



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**Desarrollo, optimización y validación de un método  
analítico tipo ELISA para cuantificar veneno de  
escorpión *Centruroides* en plasma humano**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

*Ariana Chávez Méndez*



A s e s o r : Dr. Alejandro Alagón Cano

-2007-



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

La presente tesis fue realizada en el Departamento de  
Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología  
de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como en el  
Instituto Bioclon y Silanes

Bajo la asesoría del Dr. Alejandro Alagón Cano

---

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Alejandro Alagón Cano por su valiosa asesoría que hizo posible la realización de este proyecto de tesis.

Al Biólogo Felipe Olvera Rodríguez por todo el apoyo técnico.

Al Q. F. B. Alejandro Alcántara Pineda por su colaboración en la estadística del presente trabajo.

Al M. en C. Alejandro Carbajal Saucedo por sus enriquecedores comentarios y sugerencias sobre el presente escrito.

A la M. en C. Laura Olgún por todo su apoyo y aportaciones en la cuantificación de muestras.

A la Q. B. Alma Buelna Romero por su apoyo técnico durante la validación del método analítico.

A la M. en C. Judith Estevez por las facilidades brindadas en la realización del este proyecto.

A la Dra. Leslie Boyer y al Dr. Walter García, por el suministro de muestras de plasma de pacientes para su posterior cuantificación mediante el método desarrollado en este proyecto.

A los integrantes del jurado: Dr. Alejandro Alagón, M. en C. Alfonso José Vilchis, Dra. Patricia Ramos, Dr. Baltazar Becerril y Q. F. B. Alejandro Alcántara, por sus valiosas observaciones y revisión del presente trabajo escrito.

---

---

## **Agradecimientos personales:**

*A mis maravillosos padres y hermano por todo el amor y apoyo que me brindan. No encuentro las palabras exactas que expresen todo lo que les agradezco y lo mucho que los amo, hoy quiero que sepan que cada logro se los dedico a ustedes.*

*A mi tía Graciela Méndez por su cariño y sus valiosos consejos.*

*A mis amigas de la preparatoria: Luz Patricia, Harui, Miriam, Guadalupe C., Diana, Aura y Guadalupe H., muchas gracias por valorar y cuidar nuestra amistad, por ser siempre un apoyo y motivación para continuar alcanzando nuestras metas.*

*A Enrique y Marco por brindarme su valiosa amistad, cariño y apoyarme siempre.*

*Al Dr. Alejandro Alagón por confiar en mí, abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de tenerlo como asesor, lo admiro y estimo mucho por ser un gran científico y maestro pero sobre todo un gran ser humano.*

*A la Dra. Patricia Ramos y al M. en C. Alfonso Vilchis: por todos sus consejos que me ayudaron a tomar una de las decisiones más importantes de mi vida que posteriormente me llevaría a realizar el presente trabajo de tesis y continuar en el área de investigación científica.*

*A Arturo por los buenos momentos compartidos, por lo que de ti aprendí y por tu apoyo.*

*A Ana Joyce, Hugo y Jimena por todo su apoyo y divertidos momentos.*

*Al gran equipo de trabajo y amigos del laboratorio de quienes he aprendido mucho: Herlinda, Felipe, Alejandro C., Laura, Alejandro O., Héctor, Claudia, Francia, Blanca, Angélica, Rosana, Mabel, Leo y Ricardo. Les agradezco infinitamente su valioso apoyo y ejemplo de entrega y superación.*

---

---

---

# ÍNDICE

Número de Página

<b>I. Abreviaturas.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Justificación.....</b>	<b>3</b>
<b>III. Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>IV. Introducción</b>	
IV.1 Escorpiones.....	5
IV.2 Escorpionismo.....	12
IV.3 Características del veneno y cuadro clínico del envenenamiento por escorpión del género <i>Centruroides</i> .....	13
IV.4 Tratamiento para envenenamiento por picadura de escorpión <i>Centruroides</i> .....	20
IV.5 Venenonemia como un marcador de efectividad en el uso de antivenenos.....	22
IV.6 ELISA como método analítico.....	23
IV.7 Validación de métodos analíticos.....	28
<b>V. Objetivos.....</b>	<b>32</b>
<b>VI. Metodología y Resultados</b>	
<b>VI.1 Desarrollo y Optimización del método analítico tipo ELISA</b>	
VI.1.1 Obtención de veneno de escorpión.....	33
VI.1.2 Obtención de plasma humano.....	33
VI.1.3 Obtención de anticuerpos de captura.....	34
VI.1.4 Anticuerpos de detección anti veneno de <i>Centruroides</i> .....	37
VI.1.5 Principio del ensayo tipo ELISA para cuantificar veneno de escorpión <i>Centruroides</i> .....	37

---

---

---

	Número de Página
VI.1.6 Selección de dilución óptima de anticuerpos primarios o de detección.....	40
VI.1.7 Selección de dilución óptima de conjugado enzimático.....	42
VI.1.8 Selección de sustrato para peroxidasa.....	44
<b>VI.2 Validación del método analítico tipo ELISA .....</b>	<b>47</b>
VI.2.1 Evaluación de linealidad y precisión del sistema.....	51
VI.2.2 Evaluación de recuperación de veneno.....	53
VI.2.3 Evaluación de exactitud, linealidad y repetibilidad del método.....	55
VI.2.4 Evaluación de precisión intermedia del método.....	58
VI.2.5 Evaluación de estabilidad a corto plazo en hielo seco de muestras de plasma adicionadas con veneno.....	61
VI.2.6 Evaluación de estabilidad en ciclos de congelación descongelación de muestras de plasma adicionadas con veneno.....	64
VI.2.7 Evaluación de estabilidad a largo plazo a -20°C de muestras de plasma adicionadas con veneno.....	66
VI.2.8 Evaluación del límite bajo de cuantificación.....	70
VI.2.9 Evaluación del límite alto de cuantificación.....	72
VI.2.10 Evaluación de selectividad y especificidad del método.....	74
<b>VI.3 Aplicación del ELISA validado para la cuantificación de veneno de escorpión</b> <b><i>Centruroides</i> en plasma humano .....</b>	<b>79</b>
<b>VII. Discusión.....</b>	<b>83</b>
<b>VIII. Conclusiones.....</b>	<b>86</b>
<b>XIX. Apéndice.....</b>	<b>87</b>
<b>X. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>94</b>

---

**I. ABREVIATURAS**

ABTS.....	2-2'-Azino-di[3-etilbenzoliazo-lino sulfonato]
Ac. ....	Anticuerpo
AcOH.....	Ácido acético
Antilog.....	Antilogaritmo
$\alpha$ (ScTX).....	alfa toxina de escorpión
° C.....	Grado Celsius
<i>C.l.l.</i> .....	<i>Centruroides limpidus limpidus</i>
cm <sup>3</sup> .....	Centímetro cúbico
CNBr.....	Bromuro de cianógeno
<i>C. s.</i> .....	<i>Centruroides sculpturatus</i>
CV.....	Coefficiente de variación
Cys.....	Cisteína
Da.....	Dalton
EDTA.....	Ácido etilen-diamino-tetracético, sal disódica dihidratada
ELISA.....	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
g.....	Gramo
HCl.....	Ácido clorhídrico
HRP.....	Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase)
IC.....	Intervalo de confianza
IgG.....	Inmunoglobulina G
K <sup>+</sup> .....	Potasio
KDa.....	Kilodaltones
L.....	Litro

Log.....	Logaritmo
M.....	Molar
μ.....	Micro
mg.....	Miligramo
mL.....	Mililitro
mM.....	Milimolar
MPM.....	Marcador de peso molecular
Na <sup>+</sup> .....	Sodio
NaCl.....	Cloruro de sodio
NaOH.....	Hidróxido de sodio
NaTxs.....	Toxinas de escorpión específicas para canales de sodio
ng.....	Nanogramo
nm.....	Nanómetro
PM.....	Peso molecular
PrFcal .....	Probabilidad de F calculada
r <sup>2</sup> .....	Coefficiente de determinación
rpm.....	Revoluciones por minuto
SDS.....	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE.....	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
Sln. ....	Solución
T. A. ....	Temperatura ambiente
TMB.....	Tetrametilbenzidina
TEMED.....	Tetrametilendiamina

---

## II. JUSTIFICACIÓN

El alacranismo también conocido como escorpionismo es considerado un problema de salud en varias regiones del mundo. Diversos desarrollos tecnológicos e investigaciones han permitido la implementación de varios tipos de antivenenos.

La evaluación clínica de un medicamento, tal como un antiveneno, involucra dos grandes parámetros: su seguridad y su efectividad. Una manera de medir la efectividad de un antiveneno es a través de la cuantificación de los niveles de veneno en plasma o sangre, e.g. la disminución o remoción del veneno circulante por la presencia del antiveneno es una prueba de su efectividad.

Ante esto, surge la necesidad de desarrollar y optimizar un método analítico sensible que permita cuantificar el veneno de manera efectiva.

Partiendo del hecho de que todo método analítico debe cumplir el atributo de confiabilidad es necesario realizar la validación del método, ya que es mediante el proceso de validación que se demuestra si el método es adecuado y confiable para la aplicación deseada.

---

---

### III. RESUMEN

El escorpionismo es un problema de salud para el humano originado por la picadura de escorpiones tóxicos. Afecta a grandes núcleos de población, tanto rural como urbana, en varias regiones del mundo. El avance tecnológico e investigaciones sobre el tema han permitido el desarrollo e implementación de varios tipos de antivenenos necesariamente evaluados en términos de su seguridad y efectividad. Una forma de evaluar la efectividad es mediante la cuantificación del veneno circulante en plasma después de aplicado el antiveneno, esto es, esperando observar la disminución o remoción de veneno en presencia de un antiveneno.

En el presente trabajo se desarrolló, optimizó y validó un método analítico tipo ELISA para cuantificar veneno de escorpión del género *Centruroides* en muestras de plasma humano, que contribuyera a evaluar la efectividad de un faboterápico (antiveneno constituido por fragmentos  $F(ab')_2$  antialacrán conocido comercialmente con el nombre de Alacramyn®).

El desarrollo y optimización del método tipo ELISA dieron como resultado el establecimiento de las siguientes condiciones: el uso de anticuerpos de captura  $F(ab')_2$  inmunopurificados a partir del faboterápico, a una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$ ; la utilización de anticuerpos de detección (suero hiperinmune de conejo anti veneno de *Centruroides l.l.*) diluido 1:4000 en solución vehículo; el uso de IgG de cabra anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:2000 en solución vehículo; así como, la utilización de ABTS *ready to use* (Roche®) como sustrato óptimo para HRP.

El método analítico optimizado se validó mediante la evaluación de los siguientes parámetros de desempeño: la linealidad y precisión del sistema; el análisis de recuperación de veneno; la exactitud, linealidad y precisión intermedia del método; la estabilidad a corto plazo, la estabilidad a ciclos de congelación-descongelación y estabilidad a largo plazo de muestras adicionadas con veneno; el límite bajo de cuantificación; el límite alto de cuantificación; la selectividad y especificidad. Los resultados de esta validación generaron evidencia documentada de que el método analítico es adecuado y confiable para la cuantificación de muestras con veneno de escorpión *Centruroides* en plasma humano, con una sensibilidad -dada por su límite bajo de cuantificación- de 1ng/mL. Este método se aplicó para cuantificar muestras clínicas de pacientes pediátricos con sintomatología de alacranismo a los cuales -en el centro de salud- se les aplicó faboterápico o placebo respectivamente. Los resultados de esta cuantificación mostraron que en presencia de faboterápico la concentración de veneno circulante en plasma disminuye a niveles inferiores a 1ng/mL.

---

## IV. INTRODUCCIÓN

### IV.1. ESCORPIONES

---

Los escorpiones (Del latín *scorpio -ōnis* ), también conocidos como alacranes (Del árabe *al'agráb*), se consideran los artrópodos terrestres más antiguos. Los primeros registros fósiles datan del Silúrico medio, hace aproximadamente 425 millones de años. Los primeros escorpiones fueron acuáticos o anfibios. Posteriormente estos arácnidos migraron a la Tierra al final del Devónico o inicio del Carbonífero, hace aproximadamente 350 millones de años (1, 2).

Los escorpiones pertenecen al phylum Arthropoda, clase Arachnida y orden Scorpionida, con 9 familias: Bothriuridae, Buthidae, Chactidae, Chaerilidae, Diplocentridae, Ischnuridae, Irudae, Scorpionidae y Vaejoividae (3).

Las especies peligrosas para el humano pertenecen a la familia Buthidae, de los géneros *Androctonus*, *Buthus*, *Leiurus*, *Mesobuthus* y *Parabuthus*, en África y Medio oriente, *Centruroides*, en México y sur de los Estados Unidos de Norteamérica, y *Tityus*, en América del Sur.

#### - Características morfológicas -

El cuerpo de los escorpiones está dividido en dos regiones principales: prosoma (cefalotórax) y opistosoma (abdomen). El opistosoma consta de dos partes: mesosoma y metasoma o cauda; en el opistosoma se realizan las funciones digestivas, respiratorias y de reproducción (Figura 1).

El prosoma está constituido por cabeza y tórax y está cubierto por un caparazón con granulaciones y depresiones. En la zona media del caparazón, sobre un pequeño tubérculo ocular hay un par de ocelos y a cada lado posee de dos a seis ojos organizados en uno o dos grupos. En la parte ventral se localiza el esternón el cual puede tener terminación plana, roma o en punta.

En el prosoma se localizan seis pares de apéndices: un par de quelíceros, un par de pedipalpos (con los cuales captura a su presa) y cuatro pares de patas (4, 5).

- Los quelíceros están compuestos por tres partes: coxa (oculta dentro de caparazón), tibia que termina en una prolongación (dedo fijo) y tarso (dedo móvil) articulado a la tibia.
- Los pedipalpos están constituidos por: coxa, trocánter, fémur, patela, y quela, esta última se constituye por tibia (mano y dedo fijo) y tarso (dedo móvil). Poseen órganos sensoriales llamados tricobótrias.
- Cada pata está formada por: coxa, trocánter, fémur, patela, tibia, basitarso y telotarso con un par de uñas.

El mesosoma consta de siete segmentos. Del lado ventral, en el primer segmento se encuentra el opérculo genital, en el segundo se encuentran los peines, y los siguientes segmentos poseen espiráculos (órganos respiratorios) (3).

El metasoma está compuesto por cinco segmentos, los cuales están ornamentados por quillas. Unido al último segmento del metasoma después de la abertura anal, se encuentra el telson que se subdivide en vesícula y aguijón (Figura 1).

Dentro de la vesícula se encuentran dos glándulas de veneno a manera de sacos de músculo que rodean a un epitelio secretor, (1). La inoculación del veneno se lleva a cabo cuando se contraen los músculos que rodean las glándulas lo cual permite el transporte del veneno por un conducto que desemboca en la abertura del aguijón (4).

### - *Alimentación* -

Los alacranes se alimentan principalmente de insectos. Detectan a su presa con ayuda de sus pelos sensoriales, la presa es cortada y digerida previamente de manera química en la cavidad preoral (4).

### - Reproducción y Desarrollo -

En escorpiones, la reproducción sexual inicia con un cortejo seguido de una “danza nupcial” durante la cual ambos escorpiones (macho y hembra) se sujetan con los pedipalpos, el macho con sus peines libera su espermátforo acomodándolo en el sustrato, el macho jala a la hembra de manera tal que ésta pueda absorber el contenido del espermátforo y llevarse a cabo así la fecundación en el oviducto de la hembra. El periodo de gestación tarda de 2 días hasta 2 meses dependiendo de la especie. Cada hembra puede tener de 1 a 95 crías las cuales se refugian en el dorso de la madre por lo menos hasta la primer muda. Alcanzan la madurez sexual después de los seis meses de edad (4).

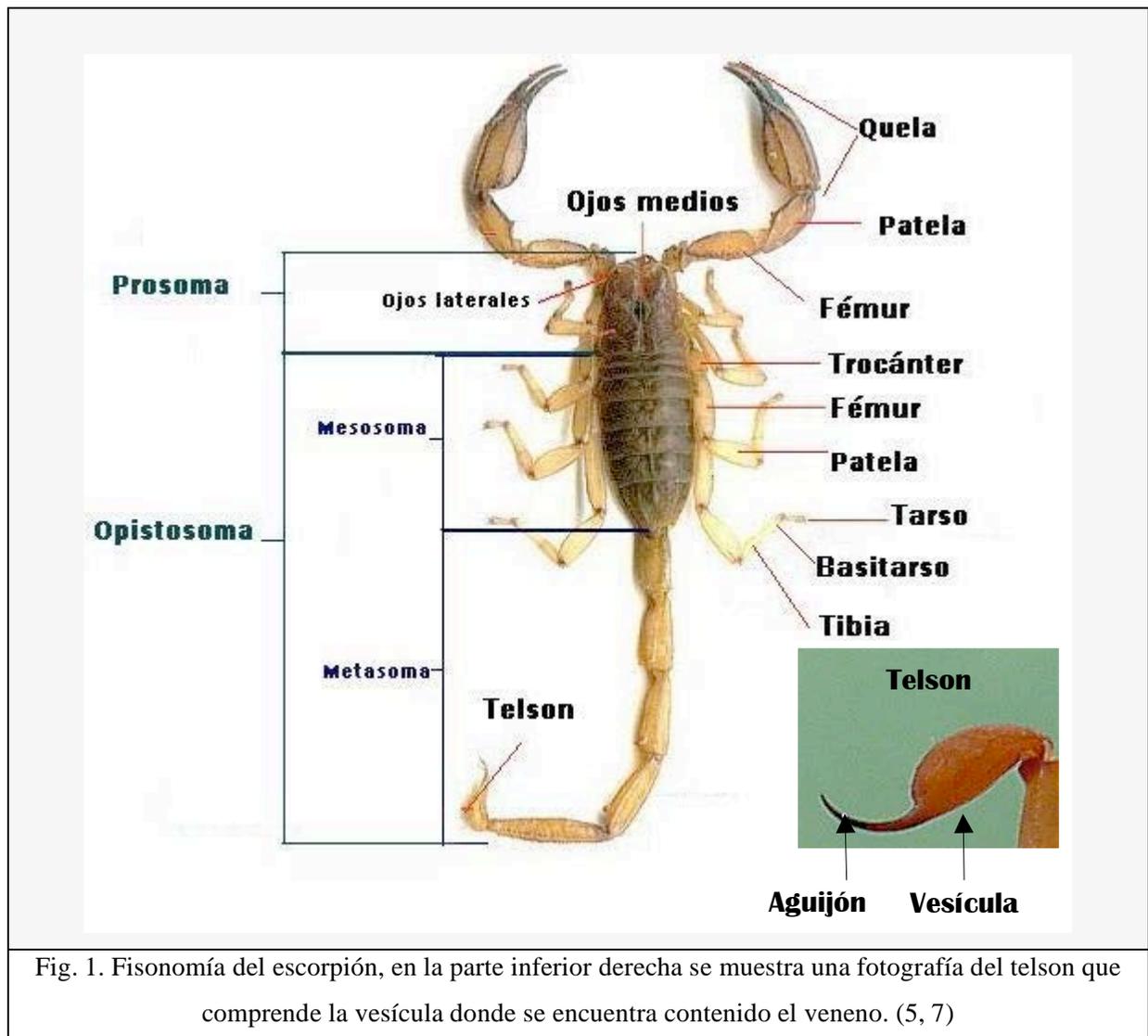


Fig. 1. Fisonomía del escorpión, en la parte inferior derecha se muestra una fotografía del telson que comprende la vesícula donde se encuentra contenido el veneno. (5, 7)

- **Distribución geográfica** -

Los escorpiones son cosmopolitas, se encuentran distribuidos en todos los continentes, especialmente en las áreas tropicales, subtropicales y templadas. Se distribuyen aproximadamente desde los 52° latitud norte y los 42° de latitud sur, desde el nivel del mar hasta lugares a 2,500 metros de altitud, siendo mayor el número de especies conforme la altitud disminuye, seguramente por el efecto del clima.

La distribución de las diferentes especies depende de la existencia de los microambientes adecuados para su subsistencia.

Actualmente se reconocen alrededor de 1500 especies, de las cuales 25 tienen potencial de producir daño o muerte al hombre (4).

La distribución geográfica a nivel mundial de las especies de escorpiones de importancia médica se muestra en la tabla de la siguiente página.

Tabla 1. Especies de escorpiones de importancia médica y país donde se encuentran (3, 5)

País	Especie	País	Especie
Argelia	<i>Buthus occitanus</i> <i>Androctonus australis</i>	Argentina	<i>Tityus bahiensis</i>
Egipto	<i>A. australis</i> <i>A. amoreuxi</i> <i>Leiurus</i> <i>quinquestriatus</i>	Brasil	<i>T. bahiensis</i> <i>T. serrulatus</i>
Jordan	<i>B. occitanus</i>	Trinidad	<i>T. trinitatis</i>
Iraq	<i>Hemiscorpion lepturus</i> <i>A. crassicauda</i>	Guyana	<i>T. cambridgei</i>
Israel	<i>L. quinquestriatus</i> <i>A. crassicauda</i> <i>A. bicolor</i>	México	<i>Centruroides noxius</i> <i>C. suffusus</i> <i>C. infamatus</i> <i>C. elegans</i> <i>C. limpidus limpidus</i> <i>C. limpidus tecomanus</i> <i>C. pallidiceps o sculpturatus</i> <i>C. exilicauda</i> <i>C. balsasensis</i> <i>C. meisei</i>
Marruecos	<i>A. mauritanicus</i> <i>A. australis</i> <i>A. amoreuxi</i> <i>B. occitanus</i>		
Sudáfrica	<i>Parabuthus</i> <i>triradulatus</i> <i>P. transvaalensis</i> <i>P. villosus</i>	Estados Unidos Americanos	<i>C. sculpturatus</i>
Sudán	<i>B. minax</i>	Venezuela	<i>T. trinitatis</i> <i>C. gracilis</i>
Turquía	<i>L. quinquestriatus</i> <i>A. crassicauda</i> <i>Mesobuthus gibbosus</i>		

México y parte de E. U. A. son consideradas importantes zonas de alacranismo debido a sus características climáticas y geográficas; en estas zonas, los escorpiones mas peligrosos pertenecen al género *Centruroides* de la familia Buthidae (Tabla 1) (Figura 2).

En E. U. A., de las 70 especies encontradas, la especie de mayor importancia médica es *Centruroides sculpturatus* localizado principalmente en Arizona (9, 10).

En México, se han descrito alrededor de 221 especies de escorpiones, de las cuales 9 son consideradas peligrosas por ser responsables de accidentes graves en su interacción con el hombre (Tabla 2).

