple tool to let them know if the victim was poisoned. Factors influencing the detection limit of a type sandwich non-competitive immunochromatographic assay to detect scorpion venom from *Tityus discrepans* in blood were determined. The type of antibody, conjugation of these to colloidal gold, optimum pH of conjugation, quality and quantity of the capture antibody, and conditions of immobilization on the nitrocellulose membrane were the determining factors for the success of the assay. The test devices were designed using IgG, IgY and $F(ab')_2$ poison neutralizers. The strip designed using rabbit IgG was the most sensitive. Results showed that a pH range between 8.35 and 9.35 was optimum for conjugating 125 mL of 40 nm colloidal gold with 0.5 mg of IgG anti-*Td* rabbits. Other decisive factors for the development of the diagnostic test were the use of a nitrocellulose membrane with capillary flow of 180 ± 60 sec/4 cm, a concentration of 2 mg/mL of detector antibody, with an application volume of 2 mg/cm on the membrane. Visual detection limit ≥ 5 ng/mL of venom in blood serum were obtained at 20 minutes post sample application on the strip. This test is a new tool that will facilitate the rapid diagnosis of scorpionism in regions of morbidity and mortality by different species of *Tityus*, both in Venezuela and in other countries of the American continent.

Key words: scorpionism, *Tityus discrepans*, colloidal gold, immunochromatographic assay.

INTRODUCCIÓN

Los ensayos inmunocromatográficos son pruebas diagnósticas que permiten detectar rápidamente la presencia o ausencia de un analito e inclusive estimar su concentración (Xiulan y col., 2005; Zhang y col., 2012). Al colocar una muestra con la sustancia a detectar sobre la tira inmunocromatográfica (Figura 1), los anticuerpos conjugados al oro coloidal interactúan específicamente con el analíto, el flujo de los componentes del ensayo forman inmunocomplejos coloreados con anticuerpos no marcados inmovilizados sobre la membrana de nitrocelulosa, que finalmente se acumulan en la línea "test" y en la línea "control" permitiendo interpretar el resultado a simple vista (Horton y col., 1991; Zhang y col., 2002).

En el presente trabajo investigamos la detección de veneno de escorpión del género *Tityus*, que se caracteriza por tener al menos 205 componentes proteicos (Batista y col., 2006). El género *Tityus* es el que agrupa a todas las especies de alacranes venenosos a los humanos desde Panamá hasta Argentina incluyendo algunas islas de Caribe. Sus venenos son exquisitamente neurotóxicos pero además inducen una reacción inflamatoria generalizada (D'Suze y col., 2003; 2011; 2015). La sintomatología del escorpionismo se inicia con dolor local, que puede progresar o no a manifestaciones sistémicas como dolor abdominal, vómitos, sialorrea, broncorrea, bradicardia sinusal, miosis, piloerección, palidez mucocutánea, hipertensión, taquicardia sinusal, arritmias cardíacas, compromiso pulmonar grave y shock cardiogénico (Mazzei de Dávila y col., 2002). La severidad depende de la cantidad de veneno inoculada, de la especie involucrada y la condición corporal de la víctima. En los casos graves**,** las complicaciones desarrolladas por el escorpionismo moderado o severo en Venezuela son: pancreatitis, miocarditis, edema pulmonar agudo o daño agudo del pulmón y su desenlace final el síndrome de dificultad respiratoria, la complicación más severa, letal y prácticamente incurable aun aplicando la antivenina (D'Suze y col., 2013). La mayoría de los pacientes se recuperan después de recibir tratamiento con el antídoto antiescorpíonico comercial venezolano, simultáneamente con el control de los síntomas específicos (Mazzei de Dávila, 2011). Sin embargo dada la existencia de emponzoñamientos blancos o secos, es decir, sin la inoculación de veneno, se prefiere esperar hasta la aparición de los síntomas de envenenamiento para administrar la antivenina. Los casos fatales ocurren generalmente cuando la antivenina es inyectada demasiado tarde, y la cascada de

complicaciones y eventos secundarios al escorpionismo ya no dependen del veneno ni de su neutralización. La detección a tiempo de la presencia de veneno en sangre permite establecer si el paciente recibió o no veneno y proceder a aplicar la antivenina lo antes posible. Expertos en el área han reiterado la importancia de la administración precoz del antiveneno, idealmente durante la primera hora después del emponzoñamiento (Sevcik y col., 2004; Sevcik y D'Suze, 2011).

Las numerosas especies de escorpiones que pertenecen al género *Tityus* tienen venenos similares tanto en potencia como en inmunidad cruzada (D'Suze y col., 2007; 2011). La toxicidad de sus venenos sumado a la co-distribución con los humanos ha generado la mayoría de los casos graves y letales de emponzoñamiento escorpiónico. A pesar de que en Venezuela existe un alto subregistro del escorpionismo, los datos que se conocen indican que entre 1998 y 2009 hubo 19663 casos, siendo la región Centro-Norte del país la de mayor incidencia. Esto representa un serio problema de salud pública (Mazzei de Dávila y col., 2011) no solo en Venezuela sino en muchos países de la región, por lo cual el desarrollo de una prueba rápida y sensible para detectar veneno de escorpión del género *Tityus* en sangre será de gran utilidad para la población expuesta a estos escorpiones desde Panamá hasta Argentina.

