

# Preparación y ensayo de un antiveneno (inmunoglobulina antiofídica) liofilizado activo contra veneno de *Bothrops Neuwiedii* (yara)

Dres Horacio F Laborde, Cynthia Sevcec,  
Carmen Legnani

*Los antivenenos antiofídicos (sueros e inmunoglobulinas) son elementos de probada eficacia en el tratamiento de envenenamientos provocados por las mordeduras de serpientes ponzoñosas.*

*En el presente trabajo se describe la elaboración y el ensayo de una inmunoglobulina capaz de neutralizar la toxicidad del veneno de *Bothrops neuwiedii* (yara).*

*El suero inmune fue obtenido de un equino, el que había sido inoculado previamente con dosis crecientes de veneno detoxificado y luego con dosis crecientes de veneno activo de ejemplares de la citada especie.*

*El referido suero fue purificado y liofilizado; la purificación tiene como objeto aislar la inmunoglobulina responsable de la actividad neutralizante, mientras que la liofilización asegura la conservación de dicha actividad por un período de hasta cinco años a temperatura ambiente. Esta característica hace que el antiveneno pueda estar disponible en zonas rurales apartadas o carentes de las condiciones de refrigeración requeridas por los sueros líquidos.*

*Los resultados obtenidos reafirman la viabilidad técnica de la producción local de sueros antiofídicos y las ventajas socioeconómicas que esa producción implica, al hacer que el país no dependa del exterior para su aprovisionamiento de antivenenos.*

## Palabras clave:

- Venenos de serpiente
- Antivenenos
- Sueros inmunes
- Inmunoglobulina

## Dr Horacio F Laborde

Jefe, División Microbiología,  
Instituto de Investigaciones  
Biológicas Clemente Estable  
(IIBCE).

## Cynthia Sevcec

Bachiller en Medicina  
Veterinaria  
Especialista Preparador,  
División Microbiología, IIBCE.

## Carmen Legnani

Química Farmacéutica  
Ayudante de Investigación,  
División Microbiología, IIBCE.

## INTRODUCCION

Desde los trabajos de Calmette en 1894 y Vital Brazil en 1907 a la fecha, los antivenenos han mostrado su eficacia en el tratamiento de los envenenamientos causados por mordeduras de serpientes ponzoñosas (1,2); al respecto la Organización Mundial de la Salud (OMS) afirma que la mortalidad en personas mordidas desciende del 74% al 12% cuando se realiza un tratamiento precoz con antiveneno (2).

La incidencia del ofidismo en el Uruguay es de alrededor de 100 casos anuales (3), para cuyo control y tratamiento el país dispone de sueros antiofídicos importados de Argentina o Brasil.

Esta situación plantea dos problemas: 1) la dependencia

de nuestro sistema sanitario de esa importación, la que a su vez está condicionada a las variaciones en la producción de los laboratorios proveedores y a las necesidades del propio país productor; 2) los antivenenos importados son preparados a partir de venenos de ejemplares provenientes de regiones geográficas distantes de las nuestras, y es un hecho demostrado la influencia que el lugar de procedencia de las serpientes tiene en las características del veneno (4).

En este trabajo se demuestra que las metodologías aconsejadas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para la obtención de antivenenos (5), o las usadas por nuestro equipo para la producción de inmunoglobulinas anti-*Bothrops neuwiedii* en escala piloto (6), pueden ser aplicadas a la preparación de los sueros antiofídicos que los sistemas sanitarios nacionales requieren para la distribución en todo el país.

El veneno empleado en la ejecución de este trabajo fue ordeñado de ejemplares de *B. neuwiedii* colectados en

## Correspondencia:

Dr HF Laborde, IIBCE, Avenida Italia 3318,  
Montevideo, Uruguay.

los departamentos de Lavalleja, Soriano y Paysandú.

Para obtener los anticuerpos, el referido veneno se inoculó a un equino, animal adecuado (5) por la buena respuesta inmunogénica que proporciona, por los grandes volúmenes de sangre que se pueden obtener en cada extracción y porque éstas pueden repetirse en plazos relativamente cortos.

