

Producción de suero antiofídico en Uruguay

Dra. Araceli Pino Cheroni¹

Resumen

El presente trabajo, describe el proceso de producción del suero antiofídico antibothrops bivalente, para uso terapéutico, llevado a cabo por primera vez en el país en la División Producción del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina.

El suero, proveniente de equinos inmunizados con dosis crecientes de venenos bothrópicos activos, fue purificado mediante precipitaciones salinas, acción enzimática y calor. De esta forma se obtiene una inmunoglobulina hipotóxica e hiperinmune, capaz de neutralizar específicamente la acción de los venenos de Bothrops neuwiedi y alternatus.

El producto, que cumple con las normas internacionales, se presenta líquido, en frascos de 10 ml, conservado refrigerado, y es distribuido en todo el territorio, sólo por el Ministerio de Salud Pública.

La aplicación terapéutica de este suero, desde el comienzo, demostró su total eficacia y no se han producido accidentes por el uso del mismo.

Estos resultados han demostrado que es posible la producción nacional de este inmunobiológico con neutralización específica, para los venenos de ofidios que producen accidentes de entidad en Uruguay. Asimismo se asegura para el país su abastecimiento permanente con una cobertura de 100%, lográndose además la independencia de laboratorios extranjeros y ganancia de divisas.

Palabras clave: Antivenenos – uso terapéutico
Seroterapia
Inmunoglobulina
Mordeduras de serpiente – terapia
Uruguay

Antecedentes

En Uruguay, los accidentes ofídicos por especies ponzoñosas, si bien no son muy frecuentes, han sido causa de numerosas muertes. A los efectos de conocer su magnitud y normatizar el tratamiento, en 1986 la División Epidemiología del Ministerio de Salud Pública (MSP) estableció que la mordedura por ofidios venenosos es de denuncia obligatoria.

La mayor incidencia ocurre en primavera y verano, aunque pueden sucederse casos fuera de estos períodos

si existen condiciones meteorológicas favorables para la actividad del ofidio. Los accidentes predominan en trabajadores rurales, afectando en 20% a niños menores de 10 años. Todos los casos registrados fueron producidos por ofidios del género *Bothrops*^(1,2) (figura 1).

El recurso terapéutico frente al empozoñamiento ofídico es la administración del suero antiofídico (SAO) específico que neutralice el veneno^(1,4).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la mortalidad en estos accidentes desciende de 74 a 12%, cuando se realiza el tratamiento precoz con el suero específico⁽⁵⁾.

Hasta 1988, Uruguay importaba los SAO de Brasil y Argentina a través del MSP, que es quien regula su abastecimiento.

La dependencia de laboratorios extranjeros para la provisión del SAO, tiene varios inconvenientes:

1. Médico Especialista en Enfermedades Infectocontagiosas
Jefe de Sección, División Producción Sueros y Vacunas del Instituto de Higiene. Montevideo
Correspondencia: Dra. Araceli Pino Cheroni. Atlántico 1654 bis. Montevideo.
Presentado: 7/11/94
Aceptado: 21/11/94

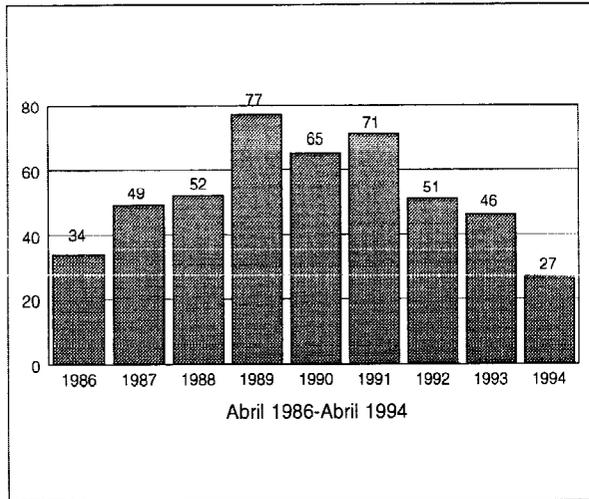


Figura 1. Accidentes ofídicos en Uruguay, (según datos de la División Epidemiología del Ministerio de Salud Pública (MSP))

- 1) inseguridad en el abastecimiento ya que la producción de estos laboratorios era insuficiente para la demanda de sus propios países,
- 2) gasto de divisas,
- 3) limitación de la importación a países limítrofes, ya que de lo contrario, los antígenos utilizados en la producción, suelen tener diferente especificidad por lo que los SAO son inadecuados para el tratamiento del emponzoñamiento provocado por nuestros ofídios.

No se conoce además, antecedentes de producción nacional, salvo el estudio de investigación realizado por Laborde y col. ⁽⁶⁾ en el que describen la producción a nivel experimental de una inmunoglobulina específica contra el veneno de *B. neuwiedi* purificada solamente por precipitación salina y liofilizada.

Por todas estas razones, las autoridades sanitarias consideraron de valor estratégico para nuestro país, la producción de SAO nacional.

