

ARTÍCULOS ORIGINALES

ANTIVENENOS OFÍDICOS: COMPARACIÓN DEL DESEMPEÑO DE DOS MÉTODOS DE OBTENCIÓN

Snake Antivenoms: Performance Comparison of Two Preparation Methods

Lucía Ávila,¹ María De Marco,¹ Matías Fingerhann,¹ Guillermo Temprano,¹ Rubén Iácono,^{1,2} Christian Dokmetjian,¹ Osvaldo Cascone^{1,2}

RESUMEN. INTRODUCCIÓN: Los sueros antiofídicos pueden prepararse por precipitación de suero o plasma equino hiperinmune con sulfato de amonio o con ácido caprílico. OBJETIVO: Comparar el rendimiento de ambos métodos. MATERIALES Y MÉTODOS: Las inmunoglobulinas se precipitaron con sulfato de amonio, y la albúmina con ácido caprílico. El nivel de anticuerpos en la preparación final se midió por el método de ELISA. RESULTADOS: El ácido caprílico al 3% dejó un sobrenadante que contenía la totalidad de los anticuerpos antiveneno con apenas vestigios de albúmina. El sulfato de amonio al 40% precipitó la totalidad de los anticuerpos antiveneno, pero coprecipitó alrededor del 10% de albúmina. CONCLUSIONES: El dosaje del nivel de anticuerpos en el antiveneno final indica que la precipitación con ácido caprílico permite obtener una mayor potencia que la precipitación con sulfato de amonio.

ABSTRACT. INTRODUCTION: Antivenom sera can be prepared by precipitation of hyperimmune equine serum or plasma with ammonium sulfate or caprylic acid. OBJECTIVE: To compare the performance of both methods. METHODS: The immunoglobulins were precipitated with ammonium sulfate, and the albumin with caprylic acid. The antibody level in the final preparation was measured by ELISA. RESULTS: The 3% caprylic acid produced a supernatant containing all the antivenom antibodies with only remnants of albumin. The 40% ammonium sulfate precipitated all the antivenom antibodies, but accompanied by some 10% of albumin. CONCLUSIONS: The quantification of antibody level in the final antivenom shows that precipitation with caprylic acid allows to obtain a stronger effect than precipitation with ammonium sulfate.

PALABRAS CLAVE: Antivenenos ofídicos - Precipitación - Sulfato de amonio - Ácido caprílico

KEY WORDS: Snake antivenoms - Precipitation - Ammonium sulfate - Caprylic acid

¹ Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB), Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Carlos Malbrán

² Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

FUENTE DE FINANCIAMIENTO: INPB, ANLIS

FECHA DE RECEPCIÓN: 27 de noviembre de 2012

FECHA DE ACEPTACIÓN: 25 de febrero de 2013

CORRESPONDENCIA A: Osvaldo Cascone
Correo electrónico: ocasco@ffyb.uba.ar

INTRODUCCIÓN

El envenenamiento por serpientes venenosas es frecuente en algunas zonas de Argentina, particularmente en las provincias del noreste y noroeste. Según datos del Programa Nacional de Ofidismo, el número de mordeduras es de alrededor de 1.200 anuales; son producidas casi totalmente por víboras del género *Bothrops* (yará), en mucho menor número por *Crotalus* (cascabel) y en una cantidad todavía mucho más escasa por serpientes *Micrurus* (coral). Cuatro especies de *Bothrops* son las principales en Argentina: *B. alternatus*, *B. neiwedii*, *B. jararaca* y *B. jararacassu*, las dos últimas con presencia exclusiva en la provincia de Misiones. De los géneros *Crotalus* y *Micrurus*, las especies dominantes son *C. durissus terrificus* y *M. pyrrhocryptus*, respectivamente.¹

Los venenos de cada género producen manifestaciones tóxicas características, que permiten identificar clínicamente tres síndromes correspondientes a envenenamiento botrópico, crotálico y elapídico. Las personas que realizan actividades en áreas rurales y/o selváticas están especialmente expuestas a las mordeduras de serpientes.¹

En Argentina existen dos productores de sueros antiveneno de tipo ofídico: el Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB), dependiente de la Administración

Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Carlos Malbrán, y el Laboratorio Central de Salud Pública de la provincia de Buenos Aires, que suple las necesidades de la jurisdicción.¹ El INPB elabora cuatro antivenenos y tiene capacidad para suministrar la cantidad y variedad necesarias a todo el país.