La primera serie de inoculaciones se hizo con veneno toxoidizado (7, 8), a fin de generar en el equino los anticuerpos protectores que permitieran la administración, en una segunda etapa, de veneno activo.

Se inocularon varias dosis de toxoide, luego de lo cual se hizo una pequeña sangría para determinar el nivel de anticuerpos neutralizantes en el suero; a partir de ese momento se comenzó la inoculación de dosis crecientes de veneno activo. Se efectuó una segunda sangría de mayor volumen y el suero obtenido fue purificado de acuerdo a la metodología aconsejada por la OPS (5) y a las técnicas descritas anteriormente por los autores (9).

La purificación tiene como objeto separar la inmunoglobulina, responsable de la actividad neutralizante hacia el veneno, de otras proteínas que carecen de dicha actividad. Concomitantemente, la referida purificación evita o reduce la posibilidad que ocurran accidentes alérgicos durante el tratamiento con antiveneno a un paciente mordido (10).

Como etapas complementarias finales al proceso de purificación, la inmunoglobulina fue esterilizada, repartida en frascos y liofilizada; la liofilización, al remover el agua del producto, hace posible su conservación y el mantenimiento de la actividad neutralizante por períodos de hasta cinco años sin necesidad de refrigeración (2).

El antiveneno obtenido tiene una actividad neutralizante, frente al veneno de *B neuwiedii*, similar a la recomendada por OPS (5).

## MATERIAL Y METODO

### Ejemplares de *B neuwiedii*

Los ejemplares usados para la extracción de veneno fueron capturados en diferentes localidades del interior del país, y mantenidos en un pequeño serpentario en el IIBCE, en las condiciones aconsejadas en el Manual de la OPS (5).

### Veneno

El veneno fue extraído por ordeño, congelado de inmediato a  $-20^{\circ}\text{C}$  y luego liofilizado. Los frascos con el veneno desecado se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su reconstitución.

### Solución salina fosfatada (SSF)

Esta solución fue usada para reconstituir el veneno y

para efectuar las diluciones seriadas empleadas en la determinación de la actividad neutralizante de la inmunoglobulina. Su composición es la siguiente: cloruro de sodio: 8,20 g; fosfato disódico: 1,70 g; fosfato monopotásico: 0,41 g; agua destilada: hasta 1000 ml. El pH resultante es de 7.2.

### Reconstitución del veneno y ajuste de la densidad óptica (DO) de sus soluciones

El veneno liofilizado fue disuelto en SSF, a una concentración de 2.5 mg/ml. La solución se centrifugó a 3000 g durante 30 minutos. Se descartó el sedimento y con el sobrenadante se prepararon diluciones seriadas usando SSF como diluyente. Se midió la DO de estas soluciones en un espectrofotómetro Gilson, a una longitud de onda de 280 nm. Para los ensayos de preparación del toxoide y de determinación de la dosis mortal (DM 100) se emplearon soluciones de DO 0.85 a 1.55, con intervalos de 0.10. Como dato complementario, toda vez que se haga referencia al valor de la DO, se agregará entre paréntesis, la concentración aproximada equivalente, expresada en mg/ml.

### Determinación de la dosis mortal (DM 100) de veneno

En esta determinación se emplearon venenos de diferentes ejemplares de *B neuwiedii* o venenos del mismo animal, ordeñado en diferentes fechas.

Se inocularon por vía intraperitoneal varios lotes de ratones, con dosis de 0.1 ml de diluciones de veneno que tenían DO entre 0.80 y 1.50 (0.8 mg/ml a 1.5 mg/ml).

### Preparación del toxoide

El veneno fue toxoidizado siguiendo el método de Kondo y colaboradores (11): a una solución de veneno de DO 1.55 (1.5 mg/ml) se le agrega 0.25% de formol cada 48 horas, hasta llegar al 1% de ese producto. El tratamiento se lleva a cabo a  $37^{\circ}\text{C}$ , y a las 48 horas del último agregado de formol se hace una diálisis de 24 horas contra agua destilada a  $4^{\circ}\text{C}$ , con cambios de agua cada 6 horas. Este tratamiento tiene como objeto eliminar el formol, agregándose entonces 0.5% de fenol como conservador. En la Tabla 1 se esquematiza el cronograma de toxoidización.