Siendo que el Instituto de Higiene de Montevideo, desde su fundación en 1896, elabora sueros heterólogos antitetánico y antidiftérico para uso humano y veterinario de origen equino, resultó la institución idónea para tomar la iniciativa.

En 1987 la División Producción del Instituto de Higiene a través de su Sección Sueros y con el apoyo del MSP, encaró la producción de suero bivalente antibothrops para uso humano. A continuación se describe el proceso y sus resultados.

Material y método

Materiales técnicos

El entrenamiento necesario se logró con la capacitación

del personal técnico en el Instituto Malbrán de la República Argentina (RA) por medio de becas otorgadas por la Oficina Panamericana de la Salud (OPS) y con el resto del personal que funcionaba en el Instituto de Higiene.

Animales

El primer lote de diez equinos fue proporcionado por el MSP. Los animales eran sanos, jóvenes entre 2 y 5 años y de más de 500 kilos de peso.

Para las pruebas de potencia y seguridad, se utilizaron ratones blancos de 18 a 20 g de peso (*Mus musculus*) de ambos sexos, y libres de patógenos específicos. Para las pruebas de inocuidad y seguridad se utilizaron cobayos machos de 300 a 350 g de peso y libres de patógenos específicos.

Antígenos

Como se carecía de producción local de veneno, en el comienzo se utilizaron venenos de *Bothrops neuwiedi*, y *B. alternatus* cedidos por el Instituto Malbrán obtenidos por la técnica de ordeño manual, desecado al vacío y conservados en frío hasta su reconstitución.

Adyuvantes

Adyuvante de Freund completo (AFC), preparado en nuestro laboratorio según la siguiente fórmula:

Arlacel 13,1 ml, vaselina líquida 85 ml, tween 80 1,9 ml y BCG 1 mg/ml. Todos los componentes se esterilizaron por separado y luego se mezclaron asepticamente.

Adyuvante de Freund incompleto (AFI), preparado con iguales componentes que el anterior, pero sin BCG, y en condiciones de esterilidad.

Solución salina tamponada (SSB) estéril, utilizada en la preparación de la solución madre de venenos y su posterior dilución para las inmunizaciones según los requerimientos del protocolo estipulado.

NaCl	8 g
ClK	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
c.s.p.	1.000 ml

Productos químicos y otros

- Sulfato de amonio purísimo (Carlo Erba), 32 kg para 100 litros de plasma
- Toluol 0,1% - 300 ml para 100 litros de plasma
- Pirofosfato de sodio 0,2% - 600 ml para 100 litros de plasma
- Soda a 40%
- Acido clorhídrico p.p.a.
- Pepsina 1/10.000 (Sigma) - 1,25 g por litro de plasma

- Merthiolate a 10% (concentración final 1/10.000)
- Cloruro de Bario
- Cloruro de Calcio a 25%

Métodos

Caracterización de los venenos

Se siguió la metodología aconsejada por la OPS/OMS para la elaboración de sueros heterólogos, según se aplica en el Instituto Malbrán⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Antes de comenzar la inmunización se determinó la potencia de cada uno de los venenos, utilizando ratones de 18 a 20 g, para calcular la dosis letal 50 (DL50) aplicando métodos estadísticos^(11,12). La misma estuvo en menos de 4 µg/ml para el veneno de *B. alternatus* y menos de 10 µg/ml para *B. neuwiedi*.

Animales seroproductores

Los equinos fueron controlados por un médico veterinario, realizándosele, a cada uno, su ficha sanitaria en la cual se anotaron las características de su pelaje, identificación, sexo, número, estado de las mucosas, dentadura y peso. Fueron numerados del 21 al 30.

Se los vacunó contra tétanos y se desparasitaron.

Antígenos: Se preparó una solución madre de venenos de *B. alternatus* y *B. neuwiedi* a una concentración de 10 mg/ml, utilizando venenos completos y secos, reconstituidos⁽⁷⁾. Se corrigió su pH a 7,2. Se los filtró clariestabilizante por membranas Millipor de diámetro 47 mm y poros 0,8 y 0,22 µ. Se controló la esterilidad, seleccionando medios que desarrollaran gérmenes aerobios y anaerobios según lo pautado por la OMS⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Se realizaron las diluciones del veneno siguiendo el protocolo y usando como adyuvante el de Freund completo (AFC), (AFI), y solución salina tamponada (SSB). Los mismos fueron completamente homogeneizados y conservados a 5°C. Para tal fin, se idearon frascos estériles que contenían una barra magnética en su interior y cerrados herméticamente. Los componentes estériles, fueron mezclados asépticamente dentro de estos recipientes, los cuales una vez cerrados, se colocaron sobre un agitador magnético obteniéndose así una correcta homogeneización de los antígenos con los adyuvantes y evitando la contaminación. Se mantuvieron a 5°C hasta su inoculación.

En todas estas etapas el personal técnico usó sobretúnica, gorro, guantes y tapabocas estériles.