Antiguamente se utilizaban sueros antitoxina para tratar tanto la difteria como el tétanos o los envenenamientos por mordeduras de serpientes. Aunque la vacunación ha reemplazado el uso de sueros hiperinmunes para la difteria y el tétanos, el arma terapéutica principal para el tratamiento de las mordeduras sigue siendo el suero obtenido de caballos inmunizados, que contiene inmunoglobulinas enteras o sus fragmentos.²

El uso de sueros compuestos de inmunoglobulinas enteras ha sido cuestionado, ya que sus fragmentos Fc son los principales responsables de las reacciones adversas tempranas asociadas a la administración intravenosa.³ Por lo tanto, en muchos países los sueros antiveneno se preparan digiriendo las inmunoglobulinas con pepsina para obtener sus fragmentos F(ab')₂, los que presentarían menos efectos secundarios con la misma potencia antitóxica. Sin embargo, algunos estudios⁴⁻⁶ revelaron que la administración de antivenenos a base de inmunoglobulinas enteras producía una incidencia relativamente baja de reacciones adversas, con los agregados de inmunoglobulinas, las proteínas contaminantes y la carga total de proteínas como principales responsables.^{7,8} El proceso de producción de antivenenos debería ser entonces específico y también económico, habida cuenta de que las mordeduras de víboras ocurren mayormente en los países con menos recursos. Sobre la base de estas consideraciones, los experimentos del presente trabajo sólo involucran la obtención de inmunoglobulinas enteras.

Se han desarrollado muchos métodos para elaborar antivenenos a partir de plasma o suero de animales inmunizados. Las técnicas cromatográficas, como las de afinidad o intercambio iónico, generan un producto de alta calidad,⁹⁻¹² pero el costo de operación es alto y se requiere equipamiento especializado. Por ello, los métodos de precipitación son los más usados para la producción de sueros antiveneno. En algunos países se recurre a la precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato de amonio y en otros, a la de las proteínas no inmunoglobulinas con ácido caprílico.

La técnica utilizada desde los comienzos de la producción de sueros antiveneno fue la precipitación con sulfato de amonio. Este agente captura las moléculas de agua para lograr su propia hidratación; así exacerba la interacción entre las proteínas, que terminan formando agregados y finalmente precipitan. Las inmunoglobulinas lo hacen a menores concentraciones de sulfato de amonio, porque son menos solubles en agua que la albúmina.

En 1994, Rojas¹³ desarrolló un método para la producción de sueros antiveneno a partir de plasma equino hiperinmune con una única precipitación con ácido caprílico. A

pH bajos, la hidrofobicidad de la porción octilo del ácido caprílico es dominante y hace que precipiten las proteínas ácidas como la albúmina; por su parte, debido a su mayor punto isoeléctrico, las inmunoglobulinas tienen suficiente carga para contrarrestar esa hidrofobicidad y, por lo tanto, permanecen siempre en solución.¹⁴ A raíz de ello, la pérdida de rendimiento y la posibilidad de formación de agregados proteicos son menores que en el caso de la precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato de amonio. Dado que la interacción hidrofóbica es el factor principal en la precipitación de la albúmina y que la temperatura ejerce una influencia importante en este tipo de interacción,^{15,16} en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Procesos de ANLIS se evidenció el papel crítico del aspecto térmico en la precipitación de las proteínas no inmunoglobulinas con ácido caprílico. Se recomendaron entonces las siguientes condiciones de precipitación: ácido caprílico 3%, temperatura 37°C y pH inicial del plasma o suero 4,9. Bajo estas condiciones, la totalidad de las inmunoglobulinas y sólo 0,1% de albúmina permanecen en el sobrenadante.¹⁷