### Control de toxicidad del toxoide

Se inoculó intraperitonealmente con 0.5 ml por animal, a un lote de 5 ratones.

### Animales de experiencia

Equino. Para la producción del suero inmune se usó un equino de aproximadamente 400 kg. de peso y siete años de edad, mantenido con permanente control veterinario, y en las condiciones sanitarias aconsejadas para una experiencia de este tipo.

Ratones. Se usaron animales de ambos sexos, de 15 a

**TABLA 1**  
Preparación del toxoide

100 ml de solución de veneno DO* 1.55 + (1.5 mg/ml)	día	0	0.25%	formol
	día	2	0.25%	formol
	día	4	0.25%	formol
	día	6	0.25%	formol
-----				
	día	8	dializado	
	día	10	0.5%	fenol

\*DO (densidad óptica) a 280 nm

20 g de peso, alimentados con ración adecuada y agua sin restricciones.

Conejos. Se usaron animales de ambos sexos, de aproximadamente 1,5 kg de peso, alimentados con ración adecuada y agua sin restricciones.

**Inmunización y sangrado del equino**

En los primeros 300 días del cronograma de inoculación se usaron 13 dosis crecientes (3 a 20 ml) de toxoide, y a partir del día 320, 11 dosis crecientes (0.4 a 20 mg) de veneno activo. Las dosis de 20 mg corresponden aproximadamente a 20 DM para el equino; cuando se aumentó la dosis a 25 mg aproximadamente, se produjeron algunos trastornos, por lo que se decidió mantener la

dosis de 20 mg.

En el día 265 se hizo una sangría de 100 ml (para determinar el nivel de anticuerpos neutralizantes) y en el día 510 una de 4 litros. Este último volumen se recogió en recipientes con oxalato de sodio, y fue destinado a la producción de inmunoglobulina. En la Tabla 2 se detalla el cronograma de inoculación y sangrado.

**Purificación del suero**

La sangre obtenida se dejó 24 horas en heladera a 4°C y luego se centrifugó a 1250 g durante 45 minutos. El plasma sobrenadante fue sometido a precipitaciones sucesivas con diferentes porcentajes de sulfato de amonio, de acuerdo al método recomendado por la OPS (5). Lue-

**TABLA 2**  
Cronograma de inoculación al caballo

DIA	INOCULO	DIA	INOCULO
0	3 ml toxoide	300	20 ml toxoide
30	5 " "	320	0.4 mg veneno
45	5 " "	335	0.4 " "
65	5 " "	350	1.0 " "
85	5 " "	375	2.0 " "
105	10 " "	405	4.0 " "
125	15 " "	420	5.0 " "
155	15 " "	435	10.0 " "
170	20 " "	455	15.0 " "
195	20 " "	465	20.0 " "
220	20 " "	480	20.0 " "
260	20 " "	495	20.0 " "
265	sangría	510	sangría

**TABLA 3**

Purificación del plasma con sulfato de amonio (SuA)

plasma + 11.07% SuA; centrifugar  
 sobrenadante + 23.8% SuA; centrifugar  
 sedimento solubilizado en agua  
 agregado de 30% de SuA; centrifugar  
 sedimento solubilizado en agua  
 diálisis, esterilización  
 envasado, liofilización

go de la última precipitación se disolvió el sedimento en agua, se realizó una diálisis contra agua a 4°C, para eliminar el sulfato de amonio de la solución, se esterilizó esa solución por filtración y se repartió asépticamente en frascos. Finalmente el producto fue liofilizado en un liofilizador Virtis, empleándose un lapso de 5 horas para el desecado de cada lote de 11 frascos. En la Tabla 3 se detallan las diferentes etapas de la purificación.