Protocolos de inmunización

La primoinmunización y reinmunización se realizaron según el protocolo preparado para tal fin (cuadro 1) en el cual se estipularon una dosis de un mg de solución madre de veneno en adyuvante de AFC, seguido de una

Cuadro 1
Protocolo de inmunización
Equinos números 21 al 30

Día	Dosis	Adyuvante	Volumen	Vía
0	1 mg	AFC	10 ml	Subcutánea
7	1 mg	AFI	10 ml	Subcutánea
14	2 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
21	2 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
Se interrumpe durante 30 días por intolerancia				
52	1 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
56	1 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
60	1 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
67	1 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
Se descansa 60 días				
127	2 mg	AFI	10 ml	Subcutánea
134	3 mg	AFI	10 ml	Subcutánea
139	4 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
140	4 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
141	4 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
145	4 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
146	4 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
147	4 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
159	4 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
160	4 mg	SSB	18 ml	Subcutánea
161	4 mg	SSB	18 ml	S. Explorat.
171	Sangría de producción			

dosis también semanales que variaron entre 1 y 2 mg de veneno en AFI, completando así un volumen de 10 ml por vía subcutánea (s/c).

A los 21 días de iniciadas las inoculaciones, se debieron interrumpir durante 30 días, por intolerancia al veneno, que apareció precozmente y se manifestó por una marcada pérdida de peso y reacción local importante.

Se prosiguió a partir del día 52 al 67, con dosis que no superaron el miligramo de veneno, en un volumen total de 18 ml (SSB) por vía s/c cada 4 días.

Previo a la reinmunización se dejó descansar a todo el lote durante 60 días, y se reinició el día 127 prolongándose hasta el día 161. Se utilizaron dosis crecientes de venenos que fueron desde 2 mg/ml a 4 mg/ml, en un volumen total de 10 ml AFI y de 18 ml de SSB por vía s/c con una frecuencia al inicio de una dosis semanal y en las tres últimas semanas, durante tres días seguidos.

Obtención del suero

Sangría

La sangría exploratoria se realizó el día 161 de la reinmunización, por punción de la vena yugular del equino. El suero obtenido se tituló para cada veneno por separado, mediante la técnica de seroneutralización *in vivo*, uti-

lizando como animal de experimentación el ratón que fue inoculado por vía intravenosa en vena de la cola^(7,13,14). Cada ratón recibió 0,5 ml i/v de veneno a una concentración 1/1000, mezclado con cantidades variables del suero de prueba. Se los observó durante 72 horas, al cabo de las cuales se procedió a la lectura y a realizar los cálculos estadísticos correspondientes⁽¹²⁾.

De los 10 equinos inmunizados, 9 tenían títulos neutralizantes aceptables (más de 900 µg/ml). Un caballo, el número 21, mostró una neutralización incompleta para el componente newwiedi.

A los diez días de la última inoculación se realizaron dos sangrías definitivas, separadas por 48 horas, a los 9 equinos que tenían buena respuesta inmune.

No se repuso el paquete globular por falta de estandarización de la técnica⁽⁷⁾. Sin embargo, el procedimiento fue muy bien tolerado por los animales. Se extrajeron 8 litros de plasma de cada uno.

Dicho plasma se recogió en damajuanas estériles de diez litros conteniendo citrato de sodio a 33%. El mismo día de la sangría se separó el paquete globular por decantación y se obtuvo un total de 79 litros de plasma sobrenadante.

Purificación del suero: obtención de inmunoglobulina específica

Se realizó siguiendo las recomendaciones de la OPS⁽⁷⁾, mediante digestión péptica y precipitaciones salinas con sulfato de amonio (método utilizado en el Instituto Butantan de Brasil), al cual se le agregó previamente una etapa de defibrinación con cloruro de calcio a 25%. Luego fue dializado contra agua destilada a 5°C para eliminar la sal de amonio. Se isotonizó con cloruro de sodio a 0.85% y se estabilizó su pH entre 6,00 y 7,00. Como preservativo se usó el timerosal a una concentración final de 1/10.000 (figura 2).

Posteriormente siguieron las etapas de filtración clarifierilizante, utilizando membranas de acetato de celulosa con equipos de filtración Sartorius con membranas de poro de 0,8 y 0,20 µ.

Se tomaron las correspondientes muestras para controles químicos (proteínas, pH, Hg, sulfato, PEF) y biológicos (potencia, esterilidad, inocuidad y seguridad).

Se envasó asépticamente en frascos conteniendo 10 ml.

Determinación de la actividad neutralizante de la inmunoglobulina específica

Para cada uno de los venenos por separado, se inocularon ratones de ambos sexos de 18 a 20 gramos, con una mezcla de veneno/antiveneno, dejando constante el antiveneno y aumentando la dilución del veneno según un factor de dilución constante.