Tanto los anticuerpos, principales componentes de las pruebas rápidas, como las condiciones en que ocurre la interacción antígeno-anticuerpo definen las características analíticas del ensayo inmunocromatográfico. La prueba de diagnóstico debe tener un porcentaje alto de sensibilidad y especificidad lo cual depende del control y elección óptima del tipo de anticuerpos, su conjugación al oro coloidal, el pH, la calidad y cantidad del anticuerpo de captura y las condiciones de inmovilización sobre la membrana de nitrocelulosa (Posthuma-Trumpie, 2009). Sin embargo, las investigaciones que se basan en el desarrollo experimental de ensayos inmunocromatográficos se centran en los resultados, más que en establecer los parámetros óptimos del desarrollo del inmunoensayo. El objetivo de este estudio fue caracterizar el efecto de: el pH de la conjugación, la síntesis de conjugados, el tamaño de las partículas de oro coloidal, la fuente biológica de los anticuerpos, las características de las membranas de nitrocelulosa y la cantidad de anticuerpos inmovilizados en la membrana, sobre la sensibilidad de un ensayo inmunocromatográfico tipo sándwich para detectar veneno de escorpión del género *Tityus*.

Una prueba de diagnóstico rápido de alta sensibilidad permitirá reducir el nivel de incertidumbre del clínico en la toma de decisión terapéutica de aplicar o no la antivenina en el menor tiempo posible. Esto es vital en los casos de escorpionismo en niños, los más afectados y que no pueden referir la picadura debido a su corta edad. Por otra parte, los síntomas de escorpionismo son tan variados que se pueden confundir los síntomas y retardar la colocación de la antivenina, al contar con la tira de diagnóstico rápido en la emergencia de lugares endémicos de escorpionismo, se podría otorgar un tratamiento oportuno y efectivo. Finalmente, no se cuenta con suficientes dosis de antiveneno en el país, contar con una tira de diagnóstico rápido permitirá el uso del antiveneno solamente para los casos donde se demostró la presencia de veneno en sangre.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención del veneno de Tityus discrepans y de los anticuerpos específicos.

El veneno de *Tityus discrepans* fue obtenido de acuerdo al método descrito por D'Suze y colaboradores (2003). Los anticuerpos específicos contra el veneno de *T. discrepans* fueron producidos en conejos y gallinas: ocho conejos fueron inmunizados durante 90 días, con 500 µL de veneno de *T. discrepans* (0,2 µg/mL en PBS pH: 7) emulsionado con 500 µL de adyuvante completo de Freud's (Sigma®) inyectado a nivel de las caderas. Se aplicaron 8 refuerzos con concentraciones crecientes de veneno (0,3, 0,4, 0,5, 0,6 µg/mL en PBS pH: 7) emulsionado 1:1 con adyuvante incompleto de Freud's (Sigma®). Los conejos se sacrificaron, la sangre se dejó coagular y se centrifugó a 8000*g* a 15 °C por 15 min, el suero obtenido se almacenó a -80 °C. Las gallinas fueron inmunizadas durante 30 días con 500 µL de solución de veneno (0,3 µg/mL en PBS pH: 7) emulsionado con 500 µL de adyuvante completo de Freud's; se aplicaron tres refuerzos con igual concentración de veneno emulsionado 1:1 con adyuvante incompleto de Freud's. Los IgY totales fueron obtenidos según el protocolo descrito por Polson y colaboradores (1985).

2. Purificación anticuerpos específicos anti-Td.

Las IgG anti-*Td* fueron purificadas a partir del suero de conejos mediante cromatografía de afinidad en una columna activada con CNBr Sepharose 4B®, a la que se acopló 10 mg de veneno de *T. discrepans*. El suero se diluyó 1:1 en 50 mM Tris/HCl pH 8,

y se aplicó a la columna. Se lavó extensivamente la columna y luego los anticuerpos específicos anti-*Td* pegados a la columna se eluyeron con ácido acético 0,1 M e hidróxido de sodio 50 mM.

Los fragmentos $F(ab')_2$ específicos anti-*Td* se obtuvieron a partir de la antivenina escorpiónica comercial (Biotecfar, CA). Esta se diluyó 1:1 en 50 mM Tris/HCl pH 8, y se aplicó a una columna de afinidad con veneno de *T. discrepans* acoplado a ella, los $F(ab')_2$ específicos anti-*Td* se purificaron siguiendo la metodología descrita arriba.

En la purificación de las IgY anti-*Td* se siguió la misma metodología pero se usó tampón fosfatos (NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 0,2 M) para lavar la columna. En todos los casos se recolectaron en tubos que contenían 500 µL de Tris/HCl 1 M, pH 8.

3. Producción de oro coloidal.

El oro coloidal de 20 y 40 nm fue producido siguiendo el protocolo de Yokota (2010). Para ello se calentaron 249,75 y 247,25 mL de agua, en ambos casos en un balón de un litro bajo constante y vigorosa agitación sobre un manto asfáltico, hasta alcanzar 96 °C, se agregó 0,25 mL de $HAuCl_4$ al 4%. Se adicionaron 2,5 mL y y 3,06 mL de citrato de sodio al 1% bajo agitación constante para formar partículas de 20 nm y 40 nm. La reducción de los iones áuricos a óxido de oro se inició cuando la solución cambió de color amarillo a azul oscuro, luego a purpura y finalmente a rojo. Estas suspensiones se dejaron hervir por 5 min para completar la reducción y en reposo hasta alcanzar temperatura ambiente. La máxima absorbancia de la suspensión de oro coloidal fue determinada espectrofotométricamente (espectrómetro UV/VIS Génesis 6) entre 400 y 700 nm. Los coloides elaborados fueron almacenados a 4°C hasta su uso.

