

Estabilidad de la actividad neutralizante del antiveneno ofídico conservado a 4°C y a 16°C contra el veneno de Cascabel (*Crotalus durissus cumanensis*) de Colombia

Jaime Ramírez, Juan M. Renjifo, María C. Forero

Resumen

Se determinó la actividad neutralizante de la letalidad de varios lotes de antiveneno polivalente (no liofilizado), producidos por el Instituto Nacional de Salud, los cuales fueron retados contra una mezcla de venenos de cascabel (*Crotalus durissus cumanensis*) de Colombia. Se compara la actividad de los diferentes lotes almacenados en oscuridad a las temperaturas de 4°C y 16°C. Se estableció el porcentaje remanente de la potencia de cada lote para cada temperatura en los diferentes años a lo largo del período del estudio.

Se concluye que el antiveneno almacenando en las condiciones recomendadas, mantiene casi la totalidad de la capacidad de neutralización (97.9%) luego de tres años de almacenamiento, lo que corresponde a la fecha de expiración del producto. En cambio, el antiveneno almacenado a 16°C y oscuridad, luego de dos años de almacenamiento, mantiene el 87.9% de su capacidad protectora contra veneno de cascabel, protección similar a la encontrada bajo las mismas condiciones de almacenamiento, para veneno de Taya X, pasados dos años de almacenamiento (1), sustentando la recomendación de descartar el producto, transcurridos dos años de almacenamiento en estas condiciones.

Summary

Neutralization of the lethal activity of several batches of Polyvalent Antivenom (non liophylized) produced by the Instituto Nacional de Salud (INS) of Colombia was tested. The antivenoms were challenged against a pool of *Crotalus durissus cuamanensis* venoms from Colombia, comparing the effectiveness of different batches stored at 4°C and 16°C in total darkness. The neutralization ability of the different batches of antivenom is given as the percentage remaining of the original titre after several years of storage.

From the results of this study, we conclude that the antivenom stored at the recommended conditions (4°C and in total darkness), maintains its neutralizing ability (97.7%) after 3 years of storage, while antivenom stored at 16°C, after two years of storage, maintains 87.7% of its neutralizing effectiveness against *Crotalus durissus cumanensis* venom. This protection is similar to that found in antivenom challenged against *Bothrops atrox* venom (Ramírez, et al. 1994).

These results support the recommendation to discard the product after two years of being stored at a temperature of 16°C.

Colombia, por ser un país tropical, en gran parte de su territorio presenta las condiciones ecológicas adecuadas para la presencia de serpientes; cerca del 32.3% de la población total habita en estas zonas de riesgo, del cual el 0.018% de esta población ha tenido un accidente ofídico en 1985 de acuerdo a estadísticas oficiales del Ministerio de Salud (1).

Las serpientes causantes de esta accidentabilidad están distribuidas en los géneros *Bothrops* (recientemente dividido en *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothriopsis* y *Porthidium* para Colombia (2) con el 97%, *Micrurus* con el 1.6%, *Crotalus* con el 1.4% de los casos, y el género *Lachesis* del cual la accidentabilidad en el país es rara (1, 3, 4).

Para el tratamiento de los accidentes ofídicos en Colombia, el Instituto Nacional de Salud produce antivenenos en forma líquida monovalente y polivalente (5). Estos antivenenos son preparados mediante la hiperinmunización de equinos con una mezcla de venenos de taya X (*Bothrops atrox-asper*) y de cascabel (*Crotalus durissus cumanensis*) de Colombia. El producto terminado son globulinas plasmáticas parcialmente purificadas por medio de precipitación con sulfato de amonio (6).

El antiveneno polivalente logra una protección efectiva contra envenenamientos causados por serpientes de los géneros *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Crotalus* y por reacción cruzada neutraliza parcialmente el veneno de *Lachesis* sp.