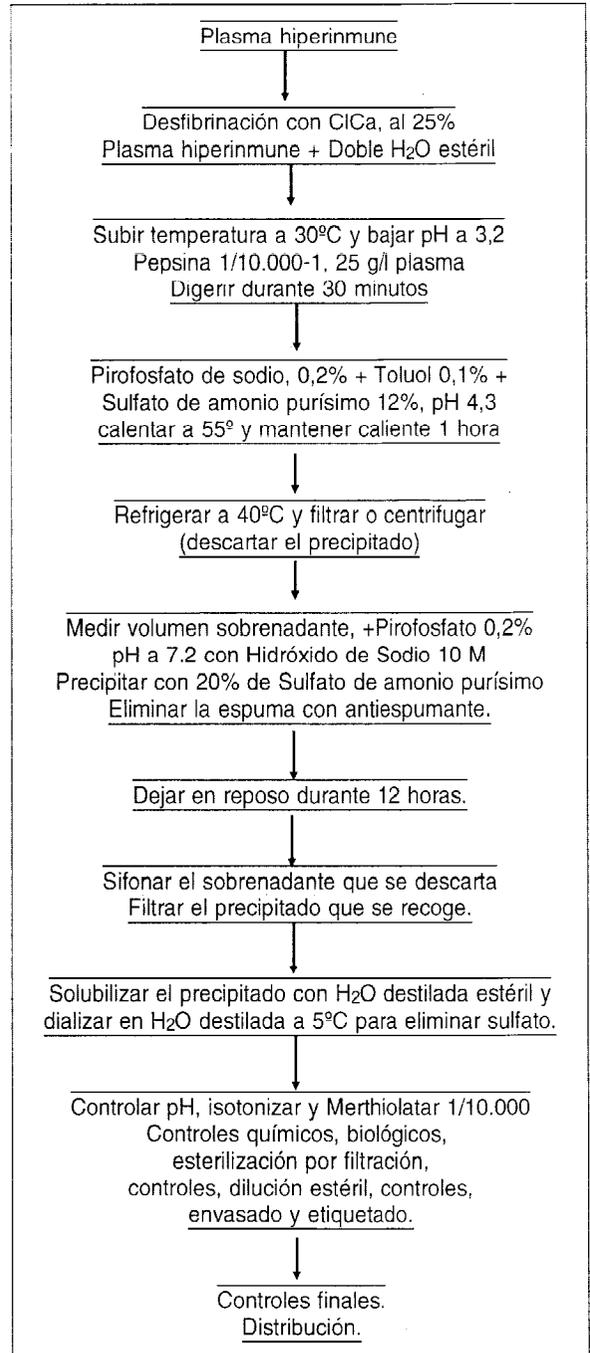


Figura 2. Técnica de procesamiento del plasma.

Cada mezcla fue incubada a 37°C durante una hora y luego inyectada i/v en vena de cola. Se observaron las muertes sobre el total de animales inyectados, luego de la primera hora de inoculación (para descartar las muertes provocadas por este procedimiento) y durante 48 horas^(8,15-17).

También se inyectaron ratones como grupo control de los venenos en similares condiciones que las referidas anteriormente.

Prueba de esterilidad: Se inoculó 1 ml de suero a 28

tubos que contenían 14 ml de tioglicolato, cada uno. Se mantuvieron a 34 y a 24 grados durante 14 días. Dos tubos con el medio de cultivo, se dejaron como control, sin sembrar⁽¹⁸⁾.

Prueba de inocuidad: Se inocularon 5 cobayos de 300–350 gramos, con 5 ml de suero por vía subcutánea. Se mantuvieron durante cuatro semanas en observación. No se produjeron muertes y todo el grupo aumentó de peso; tampoco hubo signos de intolerancia.

Prueba de seguridad: Se inocularon 2 ratones de 18 a 20 g de peso, con 0,5 ml de suero por vía subcutánea. Se mantuvieron en observación 7 días. Se obtuvo iguales resultados que en el grupo anterior^(8,9).

Presencia de sulfatos: Como reactivo se usó el cloruro de bario a 5% más 0,5% de ácido acético. Se tomaron 8 ml del agua de diálisis y se le agregaron 2 ml del reactivo. No se observó turbidez, comparándolo con el patrón que contiene 0,08 g de SA por litro (máximo permitido)⁽⁷⁾.

Se enviaron además, muestras a dos laboratorios de control extranjero: Instituto Malbrán, República Argentina y Laboratorios INCQS de Río de Janeiro.

Resultados

El suero de producción uruguaya, es una inmunoglobulina específica, purificada y estéril, que se presenta en frascos de 10 ml. Cada mililitro neutraliza, más de 2.500 µg de veneno de *B. alternatus* y más de 1.500 µg de veneno de *B. neuwiedi*.

Como conservante contiene timerosal y no más de 16 g% de proteínas, pH 6–7.

Tiene un período de validez de 3 años.

Su calidad cumple con las normas para inmunoglobulinas heterólogas específicas de la OMS.^(8,9)

Los informes elevados por los dos laboratorios de referencia fueron los siguientes:

El Boletín de Análisis del Laboratorio INCQS N° 0948/89 expresa: *Potencia* = 6,97 mg/ml, *Toxicidad* = Satisfactorio. *Conclusiones:* Satisfactorio. Departamento de Microbiología e Inmunología (7 de junio de 1989).