Tabla 2. Localización de especies peligrosas en México (3, 5, 6, 11)

Especie	Localización
<i>Centruroides noxius</i>	Nayarit
<i>C. suffusus</i>	Durango, Sinaloa y Nayarit
<i>C. infamatus</i>	Michoacán, Jalisco, Zacatecas, Nayarit, Aguascalientes, Guanajuato y Querétaro.
<i>C. elegans</i>	Jalisco, Guerrero, Nayarit, Michoacán y Colima.
<i>C. limpidus limpidus</i>	Morelos, Puebla, Michoacán, Guerrero y Estado de México
<i>C. limpidus tecomanus</i>	Colima, Jalisco y Michoacán
<i>C. balsasensis</i>	Morelos, Estado. De México, Michoacán, Guerrero y Puebla
<i>C. sculpturatus</i>	Sonora
<i>C. exilicauda</i>	Noroeste (principalmente Sonora)



**Figura 2.** Mapa de distribución del género *Centruroides* en México y Estados Unidos de América (E.U.A).

En rojo se muestra la zona de distribución de escorpiones del género *Centruroides* y en línea punteada se muestra la división política de los países México y E.U.A, al sur y norte respectivamente.

1-Arizona (E.U.A), 2-Sonora, 3-Chihuahua, 4-Sinaloa, 5-Durango, 6-Nayarit, 7-Zacatecas, 8-Aguascalientes, 9-Jalisco, 10-Colima, 11-Michoacán, 12-Guanajuato, 13-Querétaro, 14-Estado de México, 15-Distrito Federal, 16-Morelos, 17-Puebla, 18-Guerrero, 19-Oaxaca.

## ***IV.2 ESCORPIONISMO***

---

El escorpionismo o alacranismo es un problema de salud originado por la picadura de especies tóxicas para el humano.

La amplia distribución de los escorpiones y la toxicidad de ciertas especies, aunado a las características de las viviendas así como hábitos y costumbres de una población, facilitan los encuentros accidentales hombre-alacrán, en los que ocurren las picaduras. Las picaduras por escorpiones peligrosos afectan a grandes núcleos de población, tanto rural como urbana, en diferentes regiones del mundo.

En poblaciones rurales, la intoxicación por picadura de alacrán es también un problema laboral ya que frecuentemente se presenta en agricultores durante la siembra o cosecha, y leñadores, entre otros.

Por otro lado, el crecimiento de la población urbana, asociado a una expansión geográfica invasora de zonas que naturalmente correspondían al hábitat del alacrán, han aumentado el riesgo de exposición .

En una población, los riesgos de picaduras de alacrán se presentan con mayor frecuencia entre hombres de 15 a 45 años de edad que laboran en el campo; sin embargo, los niños - particularmente los que pesan menos de 30 kilogramos- y los adultos mayores son quienes peligran más, en el caso de los niños esto se debe a que el veneno está mas concentrado (reciben la misma cantidad de veneno que podría recibir un adulto pero se distribuye en un menor volumen de sangre), en los adultos mayores el problema se agrava debido a la susceptibilidad natural causada por la senescencia. Los sitios con mayor frecuencia de picadura son los miembros inferiores, aunque esto no excluye al resto del cuerpo.

También se ha observado que la variación estacional a lo largo del año influye en la frecuencia de picaduras de alacrán, en general, el mayor número de picaduras se presenta en época de lluvias.

En México, durante el 2005, se reportaron 238,031 casos de intoxicaciones por alacranes (12).

En E. U. A. durante el 2005 se reportaron 14,521 casos de víctimas de picadura de alacrán, de los cuales 1,243 fueron niños menores de 6 años; 2,831 fueron personas entre 6 y 19 años, y 10,390 casos de personas mayores de 19 años (13).

Cabe mencionar que las estadísticas de alacranismo a nivel mundial han sido subestimadas desde tiempo atrás debido a que, en algunos países, existe un subregistro por no considerar al alacranismo como daño a la salud de notificación obligatoria.

---

### ***IV.3 CARACTERÍSTICAS DEL VENENO Y CUADRO CLÍNICO DEL ENVENAMAMIENTO POR ESCORPIÓN DEL GÉNERO *Centruroides****

---

Todos los escorpiones producen un veneno cuya composición química, mecanismo de acción y consecuencias clínicas varían de acuerdo a la especie. Sólo los miembros de la familia Buthidae producen veneno neurotóxico peligroso para humanos.

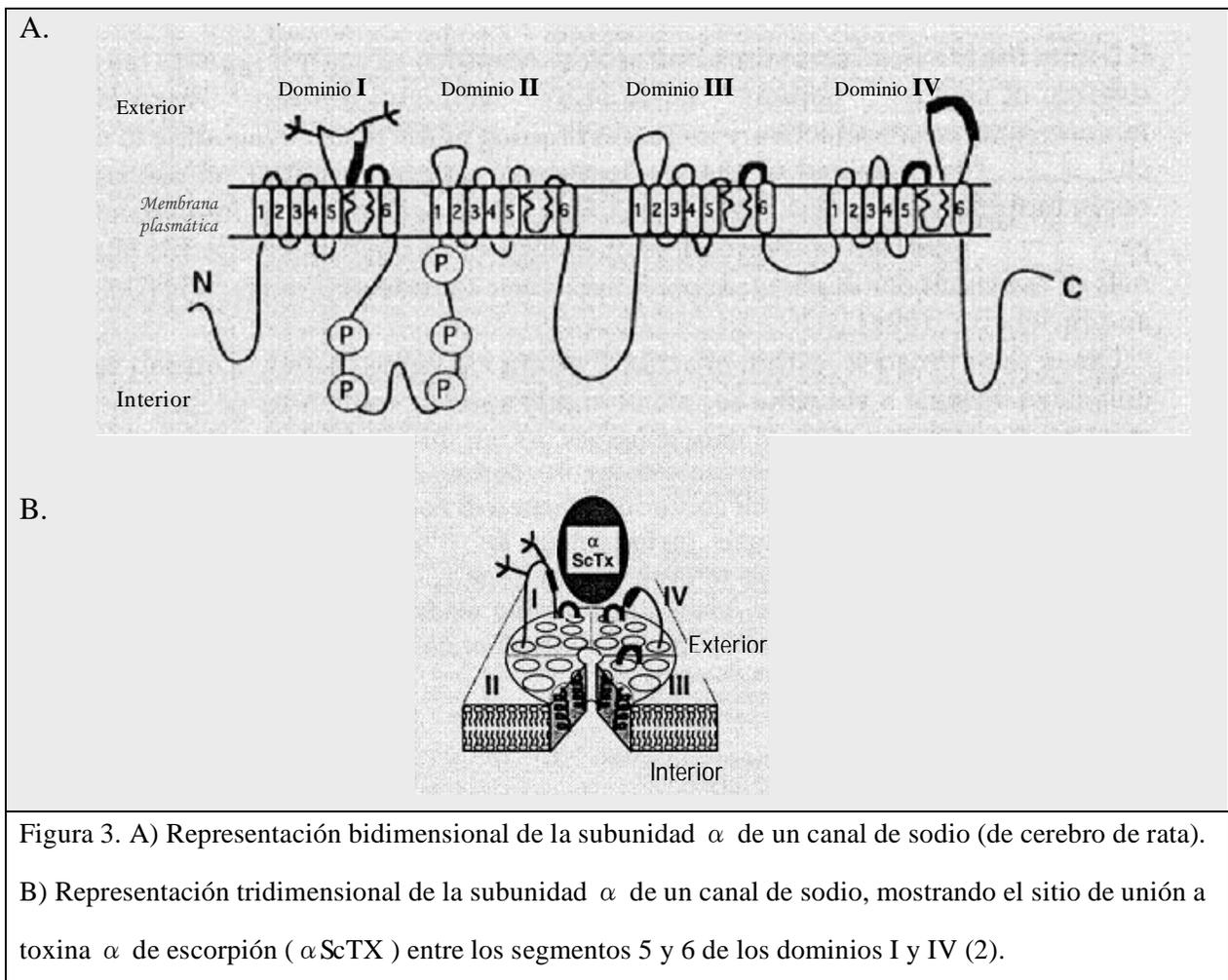
El veneno de los escorpiones del género *Centruroides*, perteneciente a la familia Buthidae, está compuesto por una mezcla de toxinas, de las que sólo algunas son tóxicas y en los humanos ocasionan envenenamiento desde leve hasta mortal. Las proteínas tóxicas son llamadas neurotoxinas, ya que actúan sobre el sistema nervioso.

Las toxinas de *Centruroides* se clasifican en cuatro familias diferentes de acuerdo al canal iónico sobre el que ejercen su acción: canales de sodio, canales de potasio, canales de cloro, y canales de calcio, siendo las más estudiadas las toxinas que afectan canales de sodio y de potasio (14).

**- Canales de Na<sup>+</sup> -**

El canal iónico de Na<sup>+</sup> sensible a voltaje descrito en mamíferos (ratas) está constituido por tres subunidades de glicoproteínas: subunidad ( $\alpha$ ) de 260 KDa unida covalentemente a una subunidad ( $\beta 2$ ) de 33 KDa unida, a su vez, de manera no covalente a una subunidad ( $\beta 1$ ) de 36 KDa.

La subunidad  $\alpha$  tiene cuatro dominios (I - IV) con seis segmentos transmembranales con un sitio receptor para toxina de escorpión localizada dentro de los dominios I y IV (Figura 3).



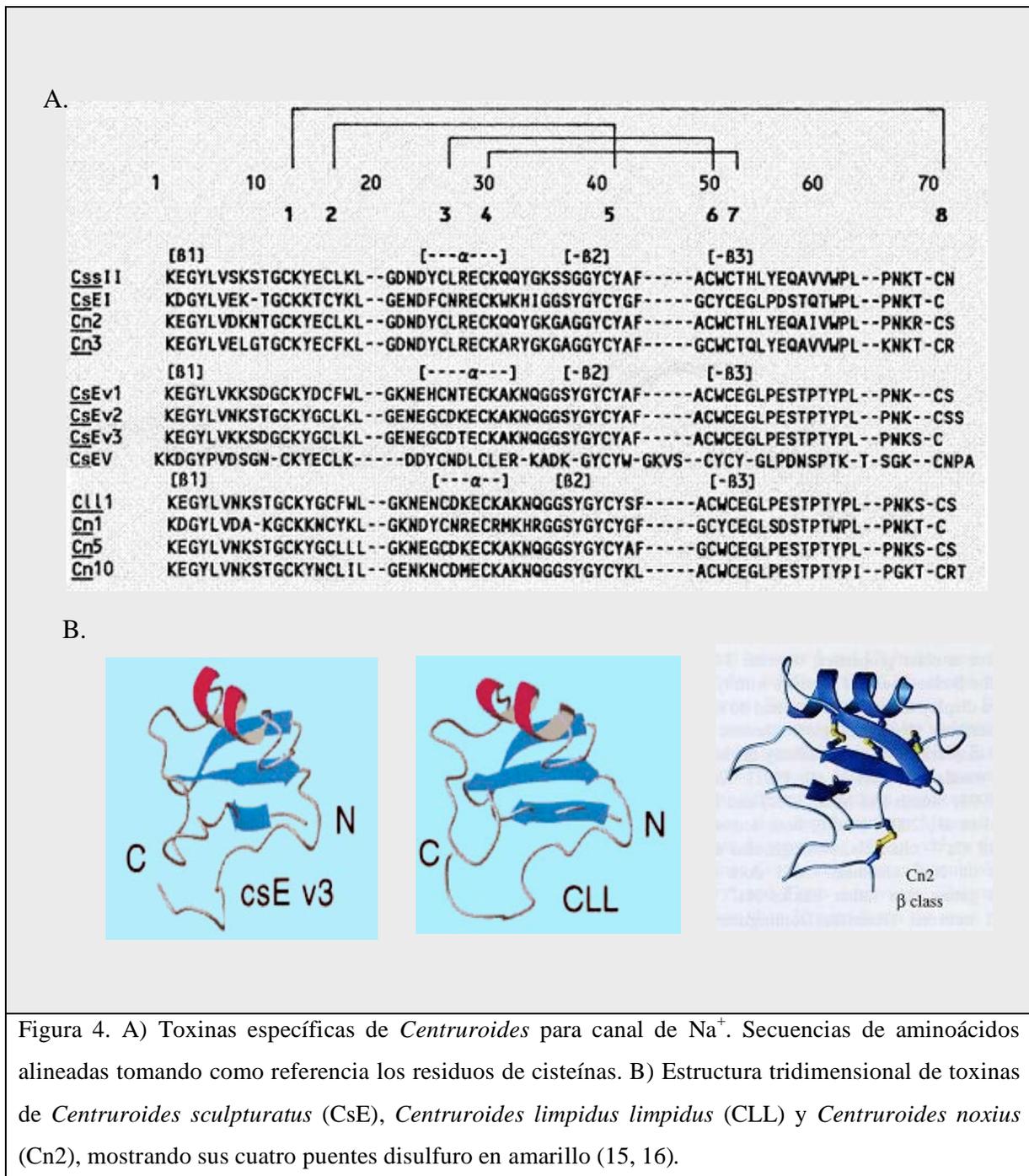
### ***-Toxinas que actúan en canales de Na<sup>+</sup>-***

Las toxinas específicas para canales de sodio (NaTxS) son péptidos de cadena larga de 60 a 76 residuos de aminoácidos (6500- 8500 Da) estabilizadas por cuatro puentes disulfuro; tienen carga neta positiva; poseen una estructura constante que consiste en uno o dos segmentos cortos de alfa-hélice más tres cadenas beta-plegadas, conectadas por regiones variables formando asas (15, 16).

El  $\alpha$ -hélice está enlazada a la cadena plegada  $\beta$  3 por dos puentes disulfuro. Un tercer puente disulfuro conservado involucra el residuo de cisteína de la cadena  $\beta$  2. Los primeros tres puentes disulfuro conservados participan en la estabilización del núcleo de la toxina. Este núcleo estructural es también conservado en toxinas que afectan canales de potasio. El cuarto puente disulfuro se establece entre los residuos de cisteína más cercanos a las regiones amino- y carboxilo-terminal (Cys 1 y Cys 8) (Figura 4) .

Estas toxinas se han dividido en dos tipos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) basándose en sus efectos farmacológicos en canales de sodio y verificado por mediciones electrofisiológicas y características de unión al canal (15).

Las  $\alpha$ -toxinas se unen a canales de sodio de tipo voltaje-dependiente, bloqueando el mecanismo de inactivación de estos canales, mientras que las  $\beta$ -toxinas se unen independientemente del potencial de membrana y afectan la activación del canal de sodio (15, 16).



**-Canales de  $K^+$ -**

Los canales de potasio son proteínas integrales de membrana responsables del intercambio de iones  $K^+$ ; están compuestos por cuatro subunidades molecularmente independientes que se ensamblan para formar el canal, cada subunidad tiene seis segmentos (S1 - S6) transmembranales, el segmento 4 es el sensor de voltaje. Entre los segmentos 5 y 6 de cada dominio, se forma el poro del canal (Figura 5) (8).

Los canales de potasio son muy importantes en procesos fisiológicos tales como la excitabilidad de las células y liberación de neurotransmisores entre otros, mediante su participación en el potencial de acción.

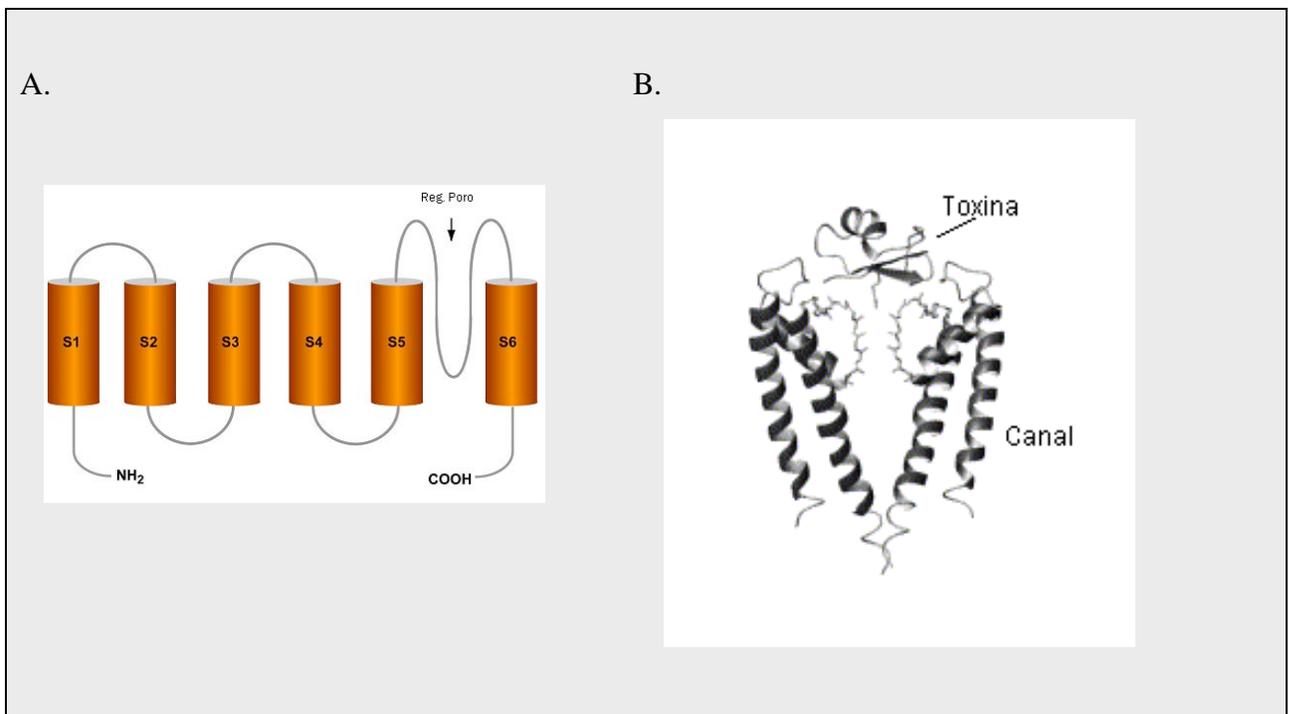
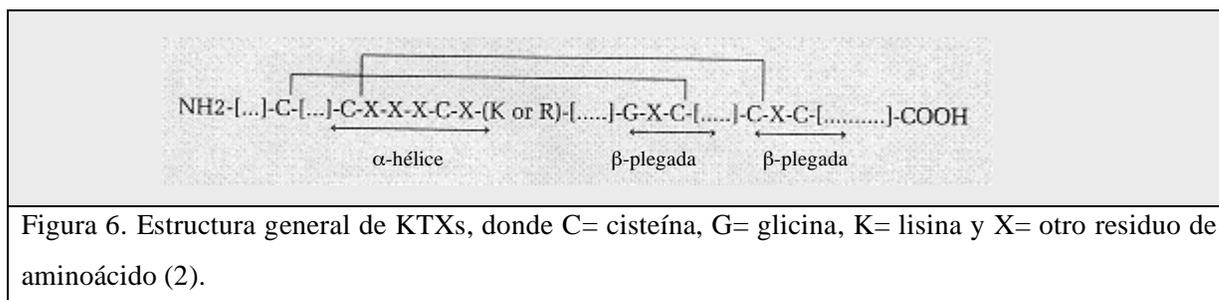


Figura 5. A) Representación esquemática de una subunidad del tetrámero que constituye el canal de  $K^+$  voltaje-dependiente, se muestran los seis segmentos transmembranales. B) Modelo de la interacción de una  $\alpha$ -KTx con el canal de  $K^+$  (Del canal se muestran solo dos de las 4 subunidades del tetrámero) (17).

**-Toxinas que actúan en canales de  $K^+$ -**

Las toxinas específicas para canales de potasio son péptidos cortos constituidos por 23 a 43 residuos de aminoácidos, enlazados por 3 ó 4 puentes disulfuro (17).

La estructura general de las KTxS consiste en una  $\alpha$ -hélice conectada a una doble o triple  $\beta$ -plegada por dos puentes disulfuro (Figura 6); estas toxinas son auténticas bloqueadoras de los canales, ya que se unen a la región extracelular del canal e impiden el paso de iones.



Además de las toxinas anteriormente descritas (NaTxS y KTxS), el veneno de alacrán también contiene otras proteínas como la hialuronidasa; lípidos, nucleótidos, aminas biogénicas y sales orgánicas (14, 15).

Las toxinas de alacrán actúan sobre los canales iónicos de células excitables y no excitables. Estas toxinas provocan la pérdida del equilibrio iónico entre el espacio intracelular y extracelular prolongando el potencial de acción principalmente de las células del sistema nervioso autónomo, y aumentan la liberación de neurotransmisores como catecolaminas y acetilcolina, afectando a las vías simpática (adrenérgica) y parasimpática (colinérgica). Lo anterior desencadena el cuadro clínico de la víctima de picadura de alacrán, donde los efectos principales son neurotóxicos y cardiotoxicos (18, 11).

**-Cuadro clínico-**

El alacrán inyecta su veneno a la víctima principalmente en el espacio subcutáneo y raras veces, en el intravenoso (6). El cuadro clínico ocasionado por picadura de *Centruroides* puede presentarse a los pocos minutos de ocurrida la picadura.

El cuadro clínico y su evolución se relacionan con los siguientes factores:

- a) Del artrópodo: género y especie, edad, tamaño y cantidad de toxina inoculada.
- b) De la víctima: edad, peso y estado físico general.
- c) Tiempo transcurrido entre la picadura y el acceso a la atención médica

Las características de los factores involucrados pueden originar diferentes grados de severidad del cuadro clínico como son los siguientes (19):

Grado I. Envenenamiento leve: Paciente asintomático o únicamente con dolor local, y parestesias en el área de la picadura.

Grado II. Envenenamiento moderado: Paciente con síntomas locales mas algún síntoma sistémico, sensación de cuerpo extraño en la laringe, sialorrea, disfagia, irritabilidad, taquicardia y disnea, entre otros.

Grado III. Las manifestaciones sistémicas son más extendidas y severas:

- a) *neurológicas*: visión borrosa, nistagmus, prurito nasal, sialorrea y disfagia entre otros.
- b) *neuromusculares*: piernas inquietas, fasciculaciones, calambres acentuados.
- c) *cardiovasculares*: hipertensión arterial, arritmias e insuficiencia cardiaca.

Grado IV. Cuando a pesar del tratamiento sintomático persisten cuando menos tres de las manifestaciones señaladas en el Grado III.

#### ***IV.4 TRATAMIENTO PARA ENVENENAMIENTO POR PICADURA DE ESCORPIÓN *Centruroides****

---

En algunos países, las creencias populares han ideado, desde hace siglos, numerosos remedios empíricos para sanar a las personas que han sido picadas por alacrán; ejemplos de esto son: la aplicación del escorpión en la zona afectada una vez frito, ingestión del mismo escorpión que produjo la picadura, aplicación de hierbas como la ruda e incluso “danzas terapéuticas”; sin embargo, estos remedios no forman parte de un tratamiento efectivo, por lo que resulta necesario recurrir al tratamiento médico.

El inicio del tratamiento médico se remonta a la década de 1920-1930 con la elaboración del suero antialacrán de origen equino dando lugar a los llamados seroterápicos de primera generación que eran sueros crudos de caballos hiperinmunizados, es decir, se le aplicaba a la gente gran cantidad de proteínas séricas irrelevantes que acompañaban a los anticuerpos (inmunoglobulinas), esto ocasionaba reacciones alérgicas y la llamada enfermedad del suero (reacción de hipersensibilidad tardía en la cual el sistema inmunológico reacciona contra ciertas proteínas del seroterápico) (20).