4. La conjugación de los anticuerpos y el oro coloidal.

4.1 Selección del pH óptimo

Se determinó el pH óptimo para cada tipo de anticuerpo, para ello en una placa de poliestireno (Nunc Immuno Maxisorp C96, THERMO NUNC) de 96 pocillos se colocó en cada pozo 125 µL de oro coloidal de 20 ó 40 nm y se ajustaron a un gradiente de pH entre 6,35 y 10,35 con K_2CO_3 (0,2 M). Luego, se añadió 3 mg de cada anticuerpo/pozo, se agitó suavemente y se dejó en reposo por 20 min, se añadió 12,5 µL de NaCl al 10%, se agitó y se

midió absorbancia a 540 nm. Los controles no recibieron anticuerpos ni la solución floculante (NaCl al 10%). Las muestras se procesaron por triplicado.

4.2 Prueba de floculación de sal

Una vez seleccionado el pH óptimo de conjugación del coloide, se procedió a determinar la menor cantidad de IgG de conejos, IgY de gallinas y $F(ab')_2$ anti-*Td* necesaria para proteger la solución de oro coloidal de la floculación en presencia de NaCl. Este valor representó la cantidad optima de anticuerpo requerido para formar conjugados estables y se obtuvo siguiendo el protocolo de Yokota, (2010), con algunas modificaciones. En una placa de poliestireno (Nunc Immuno Maxisorp C96, THERMO NUNC) de 96 pocillos, se añadieron anticuerpos a concentraciones entre 0 y 10 µg/pozo disueltos en tampón boratos pH 8,5. Se añadió 125 µL/pozo de oro coloidal (20 ó 40 nm) ajustado a pH óptimo con K_2CO_3 (0,2 M) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Luego, se agregó 12,5 µL/pozo de NaCl (10%) se agitó durante 15 segundos y se midió la absorbancia a 540 y 620 nm en un lector de placas de ELISA (Multiskan, modelo 351 Thermo Labsystems).

4.3 Conjugación oro-anticuerpo

Una vez conocida la cantidad mínima de anticuerpos para estabilizar al oro coloidal, se realizó el protocolo de conjugación según Tanaca y colaboradores (2006). En breve, se transfiere 2 mL de la solución de oro coloidal de 20 ó 40 nm, se ajusta a pH óptimo para cada anticuerpo con K_2CO_3 (0,2 M) y se añade la cantidad de anticuerpo óptimo según el test de floculación, descrito arriba. La mezcla se lleva a 25°C por 15 minutos en agitación constante. Se bloquea la superficie de las partículas de oro coloidal que no se conjugaron a los anticuerpos con 100 µL de PEG (PM 20.000) al 1% disuelto en KH_2PO_4 pH 7,5 y 200 µL de albumina de suero bovino (BSA) al 10% en KH_2PO_4 (50 mM), pH 9,0.

Luego de la inmovilización y el bloqueo, la solución se centrifugó a 10.000*g* por 1 hora a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue cuidadosamente extraído y el precipitado se resuspendió en 300 µL de tampón Tris-base (20 mM), BSA (1%) y azida de sodio (0,02%), pH 8,2 y se centrifugó de nuevo a 10.000*g* por 30 min a 4°C. El precipitado fue finalmente resuspendido en 50 µL de tampón Tris-base (20 mM), BSA (10%), sacarosa (20%), trehalosa (5%) y azida de sodio (0,02%) ajustado a pH: 8,2.

5. Preparación de las muestras

Se prepararon muestras de plasma sanguíneo con veneno de *T. discrepans* a concentraciones crecientes (0, 5, 12,5, 25 y 50 ng/mL). Las concentraciones fueron verificadas mediante un test de ELISA para detectar veneno de escorpión descrito por D'Suze y colaboradores (2003).

6. Elaboración de las tiras inmunocromatográficas

Se elaboraron 3 tiras inmucromatográficas basadas en formatos no competitivos utilizando IgG anti-*Td*, IgY anti-*Td* o $F(ab')_2$ anti-*Td* como reactivo detector y reactivo de captura respectivamente. Las concentraciones de los anticuerpos de captura IgY-anti-*Td* y $F(ab')_2$ anti-*Td* fueron de 1 mg/mL, mientras que las de IgG fueron de 1,0 y 2 mg/mL, todos fueron diluidos en NaH_2PO_4 (0,25 M) y NaCl (0,25 M) a pH: 7,6 y aplicados sobre la membrana de nitrocelulosa de 3x25 cm HF-120, HF 180 y HF 240 (Millipore, Corp) a razón de 1 y 2 µL/cm utilizando el atomizador y dispensador Bio Dot (ZY 1000 Irvine, CA). Se inmovilizaron en la línea control IgG anti-conejo, anti-gallina o anti-caballo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) según cada diseño, a concentraciones de 1 mg/mL y volumen de aplicación de 1 µL/cm. Cada membrana fue secada a 37°C por 12 horas y posteriormente bloqueada con una mezcla de leche descremada (0,2%), Albumina bovina (0,5%), Na_2CO_3 (0,1%), $NaHCO_3$ (0,01%), KCl (0,08%), colato de sodio (0,02%), sacarosa (0,32%) y PBS (10 mM). Las membranas bloqueadas se secaron durante 30 min a 37°C y ensamblada sobre la lámina adherente (MIBA-010-DCN, diagnostics) junto con el papel adsorbente, con 2 mm de superposición. El conjugado anticuerpo-oro coloidal se transfirió a la fibra de vidrio (GFCP03000, Millipore) de 10x30 mm mediante el atomizador y dispensador Bio Dot (ZY 1000), se incubó a 37 °C durante 1 hora y se fijó sobre la lámina adherente con solapamiento de 2 mm sobre la membrana de nitrocelulosa. Finalmente, la fibra de celulosa (CFSP173000, Millipore) pre-tratada con Tris- base (20 mM), albumina de suero bovino (1%) y azida de sodio (0,02%) a pH: 8,2. Se colocó en la lámina adherente con 2 mm de solapamiento sobre la fibra del conjugado.