El Instituto Malbrán hace constar:

Potencia: 1 ml de suero neutraliza 3162 µg de veneno de *B. alternatus*. 1 ml de suero neutraliza 1756 µg de veneno de *B. neuwiedi*.

Conclusiones: no se formulan objeciones a los resultados hallados. Departamento de Contralor (31 de enero de 1989)

A principios de 1988, se comenzó su aplicación clínica, con excelente resultado.

Se distribuyó en todos los centros hospitalarios del interior de la República, en donde más frecuentemente se deben asistir accidentados por mordeduras de ofidios

ponzoñosos. Esto permitió realizar el tratamiento del paciente en el Centro Asistencial más próximo, siguiendo las pautas establecidas por la Comisión Asesora Nacional de Ofidismo. Se reducen así, los traslados a la capital⁽¹⁹⁾.

Al momento actual (1994), se ha abastecido al MSP con 4.500 frascos.

Se han tratado a 389 pacientes desde 1988.

Falleció uno, a causa de envenenamiento grave, con diagnóstico tardío, que se presentó con un sangrado meníngeo.

La mortalidad según esta casuística, es pues, de 0,25%.

No se produjeron accidentes en el suministro del suero.

Discusión

La administración del antiveneno específico para el tratamiento de las mordeduras por ofidios ponzoñosos, es mundialmente aceptada^(1-4,8,9,19).

Como animal seroprodutor, todos los países concuerdan, en que el equino es el adecuado, por su fácil manejo y alto rendimiento en plasma^(7,20).

A diferencia nuestra, en Brasil y Costa Rica^(20,21), se realizan sangrías diarias durante cuatro días, pero reponen el paquete globular. Este procedimiento presenta la ventaja de obtener el doble de plasma (16 litros) y poder reutilizar al animal dador, luego de un corto período de descanso.

El lote equino nacional, no ha sufrido bajas y su rendimiento es el adecuado para la demanda, por lo que no se plantea el realizar dicha técnica. Además no se cuenta con la infraestructura necesaria, por lo que los riesgos de contaminación serían muy elevados.

Costa Rica produce también pequeñas cantidades de suero de carnero, para aquellos pacientes alérgicos a las proteínas de caballos, o que ya han recibido sueros heterólogos en otras oportunidades⁽²²⁾.

Se entiende que para nuestro país no se justificaría encarar esta producción, por el bajo rendimiento en volumen plasmático del carnero, sumado, a la infrecuencia de la sensibilización por suero en la población.

En cuanto al esquema de inmunización, se ha reproducido lo recomendado por la OPS variando los adyuvantes.

Esta experiencia se viene realizando también en Argentina y Brasil, con buenos resultados, ya que la cantidad de venenos requerida es menor, y los efectos locales son de escasa entidad^(21,23).

Referente al uso del antígeno crudo, Kondo y col. proponen la toxoidización de los venenos mediante el formol y calor, recomendando esto para primoinmunización⁽²⁴⁾.

En Uruguay, Laborde y col.⁽⁶⁾ reprodujeron dicha téc-

nica lo cual prolongó enormemente el protocolo de inmunización (510 días).

Trabajos brasileños proponen el uso del glutaraldehído para el tratamiento de venenos crotálicos y bothrópicos, pero no queda claro que sea adecuado para los venenos bothrópicos⁽²⁵⁾.

Al respecto, la OPS estima que deberían emplearse venenos toxoidizados. Sin embargo, ninguno de los tratamientos conocidos hasta el momento, proporciona toxoides con su antigenicidad sin alterar⁽⁷⁾.

Nuestra experiencia fue favorable usando venenos activos desde el inicio de la inmunización.

Si bien se produjo intolerancia, la misma fue resuelta poniendo en descanso al lote equino, durante 30 días se logró la inmunización completa al cabo de 161 días.

No se perdió ningún equino y todos mantuvieron posteriormente buen estado.

Los expertos recomiendan la mezcla de antígenos, ya que proporciona mejores títulos que los sueros monovalentes, porque da un mejor balance de los antígenos y redonda en óptimos resultados terapéuticos.

Este procedimiento fue el adoptado por nosotros, preparando una solución madre conteniendo los dos venenos. Se obtuvieron buenos resultados.

En la purificación de las inmunoglobulinas, la OMS afirma que no puede recomendarse una determinada técnica de fraccionamiento, ya que las que se conocen obtienen productos inocuos, eficaces, estables y nada demuestra que un método sea preferible a otro.

Sin embargo, describe tres técnicas que se utilizan en el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica y en el Instituto Nacional de Higiene de México^(7,20,22).