Más tarde, las inmunoglobulinas se fraccionaron de otras proteínas séricas, con esto se logró reducir las reacciones alérgicas. Estos productos constituidos por inmunoglobulinas enriquecidas son llamados seroterápicos de segunda generación, los cuales aún se utilizan a nivel mundial.

Por ejemplo, en E. U. A. en casos severos de envenenamiento se han utilizado seroterápicos de segunda generación cuya eficacia es variada. Sin embargo, el uso de estos antivenenos es controversial debido a que todos ocasionan efectos adversos e implican cuidados extremos al paciente y suministro cuidadoso de otros medicamentos (21).

En los años 40 y 50, estudios sobre el efecto de enzimas proteolíticas en inmunoglobulinas fueron la base para la posterior purificación y digestión de estas proteínas mediante el uso de pepsina, dando como resultado fragmentos  $F(ab')_2$  eliminando la fracción de la inmunoglobulina que genera respuestas inmunológicas secundarias, reduciendo así, sus propiedades

inmunogénicas y antigénicas. Esto constituye la seroterapia de tercera generación o faboterapia (20).

En México la faboterapia se propone como una solución al problema de alacranismo ya que se han desarrollado faboterápicos polivalentes obteniendo buenos resultados; entre los faboterápicos desarrollados se encuentra un antialacrán conocido con el nombre comercial Alacramyn® el cual se produce por hiperinmunización de caballos utilizando un macerado de glándulas de veneno pertenecientes a especies peligrosas (*Centruroides noxius*, *C. limpidus limpidus*, *C. limpidus tecomanus* y *C. suffusus suffusus*). Los anticuerpos producidos por el caballo son digeridos enzimáticamente con pepsina y liofilizados; este faboterápico tiene reacción cruzada con otras especies del género *Centruroides*, por lo que proporciona una amplia protección contra alacranes peligrosos de este género (22). Cifras recabadas de diferentes instituciones de salud en México muestran una estadística de 666,476 dosis aplicadas de este faboterápico con cero efectos secundarios (23).

En general, el tratamiento médico aplicado a pacientes intoxicados con veneno de alacrán consta de la aplicación de algún antiveneno ya sea constituido por inmunoglobulinas completas IgG (aprox. 150 KDa) o fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (aprox. 115 KDa).

Otros medicamentos que suelen ser utilizados como auxiliares en el tratamiento médico son: analgésicos (como acetaminofén), barbitúricos, medicamentos sedativos en su mayoría benzodiazepinas (ej. Midazolam), antihistamínicos (ej. difenhidramina) e hipnóticos, pero su uso es altamente discutible (24).

Existen otros medicamentos que se han utilizado pero que actualmente se contraindican, entre ellos están: meperidina, codeína, morfina y otros opiáceos (que pueden deprimir los centros respiratorios), gluconato de calcio (carece de indicación médica debido a que el calcio sérico se encuentra elevado) y atropina (que se suma al efecto propio del veneno y favorece el desarrollo de íleo paralítico) (24).

## ***IV.5 VENENONEMIA COMO UN MARCADOR DE EFECTIVIDAD EN EL USO DE ANTIVENENOS***

---

Actualmente los tratamientos médicos para pacientes con picadura de alacrán se basan principalmente en la aplicación de antivenenos, por ello es importante que éstos sean efectivos.

Para garantizar la efectividad en el uso de antivenenos es importante optimizar el protocolo terapéutico (25). La optimización de un protocolo terapéutico requiere una adecuada evaluación de parámetros toxicocinéticos del veneno en ausencia y presencia de antiveneno, el establecimiento de una relación entre contenido de veneno, grados de severidad y síntomas clínicos, así como el establecimiento de la vía de administración del antiveneno y el periodo de tiempo en que su aplicación es útil.

Para lo anterior, los estudios de venenonemia (medición de la concentración de veneno circulante en sangre) son sumamente útiles ya que permiten:

- El establecimiento de una relación cuantitativa de veneno circulante en sangre de pacientes envenenados con las observaciones clínicas y grados de severidad (26, 28).
- Conocer curvas toxicocinéticas mediante la cuantificación de veneno circulante en sangre a diferentes tiempos hasta su eliminación (29).
- Saber si el antiveneno tiene efecto sobre la cantidad de veneno circulante mediante la comparación de niveles de veneno cuantificado en pacientes tratados con antiveneno vs. pacientes no tratados con antiveneno (29, 30).
- Contribuir a la elección de la mejor vía de administración de antiveneno comparando el efecto en la cantidad de veneno circulante en sangre (29, 31).
- Conocer el efecto en la cantidad de veneno circulante en sangre de pacientes tratados con diferente frecuencia de aplicación de antiveneno (29).

## IV.6 ELISA COMO MÉTODO ANALÍTICO

Se han desarrollado varios métodos para detectar veneno de animales como serpientes, arañas y escorpiones, entre los que se incluyen radioinmunoensayos, inmunoensayos de fluorescencia, hemaglutinación e inmunoensayos tipo ELISA.

La técnica de ELISA, cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su denominación inglesa (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), es un procedimiento que se basa en la interacción antígeno-anticuerpo, uno de estos componentes es inmovilizado sobre un soporte sólido, se hace uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima que al actuar produce una señal cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. Importantes contribuciones al mejoramiento de la especificidad, sensibilidad, rapidez y relativa sencillez del inmunoensayo tipo ELISA lo hacen un método ideal para la detección y cuantificación de veneno y antiveneno en fluidos biológicos.

Los anticuerpos son inmunoglobulinas secretadas por linfocitos B. La unidad estructural básica de un anticuerpo consta de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas formando una molécula en forma de “Y”. Los dominios variables de la cadena ligera ( $V_L$ ) y los dominios variables de la cadena pesada ( $V_H$ ) constituyen los lugares de unión al antígeno, mientras que los dominios constantes de las cadenas pesadas ( $C_H$ ) establecen interacciones funcionales con otras moléculas del sistema inmunitario (Figura 7) (32).

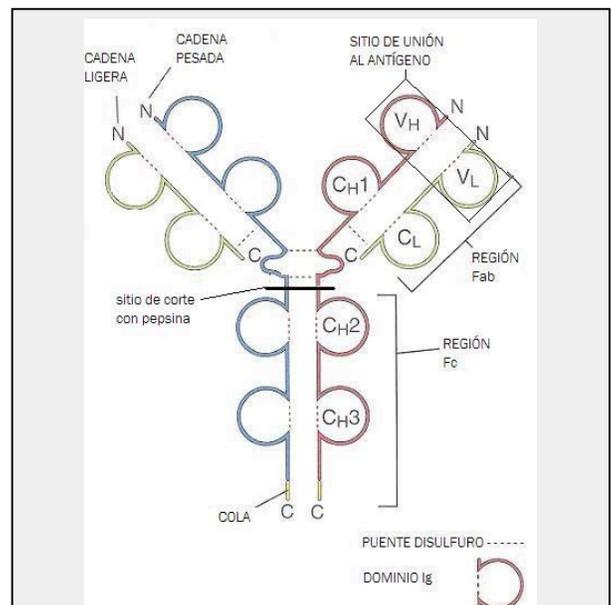


Figura 7. Esquema de una Inmunoglobulina G  
 N: región amino terminal; C: región carboxilo terminal; se muestra el sitio de corte con pepsina que genera un fragmento  $F(ab')_2$

**-Preparación de anticuerpos-**

Las propiedades de los ensayos inmunológicos dependen principalmente de la calidad de los anticuerpos incorporados al ensayo. Las características del origen del anticuerpo repercuten enormemente en la especificidad y afinidad de su interacción con el antígeno. Anticuerpos con alta afinidad permiten detectar pequeñas cantidades de antígeno, esto es esencial en la producción de inmunoensayos con alta sensibilidad.

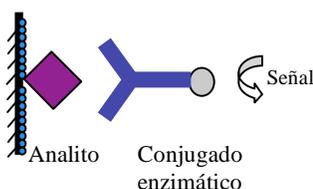
Existen tres formas principales para preparar anticuerpos:

- Anticuerpos policlonales: se obtienen del suero de animales inmunizados (típicamente conejos, cabras o caballos) con una mezcla o componente del antígeno de interés. Esta preparación consta de una mezcla de anticuerpos con diferente afinidad y especificidad.
- Anticuerpos monoclonales: Son anticuerpos específicos para un antígeno producidos *in vitro* mediante un hibridoma de linfocitos B (una línea celular obtenida por la fusión de un solo linfocito B normal con una línea tumoral de linfocitos B inmortales). Cada anticuerpo monoclonal interacciona con una región particular del antígeno (epítipo), por lo cual son altamente específicos.
- Anticuerpos recombinantes: Son fragmentos de anticuerpos producidos mediante ingeniería genética en bacterias.

**-Tipos de ELISA-**

Existen varios tipos de ELISA diseñados para distintos fines tales como la cuantificación de antígeno o anticuerpo. A continuación se describen los más comunes.

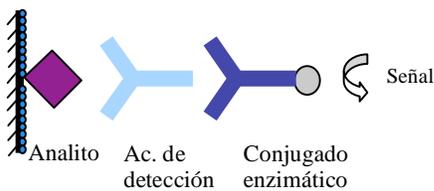
- *ELISA directo*: Las placas de ELISA se preparan recubriendo los pozos con las soluciones



en las que se sospecha se encuentra el analito, después se incuban con anticuerpos marcados, e.g. conjugados enzimáticos, que indican la presencia del analito. Es necesario incluir controles negativos que son muestras del mismo tipo de las analizadas pero sin el antígeno buscado.

Asimismo se incluyen controles positivos que son soluciones donde está presente el analito.

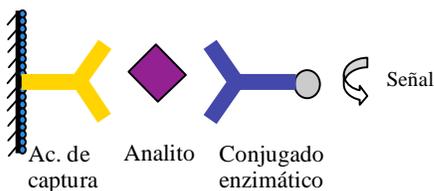
- *ELISA indirecto*: Las placas de ELISA se preparan de una forma idéntica a la anterior. Los



controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos : uno primario o detector que reconoce al analito, y uno conjugado que reconoce al detector. En este tipo de ensayo, la detección tiene mayor sensibilidad por

presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos conjugados por cada detector.

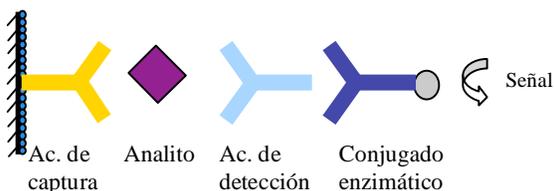
- *ELISA tipo sandwich*: Los pozos de la placa de ELISA se recubren con un primer anticuerpo



anti-analito. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el analito, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo; después de un segundo lavado, que elimina el material no retenido, se aplica una

solución con un segundo anticuerpo marcado anti-analito. De esta manera, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca.

- *ELISA tipo doble sandwich*: Los pozos de la placa son sensibilizados con anticuerpos de



captura. Las muestras que contienen analito son incubadas para permitir la captura del mismo por parte de los anticuerpos en la fase sólida. Después de remover el exceso de muestra, los pozos son incubados con los

anticuerpos de detección para, después de lavar, incubarlos con el conjugado anticuerpo-enzima que reconoce a los anticuerpos detectores.

Este ensayo es altamente sensible debido a la amplificación de señal generada por el segundo anticuerpo. (En este tipo de ensayo se basa la presente tesis).

La sensibilidad de una ELISA tipo doble sandwich depende principalmente de cuatro factores:

- 1- El número de moléculas del anticuerpo de captura que son unidas a la fase sólida
- 2- La avidéz del primer anticuerpo por el antígeno
- 3- La avidéz del segundo anticuerpo por el antígeno
- 4- La actividad específica del conjugado enzimático.

La cantidad de anticuerpo de captura que se une a la fase sólida puede ser optimizada ajustando la dilución o concentración de la solución de anticuerpo. El uso de la inmunopurificación por cromatografía de afinidad es muy común en la optimización del método. La actividad específica del conjugado enzimático es determinada por el número y tipo de moléculas marcadas que contiene.

### ***-Fases del ELISA-***

#### *Fijación del anticuerpo de captura o antígeno a la fase sólida*

La reacción inmunológica: antígeno (analito)-anticuerpos se lleva a cabo en una fase sólida que puede ser de plástico, vidrio o nitrocelulosa. Actualmente las placas de ELISA mas utilizadas son de plástico particularmente las de poliestireno y las de cloruro de polivinilo. El anticuerpo o antígeno diluido en solución es adherido a la fase sólida por enlaces no covalentes entre los sitios "pegajosos" del plástico y las regiones de la proteína responsables de esta interacción. La estabilidad de las interacciones, el tiempo de incubación y la temperatura son factores importantes que pueden afectar la sensibilidad del ensayo.

#### *Reacción antígeno-anticuerpo*

La interacción antígeno-anticuerpo es reversible y está mediada por diferentes interacciones no covalentes como son los puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van Der Waals, cuando la proximidad del antígeno y anticuerpo es grande.

La reacción del antígeno con el anticuerpo se debe realizar en condiciones similares a las fisiológicas, estas condiciones pueden variar dentro de un rango razonable sin afectar la reacción, el tiempo de incubación puede variar de 1 a 3 horas. Moléculas no específicas en solución pueden adherirse a la fase sólida afectando el resultado final del ensayo, para disminuir este riesgo se suele agregar al medio de reacción un exceso de una proteína inerte para que compita eficientemente por los sitios de unión inespecíficos en la fase sólida, esta proteína puede ser seroalbúmina bovina, caseína, gelatina u otras. También es necesario añadir al medio Tween 20 para evitar uniones inespecíficas de macromolécula, por este motivo es agregado en las soluciones de dilución (solución vehículo) y de lavado.

#### *Uso de anticuerpos conjugados y generación de señal*

En la técnica de ELISA, los anticuerpos conjugados son utilizados para generar una señal y amplificar el sistema. El marcaje de anticuerpos incluye principalmente enzimas, fluoróforos y biotina.

Enzimas: Los anticuerpos son conjugados a enzimas para amplificar la señal mediante las propiedades catalíticas de la enzimas. Las enzimas comúnmente utilizadas son fosfatasa alcalina (PA) y peroxidasa de rábano (HRP).

- La HRP tiene un peso aproximado de 40,000 Daltones, posee cadenas de carbohidratos que son usadas típicamente para conjugarla a anticuerpos o estreptavidina. La HRP lleva a cabo la descomposición del peróxido de hidrógeno en  $H_2O$  y  $\frac{1}{2} O_2$  ; los radicales de oxígeno, entonces, reaccionan con alguna sustancia que, al oxidarse, se vuelve colorida. A estas sustancias se les conoce como cromógenos y entre los más utilizados están: ABTS [2,2-azino-di (3-etil-benzatiazolina)] y TMB (3,5,3',5'-tetrametilbenzidina). El ABTS produce un color verde con una absorbancia máxima a 405 nanómetros (nm). El TMB produce un color azul con una absorbancia máxima a 650 nm, cuando se acidifica para parar la reacción se produce un color amarillo cuya máxima absorbancia es a 450 nm.

- La PA tiene un peso aproximado de 100,000 Daltones. Para esta enzima el sustrato más comúnmente utilizado es p-nitrofenil fosfato (pNPP) que produce un color amarillo con absorbancia máxima a 405 nm.

Los criterios a tomar en cuenta en la selección de la enzima apropiada o el anticuerpo conjugado comercial son su estabilidad, disponibilidad y sensibilidad.

La fase final del ELISA es la medición de la señal ya sea de fluorescencia, quimioluminiscencia o colorimétrica; comúnmente se utiliza un agente desnaturizante que permite parar la reacción y realizar la medición correspondiente. En el caso de la señal colorimétrica de un ensayo doble sandwich, la coloración que se obtenga será proporcional a la cantidad de conjugado pegado al complejo del anticuerpo de detección, el que a su vez es proporcional a la cantidad de analito; la cuantificación del analito se obtiene generando una curva de calibración (absorbancia en función de concentraciones conocidas de analito también llamadas soluciones de referencia).

---

## ***IV.7 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS***

---

En el área de investigación biomédica e industria farmacéutica los inmunoensayos son métodos analíticos frecuentemente aplicados para cuantificar moléculas indicadoras de progreso o regresión de una enfermedad y para evaluar la seguridad y eficacia de un medicamento tal como un antiveneno.

En la industria farmacéutica, todos los métodos analíticos que respaldan las Buenas Prácticas de Manufactura y estudios clínicos deben estar validados antes de su implementación.

En este contexto, el término validación significa generar evidencia documentada mediante la cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método analítico satisface los requisitos para la aplicación deseada.

Desde el año 1990 surgen las primeras conferencias sobre el tema de validación de métodos bioanalíticos en la industria farmacéutica. La primera reunión de agencias regulatorias de E. U. A. (Food and Drug Administration, FDA), Canadá (Health Protection Branch) y diferentes organizaciones científicas, dio origen a los primeros lineamientos para la validación de inmunoensayos. En ese mismo año se llevó a cabo la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, por sus siglas en inglés) que también analiza y aporta recomendaciones en el área de validación de inmunoensayos así como de métodos cromatográficos. Más tarde, durante la reunión anual de la American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) en 1998, se discutió rigurosamente la importancia de validar los inmunoensayos, lo que dio origen a la publicación de una guía por parte de la FDA (*Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*) para abordar aspectos de validación de los inmunoensayos usados para estudios en seres humanos. Actualmente han surgido guías para la documentación de las validaciones de métodos analíticos así como nuevas normas que conforman un marco regulativo general para la industria farmacéutica (33, 34, 36).

El proceso de validación de un método particular se basa en principios científicos adecuados y es optimizado para propósitos prácticos de medición. La adecuabilidad de un método analítico se mide en función de sus parámetros de desempeño que son establecidos en función del propósito analítico del método (35).

Típicamente los parámetros de desempeño de una validación son los siguientes:

- Linealidad

La linealidad de un método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son directamente proporcionales a la concentración del analito de interés presente en la muestra, dentro de un intervalo determinado.

- Exactitud

Expresa el grado de concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

- **Precisión**

Expresa el grado de concordancia (o de dispersión) entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra.

- **Precisión intermedia**

Expresa la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

- **Estabilidad analítica de la muestra**

Es la propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de estar almacenada durante determinado tiempo bajo condiciones específicas. Generalmente se evalúa la estabilidad a corto y a largo plazo.

- **Límite de detección**

Determina la concentración mínima del analito en una muestra que puede ser medida en forma confiable, es decir, que es claramente diferenciable del blanco, bajo las condiciones de operación establecidas.

- **Límite de cuantificación**

Es la concentración mínima y máxima del analito en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

- **Especificidad**

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra por ejemplo anticoagulantes.

- Selectividad

Se define como la capacidad del método analítico para medir y diferenciar el analito de interés en condiciones donde pudieran presentarse otros componentes en la muestra por ejemplo: antibióticos.

- Recuperación

Eficiencia de extracción o cuantificación de un método analítico, reportada como porcentaje de la cantidad conocida de analito contenido en una muestra llevando a cabo la cuantificación de la misma mediante el método.

- Robustez

Es una medida de la capacidad del método de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método (e.g., diferentes temperaturas, concentración de reactivos, pH, etc ).

- Tolerancia

Mide el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de las muestras bajo una variedad de condiciones demandantes de análisis (e.g., diferentes equipos, diferentes proveedores de material tal como placas de ELISA, etcétera).

En la validación de un método analítico, los parámetros de desempeño deben cumplir criterios de aceptación los cuales son límites numéricos, intervalos u otra medida apropiada para admitir los resultados del método analítico. Los criterios de aceptación varían en función del propósito analítico del método, así como de su naturaleza.

Los criterios de aceptación específicos para métodos cuyo propósito es cuantificar el analito y se trabaja con matrices de tipo biológicas, son los siguientes (34):

- Tendencia del recobro de 80 a 120%
- Coeficiente de variación (CV)  $\leq 20$  % (El coeficiente de variación se estima dividiendo la desviación estándar entre la media aritmética, y el resultado es multiplicado por 100).
- Coeficiente de correlación de la curva de calibración mínimo de 0.98

---

---

## **V. OBJETIVOS**

### ***OBJETIVO GENERAL***

---

Desarrollar, optimizar y validar un método analítico ELISA tipo sandwich para cuantificar veneno de escorpión *Centruroides* en plasma de pacientes tratados con Alacramyn® y en pacientes tratados por otros medios.

### ***OBJETIVOS PARTICULARES***

---

- Desarrollar y optimizar el método analítico ELISA tipo sandwich estableciendo las condiciones óptimas de cada componente del método, para su uso en la cuantificación de veneno de escorpión del género *Centruroides* en plasma humano.
- Validar el método analítico ELISA tipo sandwich, verificando su adecuabilidad y el cumplimiento de los criterios de aceptación predeterminados para los parámetros de desempeño regulatorio que son linealidad y precisión del sistema, exactitud y linealidad del método, precisión intermedia del método, estabilidad de las muestras de plasma con veneno, límites bajo y alto de cuantificación, así como selectividad del método.
- Aplicar el método desarrollado, optimizado y validado para la cuantificación de veneno de escorpión del género *Centruroides* en plasma de pacientes sujetos a un estudio clínico.

---

---

## **VI. METODOLOGÍA Y RESULTADOS**

---

### ***VI.1 DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO TIPO ELISA***

---

Se desarrolló y optimizó un método analítico ELISA tipo sandwich sensible para veneno de escorpión del género *Centruroides*, esto consistió en la obtención y selección de los inmunoreactivos tales como antígeno (veneno de escorpión *Centruroides*), anticuerpos de captura (F(ab')<sub>2</sub> de caballo), anticuerpos primarios o de detección (suero hiperinmune de conejo anti veneno de *Centruroides limpidus limpidus*), anticuerpos secundarios acoplados a una enzima (IgG de cabra anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano), sustrato de revelado y las diluciones óptimas de los inmunoreactivos.

#### ***VI.1.1 Obtención de veneno de escorpión***

---

El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica del telson de escorpiones *Centruroides limpidus limpidus* (C.l.l.). El contenido proteico se estimó por espectrofotometría asumiendo que una unidad de absorbancia a 280 nm es equivalente a 1 mg/mL de proteína. Para los experimentos de validación del inmunoensayo tipo ELISA se utilizó veneno comercial (Spider Farm, Arizona) de *Centruroides sculpturatus* (C.s.) y se cuantificó de la misma manera.

#### ***VI.1.2 Obtención de plasma humano***

---

El plasma humano fue donado y certificado por el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, folio No. 82, código 7005. Se generó un stock de trabajo mezclando la cantidad total de plasma.

### **VI.1.3 Obtención de anticuerpos de captura**

---

Los anticuerpos de captura se obtuvieron inmunopurificando la fracción  $F(ab')_2$  de Alacramyn® específica para el veneno de escorpión *Centruroides l.l.* mediante cromatografía de afinidad.