Resultados y discusión

1. *Selección del pH óptimo de conjugación.*

La influencia del pH de conjugación se estudió utilizando oro coloidal de 20 y 40 nm y anticuerpos contra el veneno de *T. discrepans* evocados en conejos, gallinas y caballos. La conjugación se realizó a nueve valores de pH en un rango comprendido entre (6,35 y 10,35). Las Figuras 2 y 3 muestran los cambios en la absorbancia a 540 nm en el grupo control a diferentes valores de pH, que pueden ser atribuidos al grado de acidez de la suspensión coloidal. Cuando los anticuerpos y el NaCl (1%) son añadidos, la suspensión acuosa de oro coloidal conjugado a IgG, IgY o $F(ab')_2$ anti-*Td* mantiene su color rojo, indicando que la conjugación tuvo lugar. La absorbancia de cada conjugado es diferente para cada valor de pH, tamaño del oro coloidal y tipo de anticuerpo utilizado. Los valores de pH donde no hay diferencia significativa entre las absorbancias obtenidas en ausencia y en presencia del anticuerpo, representan el rango de pH óptimo requerido para formar el conjugado oro-anticuerpo estable. El rango de pH adecuado para conjugar anticuerpos IgG anti-*Td* oscila entre 8,85 y 10,35 cuando se utiliza oro coloidal de 20 nm y entre 8,35 y 9,35 cuando el oro coloidal es de 40 nm. En el caso de las IgY anti-*Td* el pH óptimo para oro coloidal de 20 y 40 nm oscila entre 6,85-7,85 y 7,35-835 respectivamente. Para conjugar $F(ab')_2$ anti-*Td* a oro coloidal de 20 nm se encontró que el rango óptimo de pH óptimo es entre 6,35 y 6,85; con 40 nm no se logró establecer un rango de pH óptimo. La conjugación de los anticuerpos a diferentes valores de pH permitió conocer el rango de pH más adecuado para la interacción entre el anticuerpo y el oro coloidal.

Para que el anticuerpo esté en una condición energéticamente favorable para la adsorción con el oro coloidal, la conjugación debe realizarse a un pH que sea 0,5 unidades por encima del pI (punto isoeléctrico) de la proteína a conjugar (Geoghegan y Ackerman, 1977). Esta condición disminuye la interacción de cargas, la agregación y favorece la interacción hidrofóbica entre el oro y el anticuerpo. Según Nicolotti y colaboradores (1980), las IgG se caracterizan por tener un pI ≈ 7,3, las IgY de ≈ 7,0 (Cheung y col., 2003), mientras que el pI del $F(ab')_2$ es de ≈ 6,2 (Coleman y Mahel, 2003). En este trabajo se demostró que por encima del pI hay un rango de pH óptimo para lograr una conjugación estable, que varía con la naturaleza del anticuerpo y del tamaño de las partículas del coloide.

2. Test de floculación.

Independientemente del tamaño de la partícula de oro utilizada en los test de floculación, la diferencia de absorción (540-600 mn) de la solución acuosa de oro coloidal se incrementa a concentraciones crecientes de anticuerpos, hasta un máximo a partir del cual se hace independiente de la cantidad de anticuerpo añadido, indicando que las partículas de oro se saturaron. La cantidad inicial de anticuerpo capaz de saturar a las partículas de oro coloidal, es la concentración mínima requerida para conjugar al oro coloidal de manera estable (Geoghegan y Ackerman, 1977; Paek y col., 2000). La Tabla 1 muestra que la mínima cantidad de IgG anti-*Td* necesaria para conjugarse a 125 µL de oro coloidal de 20 ó de 40 nm es 2 y 0,5 µg respectivamente, 1 y 2 µg en el caso de IgY y para el $F(ab')_2$ *anti-Td* la mínima cantidad es de 1 y 0,5 µg para el oro coloidal de 20 ó de 40 nm respectivamente. Estos valores representan la concentración óptima de cada anticuerpo requerido para conjugarse a las partículas de oro coloidal.

Uno de los factores que afecta el límite de detección de los ensayos inmunocromatográficos es la conjugación de los anticuerpos al oro coloidal, durante este proceso los anticuerpos quedan inmovilizados en la superficie de las partículas de oro. Los conjugados formados con concentraciones de anticuerpos por debajo del punto óptimo son inestables y tienden a agregarse, afectando el límite de detección. Mientras que, el uso de concentraciones de anticuerpos por encima del punto óptimo de estabilidad induce a un exceso de anticuerpos sobre la superficie del coloide y afecta la interacción entre el conjugado y el antígeno por un impedimento estérico (Safencova y col., 2012). Prevenir la formación de agregados durante la reacción de conjugación es indispensable, ya que estos reducen la actividad inmunológica y afectan la sensibilidad de la prueba. Los agregados además, pueden obstaculizar el desempeño de los ensayos de flujo lateral, ya que las partículas grandes no son capaces de fluir a través de la membrana de nitrocelulosa y conduce a la obtención de resultados inexactos. De ahí la importancia de realizar, titulaciones previas determinando la cantidad mínima de anticuerpos para unirse establemente a las partículas de oro coloidal.

El pH óptimo de conjugación, cantidad del anticuerpo así como el tamaño de las partículas de oro coloidal son factores que afectan el límite de detección del ensayo

inmunocromatográfico por lo que deben ser cuidadosamente controlados para cada tipo de anticuerpo a utilizar.