Nosotros optamos por la que proporciona preparaciones más estables, de menor peso molecular y más puras, a la cual se agrega una etapa de desfibrinación con cloruro de calcio, ya que no se fenola el plasma. Esto ha permitido continuar con el proceso en forma inmediata. El resultado es un producto más estable y menos antigénico^(7,26).

Como contrapartida la pérdida de potencia puede llegar a 50%.

No podemos evaluar nuestro procedimiento desde este punto de vista, por tratarse de una inmunización e hiperrinmunización iniciales, con resultados satisfactorios. La inmunoglobulina obtenida fue potente de acuerdo al requerimiento internacional y no se produjeron accidentes por suero.

Referente a nuestra planta de fraccionamiento, si bien se adecua a la metodología empleada, sería deseable poseer equipamiento más moderno, tales como columnas cromatográficas de intercambio iónico y ultracentrífugas,

permitiendo así un proceso en circuito cerrado con alto rendimiento, poca manipulación y baja contaminación.

Brasil en su centro de biotecnología del Instituto Butantán ha instalado una planta piloto para fraccionamiento de inmunoglobulinas, que se encuentra en etapa experimental⁽²¹⁾.

Para la determinación de la potencia de los antivenenos y venenos propiamente dichos, no existe ningún método que pueda recomendarse internacionalmente.

La variación en la composición de los venenos, es tan grande, que difícilmente pueda concebirse una prueba única general. Cada país o región, debe establecer sus propios parámetros para la dosificación de sus sueros. Aún así, el requerimiento internacional en cuanto a la medida de potencia, exige la determinación de la cantidad de veneno (en miligramos), que una unidad de volumen del antiveneno neutraliza por titulación *in vivo*. Se utiliza como animal de experimentación, el ratón⁽⁷⁾.

Al igual que Bolaños y col., preferimos el uso de la vía endovenosa por ser más efectiva que la intraperitoneal para la determinación de la toxicidad de los venenos⁽¹⁷⁾.

Esta metodología, que nosotros adoptamos, también, tiene varios inconvenientes: por ej. se requiere de un elevado número de animales de experimentación, de determinado peso, libre de patógenos específicos, en un determinado tiempo. Esta técnica es laboriosa y costosa.

En cambio Brasil⁽²⁷⁾ prefiere la vía intraperitoneal por encontrar que de esta manera se eliminan las muertes inmediatas producidas en los animales de experimentación, por los componentes coagulantes de los venenos.

Entendemos necesario, desarrollar técnicas alternativas *in vitro*. Así lo vienen realizando Brasil, Costa Rica y Argentina^(28,30).

Boche y Russell en 1968 y Kupulsup y col. en 1981 han propuesto una hemaglutinación pasiva y Teakston y Reid, en 1979 un ELISA⁽³¹⁾.

Recientemente, Gutiérrez y col. en 1988, describieron una técnica en placa, muy sensible, para cuantificar la actividad hemolítica indirecta de los venenos y para estudiar la capacidad neutralizante del suero. Estos autores la proponen como alternativa, al observar correlación entre la neutralización y el efecto hemolítico indirecto^(28,30-33).

En el Instituto Butantán, Guidolín, Rosalvo y col. en 1989, describen el seguimiento del título de anticuerpos antiveneno mediante el test de floculación⁽³⁴⁾.

Entendemos que todos estos test *in vitro*, constituyen una buena solución alternativa al problema de la técnica de seroneutralización. Pensamos encaminar nuestra metodología, en un sentido similar, tratando de lograr un método sencillo, confiable, y fácilmente reproducible.

Conclusiones

Se cuenta con un organismo productor nacional de larga trayectoria, el Instituto de Higiene, en el cual se incorporó la técnica de producción de suero antiofídico, con escasas inversiones.

El suero de producción uruguaya, para uso terapéutico, demostró ser de excelente calidad, cumpliendo con las normas internacionales en la materia.

Por la metodología empleada en su elaboración, se obtuvo una inmunoglobulina hiperinmune bivalente, que neutraliza la acción de los venenos de *Bothrops alternatus* y *B. neuwiedi* simultáneamente.

Por tratarse de una preparación en estado líquido, debe ser refrigerada y su validez es de 3 años.

Por otra parte, para mantener la continuidad y especificidad en la producción, se ha puesto de manifiesto la necesidad de contar con un serpentario propio, de producción. Esta etapa recientemente se ha culminado, a través de un convenio con la Facultad de Ciencias (Cátedra de Zoología Vertebrados). Se cuenta con reservas de venenos nacionales procedentes de los Serpentarios del Zoológico de Montevideo y del Cerro Pan de Azúcar.

Es posible la exportación a otros países ya que hay capacidad técnica instalada.