El presente trabajo se propuso comparar el rendimiento del método optimizado a escalada de laboratorio en el INPB por precipitación con ácido caprílico con el del método – todavía en uso en algunos laboratorios – consistente en la precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato de amonio. Además, se estudió el efecto del conservante fenol/éter sobre los anticuerpos del plasma equino hiperinmune.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

El veneno de *C. durissus terrificus* se obtuvo del stock del INPB. Además, se trabajó con ácido caprílico de ICN Biomedicals Inc. (EE.UU.), sulfato de amonio de Anedra (Argentina), reactivos de biuret y de albúmina Proti 2 de Wiener Labs (Argentina), acrilamida, bisacrilamida, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y anticuerpo anti-inmunoglobulina equina de Sigma-Aldrich (EE.UU.), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) de Bio Basic Inc. (EE.UU.) y persulfato de amonio de Biopack (Argentina). El suero hiperinmune se extrajo de caballos inmunizados con veneno de *C. durissus terrificus*, según la metodología estándar.

MÉTODOS

Precipitación con sulfato de amonio

Se llevaron 50 ml de suero equino hiperinmune a una temperatura de 20°C. Se calculó la masa de sulfato de amonio necesaria para obtener los porcentajes de saturación de 20, 30, 40, 50 y 60% mediante el programa Ammonium Sulfate Calculator.¹⁸ Lentamente se agregó el sulfato de amonio sólido (previamente pesado) para obtener los respectivos porcentajes de saturación. Se dejó en agitación durante 30 minutos y luego se centrifugó por 10 minutos a 3.000 rpm. Se filtró el sobrenadante y se registró nuevamente el volumen. El precipitado se resuspendió en PBS (buffer de fosfatos 20 mM, 0,85% NaCl, pH 7,1) y se filtró. Por último, se registró el volumen recuperado.

Precipitación con ácido caprílico

Se siguió el protocolo establecido por Nudel:¹⁷ se llevó una alícuota de 50 ml de suero equino hiperinmune a pH 4,9 con HCl 1 N y la temperatura a 37°C en baño termostático. Luego se agregó lentamente el ácido caprílico para alcanzar una concentración de 3%. Se mantuvo en agitación vigorosa durante una hora (requerida para obtener una efectiva precipitación de las proteínas no inmunoglobulinas). Finalmente se centrifugó por 10 minutos a 3.000 rpm y se registró el volumen de sobrenadante. El precipitado se resuspendió en buffer PBS pH 7,1 y se filtró. Por último, se registró el volumen recuperado.

Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas totales, tanto en los sobrenadantes como en los precipitados redissueltos, fue determinada por el método de biuret.¹⁹ Se registraron los valores de absorbancia en 550 nm, y la curva de calibración recurrió a soluciones estándar de seroalbúmina bovina de 2 y 10 mg/ml. Las proteínas totales del sobrenadante de la precipitación con ácido caprílico fueron cuantificadas por el método de Bradford²⁰ sobre diluciones apropiadas de muestra, ya que el ácido caprílico interfiere en las determinaciones por el método de biuret. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones independientes \pm el desvío estándar.

Cuantificación de albúmina

La concentración de albúmina, tanto en los sobrenadantes como en los precipitados redissueltos, fue determinada por el método del verde de bromocresol.²¹ Se registraron los valores de absorbancia en 625 nm, y se realizaron curvas de calibración utilizando soluciones estándar de seroalbúmina bovina de 10 mg/ml para las muestras más concentradas y 2 mg/ml para las menos concentradas. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones independientes \pm el desvío estándar.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) unidimensional

Para analizar la composición de las diferentes muestras, se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida al 7,5% en condiciones desnaturizantes y no reductoras, de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli.²² Se efectuaron a 180 V y corriente variable durante aproximadamente 40 minutos. Una vez finalizada la corrida, los geles se tiñeron con Coomassie Blue R-250.