**Determinación de la actividad neutralizante de la inmunoglobulina**

Para esta prueba se siguió la metodología aconsejada por Grasset (12), basada en la inoculación de una mezcla de veneno y antiveneno. La cantidad de veneno se mantiene constante, mientras que la de antiveneno se varía para cada lote de ratones inoculados. En nuestras determinaciones se usó una solución de veneno de DO de 1.00 (1.0 mg/ml); a alícuotas de 1 ml de esta solución se les agregó 100, 80, 40, 30, 20 y 10 mg de antiveneno liofilizado. Cada mezcla fue incubada a 37°C durante 1 hora y cada una fue inoculada intraperitonealmente a

lotes de ratones, en dosis de 0.1 ml por animal. En la realización de las pruebas de control para este ensayo se incubó una solución de veneno DO 1.00 durante 1 hora a 37°C y luego se inoculó intraperitonealmente 0.1 ml por animal a un lote de 5 ratones.

**Controles de la inmunoglobulina**

*Esterilidad*

Se sembró 1 ml de antiveneno reconstituido con SSF, en 40 ml de caldo fluido con tioglicolato (Bacto), y se incubó a 30-32C y a 20-25C durante 14 días.

*Pirogenicidad*

Se usó un conejo, el que fue inoculado en la vena marginal de la oreja, con antiveneno reconstituido. La dosis fue de 3 ml por kg de peso.

*Toxicidad*

Se inocularon intraperitonealmente ratones con 0.5 ml de antiveneno reconstituido.

*Humedad*

Las muestras de antiveneno fueron pesadas, sometidas a una segunda desecación y pesadas nuevamente.

*Presencia de sulfatos*

La reacción se realizó en los baños de diálisis (antes de la esterilización de la solución de inmunoglobulina), a los efectos de comprobar la eficiencia de esa operación en la eliminación del sulfato de amonio usado en la purificación de la inmunoglobulina. Como reactivo se usa una solución al 5% de cloruro de bario, a la que se agrega 0.5% de ácido acético. Se adicionan 2 ml de este reactivo a 8 ml de agua de diálisis, y se compara la turbidez con la de un patrón que contiene 0.08 g de sulfato de

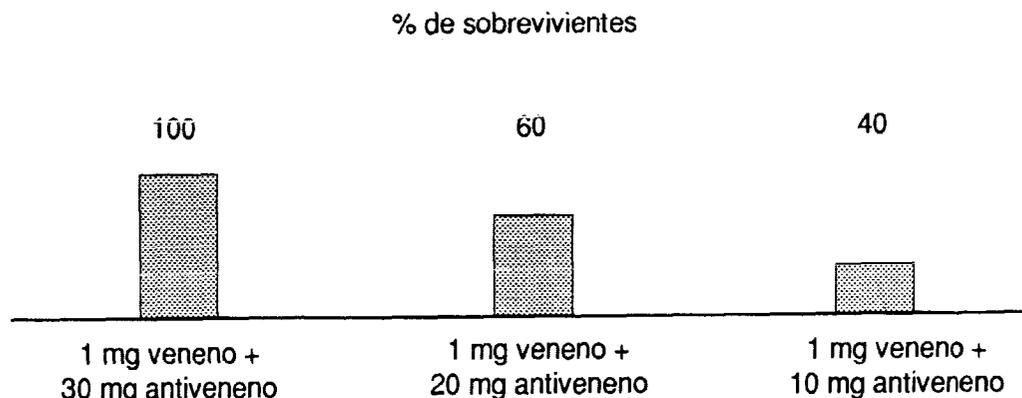
**TABLA 4**

Determinación de la DM 100 de veneno para el ratón  
 lotes inoculados con 0,1 ml de diferentes diluciones

dilución A: DO* 1.10 (1.1 mg/ml)		100% muertos
dilución B: DO 1.00 (1.0 mg/ml)		100% muertos
dilución C: DO 0.90 (0.9 mg/ml)		60% muertos

\*DO (densidad óptica) a 280 nm

**TABLA 5**  
**Actividad neutralizante del antiveneno**  
**Ratones inoculados con una mezcla de veneno y antiveneno**



amonio por litro. Este último valor es considerado el máximo permisible.