Agradecimientos

La autora agradece:

- 1) A todos los funcionarios de la División Producción de Sueros y Vacunas, del Instituto de Higiene, con cuyo esfuerzo y colaboración se logró la fabricación nacional de este suero.
- 2) Al MSP, por haber proporcionado el primer lote de equinos.
- 3) A las autoridades del Instituto Malbrán de la República Argentina, por haber cedido los primeros venenos que permitieron iniciar este trabajo.
- 4) A OPS, por haber otorgado becas de capacitación.
- 5) A las autoridades y funcionarios de las Intendencias de Montevideo (Zoológico Municipal) y de Maldonado (Reserva de Flora y Fauna Autóctona del Cerro Pan de Azúcar), quienes autorizaron a extraer venenos de los ofidios allí existentes y que hoy constituyen parte de nuestra reserva nacional de venenos.
- 6) A los licenciados F. Achaval y M. Meneghel, por colaborar en la extracción de venenos de los ofidios del serpentario del Zoológico de Montevideo y del Instituto de Higiene.
- 7) Al colega, Prof. Agdo. Dr. H. Purtscher, y al Ing. H. Massaldi, por la lectura crítica de este manuscrito.

Résumé

On décrit ici le processus de production du sérum antiop-

hidien antibothrope bivalent, pour son emploi thérapeutique, mené à bout pour la première fois au pays, au Département de Production de l' Institut d' Hygiène de la Faculté de Médecine.

Le sérum, provenant d' équins immunisés avec des doses croissantes de venins bothropiques actifs, a été purifié au moyen de précipitations salines, action enzymatique et température. Ainsi, on obtient une immunoglobuline hypotoxique et hyperimmunisante, capable de neutraliser spécifiquement l' action des venins de *Bothrops neuwiedi* et *alternatus*.

Le produit, qui respecte les normes internationales, est présente liquide, dans des flacons de 10 ml, conservé au froid, et est distribué dans tout le territoire par le Ministère de la Santé Publique uniquement.

L' emploi thérapeutique de ce sérum, depuis le début, a démontré sa complète efficacité, ne s' étant pas produit d' accidents par son utilisation.

On conclut que la production nationale de cet immunobiologique à neutralisation spécifique, est possible en ce qui concerne les venins des serpents qui produisent des accidents graves en Uruguay. Tout de même, on assure leur fournissement permanent à 100% du pays, tout en restant indépendants des laboratoires étrangers.

Summary

The present work describes the process of production of the bivalent antibothrops antiophidian serum for therapeutic purposes, first implemented in Uruguay at the Production Division of Hygiene Institute of the Faculty of Medicine.

The serum, derived from horses immunized with growing doses of active bothropic poisons, was purified by means of saline precipitations, enzymatic action and heat.

In this manner it is possible to obtain a hypotoxic and hyperimmune immunoglobulin, capable of neutralizing specifically the action of poisons *Bothrops neuwiedi* and *alternatus*.

The product, which meets international standards, presents a liquid consistence and is stored in 10 ml vials, preserved refrigerated and distributed throughout Uruguay only by the Ministry of Public Health.

The therapeutic applications of this serum, from the onset, displayed its total effectiveness with overall absence of accidents.

Available results have demonstrated the possibility of domestic production of this immunobiologic with specific neutralization for poisons of ofidians which produce a substantial number of accidents in Uruguay. Moreover it ensures its permanent supply with 100% coverage, independently of foreign laboratories.