Determinación del nivel de anticuerpos

Los niveles de anticuerpos del sobrenadante de la precipitación con ácido caprílico y el precipitado de sulfato de amonio redissuelto –previamente diafiltrados contra solución fisiológica– fueron determinados por el método de ELISA descrito por Dong.²³ Se realizaron diluciones decimales de las muestras, que fueron transferidas a una placa de 96 pocillos sensibilizada con una concentración de 5 μ g/ml de veneno crotálico. Después de sucesivos lavados, los anticuerpos anticrotálicos fueron revelados con un anticuerpo anti-inmunoglobulina de caballo conjugado con peroxidasa. Tras el agregado de TMB, la reacción de color se detuvo con ácido sulfúrico 2 N, y se registró la absorbancia en 450 nm. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones independientes \pm el desvío estándar.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los resultados de las determinaciones de proteínas totales y albúmina de las distintas fracciones. Por diferencia, se calculó la cantidad de globulinas. (Tabla 1). Dado que el uso de sulfato de amonio al 40% de saturación permite precipitar prácticamente la totalidad de las globulinas del suero hiperinmune, se eligió esta condición para establecer la comparación con la precipitación con ácido caprílico al 3%.

En las Figuras 1 y 2 se muestran las SDS-PAGE corres-

TABLA 1. Determinación de proteínas totales, albúmina y globulinas.* †

Muestra	Proteínas totales (g/50 ml)	Albúmina (g/50 ml)	Globulinas (g/50 ml)
Suero hiperinmune	3,80 \pm 0,17	1,78 \pm 0,25	2,02
Sobrenadante SA 20%	3,37 \pm 0,11	1,75 \pm 0,21	1,62
Sobrenadante SA 30%	2,45 \pm 0,09	1,64 \pm 0,20	0,81
Sobrenadante SA 40%	1,66 \pm 0,07	1,58 \pm 0,22	0,08
Sobrenadante SA 50%	1,47 \pm 0,10	1,43 \pm 0,23	0,04
Sobrenadante AC 3%	1,96 \pm 0,04	0,01 \pm 0,01	1,95
Precipitado SA 20%	0,40 \pm 0,13	0,03 \pm 0,03	0,37
Precipitado SA 30%	1,29 \pm 0,09	0,14 \pm 0,06	1,15
Precipitado SA 40%	2,01 \pm 0,29	0,20 \pm 0,12	1,81
Precipitado SA 50%	2,08 \pm 0,40	0,35 \pm 0,11	1,73
Precipitado AC 3%	1,73 \pm 0,22	1,71 \pm 0,36	0,02

* Los resultados corresponden al promedio de tres determinaciones \pm el desvío estándar.

† El valor de globulinas se obtuvo por diferencia entre el valor de proteínas totales y el de albúmina.

Abreviaturas: SA= sulfato de amonio; AC= ácido caprílico

Fuente: Elaboración propia.

pendientes a las preparaciones finales de los sobrenadantes y precipitados fraccionados con sulfato de amonio y del sobrenadante y precipitado fraccionado con ácido caprílico, respectivamente, en comparación con el suero hiperinmune que sirvió como material de partida. (Figuras 1 y 2)

En una etapa posterior, tanto el sobrenadante de la precipitación con ácido caprílico al 3% como el precipitado rediseuelto de la precipitación con sulfato de amonio al 40% de saturación se sometieron a diafiltración contra solución fisiológica y, sobre estas preparaciones finales, se midió el nivel de anticuerpos antiveneno por el método de ELISA. A fin de determinar una dilución que permitiera discriminar sueros con diferente título, se evaluó una serie de diluciones decimales de las muestras originales. Se estableció que la que mejor discriminaba el nivel de anticuerpos entre las