## RESULTADOS

### Toxicidad del toxoide

Los cinco ratones inoculados intraperitonealmente con una dosis de 0.5 ml de solución de veneno toxoidizado, sobrevivieron a dicha inoculación, quedando demostrada así la atoxicidad del veneno tratado con formol.

### Determinación de la DM 100 de veneno para el ratón

En la Tabla 4 se muestran los porcentajes de ratones sobrevivientes a la inoculación de diferentes concentraciones de veneno.

Quedó establecido que un volumen de 0.1 ml de una solución de veneno de DO 1.00 (1.0 mg/ml), inoculado intraperitonealmente, es la dosis mínima que mata al 100% de los ratones en menos de 24 horas. Este valor se ha mantenido constante para diferentes lotes de veneno obtenidos del mismo animal, o de diferentes ejemplares de *B neuwiedii*.

### Inmunización del equino

El cronograma de inoculación de este animal se cumplió en su mayor parte sin que hubieran reacciones de importancia. Sólo al final de la serie, y al elevar la dosis de 20 a 25 mg, se produjeron algunos trastornos: astasia, ataxia, dismetría y excitación. Estas manifestaciones ocurrieron inmediatamente después de la inoculación y desaparecieron al cabo de 20 minutos, pero por precaución no se repitió esa dosis.

### Determinación de la actividad neutralizante de la inmunoglobulina

La eficacia de la inmunoglobulina para proteger a los ratones de la inoculación de veneno se detalla en la Tabla 5, donde se muestran los porcentajes de ratones sobrevivientes a la inoculación intraperitoneal de mezclas de concentraciones fijas de veneno y de concentraciones escalonadas de inmunoglobulina. Quedó establecido que 30 mg de inmunoglobulina neutralizan 1 mg de veneno (el existente en 1 ml de una solución de DO 1.00).

Cantidades inferiores de inmunoglobulina (20 y 10 mg) neutralizaron cantidades menores de veneno, lo que se reflejó en una disminución del número de ratones sobrevivientes a la inoculación de la mezcla.

En cada uno de los ensayos de la actividad neutralizante de la inmunoglobulina se redeterminó el valor de la DM 100, no encontrándose variaciones en la actividad tóxi-

**TABLA 6**  
**Controles complementarios**

ESTERILIDAD	cultivo negativo
PIROGENICIDAD	negativa
HUMEDAD RESIDUAL	menor del 1%

ca del veneno.

### Controles de esterilidad, pirogenicidad y humedad de la inmunoglobulina

Se comprobó la ausencia de crecimiento bacteriano en los medios de cultivo usados; quedó establecida también la ausencia de pirógenos y se determinó que la cantidad de agua residual en el producto es inferior al 1% del peso total.

En la Tabla 6 se reseñan los resultados de los controles efectuados a la inmunoglobulina.

### DISCUSION

El uso de antivenenos es siempre aconsejado para el tratamiento de una persona mordida por un ofidio ponzoñoso y al respecto se postula (3) que ese tratamiento debe iniciarse dentro de las seis horas de producida la mordedura. Otros autores (13) sostienen que aún después de ese período de tiempo es beneficioso el empleo de antiveneno. Debe tenerse en cuenta que ese tratamiento es sólo una parte de la terapia, la que puede requerir además hemodiálisis y la reposición de factores (fibrinógeno, plaquetas) (3).

La abundancia en algunas zonas del país de ejemplares del género *Bothrops*, con su característica de acercarse a centros poblados, reafirma la conveniencia sanitaria de producir un antiveneno con actividad neutralizante para el veneno de *B. neuwiedii*.

El veneno usado para la inmunización del equino se obtuvo de serpientes del país (a pesar de disponer de pocos ejemplares en cautividad) porque es un hecho demostrado la variación en los venenos de serpientes provenientes de zonas geográficas diferentes (14); es ésta otra razón para sostener que la producción de antivenenos a partir de venenos locales es la meta que debe alcanzarse.