3. Actividad de los ensayos inmunocromatográficos

Tres ensayos para detectar veneno de escorpión del género *Tityus* basados en un formato no competitivo fueron diseñados utilizando IgG de conejos, IgY de gallinas y $F(ab')_2$ de caballos como reactivo detector y de captura respectivamente. De cada ensayo se utilizaron dos tiras, a una se le añadió 100 µL de plasma sanguíneo sin veneno (0 ng/mL) a la otra 100 µL plasma con veneno (50 ng/mL), posteriormente a cada tira se le adicionó 100 µL de NaCl al 2%, se utilizaron tres replicas. La Figura 4 muestra que solo la tira que contiene IgG de conejos puede detectar 50 ng/mL de veneno. La tira basada en IgY de gallinas mostró una débil detección de veneno pero con uniones inespecíficas en el control, lo que la hace inadecuada, mientras que el ensayo basado en $F(ab')_2$ de caballo no detectó veneno. Los anticuerpos de conejos han sido empleados por otros autores en la elaboración de ensayos inmunocromatográficos (Gasparyan, 2005; Rudolf y col., 2009). Su uso es favorable ya que no pierden actividad cuando son sometidos a cambios bruscos de pH durante el proceso de purificación y a pesar de ser anticuerpos policlonales, se conjugan bien con el oro coloidal y se mantienen activos cuando se inmovilizan sobre la membrana (Rudolf y col., 2009). Los ensayos inmunocromatográficos basados en IgY de gallinas anti-*Td* mostraron muy baja sensibilidad para detectar veneno de escorpión, lo cual podría atribuirse a que en este tipo de inmunoensayo el complejo antígeno-anticuerpo debe formarse simultáneamente con el flujo de los componentes a través de la membrana de nitrocelulosa, esto ocurre en un tiempo muy corto; quizás las IgYs requieran más tiempo para la formación del complejo antígeno-anticuerpo. No se puede descartar la posibilidad de que durante el proceso de purificación de las IgY se haya alterado la estabilidad del anticuerpo, o que se requieran de otros sistemas tampón que mejoren la interacción antígeno-anticuerpo. Sevcik y colaboradores en el 2008 detectaron la presencia de IgG anti-IgY en preparados de IgG humanas, de aquí que otro factor que pudiera interferir es la posibilidad de que el plasma sanguíneo humano utilizado en los ensayos contenga IgG anti-IgY formando inmunocomplejos y haciendo menos eficiente el ensayo.

Un componente relevante de un ensayo inmunocromatográfico es la membrana de nitrocelulosa, sobre ella ocurre la unión entre el reactivo detector y el antígeno de interés y

su unión posterior a los anticuerpos de captura. Por otra parte, la tasa de flujo capilar de la membrana es otro de los parámetros críticos para un buen ensayo. En este estudio se utilizaron las membranas Hiflow plus Millipore HF120, HF180 y HF240 las cuales se diferencian en la rapidez en que los componentes líquidos del sistema fluyen a través de ella. Los resultados mostrados en la Figura 5 señalan que las membranas Hiflow plus Millipore HF180 y HF240 son las más sensibles para detectar el veneno de *T. discrepans*, con las cuales se detectó veneno en el orden de 5 ng/mL. Para los siguientes ensayos se escogió la membrana Hiflow plus Millipore HF180 por su excelente sensibilidad de detección, además presentó menos uniones inespecíficas y mayor flujo que la HF240.

La Figura 6 muestra que al aumentar simultáneamente la concentración de anticuerpo de captura a 2 mg/mL y el volumen de aplicación sobre la membrana a 2 μL/cm se mejoró la resolución del ensayo. Aunque la línea de prueba formada se visualiza mejor al emplear partículas de oro coloidal de 20 nm, su línea control muestra uniones inespecíficas, las cuales disminuyen al utilizar oro coloidal de 40 nm. El tamaño de la partícula coloidal influye en las propiedades ópticas del marcador (Liu, 2007) así como en los conjugados con anticuerpos, en consecuencia, afectan la afinidad (Oda y col., 2009; Safenkova y col., 2010) y la cinética de unión al antígeno (Adamezyk y col., 1999; Safenkova y col., 2010). Todos estos factores afectan el límite de detección del ensayo inmunocromatográfico. Los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales seleccionadas en éste trabajo, demostraron que tanto las nanopartículas de oro de 20 nm como las de 40 nm pueden ser empleadas con éxito como reactivos detectores, logrando determinar hasta 5 ng/mL de veneno de escorpión en plasma sanguíneo.

Conclusiones

Un ensayo inmunocromatográfico competente puede ser desarrollado al optimizar los factores claves que influyen en su límite de detección. Varios parámetros y su efecto fueron considerados en este estudio, para desarrollar una tira diagnóstica capaz de detectar veneno de escorpión del género *Tityus* en sangre. Una disminución del límite de detección visual desde 50 ng/mL a 5 ng/mL fue obtenida al optimizar la fuente de anticuerpos, el pH de conjugación, la síntesis de conjugados, el tamaño de las partículas de oro coloidal, las

características de la membrana de nitrocelulosa, así como la cantidad y el volumen de aplicación del anticuerpo de captura sobre la membrana.

El ensayo inmunocromatográfico donde se emplearon anticuerpos IgG de conejos anti-*Td* reunió las condiciones requeridas de sensibilidad para detectar bajas concentraciones de veneno en plasma sanguíneo. La disponibilidad de esta prueba será una herramienta útil para detectar la presencia del veneno en pacientes víctimas de escorpinismo y su aplicación permitirá al médico decidir si coloca o no la antivenina, tratamiento que es más efectivo al efectuarlo dentro de la primera hora luego del accidente escorpiónico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamczyk M, Mattingly PG, Shreder K, Yu Z. Surface plasmon resonance (SPR) as a tool for antibody conjugate analysis. Bioconjug Chem 1999; 10: 1032-1037.

Batista CVF, D'Suze G, Gómez-Lagunas F, Zamudio FZ, Sevcik C, Possani LD. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. Proteomics 2006; 6: 3718-3727.