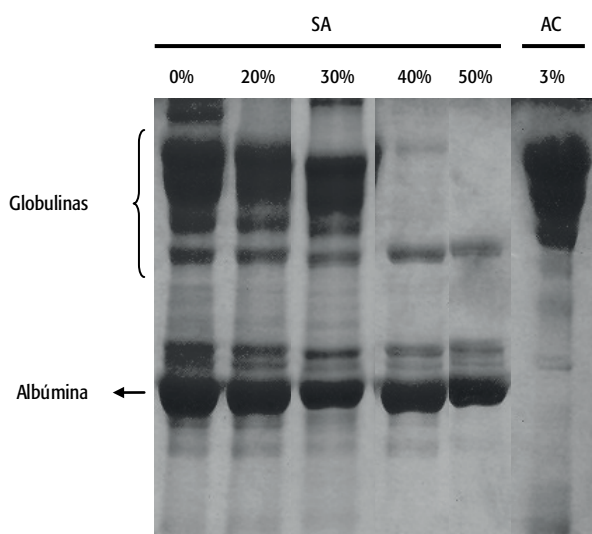
muestras era 1/1.000. (Figura 3)

No se observaron cambios significativos en proteínas totales, albúmina y corrida electroforética (datos no mostrados) por el uso de una solución de fenol 90%/éter (50:50) en una proporción de 0,9% como conservante del plasma equino hiperinmune. Tras los ensayos de ELISA, se registraron los resultados para la dilución 1/1.000 de las muestras control y las muestras de plasma hiperinmune crotálico, con y sin conservante. (Figura 4)

DISCUSIÓN

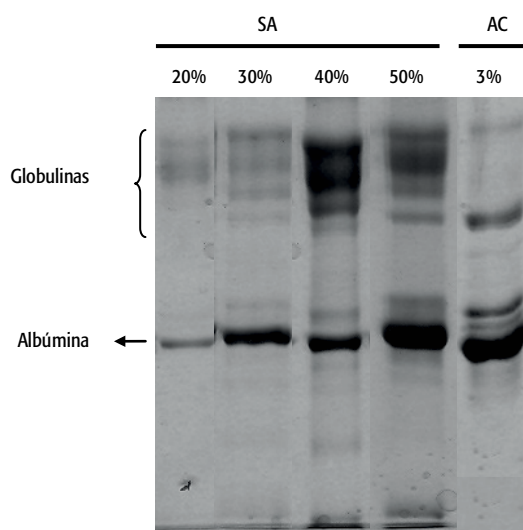
Se evidencia una disminución del contenido total de proteínas en los sobrenadantes a medida que aumenta el porcentaje de saturación de sal. Con 40% de saturación de sulfato de amonio, sólo precipita alrededor de 10% de

FIGURA 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes y no reductoras, 7,5% de los sobrenadantes de la precipitación de suero equino hiperinmune con sulfato de amonio a diversas concentraciones y con ácido caprílico al 3%, tinción del gel realizada con Coomassie Blue R-250.



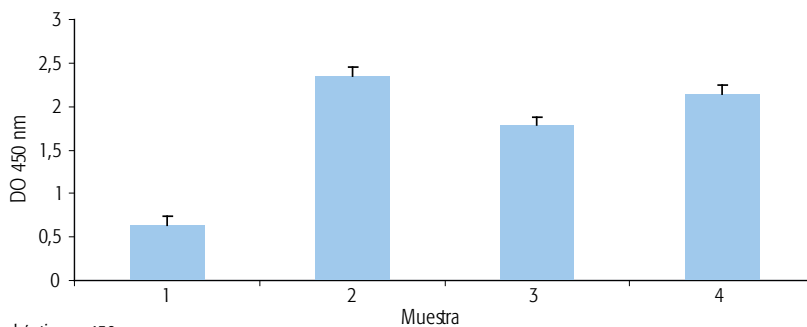
Abreviaturas: SA = sulfato de amonio; AC = ácido caprílico
Fuente: Elaboración propia.

FIGURA 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes y no reductoras, 7,5% de los precipitados rediseueltos tras la precipitación de suero equino hiperinmune con sulfato de amonio a diversas concentraciones y con ácido caprílico al 3%, tinción del gel realizada con Coomassie Blue R-250.