Debido a las altas temperaturas en zonas de riego y en muchos casos con la imposibilidad de tener un correcto almacenamiento para el antiveneno, el INS ha realizado estudios para determinar la estabilidad del antiveneno tanto en las condiciones ideales de almacenamiento (refrigerado a 4°C y al abrigo de la luz) y a 16°C al abrigo de la luz. Como primer avance de la estabilidad del antiveneno, Ramírez y colaboradores (1994) publicaron la estabilidad del antiveneno producido por el Instituto Nacional de Salud (INS), contra el complejo *Bothrops atrox-asper* (5), por la importancia que tiene esta especie en los accidentes ofídicos del país.

La estabilidad del antiveneno es afectado por factores extrínsecos e intrínsecos (7), debido a estos factores se recomienda determinar experimentalmente la estabilidad del antiveneno (8). En Latinoamérica la determinación de la estabilidad de los antivenenos ha estado centrada al género *Bothrops* (5, 9, 10, 11).

El presente trabajo presenta los resultados obtenidos hasta 1989, de la estabilidad del antiveneno polivalente que protege contra veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Colombia (2), y compara estos resultados con los obtenidos para el complejo *Bothrops atrox-asper* (5).

Materiales y métodos

Los antivenenos utilizados para este estudio fueron del tipo polivalente que también sirvieron para el estudio de la estabilidad en el complejo *Bothrops atrox-asper* y se usó la misma metodología planteada en Ramírez y colaboradores (5).

Adicionalmente, se llevo a cabo el análisis estadístico con el paquete estadístico SYSTAT versión 5.03 (12), con el cual se realizó la Figura 1, usando el promedio del porcentaje remanente del título original (Tabla 1) para cada año y

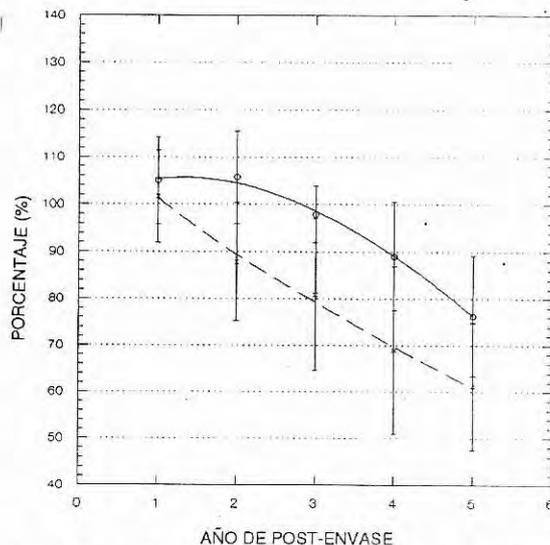


Figura 1. Promedio del porcentaje residual del título original de una mezcla de venenos de *Crotalus durissus cumanensis* de Colombia, almacenados a 4°C (- o -) y a 16°C (- x -), las curvas fueron suavizadas por el método DWLS.

trazando las curvas con el método DWLS (13). Además, a cada curva suavizada por el método DWLS, se le incorpora los valores de una desviación estándar para cada año.

Con el mismo paquete estadístico se realiza el análisis de varianzas (ANOVA) y la prueba de hipótesis de Bonferroni para detectar en donde se encuentra la diferencia estadística, con una probabilidad de 0.05

Resultados

En la Tabla 1 se presentan los resultados de las pruebas de potencia realizadas a los diferentes lotes almacenados a 4°C Y 16°C, contra el veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, expresadas como el porcentaje de la potencia residual del título original.

La potencia de la capacidad neutralizante de la letalidad contra el veneno de *C. d. cumanensis* en

antivenenos almacenados a 4°C, permanece estable hasta el segundo año, luego del cual inicia una pérdida con una tasa cada vez mayor hasta el quinto año, alcanzando en el tercer año el 97,9% (momento de expiración del producto), llegando al 76,3% en el quinto año (Figura 1). Además, en ningún caso dio un resultado inferior al título original para los dos primeros años con los antivenenos almacenados a 4°C, ratificando el título de protección original, siendo lo esperado para poder asegurar una protección al usuario del antiveneno.