Cheung GLM, Thomas TM, Rylatt DB. Purification of antibody Fab and $F(ab')_2$ fragments using Gradiflow technology. Protein Expression and Purification 2003; 32: 135–140.

Coleman L, Mahler SM. Purification of Fab fragments from a monoclonal antibody papain digest by Gradiflow electrophoresis. Protein Expr Purif 2003; 32: 246-251.

D'Suze G, Moncada S, González, C. Sevcik C, Aguilar V, Alagón A. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumor necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. Toxicon 2003; 41: 367-375.

D'Suze G, Moncada S, González C, Sevcik C, Alagón A. Antigenic cross-reactivity between sixteen venoms from scorpions belonging to six genera. Clinical Toxicology 2007; 45: 158-163.

D'Suze G, Sevcik C, Brazón J. Fisiopatología inducida por el veneno de alacranes del género *Tityus* de Venezuela. En: D 'Suze G, Corzo G, Paniagua J, editors. Emergencias por animales ponzoñosos en las Américas. México: Documaster, SA; 2011. p. 31-64.

D'Suze G, Castillo C, Sevcik C, Brazón J, Malave C, Hernández D, Zerpa N. Scorpionism and dangerous scorpion species in Venezuela. En: Eds Springer. Handbook of Toxicology 2013. p 1-27.

.

Gasparyan VK. Hen egg immunoglobulin Y in colloidal gold agglutination assay: comparison with rabbit immunoglobulin G. J Clin Lab Anal 2005; 219:124-127.

Geoghegan WD, Ackerman GA. Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. J Histochem Cytochem 1977; 25: 1187-1200.

Horton JK, Swinburne S, O'Sullivan MJ. A novel, rapid, single-step immunochromatographic procedure for the detection of mouse immunoglobulin. J Immunol methods 1991; 140: 131-134.

Liu L, Peng C, Jin Z, Xu C. Development and evaluation of a rapid lateral flow immunochromatographic strip assay for screening 19-nortestosterone. Biomed Chromatogr. 2007; 1: 861-866.

Mazzei de Dávila, CA, Dávila D, Donis J, Arata de Bellabarba G, Villarreal V, Barbosa J. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestation of scorpion envenomation. Toxicon. 2002; 4: 1339-1346.

Mazzei de Dávila CA, Dávila-Spinetti DF, Ramoni-Perazi P, Donis JH, Santiago JV, Villarroel V, Arata de Bellarba, G. En: D'Suze G, Corzo G, Paniagua J, editors. Epidemiología, clínica y terapéutica del accidente escorpiónico, México: Documaster, SA; 2011. P. 115-146.

Nicolotti RA, Briles DE, Schroer JA, Davie JM. Isoelectric focusing of immunoglobulins: improved methodology. J Immunol Methods 1980; 33:101-115.

Oda M, Uchiyama S, Noda M, Nishi Y, Koga M, Mayanagi K. et al. Effects of antibody affinity and antigen valence on molecular forms of immune complexes. Mol Immunol 2009; 47: 357-364.

Paek SH, Lee SH, Cho JH, Kim YS. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. Methods 2000; 22: 53-60.

Polson A, Coetzer T, Kruger J, Von Maltzahn E, Van Merwe, KJ. Improvements in the isolation of IgY from the eggs laid by immunized hens. J. Immunol Invest 1985; 14: 323-327.

Posthuma-Trumpie GA, Korf J, Van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. Anal Bioanal 2009; 393 569-582.

Rudolf J, Fuhrer M, Ansari P, Hasnhindl C, Baumgartner S. Differences in usability of rabbit IgG and chicken IgY after clean-up and impact on gold labelling properties. J. Immunol. Methods 2009; 350: 79-88.

Safenkova IV, Zherdev AV, Dzantiev BB. Correlation between the composition of multivalent antibody conjugates with colloidal gold nanoparticles and their affinity. J Immunol Methods 2010; 357: 17-25.

Sevcik C, D'Suze G, Díaz P, Salazar V, Hidalgo C, Azpurua H, Bracho N. Modelling *Tityus* scorpion venom and antivenom pharmacokinetics. Evidence of active immunoglobulin G's F $(ab')_2$ extrusion mechanism from blood to tissues. Toxicon 2004; 44: 731–741.

Sevcik C, Díaz P, D'Suze G. On the presence of antibodies against bovine, equine and poultry immunoglobulins in human IgG preparations, and its implications on antivenom production. Toxicon 2008; 51: 10-16.

Sevcik C, D'Suze G. Farmacocinética básica del tratamiento con antivenenos. En: D'Suze G, Corzo G, Paniagua J, editors. Emergencias por animales ponzoñosos en las Américas. México: Documaster, SA; 2011. p. 249-276.

Tanaca R, Yuhi T, Nagatani N, Endo T, Takamura Y, Tamiya E. A novel enhancement assay using gold nanoparticles. Anal Bioanal Chem. 2006; 386: 1413-1420.

Xiulan S, Xiaolian Z, Jian T, Zhou J, Chu F. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. Int J Food Microbiol 2005; 99:185–194.

Yokota S. 2010. Preparation of colloidal gold particles and conjugation to protein A, IgG, F $(ab')_2$, and streptavidin. Methods Mol Biol 2010; 657:109-19.

Zhang C, Zhang Z, Yu B, Shi J, Zhang X. Application of the biological conjugate between antibody and colloid Au nanoparticles as analyte to inductively coupled plasma mass spectrometry. Analytical Chemistry 2002; 74: 96-99.

Zhang D, Li P, Zhang Q, Li R, Zhang W, Ding X, Li CMA. A naked-eye based strategy for semiquantitative immunochromatographic assay. Anal Chim Acta 2012; 740: 74-9.