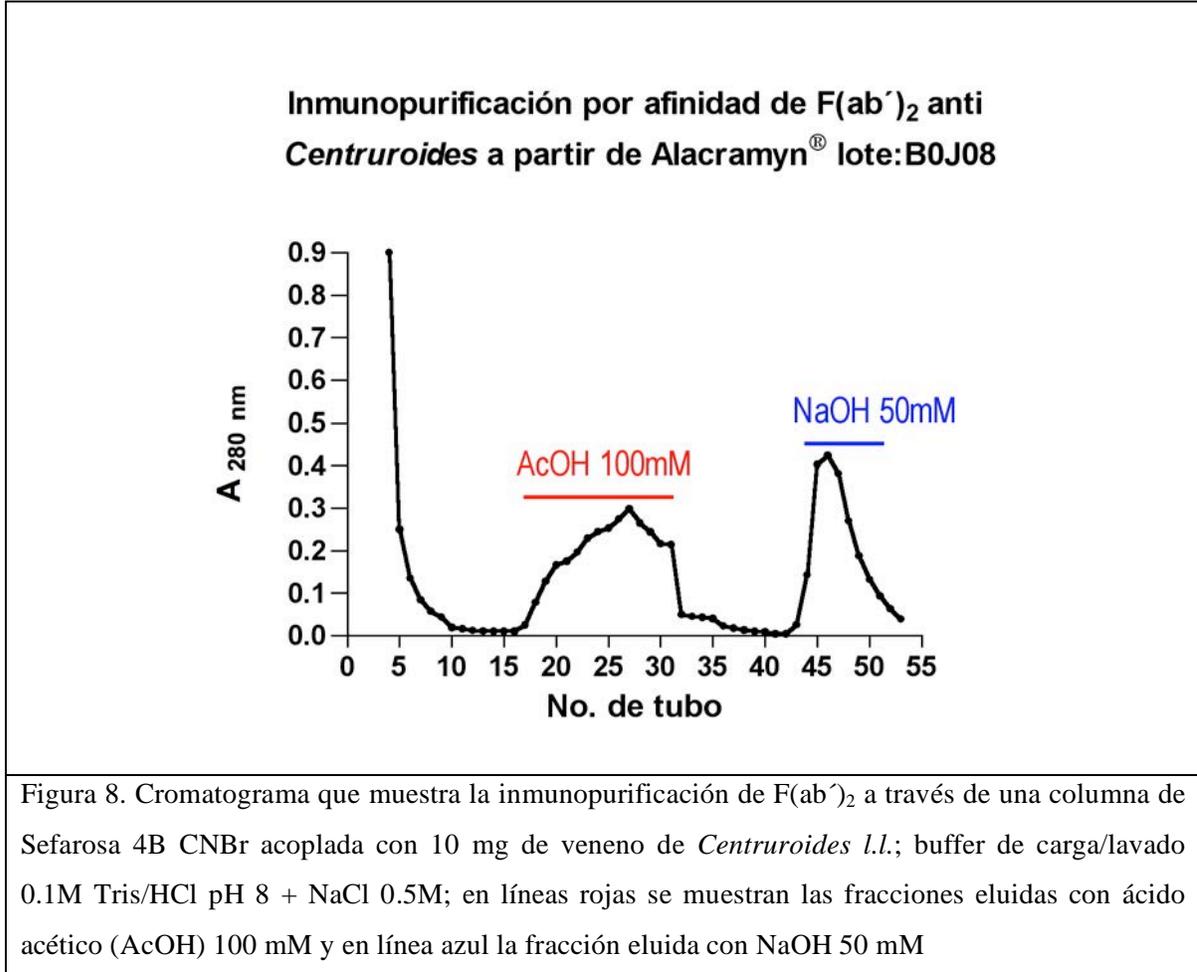
#### **- Cromatografía de afinidad -**

La cromatografía de afinidad se basa en la interacción específica y reversible entre una proteína o grupo de proteínas (llamado genéricamente afinante) y una molécula particular (denominada ligando) acoplada a una matriz porosa. Las interacciones entre ligando y afinante pueden ser electrostáticas, hidrofóbicas, fuerzas de Van Der Waals y/o puentes de hidrógeno. La proteína de interés puede ser eluida por cambios de pH, competencia con un ligando específico o inespecífico, fuerza iónica o polaridad (27).

A resina de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr) se acoplaron 10 mg de veneno de *Centruroides l.l.* cuantificados por absorbancia a 280 nm, mediante el protocolo que se muestra en el apéndice X.1.

A través de la columna de resina acoplada con veneno se pasaron 87.1 mg totales de antiveneno Alacramyn® (dos viales del lote B0J08) en buffer de carga/lavado (0.1 M Tris/HCl pH 8.0 + NaCl 0.5 M)

La elución se realizó con ácido acético (AcOH) 100 mM e hidróxido de sodio (NaOH) 50 mM, se midió absorbancia a 280 nm, en total se recuperaron 4.61 mg totales de  $F(ab')_2$  específicos. Las fracciones eluidas con ácido o con base fueron colectadas en tubos con 0.5mL de 1M Tris/HCl pH 8 con el objeto de neutralizar inmediatamente el pH (Figura 8).



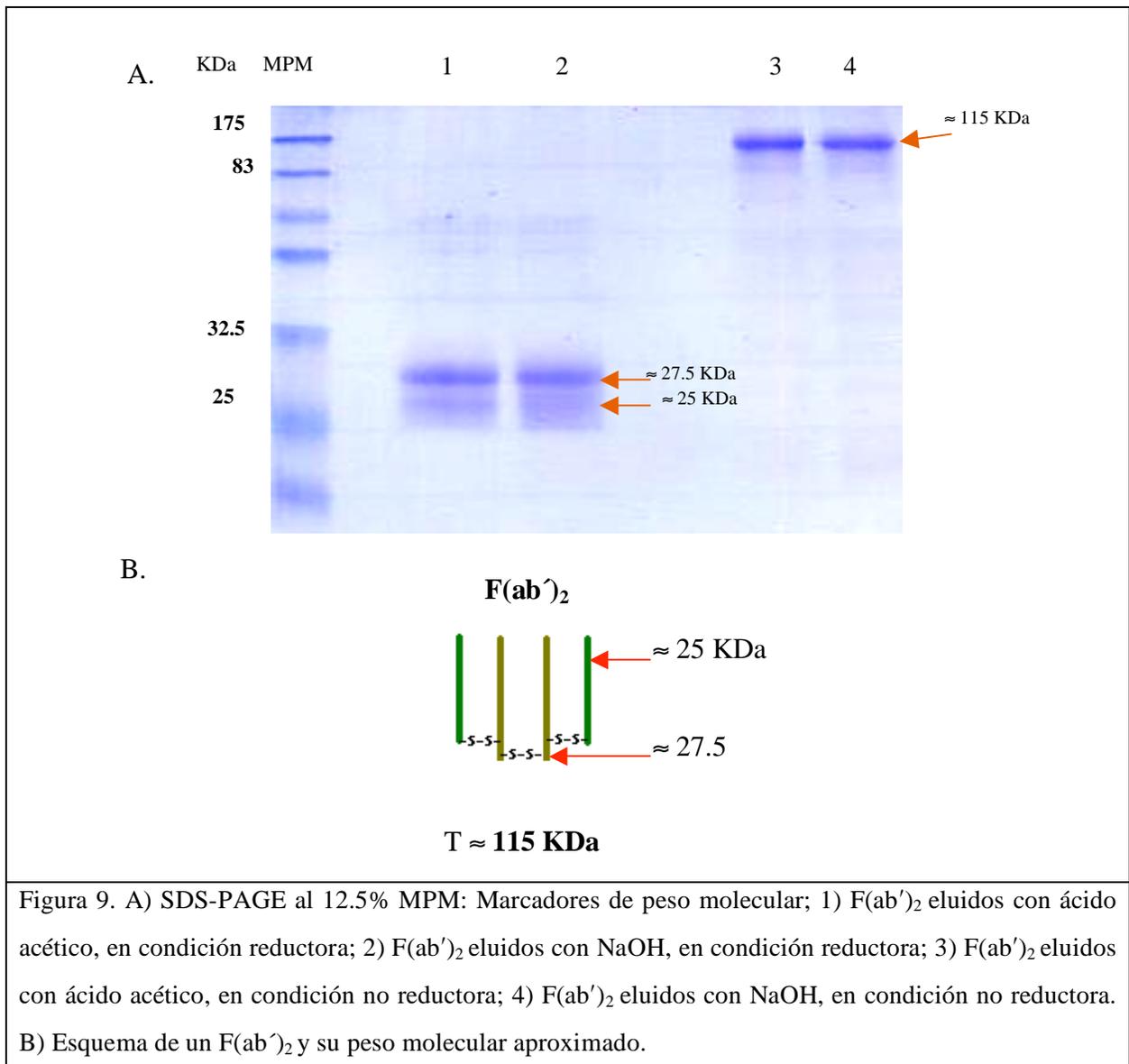
### ***-SDS-PAGE de los $F(ab')_2$ inmunopurificados-***

La obtención de  $F(ab')_2$  mediante cromatografía de afinidad se comprobó corriendo una muestra del eluido en gel de poliacrilamida.

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de detergente dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) se basa en la separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular (PM) el cual se estima comparando su movilidad relativa con proteínas de PM conocido.

Los F(ab')<sub>2</sub> eluidos con ácido acético 100 mM y con hidróxido de sodio 50 mM se corrieron separadamente en un gel de poliacrilamida al 12.5%, en condiciones reductoras (con β-mercaptoetanol) y no reductoras, a 50 Volts en el gel concentrador y 100 Volts en el gel separador. Se cargaron 2.4 μg de F(ab')<sub>2</sub> eluidos con ácido acético 100 mM y 2.7 μg de F(ab')<sub>2</sub> eluidos con hidróxido de sodio 50 mM. (Apéndice X.3)

Las muestras corridas en el gel tuvieron el peso molecular esperado: aproximadamente 115 KDa para F(ab')<sub>2</sub> completos y aproximadamente 25 y 27.5 KDa para los F(ab')<sub>2</sub> en condiciones reductoras (Figura 9).



#### **VI.1.4 Anticuerpos de detección anti veneno de *Centruroides***

---

Como anticuerpos de detección se utilizó suero de conejo hiperinmune anti *Centruroides l.l.*

A partir de un stock homogéneo se hicieron alícuotas las cuales se almacenaron a -20°C, solo la alícuota en uso se conservó a 4°C durante máximo una semana, transcurrido este tiempo se utilizó otra alícuota de las almacenadas a -20°C conservándose durante su uso a 4°C y así sucesivamente; esto con la finalidad de mantenerlo libre de contaminación. El suero hiperinmune se utilizó en dilución con solución vehículo. En los ensayos de ELISA descritos posteriormente en esta tesis, se indica la dilución realizada del suero hiperinmune.

#### **VI.1.5 Principio del ensayo tipo ELISA para cuantificar veneno de escorpión *Centruroides***

---

El ELISA desarrollado es del tipo doble sandwich. Los anticuerpos de captura están constituidos por fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de caballo específicos para veneno de escorpión *Centruroides l.l.* Los anticuerpos de detección son suero hiperinmune de conejo anti- veneno de escorpión *Centruroides l.l.* Los anticuerpos conjugados a enzima son IgG de cabra anti-IgG de conejo unidos a peroxidasa de rábano (Figura 12).

Descripción del inmunoensayo tipo ELISA:

1. Para la realización del ELISA, se utilizan placas Maxisorp (Nunc) cuyos pozos son sensibilizados con una solución de 5 µg/mL de anticuerpo de captura en buffer de sensibilización [100 mM Carbonato/Bicarbonato pH 9,5] (Apéndice X.4). Se colocan 100 µL/pozo de la solución y se incuba la placa durante 2 horas a temperatura ambiente (T. A.) o toda la noche a 4 °C.

2. Después de lavar la placa tres veces con 250  $\mu$ L/pozo de solución de lavado 1X (Apéndice X.4); el exceso de sitios de pegado se bloquea con gelatina para evitar la unión inespecífica de componentes indeseables a la superficie de los pozos, para ello se colocan 200  $\mu$ L/pozo de solución de bloqueo (Apéndice X.4) y se incuba la placa durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lava la placa tres veces con 250  $\mu$ L/pozo de solución de lavado 1X [50 mM Tris/HCl pH 8 + 150 mM NaCl + 0,05% Tween 20] .

3. En seguida se incuba con veneno para permitir la captura del mismo por parte de los anticuerpos en fase sólida. Se prepara una curva de calibración cuyas características dependen de la fase en desarrollo del ELISA -por lo que se especifican en el apartado de cada experimento de esta tesis-. Una vez colocado el veneno, la placa se incuba durante una hora a T.A. Posteriormente se lava tres veces con 250  $\mu$ L/pozo, de solución de lavado 1X .

4. Después de remover el exceso de muestra mediante el lavado, los pozos se incuban con los anticuerpos de detección durante una hora a T.A.

5. Posteriormente se lava la placa tres veces con 250  $\mu$ L/pozo de solución de lavado 1X. Se incuba con el conjugado enzimático durante una hora a T.A.

6. Después de lavar la placa tres veces con 250  $\mu$ L/pozo de solución de lavado 1X, se agrega peróxido de hidrógeno y un cromógeno que, oxidado por el oxígeno atómico generado por la descomposición del peróxido, genera un producto colorido. Para este efecto se incuba la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente después se detiene la reacción enzimática con un agente desnaturizante que se deja actuar durante 5 minutos y se procede a leer la absorbancia. La coloración que se obtenga será proporcional a la cantidad de conjugado pegado al complejo del anticuerpo de detección el que a su vez es proporcional a la cantidad de veneno en la muestra.

Finalmente, se construye una curva de calibración graficando la absorbancia en función de las concentraciones de veneno usadas como referencia.

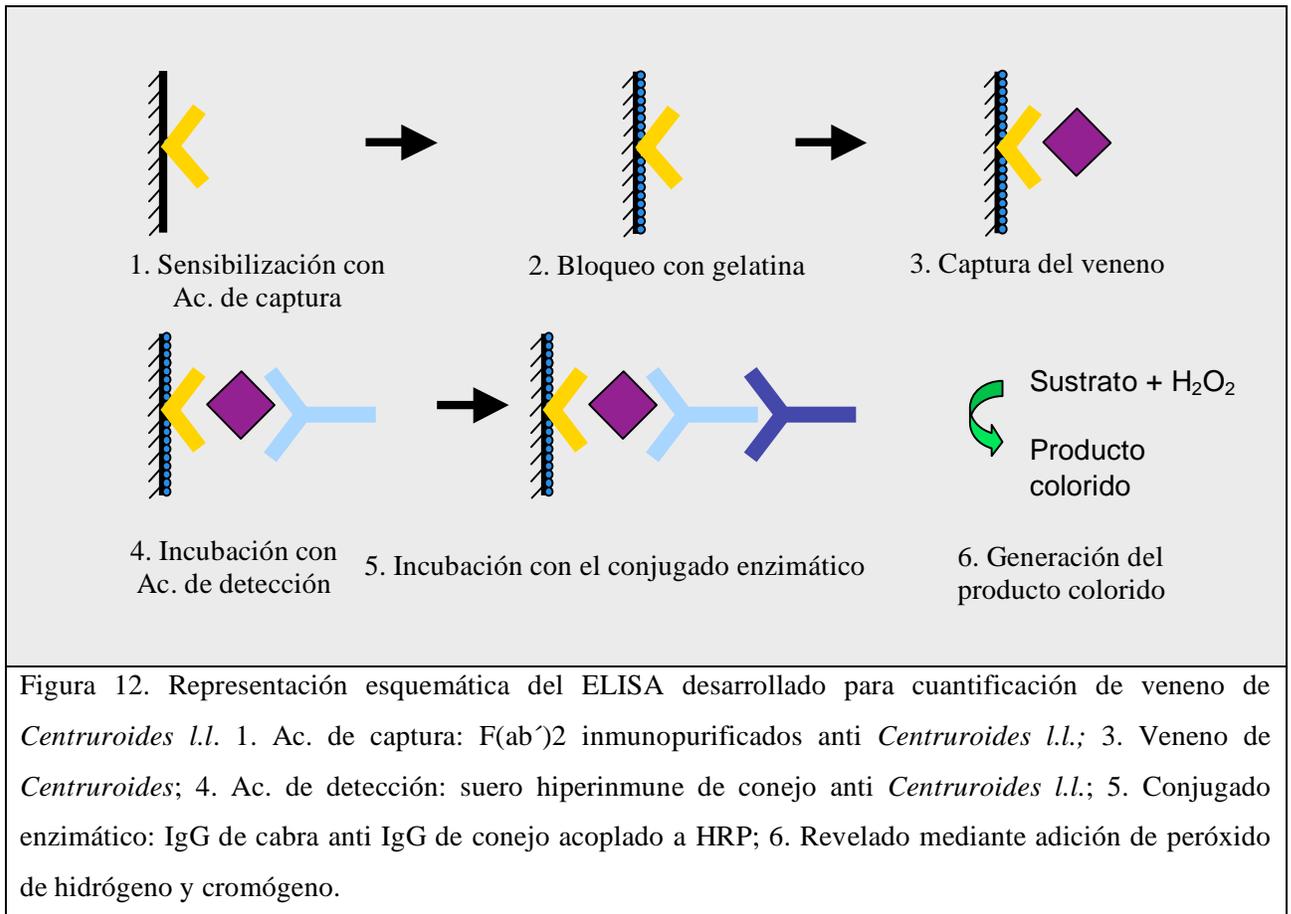


Figura 12. Representación esquemática del ELISA desarrollado para cuantificación de veneno de *Centruroides l.l.* 1. Ac. de captura: F(ab)<sup>2</sup> inmunopurificados anti *Centruroides l.l.*; 3. Veneno de *Centruroides*; 4. Ac. de detección: suero hiperinmune de conejo anti *Centruroides l.l.*; 5. Conjugado enzimático: IgG de cabra anti IgG de conejo acoplado a HRP; 6. Revelado mediante adición de peróxido de hidrógeno y cromógeno.

### ***VI.1.6 Selección de dilución óptima de anticuerpos primarios o de detección***

---

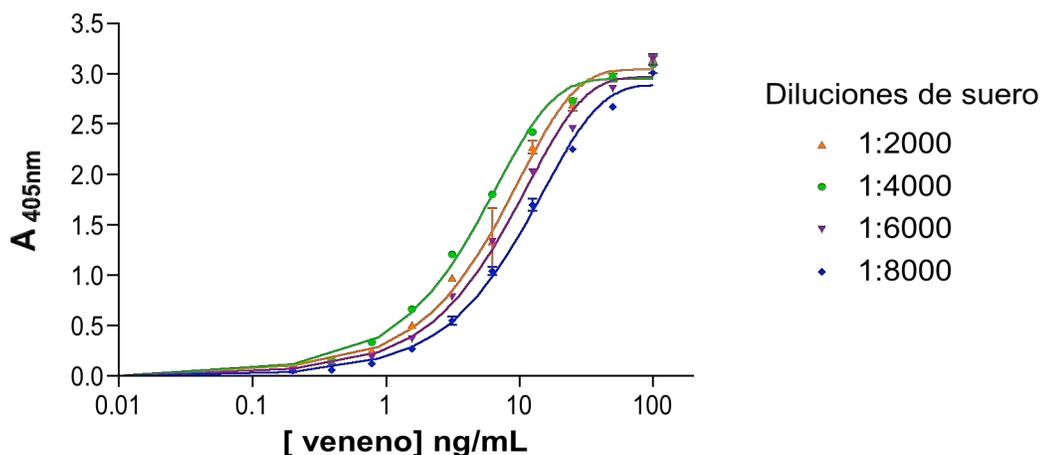
Se realizó un ELISA conforme al método anteriormente descrito. En una placa se evaluaron por duplicado diferentes diluciones de suero hiperinmune de conejo anti veneno de *Centruroides l.l.* (anticuerpos de detección): 1:2000, 1:4000, 1:6000 y 1:8000 en solución vehículo. Se colocaron 100  $\mu$ L/pozo de conjugado enzimático (IgG de cabra anti IgG de conejo-HRP) en dilución 1:1000; se reveló con 100  $\mu$ L/pozo de ABTS, después de 10 minutos se detuvo la reacción adicionando 100  $\mu$ L/pozo de SDS al 5% , después de 5 minutos se leyó absorbancia a 405 nm. Posteriormente se procesaron los datos realizando una curva de calibración de absorbancia en función de concentración de veneno (Figura 13).

La curva de calibración se hizo por duplicado, se construyó iniciando con 100 ng/mL de veneno en solución vehículo en la columna 1 de la placa de ELISA y realizando diluciones seriadas 1:2 hasta la columna 10 donde se llegó a una concentración de 0.195 ng/mL. Las últimas dos columnas de la placa corresponden a los blancos: sin veneno (columna 11) y sin veneno ni anticuerpo de captura (columna 12).

Los resultados fueron procesados en Microsoft excel y en PRISMA Version 4.0 b utilizando un análisis de regresión no lineal con pendiente variable (modelo sigmoideal, dosis-respuesta). En la siguiente página se muestran las curvas generadas en PRISMA así como la tabla de valores generados a partir del modelo sigmoideal.

A.

**Curvas de calibración con diferentes diluciones de suero de conejo hiperinmune anti veneno de *Centruroides* -Anticuerpos de detección-**



B.

Curvas con su correspondiente dilución de anticuerpos de detección				
Parámetros	1:2000	1:4000	1:6000	1:8000
LLD (ng/mL)	0.195	0.195	0.195	0.376
EC 50	7.41	4.81	8.88	11.93
Top	3.29	3.16	3.30	3.23

Figura 13. A) Curvas de calibración resultantes de ELISA, cada curva representada es el promedio de un duplicado. Condiciones del ELISA: Ac. captura F(ab')<sub>2</sub> anti veneno de *Centruroides l.l.*; Antígeno: veneno de *Centruroides l.l.*; Ac. de Detección: Suero hiperinmune de conejo anti veneno de *Centruroides l.l.*; Conjugado enzimático: IgG de cabra anti IgG de conejo acoplado a HRP; Sustrato de revelado: ABTS. Cada una de las curvas resulta de una dilución diferente de anticuerpo de detección, se utilizó como diluyente solución vehículo. B) Tabla de resultados de las curvas de calibración; LLD: límite bajo de detección que indica la concentración mínima de veneno que se puede detectar, es calculado a partir del promedio de los valores de absorbancia de los blancos + 3 desviaciones estándar de los mismos, este valor es interpolado en la curva de calibración para obtenerlo en ng/mL; Top indica el valor máximo o punto mas alto de respuesta (absorbancia) generada en la curva; EC50 indica el valor de concentración de veneno en ng/mL a la cual se obtiene la mitad de la respuesta (absorbancia) entre el valor más bajo (bottom) y el valor más alto (Top) de la curva.

La dilución seleccionada de anticuerpo de detección fue 1:4000 debido a que generó una buena sensibilidad sustentada por el límite bajo de detección de 0.195 ng/mL y un mejor comportamiento de EC50 respecto a las otras curvas con diferente dilución ya que a un menor valor de concentración de veneno (4.81 ng/mL) se obtuvo la mitad de la respuesta (absorbancia) generada entre el valor más bajo (bottom) y el valor más alto (Top) de la curva (Figura 13).