Para el antiveneno almacenado a 16°C, la capacidad neutralizante presenta una tendencia a disminuir desde el segundo año (87,9%), con una pendiente aparentemente semejante, pero con pequeñas oscilaciones hasta el año 5 (Figura 1), manteniendo en el tercer año el 80,8% y en el quinto año aún conserva el 61,2% de la potencia original.

Tabla 1. Determinación de la potencia residual de varios lotes de antiveneno almacenados a 4°C y a 16°C contra una mezcla de venenos de *Crotalus durissus cumanensis*.

Lote Nº	Fecha envase	Título original (mg/ml)	Potencia residual del título original dado en porcentaje									
			Almacenado a 4°C					Almacenado a 16°C				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
30	Agosto/84	1.2	-	-	83	75	63	-	75	63	63	50
31	Junio/83	1.2	-	-	-	83	83	-	-	-	63	63
33	Febrero/84	1.2	-	-	-	75	63	-	-	63	50	50
34	Octubre/84	1.0	-	-	100	90	90	-	75	60	50	60
35	Marzo/85	1.2	-	-	100	100	83	-	-	83	83	83
36	Julio/85	1.0	-	120	100	100	-	-	75	75	60	-
37	Diciem./85	1.2	-	100	100	100	-	-	-	100	83	-
38	Julio/86	1.0	100	100	100	-	-	-	-	100	100	-
39	Noviem./86	1.0	100	100	100	-	-	90	90	90	-	-
150986	Enero/87	1.0	100	100	100	-	-	-	100	100	-	-
260187	Junio/87	1.0	100	100	-	-	-	-	100	75	-	-
040587	Septiem./87	1.0	120	120	-	-	-	100	100	-	-	-
020588	Agosto/88	1.0	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-
080888	Noviem./88	1.0	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-
260988	Enero/89	1.0	120	-	-	-	-	120	-	-	-	-
160189	Mayo/89	1.0	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-
PROMEDIO			105.0	105.7	97.9	89.0	76.3	101.7	87.9	80.8	69.0	61.2

Discusión

El Antiveneno Polivalente del Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia, retado con el veneno de *C. d. cumanensis*, y almacenado en condiciones ideales presenta un comportamiento semejante a un polinomio de segundo grado, mostrando un período estable hasta el segundo año, donde no se aprecia disminución del porcentaje remanente del título original. Después del segundo año se presenta un período donde la disminución del porcentaje remanente es cada vez mayor hasta el año 5. Esta pérdida del título en el año de expiración del producto (tercer año) es muy pequeña, manteniendo el 97.9% del título original (Figura 1).

Sin embargo, los resultados obtenidos con antiveneno polivalente almacenado a 4°C y retado con veneno de cascabel (*C. d. cumanensis*), al compararlos con los resultados para el veneno de taya X (5, Figura 1), son semejantes hasta el tercer año de postenvase, donde la capacidad neutralizante para el veneno de cascabel, ha conservado el 97.9% y para el veneno de taya X, el 95.2% del título original. En el quinto año, el antiveneno presenta mayor porcentaje del título remanente contra el veneno de taya X (87.9%), comparado con el porcentaje para el veneno de cascabel (76.3%).

En los antivenenos almacenados a 16°C, retados con los venenos de *C. d. cumanensis*, se puede ver que el comportamiento es una función logarítmica, semejante a la encontrada con taya X en antivenenos almacenados a 4°C y 16°C (5). De esta forma, los antivenenos almacenados a 16°C, desde el segundo año de postenvase presenta disminución en el promedio del porcentaje remanente del título original con ambos tipos de venenos.

El análisis de varianzas (ANOVA) para el antiveneno almacenado a 4°C muestra que existe diferencia estadística ($p=0.05$) entre los diferentes años. Esta diferencia fue analizada con la prueba de Bonferroni y demostró que es debido a los datos del quinto año. Este resultado implica que no hay diferencia significativa para

antivenenos almacenados a 4°C y obscuridad en los cuatro primeros años de postenvase. Sin embargo, teniendo en cuenta las recomendaciones de la Organización Panamericana de la Salud (6) y de la Organización Mundial de la Salud (7), la gran variabilidad de los datos y la disminución despreciable del poder neutralizante al tercer año de postenvase (97.9%), se confirma que la fecha de expiración de 3 años es adecuada a pesar de que el producto no presenta diferencia significativa en el poder neutralizante hasta el cuarto año de postenvase.