La cantidad de sustancias que componen un veneno y sus diversos modos de actuar en las diferentes especies de animales hace dificultosa la elección de un modelo experimental adecuado para la determinación de la actividad neutralizante de un antiveneno. La OMS, la OPS y los laboratorios de referencia aconsejan el uso del ratón (2), pero también ponen de manifiesto la necesidad de buscar nuevos métodos de evaluación de esa actividad neutralizante. Al respecto creemos de interés mencionar los trabajos de Gutiérrez y colaboradores (15) sobre una reacción *in vitro* de neutralización de la actividad hemolítica, y de Theakston y Reid (16) mediante reacción de ELISA. Por su excelente correlación con las determinaciones *in vivo*, estas pruebas son propuestas por sus autores como sustitutivas de las de neutralización.

La decisión de expresar la concentración de veneno en valores de densidad óptica se apoya en tres razones: 1) existe una relación lineal entre la concentración de vene-

no y la DO de la solución; 2) cuando se reconstituye el veneno con SSF, es necesario remover por centrifugación partículas insolubles, lo que hace que cambie la relación inicial peso/volumen que expresaba la concentración de veneno en la solución; 3) los valores requeridos de DO corresponden a la zona de mayor precisión del espectrofotómetro, mientras que si se usara la relación peso/volumen para expresar la concentración, las pesadas requeridas (de décimas de milígramo), estarían en el límite de la precisión de nuestras balanzas.

La elección del equino como productor de anticuerpos se debe no sólo a su buena respuesta inmunitaria, sino también a los grandes volúmenes de sangre que es posible obtener en cada sangría (hasta 16 litros en tres días si se reponen los glóbulos rojos) (5).

Para la primera etapa del proceso de inmunización se usó un veneno toxoidizado; este paso constituyó un importante factor de seguridad para el animal, ya que así se estimuló su sistema inmunitario sin el riesgo que implicaba el uso de veneno activo; si bien esta precaución alargó el cronograma en forma importante, debe recordarse que en los cronogramas en los que se emplea veneno no toxoidizado se requieren hasta cinco equinos, por la frecuencia de accidentes mortales durante las primeras inoculaciones.

Sin embargo, la inoculación de veneno activo es imprescindible, ya que sus características inmunogénicas son superiores a las del toxoide (17). Esta segunda etapa se inició con la administración de pequeñas dosis de veneno, que fueron incrementadas hasta llegar a una cantidad de 20 mg, equivalente a 20 DM 100 para un equino de 350 kg de peso.

El mismo interés en prevenir accidentes nos hizo prescindir del uso de adyuvantes, para evitar la formación de abscesos o la aparición de otras complicaciones (18).

El motivo de preparar un antiveneno purificado se basa en la ventaja que ofrece el uso de una inmunoglobulina purificada, al eliminar o reducir las posibilidades de aparición de reacciones alérgicas (10). La elección del método de precipitaciones con sulfato de amonio estuvo determinada por su aceptación universal, por la facilidad de su ejecución y por su adecuación a las posibilidades de nuestro medio (5). Se hace notar que también puede usarse la precipitación con sulfato de sodio, de acuerdo a resultados obtenidos en trabajos anteriores de nuestra División (9).

La liofilización (2) confiere a la inmunoglobulina dos características útiles: asegura la inalterabilidad de la actividad neutralizante del producto por un lapso de hasta cinco años, y elimina la necesidad de conservación en refrigeradora. Se posibilita así el almacenamiento del antiveneno en zonas rurales apartadas donde no se pueden conseguir las condiciones de conservación que requieren los sueros líquidos.

Debemos señalar que dado que no existen normas nacionales para la estandarización y control de las pro-

pedades de los antivenenos, se resolvió que los métodos de preparación y control de las inmunoglobulinas se ajustaran en todos sus términos a los que al respecto aconsejan la OMS y la OPS (5). Para la evaluación de los resultados de los ensayos de la actividad neutralizante se siguieron los lineamientos estadísticos establecidos por estas mismas Organizaciones. Se hace notar también que la actividad neutralizante del antiveneno obtenido coincide con los valores establecidos por los laboratorios de referencia (5).