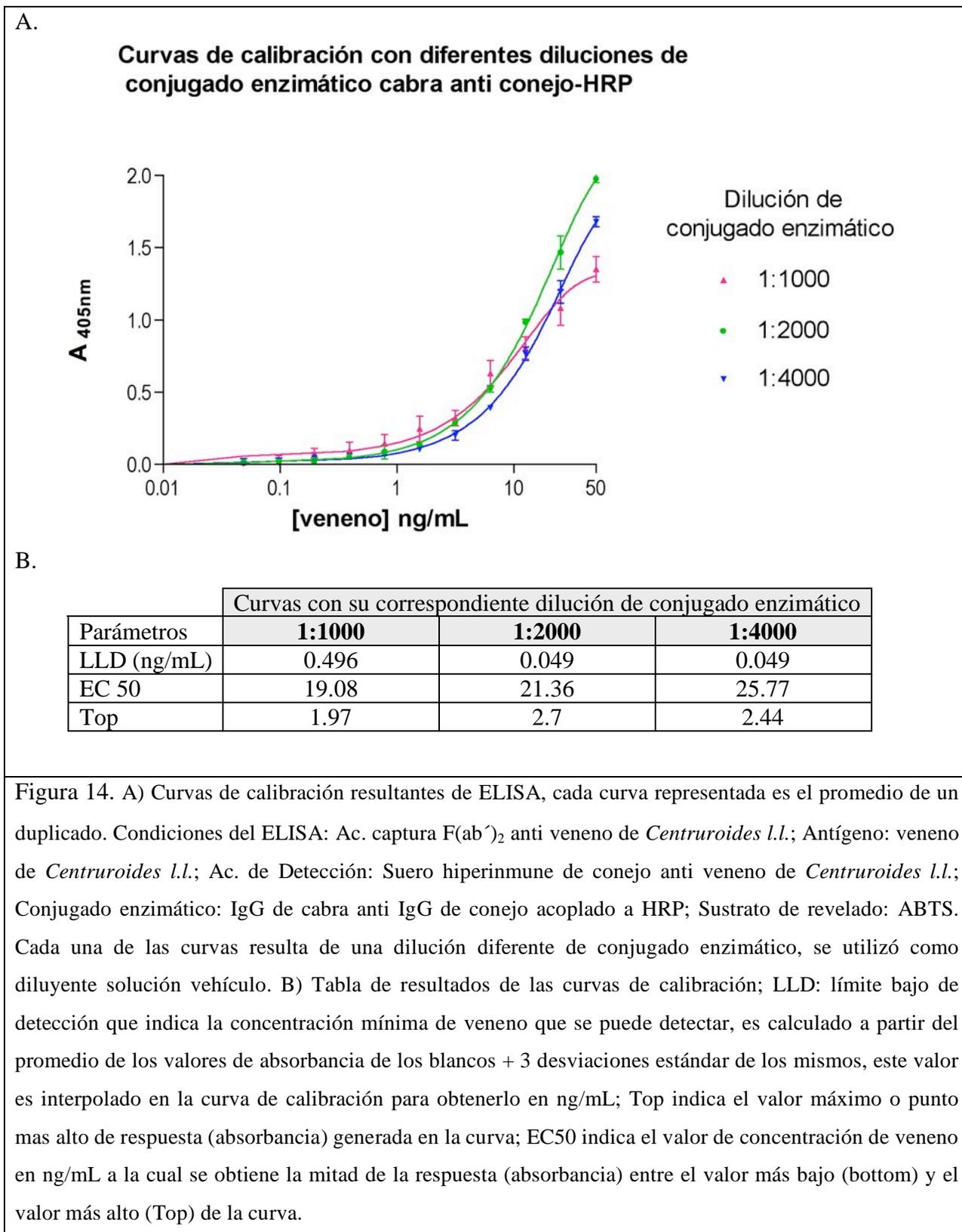
### ***VI.1.7 Selección de dilución óptima de conjugado enzimático***

---

Se realizó una ELISA conforme al método descrito en el apartado VI.1.5. En una placa se evaluaron por duplicado las diferentes diluciones de conjugado enzimático: 1:1000, 1:2000 y 1:4000 en solución vehículo. Se colocaron 100 µL/pozo de anticuerpo detector (suero hiperimmune de conejo anti veneno de *Centruroides l.l.*) en dilución 1:4000; el revelado se realizó agregando 100 µL/pozo de ABTS, después de 10 minutos se detuvo la reacción adicionando 100 µL/pozo de SDS al 5% , después de 5 minutos se leyó absorbancia a 405 nm. Posteriormente se procesaron los datos realizando una curva de calibración de absorbancia en función de concentración de veneno (Figura 14).

La curva de calibración se hizo por duplicado, se construyó iniciando con 50 ng/mL de veneno en solución vehículo en la columna 1 de la placa de ELISA y realizando diluciones seriadas 1:2 hasta la columna 11 donde se llegó a una concentración de 0.049 ng/mL. Las última columna de la placa corresponden al blanco: sin veneno (columna 12).

Los resultados se procesaron en Microsoft excel y en PRISMA Version 4.0 b utilizando un análisis de regresión no lineal con pendiente variable (modelo sigmoidal, dosis-respuesta). A continuación se muestran las curvas y valores generados en PRISMA y excel.



La dilución seleccionada de conjugado enzimático fue 1:2000, se obtuvo buena sensibilidad sustentada por su límite bajo de detección de 0.049 ng/mL. Además se observó en esta dilución la señal mas alta de respuesta referente a absorbancia a 450 nm lo cual se corrobora con el valor del Top mostrado en las curvas y tabla de la figura 14.

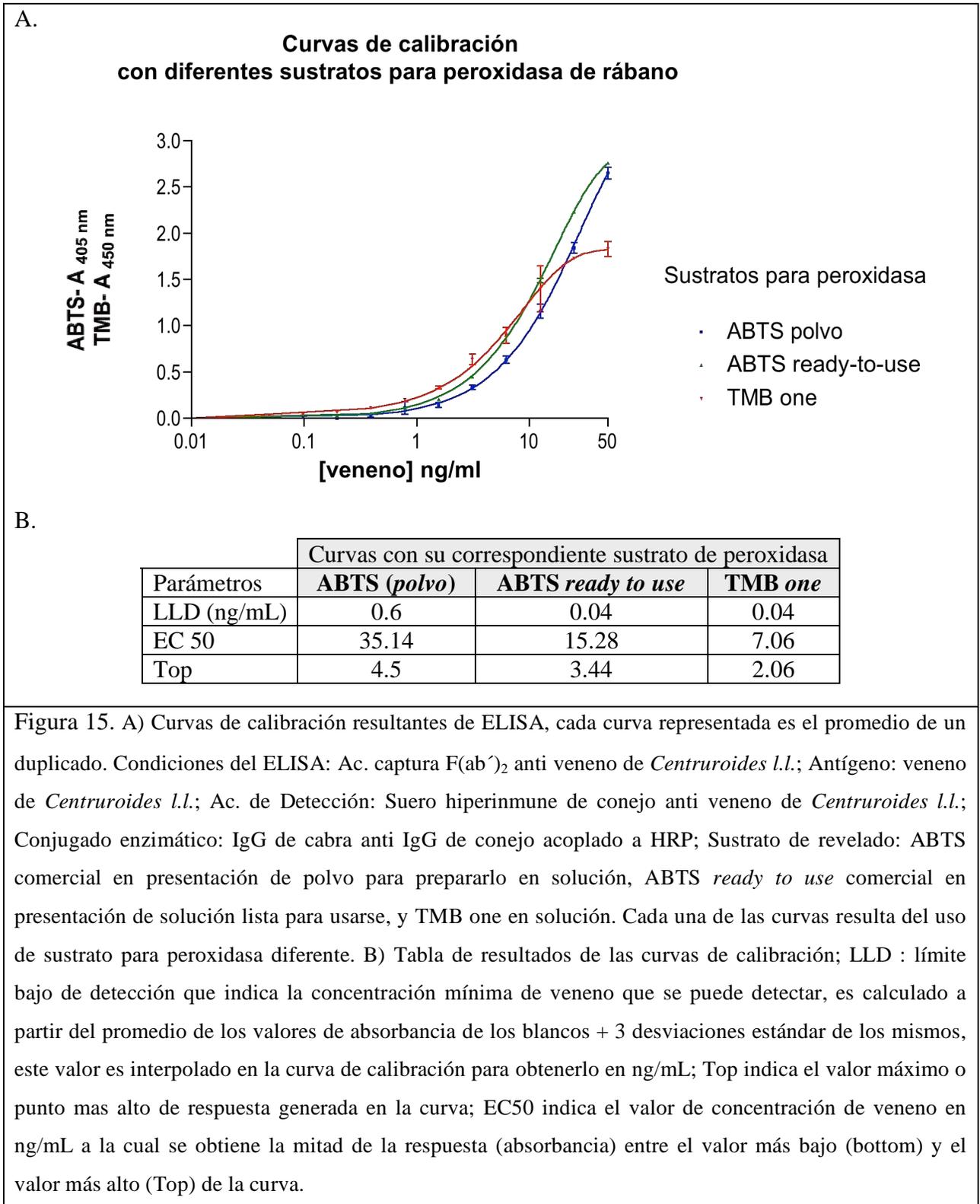
### ***VI.1.8 Selección de sustrato para peroxidasa***

---

Se realizó un ELISA conforme al método descrito en el apartado VI.1.5, con las siguientes especificidades: incubación con anticuerpo detector a una dilución de 1:4000; incubación con conjugado enzimático a una dilución de 1:2000. Se compararon en curvas por duplicado, los sustratos de peroxidasa: ABTS comercial en presentación de solución lista para usar de Roche® (ABTS *ready to use*), ABTS en presentación en polvo para preparar solución de trabajo (Roche®) y TMB one en solución lista para usarse (KEM EN TEC Diagnostics) dejándolos reaccionar durante 10 minutos, posteriormente se detuvo la reacción con SDS 5% (100µL/pozo) para ABTS, y con *Enhanced stopping solution* de KEM-EN-TEC-Diagnostics (100µL/pozo) para TMB, después de 5 minutos se leyeron las absorbancias: a 405 nm para ABTS y a 450 nm para TMB. Posteriormente se procesaron los datos realizando una curva de calibración de absorbancia en función de concentración de veneno (Figura 15).

La curva de calibración se hizo por duplicado, se construyó iniciando con 50 ng/mL de veneno en solución vehículo en la columna 1 de la placa de ELISA y realizando diluciones seriadas 1:2 hasta la columna 11 donde se llegó a una concentración de 0.049 ng/mL. Las última columna de la placa corresponde al blanco: sin veneno (columna 12).

Al igual que en los casos anteriores, los resultados se procesaron en Microsoft excel y en PRISMA Version 4.0 b utilizando un análisis de regresión no lineal con pendiente variable (modelo sigmoidal, dosis-respuesta). En la siguiente página se muestran las curvas y valores generados en PRISMA y excel



El sustrato de peroxidasa seleccionado fue ABTS ready to use (Roche®) ya que generó una buena sensibilidad sustentada por su límite bajo de detección de 0.04 ng/mL. Aunque con TMB one se obtuvo el mismo límite bajo de detección es importante señalar que con ABTS ready to use se obtuvo la señal mas alta de respuesta referente a absorbancia a 450 nm lo cual se corrobora con el valor del Top mostrado en las curvas y tabla de la figura 15.

En la figura 16 se muestra el esquema de ELISA desarrollado y optimizado que fue posteriormente sujeto a validación.

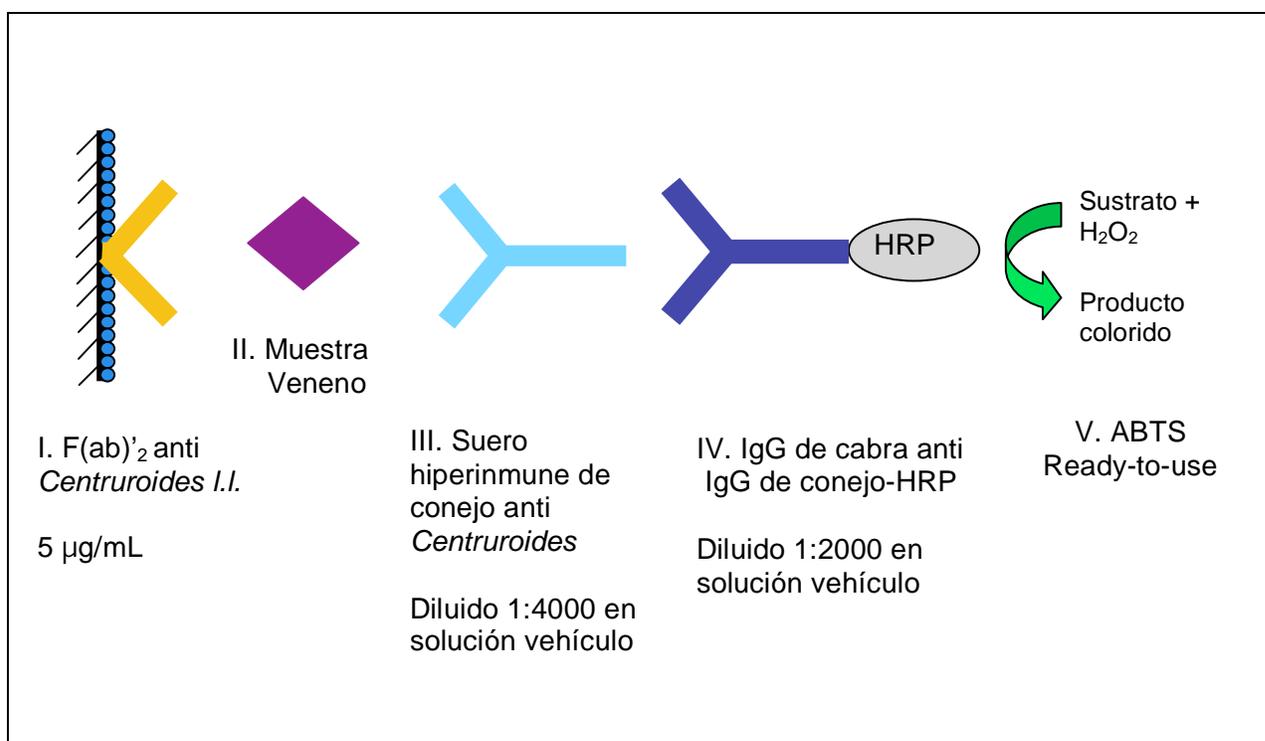


Figura 16. Esquema del ELISA desarrollado y optimizado.

I. Sensibilización con veneno con F(ab)<sub>2</sub> anti *Centruroides l.l.*, 5 µg/mL, 100 µL/pozo; II. Captura de veneno: Muestra o analito (veneno de *Centruroides*); III. Incubación con anticuerpo de detección: Suero hiperinmune de conejo anti *Centruroides l.l.* diluido 1:4000 en solución vehículo, 100 µL/pozo; IV. Incubación con conjugado enzimático: IgG de cabra anti IgG de conejo, acoplado a HRP, diluido 1:2000 en solución vehículo, 100 µL/pozo; V. Revelado: ABTS ready to use (Roche®) 100µL/pozo; posteriormente se detiene la reacción con SDS 5%, 100µL/pozo y se lee la absorbancia a 405 nm.

---

## **VI.2 VALIDACIÓN MÉTODO ANALÍTICO TIPO ELISA**

---

Para validar el método analítico tipo ELISA anteriormente desarrollado y optimizado (Figura 16) se realizó la evaluación de los siguientes parámetros de desempeño:

- ***Linealidad y precisión del sistema***
- ***Recuperación de veneno***
- ***Exactitud, linealidad y repetibilidad del método***
- ***Precisión intermedia del método***
- ***Estabilidad a corto plazo en hielo seco de muestras de plasma adicionadas con veneno***
- ***Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación de muestras adicionadas con veneno***
- ***Estabilidad a largo plazo a -20 °C de muestras de plasma adicionadas con veneno***
- ***Límite bajo de cuantificación***
- ***Límite alto de cuantificación***
- ***Selectividad y especificidad del método***

El procedimiento en detalle del ELISA fue el siguiente:

### 1) Sensibilización con anticuerpo de captura [F(ab')<sub>2</sub> de caballo inmunopurificados]

Se preparó una solución de anticuerpo de captura a una concentración de 5 µg/mL en buffer de sensibilización [100 mM Carbonato/Bicarbonato pH 9.5]. Se colocaron 100 µL/pozo de la solución y se incubó la placa durante dos horas a T.A. o toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó la placa tres veces con 250 µL/pozo de solución de lavado 1X.

## 2) Bloqueo con gelatina

Se colocaron 200  $\mu\text{L}$ /pozo de solución de bloqueo [50 mM Tris/HCl pH 8 + 5 mg/mL gelatina + 0.2% Tween 20] y se incubó la placa durante dos horas a T.A. Posteriormente se lavó la placa tres veces con 250  $\mu\text{L}$ /pozo de solución de lavado 1X.

## 3) Captura del veneno

La incubación con veneno, se realizó utilizando como diluyente solución vehículo [50 mM Tris/HCl pH 8 + 0.5 M NaCl + 1mg/mL gelatina + 0.05% Tween 20] o plasma según el parámetro de desempeño a evaluar.

Dependiendo el experimento, el plasma utilizado fue:

- Plasma deslipidizado: Se deslipidizó con cloroformo, 1 parte de cloroformo por 2 partes de plasma, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se removió la fase superior que contenía el plasma deslipidizado.
- Plasma tratado: plasma deslipidizado y diluido 1:2 con solución vehículo.

### a) Preparación de la curva de calibración

La curva de calibración se colocó por triplicado en la placa de análisis.

Para la preparación de la curva de calibración, en todos los pozos de las filas A, B y C de las columnas uno a la doce de la placa de ELISA, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución diluyente (solución vehículo o plasma tratado según el caso); en la columna uno de cada una de las tres filas (A, B y C) se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la solución de 100 ng/mL de veneno de escorpión *Centruroides*, y se hicieron diluciones seriadas 2X hasta llegar a la columna 11, (la columna 12 fue el blanco y no contenía veneno). De esta manera, se generó por triplicado la siguiente escalera de concentraciones de veneno (ng/mL): 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.391, 0.195, 0.098, 0.049, de la columna 1 a la 11, respectivamente.

b) Preparación de muestras adicionadas con veneno

La preparación de las soluciones de veneno varió dependiendo del parámetro de desempeño a evaluar, por lo que este punto se especifica en el apartado correspondiente a cada experimento de evaluación.

Una vez colocado el veneno en la placa, ésta se incubó durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se lavó la placa 3 veces con 250  $\mu$ L / pozo de solución de lavado 1X.

Es importante señalar que la validación del método analítico se realizó utilizando veneno de *Centruroides sculpturatus* ( *C.s* ) debido a que las muestras de plasma de pacientes a cuantificar con el método validado, es de esta especie. Cabe aclarar que el desarrollo y optimización se realizó utilizando veneno de *Centruroides limpidus limpidus* ( *C.l.l.* ) , esto fue debido a que durante el desarrollo del método no se disponía de la cantidad suficiente de veneno de *C. s.* para realizar los ensayos, ya que tan solo para acoplar a la columna de sefarosa utilizada en cromatografía de afinidad se requerían 10 mg más lo necesario para llevar a cabo los inmunoensayos. Antes de iniciar los ensayos de validación se realizó un inmunoensayo comparando el uso de los dos venenos con lo cual se demostró que no hay diferencia significativa en las curvas de calibración (Apéndice X.5)

4) Incubación con el anticuerpo de detección

Se preparó una dilución (con solución vehículo) 1:4000 de anticuerpo de detección. Se colocaron 100  $\mu$ L/pozo de la dilución y se incubó la placa durante una hora a T.A. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se lavó 3 veces la placa con 250  $\mu$ L /pozo de solución de lavado 1X.

5) Incubación con el conjugado enzimático

Se preparó una dilución (con solución vehículo) 1:2,000 de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados a peroxidasa. Se colocaron 100  $\mu$ L/pozo de la dilución y se incubó la placa durante una hora a T.A. Posteriormente, se lavó 3 veces la placa con 250  $\mu$ L /pozo de solución de lavado 1X.

## 6) Desarrollo del color

Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  /pozo de sustrato de peroxidasa (ABTS ready-to-use) y se incubó la placa durante 10 minutos a T.A.; inmediatamente después se adicionaron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de solución de paro [SDS 5%], se deja actuar durante 5 minutos y enseguida se lee la absorbancia a 405 nm.

## 7) Análisis de los resultados

Los datos obtenidos se analizaron con el programa GraphPad Prism Versión 4.0 b utilizando un análisis de regresión no lineal con pendiente variable (modelo sigmoidal, dosis-respuesta). Se realizó un análisis de varianza a los resultados de los parámetros de desempeño en evaluación.

Una vez analizados los datos, se contrastaron con los criterios de aceptación definidos para cada parámetro de desempeño.

Todas las curvas de calibración generadas en la evaluación de dichos parámetros, para ser aceptables, tenían necesariamente que cumplir satisfactoriamente los siguientes criterios de ajuste al modelo logístico de 4 parámetros:

- 1) El valor estimado (top) que representa la mayor concentración de veneno en la curva (50 ng/mL), debe ser mayor al valor estimado (bottom) que representa la menor concentración de veneno (0.049 ng/mL) en una diferencia  $\geq 1.8$ .
- 2) El intervalo de confianza (IC95%) para el parámetro hill slope (pendiente de Hill), debe ser positivo.
- 3) El valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe ser como mínimo 0.98
- 4) El coeficiente de variación de regresión ( $CV_{x/y}$ ) no debe exceder el 10%.

### ***VI.2.1 Evaluación de linealidad y precisión del sistema***

---

Se verificó la adecuabilidad de las características de linealidad y precisión del sistema con muestras de veneno de *Centruroides* y curvas de calibración en solución vehículo.

Para ello, se determinó la concentración de veneno en soluciones de referencia (muestras adicionadas) a 3 niveles de concentración conocida (27, 9 y 3 ng/mL) por sextuplicado, mediante diluciones independientes; utilizando el método analítico ELISA.

En cada placa de análisis se incluyó una curva de calibración por triplicado en solución vehículo; por lo que para completar el sextuplicado de los 4 niveles de concentración midiendo cada replica por triplicado, se corrieron 2 placas de análisis.

#### ***CRITERIOS DE ACEPTACIÓN***

##### ***Precisión del sistema.***

Para la predicción inversa de la concentración adicionada:

- ▣ El CV por placa de análisis y global a cada nivel de concentración adicionada no debe exceder el 10%.

##### ***Linealidad del sistema.***

Para la relación concentración adicionada vs. predicción inversa de la concentración adicionada:

- ▣ El efecto de concentración debe ser altamente significativa ( $Pr F_{cal} < 0.01$ ).
- ▣ El valor de  $r^2$  no debe ser menor de 0.98 y/o la prueba de falta de ajuste al modelo lineal no debe ser significativa ( $Pr F_{cal} > 0.05$ ).
- ▣ No debe existir efecto de placa ni de la interacción placa/concentración ( $Pr F_{cal} > 0.05$ ).
- ▣ El CV del error puro ( $CV_{ep}$ ) no debe exceder del 10%.