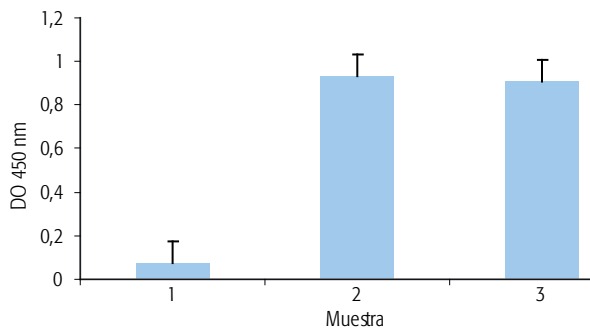
Abreviaturas: SA = sulfato de amonio; AC = ácido caprílico
Fuente: Elaboración propia.

FIGURA 3. ELISA de los preparados finales de los fraccionamientos con sulfato de amonio 40% y ácido caprílico 3% (muestra 1: control negativo; muestra 2: suero hiperinmune; muestra 3: precipitado con sulfato de amonio 40% rediseuelto; muestra 4: sobrenadante 3% ácido caprílico).



DO 450 nm: Densidad óptica en 450 nm
Fuente: Elaboración propia.

FIGURA 4. Análisis del nivel de anticuerpos de plasma equino hiperinmune tratado o no tratado con conservante (muestra 1: control negativo; muestra 2: antisuero sin conservante; muestra 3: antisuero con conservante).



DO 450 nm: Densidad óptica en 450 nm.
Fuente: Elaboración propia.

albúmina y prácticamente la totalidad de las globulinas. Por otro lado, los resultados correspondientes a la precipitación con ácido caprílico muestran que se obtiene un sobrenadante con todas las globulinas y sólo vestigios de albúmina, lo que lo convierte en un método más eficiente en comparación con el fraccionamiento con sulfato de amonio.

Es clara la presencia tanto de albúmina como de globulinas en la fracción correspondiente al precipitado con 40% de saturación de sal, mientras que se observa la presencia de albúmina y casi la ausencia de globulinas en la fracción precipitada con ácido caprílico. Estos resultados concuerdan con las determinaciones espectrofotométricas de albúmina y proteínas totales.

En la determinación del nivel de anticuerpos por ELISA se obtuvieron valores similares para el suero hiperinmune y el preparado final de la precipitación con ácido caprílico. Por el contrario, el preparado final de la precipitación con sulfato de amonio evidenció un menor nivel de anticuerpos, lo que sugiere una pérdida de ellos en la etapa de redisolución del precipitado, además de la formación de agregados inmunológicamente inactivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ministerio de Salud. Resolución 132/2001, Programa Nacional de Garantía de la Atención Médica, Guía de Centros Antiponzoñosos de la República Argentina, Programa Nacional de Ofidismo.
- Morais VM, Massaldi H. Snake Antivenoms: Adverse Reactions and Production Technology. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2009;15:2-18.
- Chippaux JP. Snake-Bites: Appraisal of the Global Situation. *Bull World Health Organ.* 1998;75:515-524.
- Arroyo O, Rojas G, Gutiérrez JM. Envenenamiento por mordedura de serpiente en Costa Rica en 1996: epidemiología y consideraciones clínicas. *Acta Med Costarric.* 1999;41:23-29.
- Otero-Patiño R, Cardoso JLC, Higashi HG, Núñez V, Sierra A, Díaz A, et al. A Randomized, Blinded, Comparative Trial of One Pepsin-Digested and Two Whole IgG Antivenoms for Bothrops Snake Bites in Urabá, Colombia. *Am J*

Trop Med Hyg. 1998;58:183-189.

Cabe señalar que la preparación de sueros antiveneno por precipitación con sulfato de amonio o ácido caprílico de los fragmentos $F(ab')_2$ de las inmunoglobulinas requiere un paso adicional de clivaje enzimático, que disminuye aún más el rendimiento del proceso. Este factor no fue tenido en cuenta en el presente trabajo.

