

Desarrollo de la respuesta de anticuerpos anti-fosfolipasa A₂ en caballos inoculados con veneno para la producción de suero antiofídico polivalente en Costa Rica

Ricardo Estrada, José María Gutiérrez, Jorge Alvarado, Abel Robles, Claudio Avila y Nuria González
Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

(Rec. 3-I-1989. Acep. 17-IV-1989)

Abstract: The development of antibody response against phospholipase A₂ activity of *Bothrops asper* venom was studied in a group of adult and healthy horses used in the production of the polyvalent antivenom at the Instituto Clodomiro Picado. Simultaneously, the general condition of the animals during the immunization schedule was also studied. There was a great individual variability in the immune response, although most of the horses studied reached the highest neutralizing titer after injection of doses of venom of 30 mg and 50 mg. On the other hand, in horses that had been previously immunized and were injected for a second immunization, the highest antibody titer was observed 16-22 days after inoculation. There were only mild alterations in the general condition of the horses as a consequence of venom inoculation. However, local abscesses, fistules and fibrosis were observed at the site of venom injection. On the basis of the conspicuous individual variability observed, it is proposed that the immune response in horses used in the production of antivenom must be evaluated on individual basis, instead of working with pools of serum samples.

Key words: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, antibodies, antivenom, anti-phospholipase antiofídico, anti-fosfolipasa.

El suero antiofídico polivalente se produce en Costa Rica desde 1967 para el tratamiento de los envenenamientos por mordeduras de serpientes de la familia Viperidae (Bolaños & Cerdas 1980). La producción de este antiveneno se inicia con la inmunización de caballos, a los que se les inyecta dosis crecientes de una mezcla de los venenos de *Bothrops asper*, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus* mezclados con coadyuvantes (Bolaños & Cerdas 1980).

Existen muy pocos estudios sobre el desarrollo de la respuesta inmune en animales inoculados con venenos para la producción de sueros. Más aún, no conocemos investigaciones relacionadas con las alteraciones que producen en los caballos la inmunización con venenos de serpientes. Recientemente, Gutiérrez *et al.* (1988) describieron una técnica de hemólisis indirecta en placa para cuantificar el efecto fosfolipasa A₂ de los venenos de serpiente. Al estudiar estos autores la capacidad de los sueros antiofídicos para

neutralizar el efecto hemolítico indirecto y para neutralizar el efecto letal, observaron una excelente correlación entre la neutralización de estos dos tipos de actividad. Dada la simplicidad de esta técnica, el estudio del efecto neutralizante de los sueros sobre el efecto hemolítico indirecto podrá usarse como un parámetro para seguir el desarrollo de la respuesta inmune en caballos inoculados con venenos.

En el presente trabajo se investigó la respuesta de anticuerpos neutralizantes y las alteraciones en el estado general en un grupo de caballos utilizados en la producción del suero antiofídico polivalente en el Instituto Clodomiro Picado.

MATERIAL Y METODOS

Inmunización: Ocho caballos adultos (2 a 5 años) sanos, raza criolla, de ambos sexos, cuyo peso osciló entre 450 y 500 Kg, que nunca habían sido inoculados con venenos, se utilizaron en la primera parte del estudio. En dichos animales

CUADRO 1

Esquema de inmunización utilizado para la producción del suero antiofídico polivalente

Días	Miligramos de veneno*	Coadyuvante
0	0.5	Freund Completo
1	1	Alginato de sodio
20	1.5	Alginato de sodio
30	3	Alginato de sodio
40	5	Alginato de sodio
50	10	Alginato de sodio
60	15	Alginato de sodio
70	30	Freund Incompleto
90	30	Alginato de sodio
110	50**	Alginato de sodio

* Mezcla de partes iguales de los venenos de *B. asper*, *C. durisis* y *L. muta*.

** Si no se ha alcanzado el título deseado se repetirá esta dosis hasta alcanzarlo.

la condición general y parámetros clínicos de salud son excelentes. Previo a la inmunización, los caballos se dejaron en un período de adaptación de dos meses y se sometieron a un programa de control parasitario y de enfermedades infecto-transmisibles. Los caballos fueron además evaluados clínicamente en varias ocasiones antes de ingresar al programa de inmunización. La alimentación de estos animales consiste en pasto de corta picado (tipo "king grass"), heno y una mezcla de alimento balanceado en polvo reforzado con vitaminas y minerales en proporciones y calidades específicas para equinos. Siete de los caballos fueron inoculados con dosis crecientes de veneno, por vía subcutánea, en la porción dorsolateral de la región costal y abdominal, según el esquema de inmunización presentado en el Cuadro 1. El otro caballo fue inoculado con dosis crecientes desde 0.5 mg hasta 5.0 mg, al igual que los otros caballos. Sin embargo, a partir de la dosis de 5.0 mg, se le administraron 8 dosis más de 5.0 mg cada una, con un intervalo de 10 días entre dosis. Dada la similitud de los pesos de los caballos, la cantidad de veneno a inocular no se ajustó al peso.