Bibliografía

1. **Purtscher H, Burger M, Savio E, Rodríguez L, Vila B, Caorsi EL et al.** Ofidismo y aracnoidismo en el Uruguay. Diagnóstico, tratamiento y complicaciones. *Rev Med Uruguay* 1983. 7: (1) 11 al 28.
2. **Caritat R (hijo).** Ofidismo en el Uruguay. In: Negro RC, Gentile I. *Enfermedades infecciosas*. 2ª ed. Montevideo: Edilimed, 1989: 1059-69 (tomo 2).
3. **Reid HA, Theakston RDG.** Les morsures de serpent. *Bull Org Mond Santé* 1984, 62 (1): 27-38.
4. **Trinca GF.** The treatment of snakebites. *Med J Aust.* 1963: 275-80.
5. **World Health Organization.** Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. Geneva: WHO 1984 (WHO offset Publication N° 58).
6. **Laborde H, Sevcec C, Legnani C.** Preparación y ensayo de un antiveneno (inmunoglobulina antiofídica) liofilizado activo contra veneno de *Bothrops Neuwiedi* (yara). *Rev Med Uruguay* 1989; 5: 20-27.
7. **Organización Panamericana de la Salud.** Manual de Procedimiento. Producción y Pruebas de Control en la preparación de antisueros diftéricos, tetánico, botulínico, antivenenosos y gangrena gaseosa. Washington: OPS, 1977: 104-41.
8. **Organización Mundial de la Salud.** Normas para los sueros antiponzoñosos (Mordeduras de serpiente) (Normas para sustancias biológicas, 21) (Serie de informes técnicos, N° 463) 1971: 26-44.
9. **OMS Comité de expertos en Patrones Biológicos.** 21er. informe. Normas para los sueros inmunes de origen animal. (Serie de Informes Técnicos N° 413) Ginebra, 1969: 49-64.
10. **World Health Organization.** Progress in the Characterization of venoms and standardization of antivenoms. Geneva: WHO, 1981.
11. **Reed LJ, Muench H.** A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27 (3): 493-7.
12. **Finney DJ.** Probit analysis, 3ª ed. London: Cambridge University Press, 1971.
13. **Grassie E.** Survey of assay methods of antivenins. Immunological factors influencing antivenin standardization. *Bull Org Mond Santé*, 1957; 16: 79-122.
14. **Kocholaty WF, Billings TA, Ashley BD, Ledford EB, Goetz JC.** Effect of the route of administration on the neutralizing potency of antivenins. *Toxicon*, 1968; 5: 165-70.
15. **Siles Villarroel M, Rolim Rosa R, Zelante F, Furlanetto RS.** Padronização de avaliação da potencia de antivenenos Biotrópicos, en camadongos. *Mem Inst Butantán*, 1978/79; 42/43: 325-6.
16. **Kocholaty WF, Ledford EB, Daly JG, Billing TA.** Toxicity and some enzymatic properties and activities in the venoms of *Crotalidae*, *Elapidae* and *Veperidae*. *Toxicon* 9, 1971: 131-8.
17. **Bolaños R.** Toxicity of Costa Rican Snake venoms for the white mouse. *Am J Trop Med Hyg* 1972; 21: 360-3.
18. **Organización Mundial de la Salud.** Normas generales de esterilidad para sustancias biológicas en OMS. Serie de Informes Técnicos. Normas generales para sustancias biológicas. Ginebra: OMS, 1960 (N° 20): 13.
19. **Uruguay, Ministerio de Salud Pública-División Epidemiología.** Comisión Asesora de Ofidismo. Medidas de emergencia frente a mordeduras de ofidios ponzoñosos. Montevideo: MSP, 1989-93.
20. **Pérez de la Mora S, Pérez Miravete A, García Pérez G.** Estudio de protección cruzada entre sueros y venenos de las especies más comunes de serpientes mexicanas. *Rev Inv Salud Pública México* 1972; 32:145-57.
21. **Raw I, Guidolin R, Hisako H, Kelen E.** Antivenins in Brazil: Preparation. *Handbook of Natural Toxins Vol. 5 Reptile and Amphibian Venoms.* New York: Marcel Dekker, 1991: 557-81.
22. **Bolaños R, Cerdas L.** Producción y control de sueros antiofídicos en Costa Rica. *Bol Of Sanit Panamá* 1980; 88 (3): 189-96.
23. **Rolim Rosa R, Viera EGJ, Siles Villarroel M, Siracusa YO, Iizuka H.** Análise comparativa entre os diferentes esquemas de hiperinmunização empregados na produção de soros antiofídicos pelo Instituto Butantán. *Mem Inst Butantán* 1980/81; 44/45: 259-70.
24. **Kondo S, Sadahiro 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: 281-94.
25. **Guidolin R, Díaz da Silva W, Higashi HG, Caricati CT, Lima ML, Morais JF, Pinto JR, Marcelino JR.** Hiperinmunização de cavalos soroprodutores com venenos Botrópicos e crotálico tratados por glutaraldeído. *Mem Inst Butantán*, 1989; 51 (3): 85-90.
26. **Pope CG.** The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. II Heat denaturation after partial enzyme action. *Br J Exp Path*, 1939; 20: 201-12.
27. **Villarroel Siles M, Zelante F, Rolim R, Furlanetto R.** Padronização da titulação de atividade tóxica de venenos Bothropicos, em camadongos. *Mem Inst Butantán*, 1978-79; 42/43: 311-23.
28. **Estrada R, Gutierrez JM, Alvarado J, Robles A, Avila C, González M.** Desarrollo de la respuesta de anticuerpos antifosfolipasa A2 en caballos inoculados con veneno para la producción de suero antiofídico polivalente en Costa Rica. *Rev Biol Trop*, 1989; 37 (2): 187-91.
29. **Boche RD, Russell FE.** Passive hemagglutination studies with snake venom and antivenin. *Toxicon*, 1968; 6: 125-30.
30. **Gutiérrez JM, Avila C, Rojas G, Cerdas L.** An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent/antivenenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, 1988; 26: (4): 411-13.
31. **Teakston RDG, Reid HA.** Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) in assesing antivenom potency. *Toxicon*, 1979; 17: 511-15.
32. **Dias Da Silva W, Guidolin R, Raw I, Higashi HG, Caricati CP, Morais JF et al.** CROSS-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem Inst Butantán*, 1989; 51 (4): 153-68.
33. **Higashi HG, Guidolin R, Nishikawa AK, Yamaguchi IK, Stephano MA, Do Santos MJ, et al.** Produção de anticorpos antiveneno total de *corotatus durissus terriflucus* em cavalos por fosfolipase A2. *Mem Inst Butantán*, 1989; 51 (3): 91-100.
34. **Arantes JB, Karmann G, Bier OG.** Emprego da reação de floculação específica na dosagem do antiveneno crotálico. *Mem Inst Butantán*, 1944/45; 28: 21-6.