**- Resultados de la evaluación de linealidad y precisión del sistema-**

**CONTRASTACIÓN CON LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Ajuste al modelo logístico de 4 parámetros para curvas en solución vehículo

REQUISITO	RESULTADO		OBSERVACIÓN
	CURVA 1	CURVA 2	
La diferencia entre el valor de $A_{405nm}$ más alto (top) y el valor más bajo (bottom) de la curva sigmoide debe ser $\geq 1.8$	TOP = 2.707 BOTTOM = 0.0132	TOP = 1.833 BOTTOM = 0.0176	Sí cumple con el requisito
El IC95% para el parámetro pendiente-, debe ser positivo.	1.151 a 1.442	1.208 a 1.456	
El valor de $r^2$ debe ser como mínimo 0.98	0.997	0.997	
El $CV_{y/x} \leq 10\%$ .	7.91	6.07	

Precisión del sistema

REQUISITO	RESULTADO				OBSERVACIÓN
	CONCENTRACIÓN (ng/mL)	PLACA 1	PLACA 2	GLOBAL	
El CV por placa de análisis y global a cada nivel de concentración adicionada; no debe exceder el 10%.	3	4.41	4.4	4.4	Sí cumple con el requisito
	9	2.41	6.59	4.5	
	27	8.05	4.35	6.2	

Linealidad del sistema

REQUISITO	RESULTADO	OBSERVACIÓN
El efecto de concentración debe ser altamente significativa (Pr Fcal < 0.01).	Pr Fcal= 0.00001	Sí cumple con el requisito
El valor de $r^2$ no debe ser menor de 0.98 y/o la prueba de falta de ajuste no debe ser significativa (Pr Fcal > 0.05)	$r^2 = 0.99$	
No debe existir efecto de placa ni de la interacción placa/concentración (Pr Fcal > 0.05).	Pr Fcal (placa) = 0.828 Pr Fcal (placa/concentración) = 0.299	
El CVep $\leq$ 10%.	8.02	

### CONCLUSIONES

- La relación entre la concentración (log) y absorbancia observada en las curvas de calibración se ajustó a un modelo logístico de 4 parámetros en el intervalo de 0,049 a 50 ng/mL.
- La variación de la concentración interpolada es aceptable en el intervalo 3 a 27 ng/mL.
- La relación concentración de veneno adicionada en función de la concentración interpolada (predicción inversa) es lineal, es homogénea entre placas de análisis y su variación es aceptable.

#### ***VI.2.2 Evaluación de recuperación de veneno***

Se estimó el porcentaje de recuperación y la variación de la cantidad recuperada en muestras de plasma adicionadas con veneno utilizando curvas de calibración en solución vehículo.

Para ello, se cuantificaron las concentraciones de muestras de veneno en plasma tratado, las muestras fueron preparadas de manera independiente a 3 niveles de concentración (27, 9 y 3 ng/mL) por sextuplicado.

**CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

*Repetibilidad del porcentaje de recuperación.*

Para el porcentaje de recuperación:

- ▣ El CV a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma, no debe exceder el 15%
- ▣ El coeficiente de variación basado en el error (CVe), no debe exceder el 15%

**- Resultados de recuperación de veneno -**

**CONTRASTACIÓN CON LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Ajuste al modelo logístico de 4 parámetros para curva en plasma tratado

REQUISITO	RESULTADO	OBSERVACIÓN
La diferencia entre el valor de $A_{405nm}$ más alto (top) y el valor más bajo (bottom) de la curva sigmoide debe ser $\geq 1.8$	TOP = 2.46 BOTTOM = -0.0086	Sí cumple con el requisito
El IC95% para el parámetro -pendiente-, debe ser positivo.	1.290 a 1.515	
El valor de $r^2$ debe ser como mínimo 0.98	0.998	
El $CV_{y/x} \leq 10\%$ .	6.05	

Porcentaje de recobro		RESULTADO
	CONCENTRACIÓN (ng/mL)	(%)
Media aritmética del porcentaje de recobro a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado	3	72.89
	9	73.65
	27	82.26

## Repetibilidad de la recuperación

REQUISITO		RESULTADO (%)	OBSERVACIÓN
	CONCENTRACIÓN (ng/mL)		
El CV por nivel de concentración adicionada de veneno en plasma, no debe exceder el 15%.	3	11.14	Sí cumple con el requisito
	9	11.50	
	27	12.69	
	CVe ≤ 15%		

*CONCLUSIONES*

- La relación entre la concentración (log) y la respuesta se ajustó a un modelo logístico de 4 parámetros en el intervalo de 0.049 a 50 ng/mL, para una curva en solución vehículo.
- La variación de la concentración recuperada del veneno en plasma es aceptable en el intervalo 3 a 27 ng/mL.
- La recuperación del veneno en plasma utilizando una curva de calibración en solución vehículo es mayor del 70% , de 3 a 27 ng/mL de veneno adicionado en el plasma.

***VI.2.3 Evaluación de exactitud, linealidad y repetibilidad del método***

Se verificó la exactitud, linealidad y repetibilidad del método para determinar el veneno presente en plasma.

Para cumplir con este objetivo, se prepararon de manera independiente muestras de plasma tratado adicionado con veneno a 3 niveles de concentración (3, 9 y 27 ng/mL) por quintuplicado (concentración adicionada).

Se determinó la concentración del veneno de las muestras preparadas utilizando una curva de calibración en plasma tratado (concentración recuperada).

**CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

*Exactitud y repetibilidad de método*

Para el porcentaje de recobro:

- ▣ La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120% a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma.
- ▣ El CV a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 15%.

*Linealidad de método*

Para la relación concentración adicionada – concentración recuperada de veneno en plasma tratado:

- ▣ El intervalo de confianza al 95% para la pendiente (IC(B<sub>1</sub>)) debe ser positivo.
- ▣ El efecto de la regresión debe ser altamente significativo (Pr Fcal < 0.01).
- ▣ La prueba de falta de ajuste al modelo lineal no debe ser significativa (Pr > 0.05).

**- Resultados de exactitud, linealidad y repetibilidad del método -**

**CONTRASTACIÓN CON LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Ajuste al modelo logístico de 4 parámetros para curva en plasma tratado

REQUISITO	RESULTADO	OBSERVACIÓN
La diferencia entre el valor de A <sub>405nm</sub> más alto (top) y el valor más bajo (bottom) de la curva sigmoide debe ser ≥ 1.8.	TOP = 2.103 BOTTOM = 0.00099	Sí cumple con el requisito
El IC95% para el parámetro –pendiente-, debe ser positivo.	1.273 a 1.488	
El valor de r <sup>2</sup> debe ser como mínimo 0.98	0.998	
El CVy/x no debe exceder el 10%.	5.66	

Exactitud y repetibilidad del método

REQUISITO		RESULTADO	OBSERVACIÓN
La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120% a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado.	CONCENTRACIÓN ADICIONADA (ng/mL)	(%)	Sí cumple con el requisito
	3	90	
	9	92.9	
27	119		
El CV a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 15%.	3	6.93	
	9	5.73	
	27	14.5	

Linealidad del método

REQUISITO	RESULTADO	OBSERVACIÓN
El IC(B <sub>1</sub> ) debe ser positivo.	1.1 - 1.32	Sí cumple con el requisito
El efecto de la regresión debe ser altamente significativo (Pr F <sub>cal</sub> < 0.01).	Pr F <sub>cal</sub> (Regresión) < 0.0001	
La prueba de falta de ajuste al modelo lineal no debe ser significativa (Pr > 0.05).	Pr F (Falta de ajuste) = 0.292	

Estos resultados se generaron a partir de un modelo de regresión lineal simple que relaciona concentración adicionada de veneno en ng/mL vs. concentración recuperada de veneno en ng/mL.

CONCLUSIONES

- La relación entre la concentración (log) y absorbancia observada en las curvas de calibración en plasma tratado se ajustó a un modelo logístico de 4 parámetros en el intervalo de 0,049 a 50 ng/mL.
- El método es exacto, repetible y lineal en el intervalo de 3 a 27 ng/mL del veneno en plasma tratado.

---

#### ***VI.2.4 Evaluación de precisión intermedia del método***

---

La reproducibilidad del método fue evaluada determinando la concentración de veneno en muestras utilizando el método analítico (concentración recuperada). Esta evaluación fue realizada por dos analistas en tres días diferentes.

En una placa de análisis se incluyó una curva de calibración por triplicado en plasma tratado, también se colocaron 3 muestras preparadas de manera independiente cada una por triplicado a 3 niveles de concentración adicionada de veneno en plasma tratado (3, 9 y 27 ng/mL).

#### ***CRITERIOS DE ACEPTACIÓN***

##### *Exactitud y precisión del método*

Para el porcentaje de recobro por cada analista:

- ▣ La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120% a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado.
- ▣ El CV a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 15%.
- ▣ El coeficiente de variación total (CV<sub>t</sub>), no debe exceder del 15%
- ▣ El coeficiente de variación del error (CV<sub>e</sub>) o error de método, no debe exceder el 15%.
- ▣ La  $Pr F_{cal} > 0.05$  para analista o su coeficiente de variación (CV<sub>ANA</sub>), no debe exceder el 15%.
- ▣ La  $Pr F_{cal} > 0.05$  para día / analista o su coeficiente de variación (CV<sub>DIA/ANA</sub>), no debe exceder el 15%.
- ▣ La  $Pr F_{cal} > 0.05$  para concentración o su coeficiente de variación (CV<sub>CON</sub>), no debe exceder el 15%
- ▣ La  $Pr F_{cal} > 0.05$  para la interacción analista / concentración o su coeficiente de variación (CV<sub>ANA/CON</sub>), no debe exceder el 15%.
- ▣ La  $Pr F_{cal} > 0.05$  para la interacción día / concentración / analista o su coeficiente de variación (CV<sub>DIA/CON/ANA</sub>), no debe exceder el 15%.

**- Resultados de precisión intermedia del método -**

**CONTRASTACIÓN CON LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Ajuste al modelo logístico de 4 parámetros para curva en plasma tratado

REQUISITO	DÍA	RESULTADO		OBSERVACIÓN
		Analista 1	Analista 2	
La diferencia entre el valor de $A_{405nm}$ más alto (top) y el valor más bajo (bottom) de la curva sigmoide debe ser $\geq 1.8$ .	1	TOP =2.61 BOTTOM=-0.003	TOP =2.7 BOTTOM=0.003	Sí cumple con el requisito
	2	TOP =2.32 BOTTOM=0.02	TOP =2.10 BOTTOM=0.004	
	3	TOP =2.51 BOTTOM=0.023	TOP =2.76 BOTTOM=0.004	
El IC95% para el parámetro -pendiente-, debe ser positivo.	1	1.09 a 1.34	1.18 a 1.201	
	2	1.2 a 1.31	1.4 a 1.52	
	3	1.21 a 1.36	1.1 a 1.17	
El valor de $r^2$ debe ser como mínimo 0.98	1	0.997	0.998	
	2	0.999	0.999	
	3	0.999	0.999	
El $CV_{y/x} \leq 10\%$ .	1	7.27	5.68	
	2	2.85	4.39	
	3	3.81	3.92	

## Exactitud y precisión del método

REQUISITO	ANALISTA	CONCENTRACIÓN ADICIONADA (ng/mL)	RESULTADO (%)	OBSERVACIÓN
La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse entre 80 a 120% a cada nivel de conc. de veneno en plasma tratado.	1	3	86.4	Sí cumple con el requisito
		9	83.8	
		27	85.5	
	2	3	80.8	
		9	91.5	
		27	109	
El CV a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 15%.	1	3	4.9	
		9	4.7	
		27	2.5	
	2	3	5.3	
		9	4	
		27	6.3	

## Exactitud y precisión del método

REQUISITO	RESULTADO (%) ó Pr	OBSERVACIÓN
El coeficiente de variación total (CVt), no debe exceder del 15%.	CVt = 11.4	Sí cumple con el requisito
El coeficiente de variación del error (CVe) del método, no debe exceder el 15%.	CVe = 4.3	
La Pr Fcal > 0.05 para analista o su coeficiente de variación (CV <sub>ANA</sub> ), no debe exceder el 15%.	CV <sub>ANA</sub> = 8	
La Pr Fcal > 0.05 para día / analista o su coeficiente de variación (CV <sub>DIA/ANA</sub> ), no debe exceder el 15%.	CV <sub>DIA/ANA</sub> = 2.1	
La Pr Fcal > 0.05 para concentración o su coeficiente de variación (CV <sub>CON</sub> ), no debe exceder el 15%	PrF cal = 0.52	
La Pr Fcal > 0.05 para la interacción analista/concentración o su coeficiente de variación (CV <sub>ANA/CON</sub> ), no debe exceder el 15%.	CV <sub>ANA/CON</sub> = 13.75	
La Pr Fcal > 0.05 para la interacción día/concentración / analista o su coeficiente de variación (CV <sub>DIA/CON/ANA</sub> ), no debe exceder el 15%.	PrF cal = 0.097	

### CONCLUSIONES

- La relación entre la concentración (log) y absorbancia observada en las curvas de calibración en plasma tratado, de los dos analistas/ tres días se ajustó a un modelo logístico de 4 parámetros en el intervalo de 0,049 a 50 ng/mL.
- El método es exacto y preciso en su ejecución por diferentes analistas y en diferentes días, en el intervalo de 3 a 27 ng/mL del veneno en plasma tratado.

#### ***VI.2.5 Evaluación de estabilidad a corto plazo en hielo seco de muestras de plasma adicionadas con veneno***

---

Se verificó la estabilidad del veneno en plasma en condiciones de almacenamiento en hielo seco que se pueden presentar durante la transportación de las muestras a evaluar con el método analítico. Para ello, en una placa de análisis se incluyó una curva de calibración por triplicado en plasma tratado; con 3 muestras cada una por triplicado a 3 niveles de concentración adicionada de veneno en plasma tratado (3, 9 y 27 ng/mL). Se corrieron dos placas de análisis una después de 48 horas de almacenaje de las muestras y otra después de 72 horas.

##### a) Preparación de la curva de calibración

La curva de calibración se preparó en plasma tratado.

##### b) Preparación de muestras adicionadas

Se prepararon de manera independiente las siguientes concentraciones de veneno en plasma: 54, 18 y 6 ng/mL, cada una por triplicado. Se colocaron durante 48 y 72 horas en hielo seco. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, se deslipidizaron conforme al protocolo antes mencionado y se diluyeron 1:2 con solución vehículo quedando a una concentración de 27, 9 y 3 ng/mL respectivamente. De las muestras 1:2 se colocaron 100 µL/pozo.

**CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

*Exactitud y precisión del método*

Para el porcentaje de recobro por cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado y para cada tiempo de muestreo:

- ▣ La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120% a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado.
- ▣ El CV a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 15%.
- ▣ El CVe no debe exceder el 15%.

**- Resultados de estabilidad a corto plazo en hielo seco de muestras de plasma adicionadas con veneno-**

CONTRASTACIÓN CON LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Ajuste al modelo logístico de 4 parámetros para curva en plasma tratado

REQUISITO	TIEMPO DE ALMACENAJE	RESULTADO	OBSERVACIÓN
La diferencia entre el valor de $A_{405nm}$ más alto (top) y el valor más bajo (bottom) de la curva sigmoide debe ser $\geq 1.8$	48 horas	TOP =2.16 BOTTOM=0.00 6	Sí cumple con el requisito
	72 horas	TOP =1.95 BOTTOM=0.02 2	
El IC95% para el parámetro - pendiente-, debe ser positivo.	48 horas	1.45 a 1.73	
	72 horas	1.33 a 1.53	
El valor de $r^2$ debe ser como mínimo 0.98	48 horas	0.998	
	72 horas	0.999	
El $CV_{y/x} \leq 10\%$ .	48 horas	6.81	
	72 horas	5.05	

## Exactitud y precisión de método

REQUISITO	TIEMPO EN HIELO SECO	CONCENTRACIÓN ADICIONADA (ng/mL)	RESULTADO (%)	OBSERVACIÓN
La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse entre 80 a 120% a cada nivel de conc.adicionada de veneno en plasma.	48 horas	3	98.9	Sí cumple con el requisito
		9	96.7	
		27	104	
	72 horas	3	84.3	
		9	82.2	
		27	96.1	
El CV a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 15%.	48 horas	3	6	
		9	2	
		27	5.7	
	72 horas	3	6.3	
		9	3.1	
		27	6.6	
El CVe $\leq$ 15%			5.3	Sí cumple con el requisito

## CONCLUSIONES

- La relación entre la concentración (log) y absorbancia observada en las curvas de calibración en plasma tratado se ajustó a un modelo logístico de 4 parámetros en el intervalo de 0,049 a 50 ng/mL.
- Las muestras son estables en hielo seco a las 48 y 72 horas en un intervalo de concentración de 3 a 27 ng/mL.
- La repetibilidad del método es aceptable ya que su coeficiente de variación del error es menor de 15%.

### ***VI.2.6 Evaluación de estabilidad en ciclos de congelación-descongelación de muestras de plasma adicionadas con veneno***

---

Se verificó la estabilidad del veneno al someter la muestra a dos ciclos de congelación-descongelación.

En una placa de análisis se incluyó una curva de calibración por triplicado en plasma tratado; en la misma placa, se colocó por triplicado cada nivel de concentración de veneno (27, 9 y 3 ng/mL) en plasma, de cada ciclo de congelación-descongelación.

#### Preparación de las soluciones de referencia

Se prepararon de manera independiente 6 muestras de cada una de las siguientes concentraciones de veneno en plasma deslipidizado: 54, 18 y 6 ng/mL. Se almacenaron durante 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , después se descongelaron a temperatura ambiente, 3 de las muestras de cada nivel de concentración se diluyeron 1:2 con solución vehículo quedando a una concentración de 27, 9 y 3 ng/mL, respectivamente. Las 3 muestras restantes se sometieron a un ciclo adicional con el mismo procedimiento. De cada muestra diluida 1:2 se colocaron 100  $\mu\text{L}$ /pozo.

### ***CRITERIOS DE ACEPTACIÓN***

#### *Exactitud y precisión del método*

Para el porcentaje de recobro por cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado y para cada ciclo de congelación/descongelación:

- ▣ La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120% a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado.
- ▣ El CV a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 15%.
- ▣ El CVe no debe exceder el 15%

**-Resultados de estabilidad en ciclos de congelación-descongelación de muestras de plasma adicionadas con veneno-**

**CONTRASTACIÓN CON LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Ajuste al modelo logístico de 4 parámetros para curva en plasma tratado

REQUISITO	RESULTADO	OBSERVACIÓN
La diferencia entre el valor de $A_{405nm}$ más alto (top) y el valor más bajo (bottom) de la curva sigmoide debe ser $\geq 1.8$	TOP = 2.02 BOTTOM=0.0213	Sí cumple con el requisito
El IC95% para el parámetro -pendiente-, debe ser positivo.	1.29 a 1.42	
El valor de $r^2$ debe ser como mínimo 0.98	0.9993	
El $CV_{y/x} \leq 10\%$ .	3.45	

Exactitud y precisión de método

REQUISITO	CICLO DE CONG/DESCONG.	CONCENTRACIÓN ADICIONADA (ng/mL)	RESULTADO (%)	OBSERVACIÓN
La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120% a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado.	1	3	91.9	Sí cumple con el requisito
		9	84.7	
		27	91.1	
	2	3	84.4	
		9	82.5	
		27	84.8	
El CV a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 15%.	1	3	5.1	Sí cumple con el requisito
		9	7.8	
		27	8.2	
	2	3	5.2	
		9	4.6	
		27	3.8	
El $CV_e \leq 15\%$			5.2	Sí cumple con el requisito

## CONCLUSIONES

- La relación entre la concentración (log) y absorbancia observada en las curvas de calibración en plasma tratado se ajustó a un modelo logístico de 4 parámetros en el intervalo de 0,049 a 50 ng/mL.
- Las muestras son estables a 2 ciclos de congelación – descongelación en un intervalo de concentración de 3 a 27 ng/mL.
- La repetibilidad del método es aceptable ya que su CVe es menor de 15%.

### ***VI.2.7 Evaluación de estabilidad a largo plazo a -20 °C de muestras de plasma adicionadas con veneno***

---

Se verificó la estabilidad de las muestras a 2 y 4 meses en condiciones normales de almacenamiento (-20°C). Para cada periodo establecido se corrió una placa de análisis en la cual se incluyó una curva de calibración por triplicado en plasma tratado; con 3 muestras de los 3 niveles de concentración adicionada de veneno en plasma deslipidizado.

Preparación de las soluciones de referencia:

Se prepararon de manera independiente 18 alícuotas de cada una de las siguientes concentraciones de veneno en plasma: 54, 18 y 6 ng/mL. Se almacenaron en congelador a -20°C ± 2°C, durante periodos establecidos de 2 y 4 meses, una vez cumplido el plazo se descongelaron a temperatura ambiente 3 alícuotas de cada nivel de concentración, se deslipidizaron conforme al protocolo anteriormente descrito y se diluyeron 1:2 con solución vehículo quedando a una concentración de 27, 9 y 3 ng/mL respectivamente. De cada muestra 1:2 se colocaron 100 µL/pozo.

### CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

#### *Exactitud y precisión del método*

Para el porcentaje de recobro por cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado y para cada tiempo de muestreo:

- ▣ La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120% a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado.
  
- ▣ El CV a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 15%.

**-Resultados de estabilidad a largo plazo a -20 °C de muestras de plasma  
adicionadas con veneno -**

**CONTRASTACIÓN CON LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Ajuste al modelo logístico de 4 parámetros para curva en plasma tratado

REQUISITO	TIEMPO DE ALMACENAJE A -20 +/- 2 °C.	RESULTADO	OBSERVACIÓN
La diferencia entre el valor de A <sub>405nm</sub> más alto (top) y el valor más bajo (bottom) de la curva sigmoide debe ser $\geq 1.8$	2 meses	TOP = 2.77 BOTTOM=0.008	Sí cumple con el requisito
	4 meses	TOP = 2.22 BOTTOM =0.017	
El IC95% para el parámetro-pendiente-, debe ser positivo.	2 meses	1.28 a 1.47	Sí cumple con el requisito
	4 meses	1.34 a 1.50	
El valor de $r^2$ debe ser como mínimo 0.98	2 meses	0.999	Sí cumple con el requisito
	4 meses	0.999	
El $CV_{y/x} \leq 10\%$ .	2 meses	4.9	Sí cumple con el requisito
	4 meses	5.6	

Exactitud y precisión de método

REQUISITO	Tiempo a -20 °C +/- 2 °C.	CONCENTRACIÓN ADICIONADA (ng/mL)	RESULTADO (%)	OBSERVACIÓN
La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse entre 80 a 120% a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado.	2 meses	3	101.4	Sí cumple con el requisito
		9	100.1	
		27	109.4	
	4 meses	3	92.6	
		9	82.9	
		27	85.7	
El CV a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 15%.	2 meses	3	7.8	Sí cumple con el requisito
		9	9.7	
		27	10.5	
	4 meses	3	13.7	
		9	8	
		27	8.7	

CONCLUSIONES

- La relación entre la concentración (log) y absorbancia observada en las curvas de calibración en plasma tratado se ajustó a un modelo logístico de 4 parámetros en el intervalo de 0,049 a 50 ng/mL.
- Las muestras son estables a 2 y 4 meses de almacenamiento a -20° C en un intervalo de concentración de 3 a 27 ng/mL.