También se estudió la elevación del título de anticuerpos en un grupo adicional de 6 caballos que habían sido previamente inmunizados y sangrados y que se dejaron 45 días en reposo. A estos caballos se les inoculó posteriormente una única dosis de 30 mg de la mezcla de venenos, en coadyuvante alginato de sodio. Con el fin de detenninar el día óptimo para la sangría, se tomaron muestras de 10 ml de sangre cada dos días durante 25 días y se estudió la elevación en el título de anticuerpos. En todos los casos, los animales fueron sangrados en horas de la mañana (8 a.m. a 10 a.m.).

Efecto neutralizante: Inmediatamente antes de cada inoculación de veneno, se sangró los caballos de la vena yugular, separándose luego el suero. Se estudió la neutralización del efecto hemolítico indirecto mediante la técnica de hemólisis radial en geles de agarosa descrita por Gutiérrez *et al.* (1988). Se efectuaron mezclas de suero y veneno, a un volumen final constante, con el fin de obtener varias razones suero/mg de veneno. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 30 min y luego se aplicó 15 µl de cada mezcla en los orificios del gel. Los geles se incubaron a 37°C durante 20 horas, midiéndose luego el diámetro de los halos de hemólisis. La Dosis Efectiva 50% se definió como la razón µl de suero/ mg de veneno en la que la actividad hemolítica se redujo en un 50%. Para fines de claridad en la representación gráfica de los resultados, la capacidad neutralizante se expresó como $1/DE_{50} \times 10^5$.

Alteraciones generales en los caballos: El estado general del caballo se catalogó en ténninos semicuantitativos, siguiendo una escala de 1, 2, 3, 4 y 5. El grado 1 corresponde a estados tenninales o comatosos, con complicaciones secundarias severas por enfermedades infecciosas o por problemas derivados del uso de los venenos o de las sangrías de producción. El grado 2 corresponde a casos en los que se evidencia hipotensión, hemorragias graves y choque cardiovascular, los cuales pueden ser tratados con éxito. El grado 3 corresponde a un estado general con alteraciones moderadas, en tanto el grado 4 corresponde a un estado general muy bueno, presentando sólo alteraciones leves. Finalmente, el grado 5 se asigna a caballos con un estado general excelente. También se observaron las alteraciones locales, en la región inoculada con veneno, sobretudoo en lo referente al edema y la presencia de abscesos, fibrosis y fístulas.

RESULTADOS

Tanto la respuesta de anticuerpos anti-fosfolipasa A2 como las alteraciones en el estado general de los caballos mostraron una gran variabilidad individual (Figs. 1,2). Los máximos títulos alcanzados se observaron en las muestras recolectadas después de la inoculación de dosis de 30 mg y de 50 mg. Sin embargo, en el caballo N° 8 el título tuvo un ligero aumento en los puntos finales de la inmunización, pese a que no se utilizaron dosis superiores a 5 mg.

Con relación al estado general de los caballos, no hubo alteraciones significativas, determinando las evaluaciones que la mayoría de ellos estaban en condiciones muy buenas (grado 4) o excelentes (grado 5). Sin embargo, el caballo N° 3 llegó a tener un estado general grado 3. Por otra parte, la mayoría de los caballos inmunizados desarrollaron abscesos, fístulas y fibrosis en el sitio de inoculación del veneno, los cuales se observaron a partir del tercer mes del proceso de inmunización.