Los resultados de la comparación del nivel de anticuerpos por ELISA en plasma no tratado y tratado con conservante evidenciaron que el agente utilizado en el Servicio de Sueros Terapéuticos del INPB no modifica el título de anticuerpos del plasma equino hiperinmune.

Los resultados surgidos a partir de este trabajo experimental sugieren fuertemente la conveniencia de adoptar el proceso de producción de antivenenos ofídicos mediante precipitación con ácido caprílico, según los parámetros optimizados descritos en la bibliografía.¹⁷ Esto permite obtener un producto con mayor pureza –por ende, con una reducción de los efectos adversos– y mayor potencia y rendimiento en comparación con el método de precipitación con sulfato de amonio.

RELEVANCIA PARA POLÍTICAS E INTERVENCIONES SANITARIAS

Este estudio puede ayudar a adoptar un método optimizado de producción de sueros antiveneno, que los mejore tanto en materia de rendimiento como de calidad.

RELEVANCIA PARA LA INVESTIGACIÓN EN SALUD

Los resultados obtenidos pueden ser aplicables al resto de los antivenenos de animales ponzoñosos que se producen en el INPB.

Este trabajo puede ser complementado por otras investigaciones dirigidas a mejorar los métodos de producción de antivenenos con nuevas tecnologías, como la cromatografía, que deberían ser de bajo costo para no influir significativamente en la economía del proceso.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

No hubo conflicto de intereses durante la realización del estudio.

Venom by Affinity Purification. *Proc West Pharmacol Soc.* 1982;25:185-189.

¹⁰ Russell FE, Sullivan JB, Egen NB, Jeter WS, Markland FS, Wingert WA, et al. Preparation of a New Antivenom by Affinity Chromatography. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34:141-150.

¹¹ Dias WO, Esteves MI, Furuta JA, Higashi HG, Marcellino JR, Oishi NY, et al. Chromatographic Purification of Antivenoms and Antitoxins. *Mem Inst Butantan.* 1989;51:195-203.

¹² Smith DC, Reddi KR, Laing G, Theakston RGD, Landon J. An Affinity Purified Ovine Antivenom for the Treatment of *Vipera berus* Envenoming. *Toxicon.* 1992;30:865-871.

¹³ Rojas G, Jiménez JM, Gutiérrez JM. Caprylic Acid Fractionation of Hyperimmune Horse Plasma: Description of a Simple Procedure for Antivenom Production. *Toxicon.* 1994;32:351-363.

¹⁴ Wang J, Diehl T, Aguilar D, Dai XP, Arunakumari A. Precipitation of process-derived impurities in non-protein A purification schemes for antibodies. *BioPharm. International*, 2009, October supplement:

¹⁵ Baldwin RL. Temperature Dependence of the Hydrophobic Interaction in Protein Folding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:8069-8072.

¹⁶ Haidacher D, Vailaya A, Horvát C. Temperature Effects in Hydrophobic Interac-

tion Chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:2290-2295.

¹⁷ Nudel BC, Perdoménico C, Jácono R, Cascone O. Optimization by Factorial Analysis of Caprylic Acid Precipitation of Non-Immunoglobulins from Hyperimmune Equine Plasma for Antivenom Preparation. *Toxicon.* 2012;59:68-73.

¹⁸ Ammonium Sulfate Calculator. [Disponible en:<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>]. [Último acceso: 29 de enero de 2013].

¹⁹ Gornall AG, Bardawill CS, David MM. Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *J Biol Chem.* 1949;177:751-766.

²⁰ Bradford MM. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.

²¹ Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin Standards and the Measurement of Serum Albumin with Bromocresol Green. *Clin Chim Acta.* 1971;31:87-96.

²² Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.

²³ Dong LV, Quyen LK, Eng KH, Gopalakrishnakone P. Immunogenicity of Venoms from Four Common Snakes in the South of Vietnam and Development of ELISA Kit for Venom Detection. *J Immunol Meth.* 2003;282:13-31.