De lo expuesto surge que por primera vez en el país se produce un antiveneno liofilizado con actividad neutralizante para el veneno de *B. neuwiedii*. Es evidente que los resultados obtenidos contribuyen sólo en parte a la solución del problema de disponibilidad de sueros antiofídicos, ya que se mantendrá la dependencia de la importación de antivenenos contra venenos de *Crotalus durissus terrificus* (cascabel) y *B. alternatus* (cruceca).

La aproximación más lógica a la solución global del problema deberá ser la preparación de una inmunoglobulina polivalente liofilizada, activa contra los venenos de las especies citadas. Con este fin se evalúa la posibilidad de que nuestro equipo se aboque a la realización de este proyecto. Se ejecutan asimismo los primeros trabajos para la purificación complementaria de la inmunoglobulina mediante tratamiento enzimático, de acuerdo a la opción planteada en los protocolos del Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica (5).

Se podrá asegurar así la disponibilidad permanente de estos productos en todo el territorio nacional, con la ventaja que esto tiene para los núcleos poblados o zonas de campamentismo en donde existe el riesgo cierto del ofidismo y que poseen la infraestructura hospitalaria mínima como para asegurar un tratamiento primario rápido del paciente mordido.

## CONCLUSIONES

La eficacia de los antivenenos en el tratamiento de personas mordidas por serpientes venenosas, ha sido demostrada en forma concluyente desde fines del siglo pasado.

La inmunoglobulina cuya preparación se ha descrito tiene la capacidad de neutralizar la actividad tóxica del veneno de *B. neuwiedii*, por lo que su disponibilidad puede ser útil en zonas del país donde abunda este ofidio; esa disponibilidad haría además que nuestras autoridades sanitarias no dependieran de la importación de antiveneno elaborado en el exterior.

Por sus características de conservar la actividad neutralizante por un período de hasta cinco años y no requerir refrigeración, el antiveneno producido puede agregar un factor de tranquilidad y seguridad en zonas apartadas de trabajo o campamentismo en las que abundan los ejemplares de *B. neuwiedii*, y donde no existan las condiciones de mantenimiento requeridas por los sueros líquidos.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los Dres O Trujillo-Cenóz y O Macadar la lectura crítica de este trabajo.

Agradecemos a las autoridades y personal de campo del Centro de Investigaciones Veterinarias Miguel C Rubino su colaboración en el mantenimiento y asistencia veterinaria del equino empleado en las experiencias descritas.

Este trabajo fue realizado en el marco del Proyecto Especial 79 de la Organización de los Estados Americanos (OEA) y del Grant F-8862 de la International Foundation for Science (IFS) de Suecia.

## Résumé

*Les antivenins (serums et immunoglobulines antiophidiens) sont des éléments dont leur valeur a été prouvée dans les traitements de morsures de serpents venimeux.*

*Ce travail décrit le procédé d'élaboration et d'essai d'une immunoglobuline qui neutralise la toxicité du venin de *Bothrops neuwiedii* (yara).*

*Le serum immunissant a été extrait d'un cheval qui avait été inoculé préalablement avec des doses croissantes de venin détoxifié d'abord et après avec des doses croissantes de venin actif, obtenu d'individus de l'espèce de référence.*

*Le serum a été ensuite purifié et lyophilisé. La première opération a pour but éviter ou réduire les accidents allergiques qui peuvent se produire pendant le traitement de personnes qui ont souffert des morsures; la deuxième assure la conservation de l'activité antitoxique pour une période de jusqu'à cinq ans sans qu'il ait besoin de réfrigération. Cette caractéristique permet la distribution du serum aux zones éloignées et dépourvues de moyens nécessaires pour la conservation de serums à l'état liquide.*

*D'autre part on peut constater la viabilité technique de la production locale de serums antiophidiens et les avantages socioéconomiques qui dérivent de cette production, puisque elle permet au Pays ne plus dépendre de l'extérieur pour sa provision d'antivenins.*

## Summary

*Antiophidic antivenoms (sera or immunoglobulins) have proven effective in the treatment of poisonous snakebites.*

*This paper describes the preparation and essay of an immunoglobulin capable of neutralizing the toxicity of venom from *Bothrops neuwiedii* (yara)*

*Immune serum was obtained from a horse previously inoculated with increasing doses of detoxified venom*

and later with increasing doses of active venom from *B neuwiedii*. After extraction the serum was purified and freeze-dried; purification prevents or minimizes the occurrence of allergic reactions during the treatment of the bitten patient, while freeze-drying insures the stability of the neutralizing properties of the immunoglobulin for periods of up to five years at temperatures up to 37°C. These storing characteristics are useful in far away rural districts with poor communication facilities or without the cold-room storage conditions required by liquid sera.