Se estudió además la elevación del título neutralizante en caballos que habían permanecido en descanso durante 45 días después de un proceso de inmunización. Los caballos fueron inoculados con una dosis de refuerzo de 30 mg de veneno y la respuesta inmune se estudió tomando muestras de sangre cada dos días durante un período de 22 días. La Fig. 3 muestra estos resultados, en los

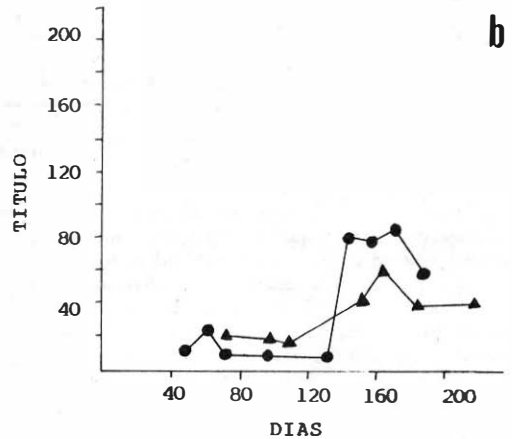
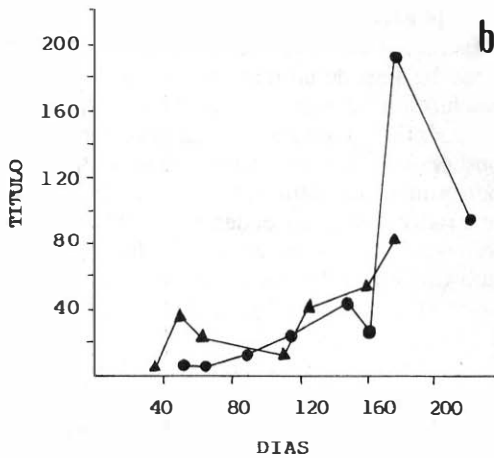
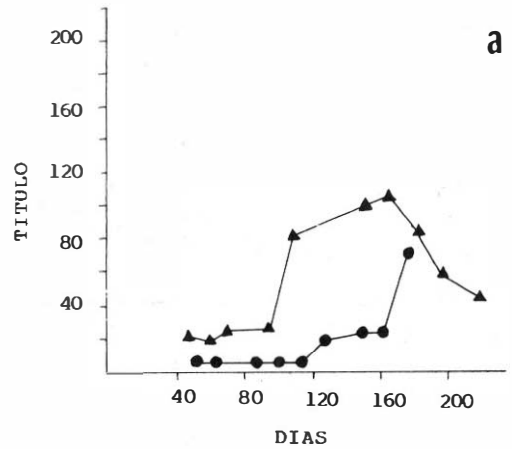
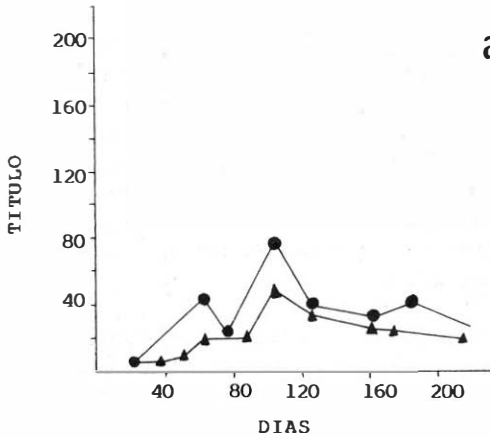


Fig 1: Desarrollo del título de anticuerpos neutralizantes de la actividad fosfolipasa A₂ en cuatro caballos utilizados en la producción del suero antiofídico polivalente. El esquema de inmunización se presenta en el Cuadro 1. El título se expresa de la siguiente manera: 1/DE₅₀ X 10⁵, donde la DE₅₀ (Dosis Efectiva 50%) se define como la razón µl de suero/mg de veneno en la que la actividad hemolítica se redujo en un 50%. (A) Caballos 1 y 2; (B) Caballos 3 y 4.

Fig 2: Desarrollo del título de anticuerpos neutralizantes de la actividad fosfolipasa A₂ en cuatro caballos utilizados en la producción del suero antiofídico polivalente. El esquema de inmunización de los caballos 5, 6 y 7 se presenta en el Cuadro 1. El esquema de inmunización del caballo 8 fue igual al anterior hasta llegar a la dosis de 5 mg. A partir de ese momento, los inóculos siguientes fueron todos de 5 mg de la mezcla de venenos. El título se expresa como 1/DE₅₀ X 10⁵, donde la DE₅₀ (Dosis Efectiva 50%) se define como la razón µl suero/mg de veneno en la que la actividad hemolítica se redujo en un 50%. (A) Caballos 5 y 6; (B) Caballos 7 y 8.

que de nuevo se aprecia una gran variabilidad individual. Sin embargo, se puede observar que los caballos elevaron rápidamente su título de anticuerpos, llegando a un máximo entre los 16 y los 22 días.