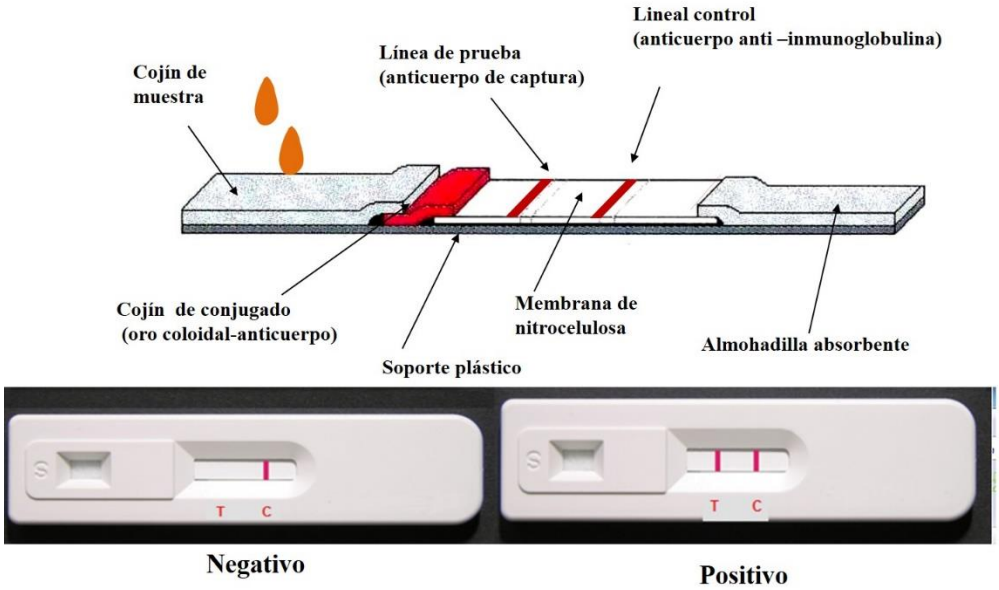

Figura 1 Vista esquemática y reactivos que componen el formato no competitivo de un ensayo inmunocromatográfico.

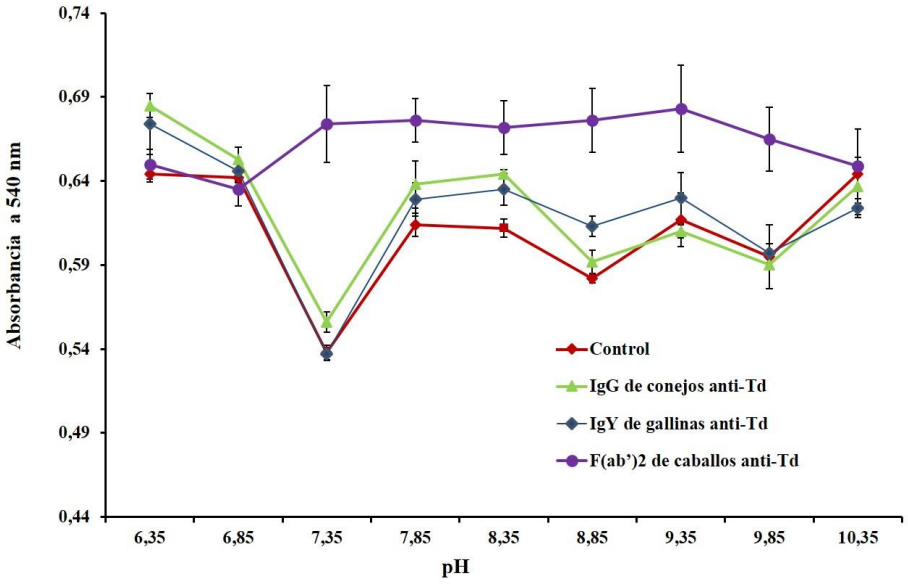

Figura 2. Efecto del pH sobre la estabilidad oro coloidal de 20 nm conjugados con IgG de conejos, IgY de gallinas y F(ab')$_2$ anti-*Td*

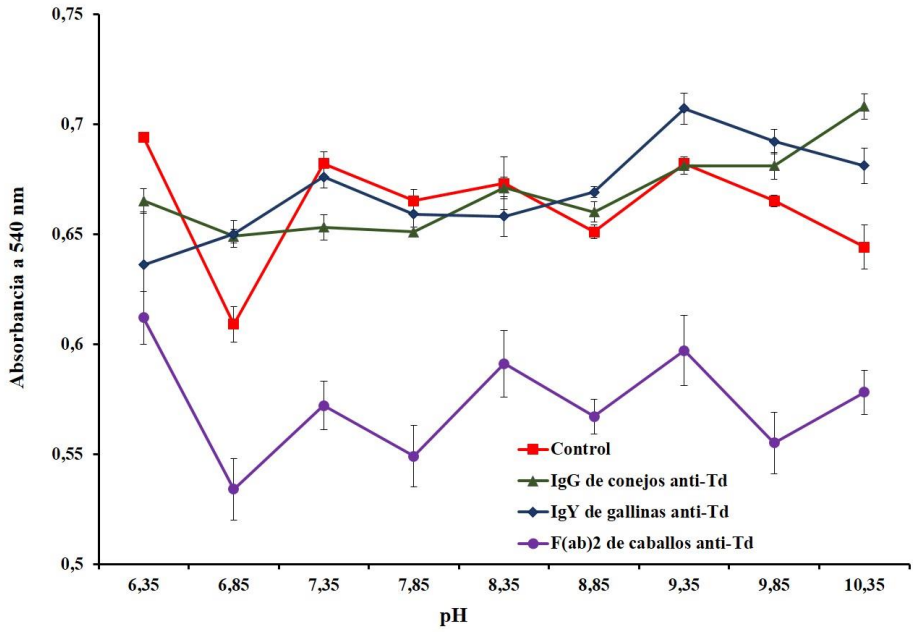

Figura 3. Efecto del pH sobre la estabilidad oro coloidal de 40 nm conjugados con IgG de conejos, IgY de gallinas y F(ab')$_2$ anti-*Td*