### ***VI.2.8 Evaluación del límite bajo de cuantificación***

---

Se verificó que a 1 ng/mL (límite bajo de cuantificación), se mantiene la exactitud y repetibilidad del método. Para ello, se prepararon muestras de plasma adicionadas con veneno, a partir de una solución de 10 ng/mL por quintuplicado, mediante diluciones independientes (concentración adicionada). Se determinó la concentración del veneno en el plasma utilizando el método analítico (concentración recuperada).

En una placa de análisis se incluyó una curva de calibración por triplicado en plasma tratado; con 5 muestras cada una por triplicado de 1 ng /mL.

#### ***CRITERIOS DE ACEPTACIÓN***

##### ***Exactitud y repetibilidad del método***

Para el porcentaje de recobro:

- ▣ La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120%
- ▣ El CV a 1 ng/mL no debe exceder el 20%.

**-Resultados del límite bajo de cuantificación-**

## CONTRASTACIÓN CON LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Ajuste al modelo logístico de 4 parámetros para curva en plasma tratado

REQUISITO	RESULTADO	OBSERVACIÓN
La diferencia entre el valor de $A_{405\text{nm}}$ más alto (top) y el valor más bajo (bottom) de la curva sigmoide debe ser $\geq 1.8$	TOP = 2.103 BOTTOM=0.0009	Sí cumple con el requisito
El IC95% para el parámetro -pendiente-, debe ser positivo.	1.273 a 1.488	
El valor de $r^2$ debe ser como mínimo 0.98	0.998	
El $CV_{y/x} \leq 10\%$ .	5.7	

Exactitud y repetibilidad del método

REQUISITO	RESULTADO (%)	OBSERVACIÓN
La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120% a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado.	87.7	Sí cumple con el requisito
El CV a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 20%.	13.7	

**CONCLUSIONES**

- La relación entre la concentración (log) y absorbancia observada en las curvas de calibración en plasma tratado se ajustó a un modelo logístico de 4 parámetros en el intervalo de 0,049 a 50 ng/mL.
- El límite bajo de cuantificación se verifica en 1 ng/mL

### ***VI.2.9 Evaluación del límite alto de cuantificación***

---

Se determinó la concentración máxima de veneno en una muestra, que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables. Para ello, se preparó una muestra de 300 ng/mL de veneno en plasma deslipidizado. A partir de la muestra de 300 ng/mL se prepararon diez alícuotas de cada una de las siguientes diluciones 1:10 (30 ng/mL), 1:20 (15 ng/mL) y 1:40 (7.5 ng/mL).

En una placa de análisis se incluyó una curva de calibración por triplicado en plasma tratado y 100  $\mu$ L/pozo de cada alícuota preparada.

#### ***CRITERIOS DE ACEPTACIÓN***

##### ***Exactitud y repetibilidad del método***

Para el porcentaje de recobro:

- ▣ La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120%
- ▣ El CV de cada dilución de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 20%.

**-Resultados del límite alto de cuantificación-****CONTRASTACIÓN CON LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Ajuste al modelo logístico de 4 parámetros para curva en plasma tratado

REQUISITO	RESULTADO	OBSERVACIÓN
La diferencia entre el valor de $A_{405nm}$ más alto (top) y el valor más bajo (bottom) de la curva sigmoide debe ser $\geq 1.8$	TOP = 2.37 BOTTOM=0.023	Sí cumple con el requisito
El IC95% para el parámetro -pendiente-, debe ser positivo.	1.34 a 1.47	
El valor de $r^2$ debe ser como mínimo 0.98	0.999	
El $CV_{y/x} \leq 10\%$ .	3.5	

Exactitud y repetibilidad del metodo

REQUISITO		RESULTADO	OBSERVACIÓN
La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120% a cada dilución de concentración adicionada de veneno en plasma tratado.	DILUCIÓN DE CONCENTRACIÓN ADICIONADA (ng/mL)	(%)	Sí cumple con el requisito
	7.5	83.7	
	15	94.5	
30	109		
El CV de cada dilución de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 20%.	7.5	3.4	
	15	3.3	
	30	15.7	

**CONCLUSIONES**

- La relación entre la concentración (log) y absorbancia observada en las curvas de calibración en plasma tratado se ajustó a un modelo logístico de 4 parámetros en el intervalo de 0,049 a 50 ng/mL.
- El método es exacto y repetible hasta 30 ng/mL, por lo cual se estableció como el límite alto de cuantificación

### ***VI.2.10 Evaluación de selectividad y especificidad del método***

---

Se verificó la capacidad del método analítico para medir y diferenciar el veneno en condiciones donde pudieran estar presentes otros componentes tales como citrato de sodio, EDTA y midazolam. Los dos primeros se emplean como anticoagulantes en sangre, y el midazolam es un sedante que se utiliza para tranquilizar a los pacientes picados por alacrán.

Se prepararon de manera independiente muestras a 3 niveles de concentración (3, 9 y 27 ng/mL) de veneno en plasma tratado y adicionado con el componente de interés (citrato de sodio, EDTA o midazolam), posteriormente se determinó la concentración de veneno utilizando el método analítico.

Se realizaron 2 placas de análisis, en cada placa se incluyó una curva de calibración de veneno y sus respectivas muestras.

#### Preparación de muestras

Placa 1 (evaluación de selectividad en presencia de midazolam):

Se prepararon de manera independiente en plasma tratado: 3 muestras con veneno (27, 9 y 3 ng/mL) y midazolam a 1 µg/mL. De estas últimas, se colocaron 100 µL/ pozo por triplicado en la placa.

Placa 2 (evaluación de especificidad en presencia de EDTA y citrato de sodio):

Se prepararon de manera independiente en plasma tratado: 3 muestras adicionadas con veneno (27, 9 y 3 ng/mL) y EDTA al 0.1%. De estas últimas, se colocaron 100 µL/ pozo por sextuplicado en la placa.

Se prepararon de manera independiente en plasma tratado: 3 muestras adicionadas con veneno (27, 9 y 3 ng/mL) y citrato de sodio 13.6 mM. De estas últimas, se colocaron 100 µL/ pozo por sextuplicado en la placa.

*CRITERIOS DE ACEPTACIÓN*

*Exactitud y repetibilidad del método*

Para el porcentaje de recobro:

- ▣ La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120% a cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado.
  
- ▣ El CV de cada dilución de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 20%.

**-Resultados de selectividad-****CONTRASTACIÓN CON LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Ajuste al modelo logístico de 4 parámetros para curva en plasma tratado

REQUISITO	RESULTADO	OBSERVACIÓN
Para Midazolam		
La diferencia entre el valor de $A_{405\text{nm}}$ más alto (top) y el valor más bajo (bottom) de la curva sigmoide debe ser $\geq 1.8$	TOP = 2.12 BOTTOM = 0.004	Sí cumple con el requisito
El IC95% para el parámetro-pendiente-, debe ser positivo.	1.35 a 1.56	
El valor de $r^2$ debe ser como mínimo 0.98	0.999	
El $CV_{y/x} \leq 10\%$ .	5.1	
Para EDTA y Citrato de sodio		
El valor del estimado de top es mayor al de bottom.	TOP = 2.07 BOTTOM = 0.025	Sí cumple con el requisito
El IC95% para el parámetro -pendiente-, debe ser positivo.	1.24 a 1.53	
El valor de $r^2$ debe ser como mínimo 0.98	0.998	
El $CV_{y/x} \leq 10\%$ .	5.6	

Exactitud y repetibilidad del método

Para Midazolam			
REQUISITO	CONC. ADICIONADA DE VENENO (ng/mL)	RESULTADO (%)	OBSERVACIÓN
La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120%	3	98	Sí cumple con el requisito
	9	91.8	
	27	117	
El CV de cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 20%.	3	1.1	Sí cumple con el requisito
	9	3	
	27	15	

Para EDTA			
REQUISITO	CONC. ADICIONADA DE VENENO (ng/mL)	RESULTADO (%)	OBSERVACIÓN
La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120%	3	81.8	Sí cumple con el requisito
	9	80.5	
	27	89.5	
El CV de cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 20%.	3	3.9	Sí cumple con el requisito
	9	2.8	
	27	11.5	

Para Citrato de sodio			
REQUISITO	CONC. ADICIONADA DE VENENO (ng/mL)	RESULTADO (%)	OBSERVACIÓN
La media aritmética del porcentaje de recobro debe incluirse en el intervalo 80 a 120%	3	86.7	Sí cumple con el requisito
	9	82.8	
	27	100.7	
El CV de cada nivel de concentración adicionada de veneno en plasma tratado, no debe exceder el 20%.	3	5.1	Sí cumple con el requisito
	9	3.4	
	27	13.5	

### CONCLUSIONES

- La relación entre la concentración (log) y absorbancia observada en las curvas de calibración en plasma tratado se ajustó a un modelo logístico de 4 parámetros en el intervalo de 0,049 a 50 ng/mL.
- Los resultados muestran que el método es exacto y repetible en muestras adicionadas de veneno mas otros componentes: midazolam, EDTA y citrato de sodio respectivamente por lo que se considera que el método es selectivo y específico, es decir, tiene la capacidad de cuantificar solo al veneno aún cuando estos componentes pudieran presentarse en las muestras.

---

### **V.3 Aplicación del ELISA validado para la cuantificación de veneno de escorpión *Centruroides* en plasma humano**

---

Como ya se mencionó en el presente trabajo, algunas regiones de México y E.U.A. son importantes zonas de escorpionismo, donde las especies de importancia médica pertenecen al género *Centruroides*. Debido a que el veneno de estas especies es neurotóxico es muy importante la producción y distribución de un tratamiento efectivo; en México se utiliza un faboterápico (=antiveneno) antialacrán conocido comercialmente con el nombre de Alacramyn® el cual ha demostrado ser eficaz y seguro en dicho país (11).

En E.U.A., se reportan alrededor de 15,000 casos de accidente por picadura de alacrán, al año (13), varios de ellos derivan en cuadros clínicos severos e inclusive en la muerte del paciente por no contar con un tratamiento efectivo.

Ante esto, surgió la necesidad de realizar un estudio clínico en el Arizona Poison and Drug Information Center bajo la supervisión de la FDA (Food and Drug Administration) de los E.U.A. Para ello se realizó un estudio doble ciego, donde los pacientes, previa autorización, fueron tratados con el faboterápico antialacrán o con placebo -el uso de placebo es ético ya que el tratamiento estándar no incluye empleo de antiveneno-; se tomaron muestras de 15 pacientes pediátricos con reporte o sintomatología de escorpionismo en diferentes tiempos de estancia en el centro de salud. Dichas muestras fueron enviadas a México para analizar el contenido de veneno y antiveneno circulante y posteriormente cotejar estos resultados con las historias clínicas de cada paciente. El inmunoensayo tipo ELISA validado en el presente trabajo, fue utilizado para cuantificar el veneno presente en las muestras anteriormente mencionadas.

## PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA CUANTIFICACIÓN

Las muestras de plasma fueron deslipidizadas con cloroformo, 1 parte de cloroformo por cada dos partes de plasma, se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se removió la fase superior que contiene el plasma deslipidizado.

Las muestras deslipidizadas fueron diluidas 1:2 en la placa de análisis, colocando en el pozo correspondiente 50µL de solución vehículo + 50µL de la muestra deslipidizada. Cada muestra se cuantificó por triplicado, en tres días diferentes (Apéndice X.6).

### ***-Resultados de cuantificación de muestras clínicas-***

Es importante señalar que las muestras de los pacientes fueron aleatorizadas, es decir, les asignaron una clave que no necesariamente correspondía al orden en que fueron tomadas del paciente, esto con la finalidad de evitar algún sesgo en la cuantificación de las mismas. Después de obtener los valores de cuantificación mediante el método validado, los resultados de las muestras fueron reordenados, de esta manera, los datos presentados como muestras 1, 2 y 3 corresponden al orden en que fueron tomadas de cada paciente.

Con el método analítico validado se cuantificaron en total 42 muestras pertenecientes a 15 paciente pediátricos, 17 muestras fueron positivas a veneno en un rango de 1.31 a 26.8 ng/mL (Tabla 3).

A continuación se presentan los resultados de la cuantificación de veneno de cada una de las muestras clínicas de los pacientes. Cabe mencionar que en la tabla de resultados también se muestran las concentraciones de antiveneno medidas en las mismas muestras, esto último fue realizado por la M. en C. Laura Olguín mediante otro inmunoensayo validado de manera similar al que se describe en el presente trabajo.

Tabla 3. Resultados de cuantificación de veneno

Paciente	Veneno [ng/mL] Antiveneno [ $\mu$ g/mL]	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
1	Veneno	3.7	NC	Sin muestra
	Antiveneno	NC	108.2	Sin muestra
2	Veneno	2.74	NC	NC
	Antiveneno	NC	NC	NC
3	Veneno	26.8	8.57	4.98
	Antiveneno	NC	NC	NC
4	Veneno	8.54	NC	NC
	Antiveneno	NC	74.7	NC
5	Veneno	2.68	1.31	NC
	Antiveneno	NC	NC	NC
6	Veneno	8.87	NC	NC
	Antiveneno	NC	74.1	98.6
7	Veneno	12.9	NC	NC
	Antiveneno	NC	29.5	37.7
8	Veneno	5.8	4.37	2.3
	Antiveneno	NC	NC	NC
9	Veneno	8.78	NC	NC
	Antiveneno	NC	72.7	80.3
10	Veneno	NC	NC	NC
	Antiveneno	NC	NC	NC
11	Veneno	4.05	NC	Sin muestra
	Antiveneno	NC	NC	NC
12	Veneno	Sin muestra	3.05	NC
	Antiveneno	NC	NC	NC
13	Veneno	NC	NC	NC
	Antiveneno	77.36	NC	48.21
14	Veneno	NC	NC	NC
	Antiveneno	NC	NC	NC
15	Veneno	15.2	NC	NC
	Antiveneno	NC	69.2	57.7

NC: No Cuantificable, en el caso de la medición de veneno significa que el valor de concentración de veneno es menor a 1 ng/mL establecido como límite bajo de cuantificación del método; para el caso de antiveneno significa que el valor de concentración es menor a 1  $\mu$ g/mL.

Los resultados de esta cuantificación mostraron que en presencia de faboterápico la concentración de veneno circulante en plasma disminuye a niveles inferiores a 1ng/mL (Figura 17).

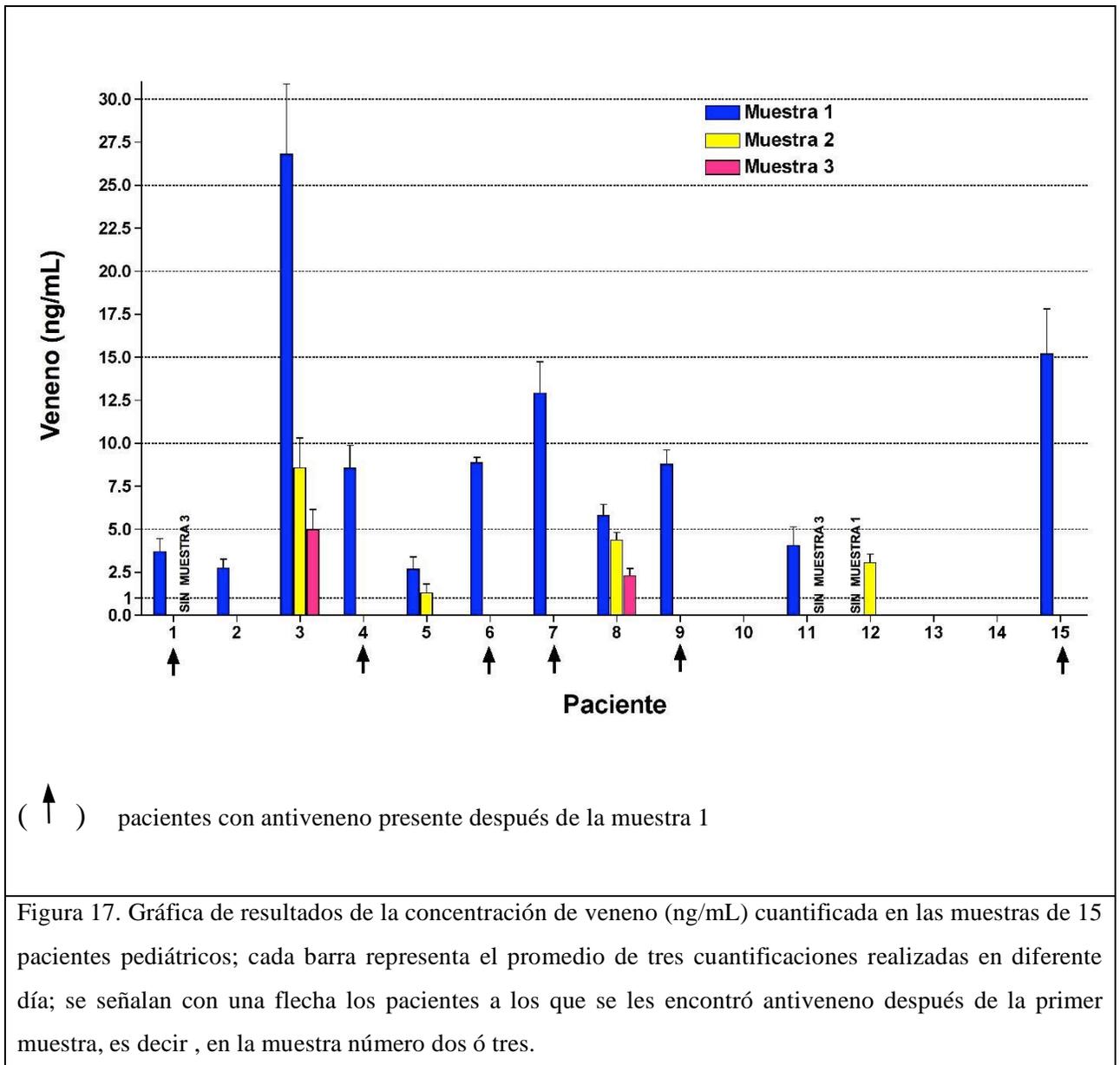


Figura 17. Gráfica de resultados de la concentración de veneno (ng/mL) cuantificada en las muestras de 15 pacientes pediátricos; cada barra representa el promedio de tres cuantificaciones realizadas en diferente día; se señalan con una flecha los pacientes a los que se les encontró antiveneno después de la primer muestra, es decir , en la muestra número dos ó tres.

## VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrolló un método analítico tipo ELISA debido a sus cualidades tales como sensibilidad, reproducibilidad, rapidez y sencillez. De los diferentes tipos de ELISA se eligió desarrollar uno de tipo doble sandwich ya que tiene la ventaja de conferir una alta sensibilidad debido a la amplificación de señal generada por el uso de un segundo anticuerpo (conjugado enzimático) además de anticuerpos de captura y anticuerpos de detección.

Los anticuerpos de captura se inmunopurificaron a partir del faboterápico Alacramyn® mediante cromatografía de afinidad, las fracciones eluidas analizadas en gel de poliacrilamida mostraron que efectivamente contenían  $F(ab')_2$  esto se corroboró por la localización de las bandas de corrimiento en el gel las cuales se estacionaron en el peso molecular esperado de aproximadamente 150 Kilodaltones.

Se seleccionó la dilución óptima de anticuerpos de detección -suero hiperinmune de conejo anti veneno de *Centruroides l1*- comparando las diluciones: 1:2000, 1:4000, 1:6000 y 1:8000. La dilución seleccionada fue 1:4000, ésta permite detectar desde 0.195 ng/mL de veneno en solución vehículo; las diluciones 1:2000, 1:4000 y 1:8000 generaron el mismo límite de detección, sin embargo, la dilución 1:4000 generó la curva de calibración con una mejor respuesta de absorbancia a 405 nm sustentada por su valor de  $EC_{50}$  ,4.81ng/mL.

Se seleccionó la dilución óptima de conjugado enzimático -IgG de cabra anti IgG de conejo, acoplado peroxidasa de rábano- comparando las diluciones: 1:1000, 1:2000 y 1:4000. La dilución seleccionada fue 1:2000, ésta generó un mejor límite de detección de veneno (0.049 ng/mL) en comparación con la dilución 1:1000 (límite de detección: 0.496 ng/mL), y una curva de calibración con una mayor respuesta de absorbancia a 405 nm en comparación con la dilución 1:4000.

Se evaluaron diferentes sustratos para peroxidasa de rábano: ABTS presentación en polvo, ABTS *ready to use* y TMB one. Se seleccionó ABTS *ready to use* debido a que generó una buena sensibilidad sustentada por su límite bajo de detección de 0.04 ng/mL, y una mayor respuesta de absorbancia a 405 nm.

El método analítico tipo ELISA desarrollado y optimizado se validó mediante la evaluación de diferentes parámetros de desempeño.

El primer parámetro evaluado fue linealidad y precisión del sistema, esto se realizó utilizando curvas de calibración y muestras de veneno en solución vehículo, el análisis de varianza aplicado a los datos generados demostró que las condiciones de trabajo establecidas en el método son adecuadas y aceptables.

Un segundo parámetro evaluado fue recuperación de veneno, esto se realizó para conocer si el método permite realizar cuantificaciones de veneno en muestras de plasma utilizando una curva de calibración hecha en solución vehículo dando resultados aceptables (deben tener un porcentaje de recobro mínimo de 80%). Los resultados obtenidos de porcentajes de recobros varían dentro del intervalo de 70% a 80% , por lo tanto, se estableció que el método no permite cuantificar veneno de manera confiable en tales condiciones.

El tercer parámetro evaluado fue exactitud, linealidad y repetibilidad del método, esto se realizó utilizando curvas de calibración en plasma humano y muestras de veneno en plasma humano, el análisis aplicado a los datos generados demostró que la variabilidad del método es aceptable y por lo tanto, el método se considera exacto, repetible y lineal en estas condiciones.

El cuarto parámetro evaluado fue precisión intermedia del método, para ello, el método analítico fue ejecutado por dos analistas en diferentes días cada uno, los valores generados mostraron una dispersión aceptable por lo cual se estableció que el método es exacto y preciso en tales condiciones.

Se evaluaron los parámetros de desempeño referentes a estabilidad de las muestras de plasma adicionadas con veneno. Para establecer las condiciones a evaluar, se tomaron en cuenta las condiciones de almacenamiento y transporte a las que pudieran haber estado sujetas las muestras de plasma a cuantificar con el método analítico validado; de esta manera, las condiciones elegidas fueron: estabilidad a corto plazo en hielo seco, estabilidad en ciclos de congelación-descongelación, y estabilidad a largo plazo a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Los resultados de variabilidad y porcentaje de recuperación de los datos generados en las evaluaciones de estabilidad permitieron establecer que las muestras de plasma adicionadas de veneno mantienen su estabilidad en las siguientes condiciones: en hielo seco hasta 72 horas; sujetas hasta por 2 ciclos de congelación-descongelación; durante 4 meses a  $-20^{\circ}\text{C}$  .