DISCUSION

Tradicionalmente el estudio de la respuesta de anticuerpos neutralizantes en caballos utilizados

en la producción del suero antiofídico se ha efectuado investigando la capacidad del suero equino para neutralizar el efecto letal de un determinado veneno (Bolaños & Cerdas 1980). Esta metodología tiene varios inconvenientes, por lo que se hace necesario desarrollar técnicas alternativas *in vitro* que permitan estudiar esta respuesta en caballos individuales sin requerir ratones.

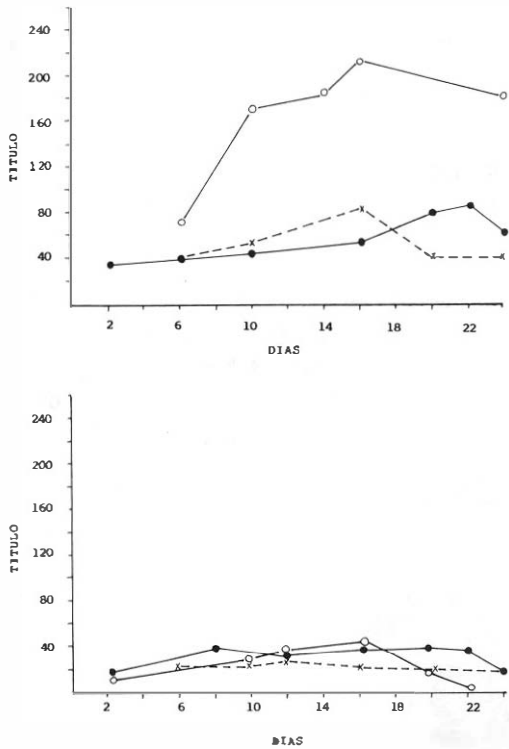


Fig. 3: Desarrollo del título de anticuerpos neutralizantes en un grupo de 6 caballos que habían sido previamente inmunizados y sangrados para la producción del suero antiofídico. Luego de un período de descanso de 45 días, se les inoculó una dosis de 30 mg de la mezcla de venenos y se estudió el desarrollo del título, el cual se expresa como $1/ED_{50} \times 10^2$, tal y como se especifica en las leyendas de las figuras anteriores.

Diversos grupos de investigadores han propuesto técnicas *in vitro*, tales como la hemaglutinación pasiva (Boche & Russell 1968, Khupulsup *et al.*, 1981) y ELISA (Theakston & Reid 1979). Recientemente, Gutiérrez *et al.* (1988) describieron una técnica en placa muy sensible para cuantificar la actividad hemolítica indirecta de los venenos y para estudiar la capacidad neutralizante del suero. Al observarse una correlación altamente significativa entre la neutralización del efecto letal del veneno de *B. asper* y la neutralización del efecto hemolítico indirecto, estos autores propusieron el uso de esta técnica para seguir el desarrollo de la respuesta de anticuerpos neutralizantes en caballos.

En el presente trabajo se estudió este desarrollo en 8 caballos que fueron inoculados con veneno por primera vez y en 6 caballos que recibían dosis de refuerzo de veneno. Con res-

pecto al primer grupo, los datos indican, por un lado, una gran variabilidad en la respuesta inicial y, por otro, el hecho de que el mayor título se obtuvo después de los 100 días de iniciada la inmunización, con dosis de veneno que oscilaron entre 30 y 50 mg. El caballo que recibió dosis máximas de 5 mg no desarrolló una respuesta muy elevada, aunque es difícil juzgar si esto se debió a las bajas dosis o a una respuesta individual insuficiente.

También se observó una variación individual muy evidente en los caballos que habían sido inmunizados previamente y que habían estado en reposo durante 45 días previo a la inoculación de la dosis de refuerzo. En estos caballos se observó un descenso muy rápido del título neutralizante una vez que alcanzaron sus máximos niveles. Ello plantea que, cuando se utilicen dosis de refuerzo, se debe efectuar sangrías exploratorias a los 10 días, de tal manera que las sangrías de producción se efectúen alrededor de 14 días después de la inoculación. La gran variabilidad observada en la respuesta de caballos inoculados por primera vez demuestra la necesidad de evaluar individualmente el desarrollo del título neutralizante. A raíz de estos resultados, en el Instituto Clodomiro Picado se efectúan sangrías exploratorias de todos los caballos a partir de la dosis de 10 mg de veneno.