We lay stress on the feasibility of local preparation of antiophidic immunoglobulins and its implied socioeconomical advantages, because Uruguay could cease to depend on outside sources for the availability of antivenoms.

### Bibliografía

- 1.- **TRINCA GF**: The treatment of snakebites. *Med J. Aust* 1963; 275-280.
- 2.- **WORLD HEALTH ORGANIZATION**: Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. Geneva, 1981. (WHO Offset Publication N 58).
- 3.- **PURTSCHER H** et al.: Ofidismo y aracnidismo en el Uruguay. Diagnóstico, tratamiento y complicaciones. *Rev Med Uruguay*, 1983; 7:3-28.
- 4.- **SCHOTTLER W H A.**: Reference toxins for antivenin standardization. *Bull Org Mond Santé*, 1958; 19:341-361.
- 5.- **ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD**: Manual de procedimientos. Producción y pruebas de control en la preparación de antisueros diftérico, tetánico, botulínico, antivenenos y de la gangrena gaseosa. Washington, 1977; 104-141.
- 6.- **LABORDE HF, SEVCECC, LEGNANI DE FAJARDO C**: Preparación de un antiveneno (suero antiofídico) activo contra veneno de *Bothrops neuwiedii* (yara). Reunión de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, 2ª. Maldonado, 1988.
- 7.- **SADAIRO S, KONDO S, YAMAUCHI K, KONDO H, MURATA R**: Studies on immunogenicity of toxoids from Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) *Jpn J Med Sci Biol (Symposium)* 1970;285-289.
- 8.- **SOMEYA S, MURATA R, SAWAI Y, KONDO H, ISHI A**: Active immunization of man with toxoid of Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom. *Jpn. J Med Sci Biol*, 1972; 25:47-51.
- 9.- **LABORDE HF, LEGNANI DE FAJARDO C**: Preparation and assay of horse anti-*Pseudomonas* serum and gamma globulin in mice. In: Regamey, RH, Perkins, FT, *Progress in Immunobiological Standardization*. Basel: S Karger, 1972: 419-424.
- 10.- **SUTHERLAND SK**: Acute untoward reaction to antivenoms. *Med J Aust*, 1977; 17:841-842.
- 11.- **KONDO S, SADAIRO S, YAMAUCHI K, KONDO H, MURATA R**: Preparation and standardization of toxoid from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu). *Jpn J Med Sci Biol*, 1971; 24:281-294.
- 12.- **GRASSET E**: Survey of assay methods of antivenins. Immunological factors influencing antivenin standardization. *Bull Org Mond Santé*, 1957; 16:79-122.
- 13.- **REID HA, THEAN PC, MARTIN JW**: Specific antivenene and prednisone in viper bite poisoning: controlled trial. *Br Med J*, 1963; 1378-1380.
- 14.- **BOLAÑOS R, MUÑOZ G, CERDA L**: Toxicidad, neutralización e inmunoelectroforesis de los venenos de *Lachesis muta* de Costa Rica y Colombia. *Toxicon*, 1978; 16:295-300.
- 15.- **GUTIERREZ JM, AVILA C, ROJAS E, CERDAS L**: An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent /antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, 1988; 26(4): 411-413.
- 16.- **THEAKSTON RDG, REID HA**: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon*, 1979; 17: 511-515.
- 17.- **BOQUET P**: Immunological properties of snake venom. In: Lee YC *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer Verlag, 1979; 751.
- 18.- **CHRISTENSEN PA**: Production and standardization of antivenin. In: Lee CY, *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer Verlag, 1979:825.