Se evaluaron los límites bajo y alto de cuantificación permitidos por el método analítico. La evaluación del límite bajo de cuantificación permitió conocer la mínima concentración de veneno en plasma que se puede medir con precisión y exactitud aceptables; de forma similar, la evaluación del límite alto de cuantificación permitió conocer la máxima concentración de veneno en plasma que se puede medir con precisión y exactitud aceptables. Los resultados de porcentaje de recobro y variación, permitieron establecer 1 ng/mL como límite bajo de cuantificación y 30 ng/mL como límite alto de cuantificación.

Un último parámetro evaluado fue la selectividad y especificidad del método, esto se realizó para verificar la capacidad del método analítico para medir únicamente el veneno de la muestra aún en presencia de otros componentes que pudieran presentarse, para ello, se midieron muestras de veneno en plasma adicionadas con midazolam, citrato de sodio y EDTA, los resultados de variación y porcentajes de recobro mostraron que el método mantiene su exactitud aún en presencia de dichos componentes, por lo tanto, en estos términos el método se considera selectivo y específico.

El ELISA validado se aplicó para cuantificar muestras de pacientes pediátricos de Arizona sujetos a un estudio clínico en el cual fueron tratados con faboterápico o con placebo. Se cuantificaron 42 muestras pertenecientes a 15 pacientes, 17 muestras tuvieron una concentración de veneno en un rango de 1.31 a 26.8 ng/mL. Los resultados cuantitativos de las muestras de los pacientes: número 1, número 4, número 6, número 7, número 9 y número 15 reflejaron que en presencia del faboterápico la concentración de veneno circulante en plasma disminuye a niveles inferiores a 1ng/mL.

Los resultados generados mediante el método analítico validado contribuyen a la evaluación de la efectividad de un faboterápico antialacrán, ya que permiten establecer una correlación con la clínica de los pacientes (esto último está a cargo del Arizona Poison Information Center de los E.U.A)

## VIII. CONCLUSIONES

- Se desarrolló y optimizó un método analítico tipo ELISA estableciéndose las siguientes condiciones: anticuerpos de captura -F(ab')<sub>2</sub> anti *Centruroides l.l.*- a una concentración de 5 µg/mL; anticuerpos de detección -suero hiperinmune de conejo anti veneno de *Centruroides l.l.*- en dilución 1:4000 en solución vehículo; conjugado enzimático -IgG de cabra anti IgG de conejo, acoplado a peroxidasa de rábano- a una dilución de 1:2000 en solución vehículo; y como sustrato para peroxidasa de rábano -ABTS *ready to use*-.
- Se validó el método analítico tipo ELISA generando evidencia documentada mediante la cual se estableció que dicho método es adecuado y confiable para cuantificar veneno de *Centruroides* en plasma humano.
- Se aplicó el método analítico desarrollado, optimizado y validado para cuantificar veneno de escorpión *Centruroides* en plasma de pacientes pediátricos sujetos a un estudio clínico.
- El método analítico tipo ELISA validado en el presente trabajo, contribuyó a la evaluación de efectividad un faboterápico antialacrán

---

---

## IX. APÉNDICE

---

### X.1 Acoplamiento de veneno de *Centruroides* a resina Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno

Pesar 1 g de resina sefarosa 4B CNBr y colocarla en 80 mL de NaHCO<sub>3</sub> 100 mM , dejar reposar durante 30 minutos, filtrar la resina utilizando una unidad de filtración Millipore® en seguida pasar 30 mL de HCl 1 mM a través de la resina. Posteriormente, retirar la resina de la unidad de filtración y colocarla en un tubo falcon, adicionar 3 mL de NaHCO<sub>3</sub> 100 mM y agregar 10 mg de veneno resuspendido en (cuantificado por A<sub>280 nm</sub>) colocar en agitación muy suave durante 10 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, leer A<sub>280nm</sub> el sobrenadante. A partir de los valores de A<sub>280 nm</sub> calcular la cantidad de veneno que se acopló a la resina.

### X.2 Buffers para cromatografía de afinidad

Buffer de cargado/lavado [0.1M Tris/HCl pH 8.0 + 0.5M NaCl]:

A 50 mL de Buffer Tris concentrado [1 M Tris/HCl pH 8] adicionar 14.61g de NaCl y aforar a 500 mL con agua destilada.

Buffer de colecta de muestra [0.1M Tris/HCl pH 8.0 ]:

A 50 mL de Buffer Tris concentrado [1 M Tris/HCl pH 8] adicionar 450 mL de agua destilada.

Buffer de elución ácido acético 100 mM:

575 µL de ácido acético (stock 17.4 M) aforar a 100 mL con agua destilada.

Buffer de elución NaOH 50mM

100 mg de NaOH aforar a 50 mL con agua destilada.

### **X.3 Preparación de gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

Solución de acrilamida [30% de acrilamida + 0.8% bis-acrilamida]:

Disolver 49.5 g de acrilamida y 1.32 g de bis-acrilamida en un volumen final de 165 mL de agua destilada.

Solución espaciadora –Buffer inferior- [1.5 M de Tris + 0.4% de SDS]:

Disolver 18.17 g de Tris en 50 mL de agua destilada y adicionar 2 mL de SDS al 20%. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución concentradora –Buffer superior- [0.5 M de Tris + 0.4% SDS]:

Disolver 6.06 g de Tris en 50 ml de agua destilada y adicionar 2 mL de SDS 20%. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución de migración -Tank buffer- [0.25 M de Tris + 0.19 M glicina + 0.1 % SDS]:

Para una solución 10X, disolver 15.1 g de Tris y 72.1g de glicina en 300 mL de agua destilada y adicionar 25 mL de SDS 20%. Ajustar el pH a 8.6 con 10 M de NaOH. Aforar a 500 mL con agua destilada. Diluir con agua destilada para utilizar la solución a 1X.

Solución 2X desnaturalizante para la muestra [10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM de Tris-HCl pH 6.8 + 5% 2-mercaptoetanol + 0.02% azul de bromofenol]:

Mezclar los siguientes volúmenes: 1 mL de glicerol, 1.25 mL de SDS 20%, 0.5 mL de Tris-HCl 1M pH 6.8, 0.5 mL de 2-mercaptoetanol, 0.2 ml de 1% azul de bromofenol. Aforar a 10 mL con agua destilada.

Persulfato de amonio al 10%:

Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua destilada.

Solución de tinción [25% isopropanol + 10% ácido acético + 0.2% de azul de Coomassie R250]:

Disolver 1 g de azul de Coomassie R250 en 125 mL de isopropanol, 50 mL de ácido acético y aforar a 500 mL con agua destilada.

Solución de destinción [10% isopropanol + 10% ácido acético]:

Mezclar 400 mL de agua destilada, 50 mL de isopropanol y 50 mL de ácido acético.

En la siguiente tabla se indican los componentes y volúmenes que se deben mezclar para preparar la fase inferior (gel separador) y la fase superior (gel concentrador) del SDS-PAGE.

	Gel separador al 12.5% (fase inferior)	Gel espaciador-concentrador al 4% (fase superior)
<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Volumen</b>
Buffer inferior	1.5 mL	0
Sln. de acrilamida	2.5 mL	0.33 mL
Agua destilada	2 mL	1.54 mL
TEMED	5 µL	2.5 µL
Persulfato de amonio 10%	20 µL	12.5 µL
Buffer superior	0	0.63 mL

#### Preparación de la muestra

De ser posible, diluir la muestra con solución desnaturante a una concentración final de  $\approx 500 \mu\text{g}$  de proteína/mL. Colocar idealmente de 10 a 20  $\mu\text{L}$  de la muestra en cada pozo del gel de tal manera que se coloquen  $\approx 5 \mu\text{g}$  de proteína.

### Condiciones de migración en electroforesis

Migrar a 10 mA hasta que el colorante de referencia (azul de bromofenol) haya atravesado el gel concentrador. Posteriormente, incrementar a 15mA y continuar la migración hasta que el colorante de referencia llegue a 0.5 cm del extremo inferior del gel separador.

### Tinción y destinción

Posterior a la electroforesis, teñir el gel con solución de tinción durante 1 hora con agitación constante y a temperatura ambiente. Desteñir el gel con solución de destinción durante  $\approx$  10 horas con agitación constante y a temperatura ambiente.

## **X.4 Preparación de soluciones para ELISA**

### Buffer Tris concentrado [1 M Tris/HCl pH 8]:

Pesar 121,1 g de Tris-(hidroxi)-aminometano base y disolver en 800 mL de agua. Ajustar el pH a 8 con HCl concentrado, bajo el potenciómetro, y aforar a un litro con agua destilada. Conservar a temperatura ambiente.

### Buffer de sensibilización [100 mM Carbonato/Bicarbonato pH 9,5]:

Pesar 4,2 g de  $\text{NaHCO}_3$  y llevar a 450 mL con agua destilada. Ajustar el pH de la solución a 9,5 añadiendo 5 N de NaOH, bajo agitación y monitoreo con el potenciómetro, y aforar a 500 mL con agua destilada. En uso continuo, conservar en refrigeración; si no, en congelación.

### Solución de lavado concentrada 10X [500 mM Tris/HCl pH 8 + 1,5 M NaCl]:

Pesar 87,7 g de NaCl (1,5 M) y disolver en 500 mL de 1 M Tris/HCl pH 8,0. Aforar a un litro con agua destilada. Conservar en refrigeración.

### Solución de lavado 1X [50 mM Tris/HCl pH 8 + 150 mM NaCl + 0,05% Tween 20]:

Tomar 100 mL de la solución de lavado 10 X y llevar a 1 L con agua destilada. Adicionar 0,5 mL de Tween 20 y mezclar. Cuando no esté en uso, guardar en refrigeración.

Solución vehículo [50 mM Tris/HCl pH 8 + 0,5 M NaCl + 1 mg/mL gelatina + 0,05% Tween 20]:

A 5 mL de 1 M Tris/HCl pH 8,0 + 2,9 g de NaCl aforados a 100 mL con agua destilada, agregar 100 mg de gelatina. Calentar la mezcla en baño maría a 50°C; durante este proceso, periódicamente sacar el frasco y mezclar por inversión hasta que la gelatina se disuelva por completo. Cuando la solución alcanza la temperatura ambiente se adicionan 50 µL de Tween 20 y se mezcla a homogeneidad. Esta solución se conserva en refrigeración.

Solución de bloqueo [50 mM Tris/HCl pH 8 + 5 mg/mL gelatina + 0,2% Tween 20]:

Pesar 500 mg de gelatina y adicionarla a 100 mL de 50 mM Tris/HCl pH 8,0 (5 mL 1 M Tris/HCl pH 8 + 95 mL de agua destilada). Calentar la mezcla con pulsos en horno de microondas, mezclando entre pulso y pulso, hasta que la gelatina se disuelva por completo. Cuando la solución alcanza la temperatura ambiente se adicionan 200 µL de Tween 20 y se mezcla a homogeneidad. Conservar en refrigeración.

Solución de paro [5% SDS]:

Pesar 10 g de docecil sulfato de sodio (SDS) y disolver en 200 mL de agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.

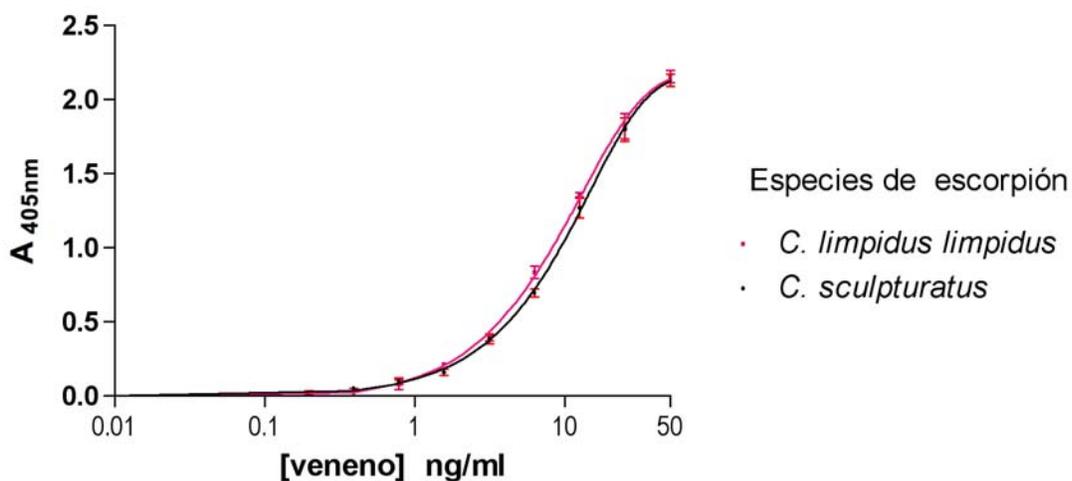
### **X.5 Inmunoensayo comparativo con veneno de *Centruroides limpidus limpidus* vs. *Centruroides sculpturatus***

Se realizó un inmunoensayo conforme al esquema mostrado en la figura 16 del presente escrito. Se elaboraron 2 curvas de calibración (cada una por triplicado), una curva de calibración se realizó utilizando veneno de *Centruroides limpidus limpidus* y la otra utilizando veneno de *Centruroides sculpturatus*.

Las curvas de calibración se realizaron iniciando con 50 ng/mL de veneno en solución vehículo en la columna 1 de la placa de ELISA y realizando diluciones seriadas 1:2 hasta la columna 11 donde se llegó a una concentración de 0.049 ng/mL. La última columna de la placa corresponde al blanco: sin veneno (columna 12).

A continuación se muestran los resultados procesados en Microsoft excel y PRISMA version 4.0 b.

**Curvas de calibración  
utilizando veneno de especies diferentes de escorpión**



Parámetros	Curvas de calibración con veneno de diferente especie	
	<i>C. limpidus limpidus</i>	<i>C. sculpturatus</i>
Top	2.482	2.485
EC50	10.71	12.25
Pendiente (Hill slope)	1.23	1.29
r <sup>2</sup>	0.998	0.997
LLD (ng/mL)	0.7	0.41

**X.6.** Tabla de resultados de la cuantificación de veneno en las muestras de 15 pacientes pediátricos, cada muestra fue cuantificada por triplicado en una misma placa de análisis, esto se realizó tres veces (días diferentes). En la tabla los valores presentados en *Cuantificación No.1*, *No.2* y *No. 3* (cada una en un día diferente) son el promedio del triplicado de cada placa de análisis.

P	Orden muestra	DILUIDO 1:2			X FACTOR DE DILUCIÓN (2)			Promedio [ ng/mL]	Desviación Estándar	C. V. (%)
		Cuantificación No. 1 [ ng/mL]	Cuantificación No. 2 [ ng/mL]	Cuantificación No. 3 [ ng/mL]	Cuantificación No. 1 [ ng/mL]	Cuantificación No. 2 [ ng/mL]	Cuantificación No. 3 [ ng/mL]			
1	1	1.50	1.78	2.26	3.00	3.57	4.52	3.70	0.77	20.9
	2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	3	NO	HAY	MUESTRA	NO	HAY	MUESTRA	NO	HAY	MUESTRA
2	1	1.09	1.39	1.63	2.19	2.78	3.25	2.74	0.53	19.5
	2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
3	1	11.2	15.3	13.7	22.46	30.59	27.32	26.8	4.09	15.3
	2	3.44	5.17	4.24	6.87	10.35	8.48	8.57	1.74	20.3
	3	1.89	3.06	2.52	3.79	6.13	5.03	4.98	1.17	23.5
4	1	3.84	5.05	3.92	7.68	10.10	7.85	8.54	1.35	15.8
	2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
5	1	1.08	1.20	1.74	2.16	2.40	3.49	2.68	0.71	26.4
	2	0.65	0.40	0.91	1.30	0.81	1.82	1.31	0.51	38.7
	3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
6	1	4.30	4.40	4.61	8.60	8.79	9.22	8.87	0.32	3.6
	2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
7	1	5.49	7.33	6.56	10.98	14.65	13.11	12.91	1.84	14.3
	2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
8	1	2.52	3.11	3.06	5.05	6.21	6.13	5.80	0.65	11.2
	2	1.92	2.32	2.31	3.85	4.65	4.62	4.37	0.46	10.42
	3	0.94	1.13	1.37	1.89	2.26	2.74	2.30	0.43	18.6
9	1	3.92	4.71	4.55	7.83	9.41	9.10	8.78	0.84	9.5
	2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
10	1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
11	1	1.57	1.88	2.62	3.13	3.76	5.24	4.05	1.08	26.7
	2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	3	NO	HAY	MUESTRA	NO	HAY	MUESTRA	NO	HAY	MUESTRA
12	1	NO	HAY	MUESTRA	NO	HAY	MUESTRA	NO	HAY	MUESTRA
	2	1.23	1.68	1.67	2.46	3.35	3.33	3.05	0.51	16.8
	3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
13	1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
14	1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
15	1	6.28	8.88	7.68	12.57	17.76	15.35	15.2	2.60	17.1
	2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		
	3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC		

P: número asignado al paciente

NC: No Cuantificable, significa que el valor es menor a 1 ng/mL establecido como límite bajo de cuantificación del método.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) González- Santillán. E. 2001. Catálogo de Escorpiones de la Colección Nacional de Arácnidos (CNAN). Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 146p.
- (2) Brownell, P. and G. Polis. 2001. *Scorpion Biology and Research*. Oxford University Press. 431pp.
- (3) Meier, J. and J. White. 1995. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. CRC Press. 205-219 pp.
- (4) Pineda, D. 2002. Accidentes por animales venenosos. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. 91-105 pp.
- (5) Keegan, H. L. 1980. *Scorpions of Medical Importance*. University Press of Mississippi. U. S. A. 140 pp.
- (6) [www.redtox.org](http://www.redtox.org)
- (7) Modificado de [www.thedailylink.com/thespiralburrow/anatomy](http://www.thedailylink.com/thespiralburrow/anatomy)
- (8) Fanjul M. L., Hiriart M. y Fernandez de M. F. 1998. *Biología funcional de los animales*. Siglo veintiuno editores. 63-111pp.
- (9) Goddard, Ph. D. 2003. *Physician's Guide to arthropods of medical importance*. 4th edition. CRC Press. U. S. A. 301-308 pp.
- (10) Likes K, Banner W. Jr., Chavez M. 1984. *Centruroides exilicauda* envenomation in Arizona. *West J. Med.* 141: 634-637.
- (11) Alagón A. *et al.* 2003. Alacranismo. *Práctica Médica Efectiva*. 5 (1).

- (12) Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Boletín de epidemiología, Semana 1, 2006.
- (13) Melisa W. Lai *et al.* .2005 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poisoning and Exposure Database. *Clinical Toxicology*, 44: 803-932, 2006
- (14) Valdez-Cruz N. A. *et al.* 2004. Biochemical, genetic and physiological characterization of venom components from two species of scorpions: *Centruroides exilicauda* Wood and *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Biochimie* 86 (6) 387-396.
- (15) Possani, L. D. *et al.* 1999. Mini review: Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels. *Eur. J. Biochem.* 264, 287-300
- (16) Rodriguez de la Vega R. C and Possani, L. D. 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na(+) channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution *Toxicon* 46 831-844.
- (17) Rodriguez de la Vega R. C., Merino E., Becerril B. and Lourival D. Possani. 2003. Novel interactions between K<sup>+</sup> channels and scorpion toxins. *TRENDS in Pharmacological Sciences.* 24 (5): 222- 227.
- (18) Montoya C. M. A. 1996. Alacranismo. *Gac. Méd. Méx.* 132(6): 645-648
- (19) Montoya C. M. A. 2002. *Toxicología clínica*, 3ª edición. Méndez Editores. México. Pág:373
- (20) Alagón, C. A. y Gonzalez, J. C. 1998. De la seroterapia a la faboterapia. *Foro Silanes.* 2: 4. 8-9pp.
- (21) Bush S. P. and Ch. J. Scorpion envenomation. *Guide to scorpion envenomation treatment.*
- (22) Dehesa D. M. and Possani L. D. 1994. Scorpionism and Serotherapy in Mexico. *Toxicon.* 32: 1015-1018.

- (23) Chávez Haro A. L. Los faboterapicos mexicanos en el paciente intoxicado por veneno de alacrán. (www.venenonemia.org)
- (24) Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-033-SSA2-2000, Para la vigilancia, prevención y control de picadura de alacrán. Diario Oficial de la Federación.
- (25) Chippaux J. P. and M. Goyffon. 1998. Venoms, Antivenoms and Immunotherapy. *Toxicon*. 36 (6) : 823-846.
- (26) D'Suze G., Moncada S., González C., Sevcik C., Aguilar V., y Alagón A. 2001. Los pacientes de escorpionismo con sintomatología local tienen niveles importantes de veneno en plasma. *Archivos venezolanos de puericultura y pediatría*. 64(3): 139-147.
- (27) Amersham Pharmacia Biotech. 2001. Affinity chromatography principles and methods. Ser. Handbooks from Amersham Pharmacia.
- (28) Krifi M. N., Kharrat, Zghal K., Abdouli M., Abroug F., Bouchoucha D., Dellagi K. and El Ayeb M. 1998. Development of an ELISA for the detection of scorpions venoms in sera of humans envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occinatus tunetanus* (Bot): correlation with clinical severity of envenoming in Tunisia. *Toxicon*. Jun, 36(6):887-900.
- (29) Krifi M. N., Amri F., Kharrat, and El Ayeb M. 1999. Evaluation of antivenom therapy in children severely envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occinatus tunetanus* (Bot) scorpions. *Toxicon*. Nov, 37(11):1627-34.
- (30) El Hafny B. and Ghalim N. 2003. Clinical evolution and circulating venom levels in scorpion envenomations in Morocco. *Bull. Soc. Pathol. Exot*. Nov, 96(4): 297-301.
- (31) Hammoudi-TrikiDjélila, Ferquel Elisabeth, Robbe-Vincent Annie, Bon Cassian, Choumet Valérie and Laraba-Djebari Fatima. Epidemiological data, clinical admission gradation and biological quantification by ELISA of scorpion envenomations in Algeria: effect of immunotherapy.

- (32) Abbas K. A. y A. H. Litchman. 2004. Inmunología celular y molecular 5a. edición. Elsevier, España. 563pp.
- (33) Findlay J. W. A., Smith W. C., Lee J. W., Nordblom G. D. Das I., DeSilva B. S., Khan M. N. and R. R. Bowsher. 2000. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1249-1273
- (34) Guidance for Industry, Bioavailability and Bioequivalence Studies. August 2001. International Conference Harmonization.
- (35) García M. A., Soberón E., Cortés M., Rodríguez R., Herrera J. L. y Alcántara A. 2002. Métodos analíticos, guía de validación. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C.
- (36) Guidance for Industry on Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. 2001. Published for Food and Drug Administration , U. S. A.