	IgG de conejos anti-*Td*	IgY de gallinas anti-*Td*	F(ab')$_2$ de caballos anti-*Td*
Oro coloidal 20 nm	2 µg	1 µg	1 µg
Oro coloidal 40 nm	0,5 µg	2 µg	0,5 µg

Tabla 1. Concentración de los IgG, IgY y F(ab')$_2$ conjugados a oro coloidal de 20 y 40 nm

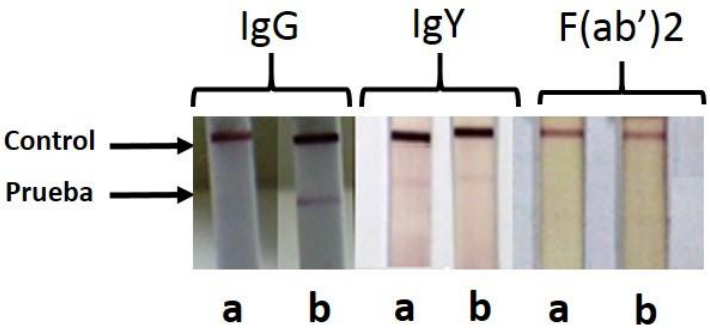

Figura 4. Efecto de la fuente biológica de los anticuerpos empleados en el rendimiento de un ensayo inmunocromatográfico para la detección de veneno de escorpión del género *Tityus*, empleando como antígeno veneno de *T. discrepans* a concentraciones de **a** 0 ng/mL y **b** 50 ng/mL. 1 mg/mL de cada anticuerpo fue inmovilizado sobre la membrana HF120 a razón de 1µL/cm.

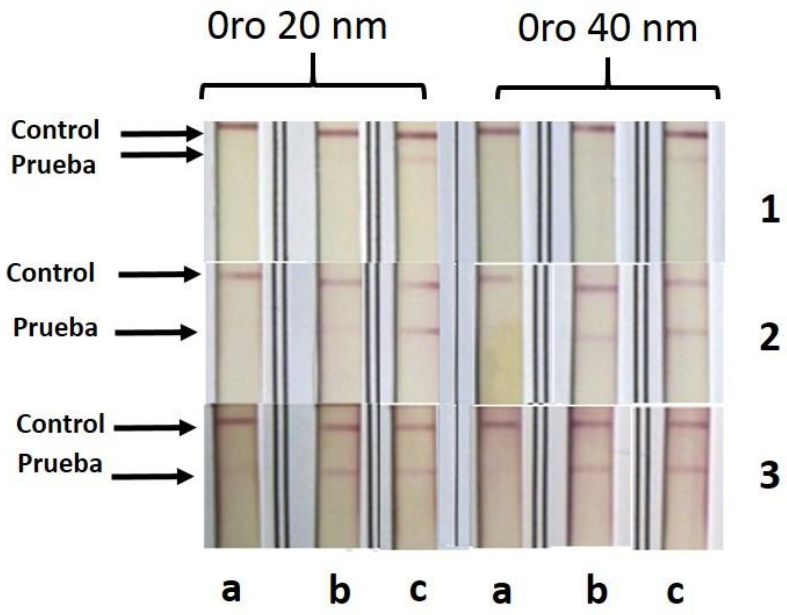

Figura 5. Efecto del diámetro de las partículas de oro coloidal y del flujo capilar de la membrana de nitrocelulosa en el rendimiento de un ensayo inmunocromatográfico para la detección de veneno de escorpión del género *Tityus*, empleando como antígeno veneno de *T. discrepans* a concentraciones de **a** 0 ng/mL, **b** 5 ng/mL, **c** 50 ng/mL. 1 mg/mL de IgG de conejos anti-*Td* fue inmovilizado sobre cada membrana (**1** HF120, **2** HF180 y **3** HF240) a razón de 1µL/cm.

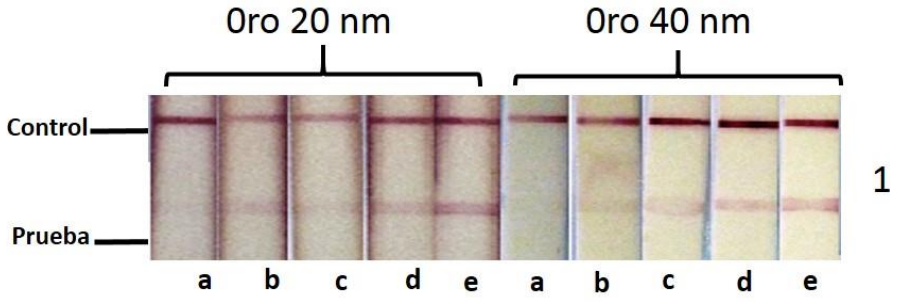

Figura 6. Efecto del diámetro del oro coloidal, la concentración (2 mg/mL) y el volumen de aplicación (2 µL/cm) de IgG de conejos anti-*Td* inmovilizado sobre la membrana **1** HF180, en el rendimiento de un ensayo inmunocromatográfico para la detección de veneno de escorpión del género *Tityus*, empleando como antígeno veneno de *T. discrepans* a concentraciones de **a** 0 ng/mL, **b** 5 ng/mL, **c** 12,5 ng/mL **d** 25 ng/mL y **e** 50 ng/mL.