Para el antiveneno almacenado a 16°C y obscuridad, el ANOVA demuestra diferencia significativa ($p=0.05$) y esta diferencia es debido a los datos de los años cuarto y quinto de postenvase con la prueba de Bonferroni. Así, estadísticamente el producto en estas condiciones de almacenamiento es utilizable hasta la fecha de expiración (3 años). Sin embargo, teniendo en cuenta la gran variabilidad de los datos y la disminución del promedio remanente del título a 87.9% en el segundo año, se recomienda descartar este producto luego del segundo año de postenvase, para antivenenos almacenados a 16°C y obscuridad.

Así se corrobora la fecha de expiración para antivenenos almacenados a 4°C y obscuridad y la recomendación de Ramírez y colaboradores (5), de desechar el antiveneno a los dos años de fabricación para el antiveneno almacenado a 16°C y obscuridad, a pesar de poder utilizar el producto hasta la fecha de vencimiento, teniendo en cuenta la disminución en la neutralización (promedio de potencia remanente a los dos años es de 87,9% contra veneno de *C. d. cumanensis* y de 87,7% para *B. atrox-asper*).

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal del laboratorio del Grupo de Sueros del Instituto Nacional de Salud y a los biólogos Emilio Cura y Ricardo Carrillo por la colaboración en la realización de este trabajo y en especial al doctor Luis Carlos Orozco por las sugerencias y revisión del presente trabajo.

Referencias

1. **Forero MC.** Problema de Ofidismo y otros Animales Ponzosos en Colombia. Informe presentado en el Seminario Internacional de Ofidismo. Brasilia (Brasil), agosto 10 al 12 de 1987.
2. **Campbell JA, Lamar WW.** The Venomous Reptiles of Latin America. Cornell University Press, 1989, 425 p.
3. **Silva JJ.** Accidentes humanos por las serpientes de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. *Mem. Inst. Butantan*, 1981; 45:403-423.
4. **Otero R.** Mordeduras por serpientes. IN: Toxicología, 1991, pp. 285-303. Cordoba, D. Ed. Medellín: Vieco y Cía. Ltda.
5. **Ramírez J, Renjifo JM, Forero MC.** Estabilidad de al Actividad Neutralizante del Antiveneno Ofidico Conservado a 4°C y 16°C contra el Veneno de Tayas (complejo *Bothrops atrox-asper*) de Colombia. *Biomédica*, 1994; 14:204-208.
6. **Organización 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. O.P.S. 1977:127 p.
7. **World Health Organization.** Progress in the Characterization of Venom and Standardization of Antivenom, 1981. W.H.O. offset publication N° 58:11.
8. **Jerne NK, Perry WLM.** The Stability of Biological Standards. *Bull. Wild. Hlth. Org.* 1956; 14:167-182.
9. **Gené JA, Gomes M, Cerdas L.** Estudio sobre la Estabilidad de la Actividad Neutralizante del Suero Antiofídico contra Veneno de Terciopelo (*Bothrops asper*). *Rev. Costarric. Cienc. Medi.* 1986; 7 (1):3-5.
10. **Gutiérrez JM, Lomonte B, Rojas G, et al.** El Suero Antiofídico Polivalente Producido en Costa Rica: Estabilidad y Capacidad Neutralizante. *Rev. Costarric. Cienc. Medi.* 1988; 9 (2):155-169.
11. **Rojas G, Espinoza M, Lomonte B, et al.** Effect of Storage Temperature on the Stability of the Liquid Polyvalent Antivenom Produced in Costa Rica. *Toxicon*, 1990; 28 (1): 101-105.
12. **SYSTAT, Versión 5.03 MSDOS.** SYSTAT, Inc, 1991.
13. **Wilkinson L.** SYGRAPH: The System for Graphics, 1990. Evanston, IL: SYSTAT, Inc. 547 p.