La inmunización con la mezcla de venenos de *Bothrops asper*, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus* produce algunas alteraciones moderadas en el estado general de los caballos. En el pasado se empleaban esquemas de inmunización que utilizaban cantidades muy elevadas de venenos, llegándose a inocular hasta 600 mg (Bolaños & Cerdas 1980), con el consecuente deterioro en el estado general del caballo. Sin embargo, en los últimos años se ha reducido la cantidad de veneno inoculado, empleándose dosis máximas de 50 mg. Ello ha traído como consecuencia que los caballos no sufran alteraciones clínicas tan drásticas, obteniéndose de todas maneras una respuesta inmune adecuada.

Las alteraciones más frecuentes fueron de tipo local, en el sitio de la inoculación, y consistieron en edema, abscesos, fístulas y fibrosis. Estos efectos se deben probablemente a la acción de una serie de toxinas de los venenos, las cuales son responsables de producir mionecrosis, hemorragia y edema locales (Gutiérrez *et al.* 1982, 1984). Por otra parte, dado que los venenos con-

tienen una gran cantidad de bacterias (Arroyo, Bolaños & Muñoz 1980), la formación de abscesos puede deberse a las bacterias presentes en el mismo veneno. Ello justifica el proceso de esterilización del veneno mediante filtración previo a la mezcla con el coadyuvante para su posterior inoculación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la valiosa colaboración de Javier Núñez, Bernardo Angulo, Alfredo Vargas y Rocío Monge en diversas etapas de este proyecto. Esta investigación fue financiada por la International Foundation for Science, proyecto F/883-2 y por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, proyecto 741-84-82. J.M. Gutiérrez es beneficiario del Programa de Apoyo a Investigadores que patrocina el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

RESUMEN

Se estudió el desarrollo de la respuesta inmune y las alteraciones en el estado general en un grupo de ocho caballos adultos sanos utilizados en la producción del suero antiofídico polivalente en el Instituto Clodomiro Picado. Se observó una gran variación individual en la elevación del título de anticuerpos aunque, en términos generales, los máximos títulos se alcanzaron luego de que se inocularon las dosis de 30 mg y 50 mg de la mezcla de venenos. Con respecto a caballos que habían sido previamente utilizados en la producción de suero y que recibieron una dosis de refuerzo, el máximo título se obtuvo entre los 16 y 22 días. Las inoculaciones de la mezcla de venenos indujeron alteraciones leves en el estado

general de los caballos. Sin embargo, la mayoría de ellos desarrollaron abscesos, fístulas y fibrosis en el sitio de inoculación del veneno. Se concluye que, dada la gran variabilidad individual de los caballos en lo que respecta a la respuesta inmune, se hace necesaria su evaluación individual, con el fin de seleccionar los animales que produzcan una respuesta satisfactoria.

REFERENCIAS

- Arroyo, O., R. Bolaños & G. Muñoz. 1980. The bacterial flora of venoms and mouth cavities of Costa Rican snakes. *Bull. Pan Health Org.* 14: 280-285.
- Boche, R.D. & F.E. Russell. 1968. Passive hemagglutination studies with snake venom and antivenin. *Toxicon* 6: 125-130.
- Bolaños, R. & L. Cerdas. 1980. Producción y control de sueros antiofídicos en Costa Rica. *Bol. Ofic. Sanit. Panam.* 88: 189-196.
- Gutiérrez, J.M., L. Cerdas, O. Arroyo, E. Rojas, B. Lomonte & J.A. Gen. 1982. Patogénesis y neutralización de los efectos locales inducidos por veneno de la serpiente "terciopelo" (*Bothrops asper*). *Acta Méd. Costar.* 25: 255-262.
- Gutiérrez, J.M., C.L. Ownby & G.V. Odell. 1984. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Experim. and Molec. Pathol.* 40: 367-379.
- Gutiérrez, J.M., C. Avila, E. Rojas & L. Cerdas. 1988. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 26: 411-413.
- Khupulsup, K., N. Poopyruchpong, B. Rechclai & C. Ratana-banangkoon. 1981. A passive hemagglutination test for antibody to *Naja naja siamensis* toxin 3. *Toxicon* 19: 863-866.
- Theakston, R.D.G. & H.A. Reid. 1979. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon* 17: 511-515.