

VENENOS DE LAS SERPIENTES CORAL (MICRURUS SPP.): INFORME SOBRE UN ANTIVENENO POLIVALENTE PARA LAS AMERICAS¹

R. Bolaños,² L. Cerdas³ y J. W. Abalos⁴

Un antídoto recientemente elaborado ha demostrado que puede neutralizar el veneno de nueve serpientes coral (Micrurus spp.) de las Américas. Los autores consideran que este antiofídico resultará eficaz contra una gran cantidad de mordeduras de las serpientes que habitan en la región que se extiende del sur de los Estados Unidos hasta Argentina.

Según Roze (1) y Hoge y Romano (2) hay 111 clases de serpientes coral, que se clasifican en tres géneros—*Leptomicrurus*, *Micruroides* y *Micrurus*—que comprenden poco más de 50 especies. La información disponible sobre la importancia médica de este grupo es muy limitada. Los pocos trabajos publicados sobre el tema, la propia experiencia de los autores y una carta personal del Dr. Janis Roze sugieren que la situación es la siguiente: la especie *Micrurus fulvius* es la más importante en Estados Unidos (3), aunque se han registrado algunas mordeduras leves por *Micruroides euryxanthus* (4). En México y Guatemala las especies más destacadas son, al parecer, *Micrurus diastema*, *M. distans* y *M. laticollaris*, mientras que en el resto de Centro América y Panamá sobresalen las especies *Micrurus nigrocinctus* y *M. alleni*. En Sudamérica existe una gran variedad de especies de *Micrurus*—entre ellas la *Micrurus carinicaudus*, *M. mipartitus*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. spixii*, *M. surinamensis* y *M. isozonus*—que podrían ser las que con más frecuencia causan accidentes, o constituir las especies más

abundantes y de mayor importancia potencial (figura 1). Desafortunadamente no se dispone de todos los venenos de estas serpientes para su estudio.

Cohen y sus colaboradores (5-7) han informado acerca de importantes reacciones cruzadas inmunológicas entre venenos de *Micrurus*, y han tratado de elaborar un anti-

FIGURA 1—Serpientes coral de las Américas: las especies (*Micrurus*) más importantes desde el punto de vista médico.



¹ Trabajo presentado en el V Simposio Internacional sobre Toxinas de Animales, Plantas y Microorganismos, celebrado en San José, Costa Rica, en agosto de 1976. Se publica también en inglés en el *Bulletin of the Pan American Health Organization*, Vol. XII, No. 1, 1978.

² Director, Instituto Clodomiro Picado, y Profesor, Cátedra de Inmunología, Universidad de Costa Rica.

³ Jefe, División de Producción, Instituto Clodomiro Picado, y Profesor Adjunto, Cátedra de Inmunología, Universidad de Costa Rica.

⁴ Director, Centro de Zoología Aplicada, y Profesor (Cátedra de Animales Invertebrados), Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

veneno polivalente para usarlo contra las principales serpientes coral de las Américas.

En nuestros trabajos de laboratorio también se han obtenido datos sobre las características inmunológicas de ciertos venenos de *Micrurus*. Algunos de estos datos se presentaron al Tercer Congreso Latinoamericano de Parasitología (8) y algunos ya se habían publicado en *Toxicon* (9).

Sobre la base de los datos disponibles, se considera que los venenos estudiados pueden dividirse en tres grupos serológicamente relacionados, como se indica en el cuadro 1. En los dos primeros grupos la relación inmunológica parece ser completa, por lo menos en los equinos, pues los antivenenos específicos protegen contra los tres venenos. Sin embargo, el tercer grupo no parece tener más que una relación en un solo sentido, pues el antiveneno de *M. alleni* no confiere protección contra el veneno de *M. mipartitus*; en cambio el antiveneno de esta especie ha demostrado que protege al ratón confrontado con ponzoña de *M. alleni*.

Estos resultados, considerados en conjunto, sugieren que un antiveneno preparado mediante la inoculación de equinos con una mezcla de venenos de los tres grupos podría ser eficaz contra las especies *Micrurus* más comunes en el Hemisferio. En el presente artículo se describe la producción de un antiveneno de esta naturaleza y el ensayo *in vitro* de su actividad neutralizante contra los venenos disponibles.

CUADRO 1—Grupos de venenos de *Micrurus* que presentan reacción cruzada.

Grupo de venenos	Especies de <i>Micrurus</i>	Habitat
1	<i>M. fulvius</i> <i>M. nigrocinctus</i> <i>M. carinicaudus</i>	América del Norte Centro América América del Sur
2	<i>M. corallinus</i> <i>M. frontalis</i> <i>M. spixii</i>	América del Sur América del Sur América del Sur
3	<i>M. alleni</i> <i>M. mipartitus</i>	Centro América América del Sur

Materiales y métodos

Para la inmunización se emplearon los tres venenos siguientes: veneno de *M. frontalis pyrrhocryptus* obtenido del Centro de Zoología Aplicada, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; veneno de *M. mipartitus hertwigi*, y veneno de *M. nigrocinctus* (una mezcla de venenos de *M. n. nigrocinctus* y *M. n. mosquitensis*) obtenidos en el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica. Estos tres venenos se emplearon también con fines de ensayo, junto con los siguientes: veneno de *M. alleni*, del Instituto Clodomiro Picado; venenos de *M. fulvius fulvius* y *M. carinicaudus dumerilii* facilitados por la División de Normas Biológicas, Institutos Nacionales de Salud, E.U.A.; venenos de *M. corallinus*, *M. spixii* y *M. lemniscatus* adquiridos en los Laboratorios del Serpentarium de Miami, Florida, e igualmente se empleó veneno de *M. surinamensis* obtenido de una sola especie de serpiente, gentilmente donada por el Dr. Juan Manuel Renjifo del Instituto Nacional de Programas Especiales de Salud (INPES), Colombia.

El procedimiento de inmunización fue esencialmente el mismo empleado anteriormente para preparar el antiveneno contra *Micrurus mipartitus* (9), salvo que el antígeno consistía en una mezcla igual de los venenos de *M. frontalis*, *M. mipartitus* y *M. nigrocinctus*.

Se utilizaron dos caballos sanos de cinco años de edad. El procedimiento de inmunización consistió en nueve inyecciones de dosis progresivamente mayores, empezando con 1 mg y terminando con una inyección de 75 mg de la mezcla de venenos. Se empleó alginato sódico como coadyuvante repositorio en todas las inyecciones, con excepción de la penúltima que se administró con coadyuvante completo de Freund.

Dos semanas después de la última inyección se extrajeron de cada caballo 30 litros de sangre (en cuatro días sucesivos) y se les transfundieron los hematíes. Luego se fraccionó el plasma inmune con sulfato de amonio y se concentró al 10% de proteína. El antiveneno

purificado se envasó en lotes de 10 ml y se liofilizó.

Se practicaron las pruebas de neutralización en ratones de ambos sexos que pesaban entre 16 y 18 gramos. Se prepararon partes alícuotas de veneno, que contenían 450 µg de venenos de *M. mipartitus*, *M. frontalis* y *M. corallinus* y 300 µg de uno de los otros venenos. A continuación se mezclaron progresivamente con cantidades mayores de antiveneno, y las mezclas resultantes se llevaron a un volumen final de 6 ml. Luego, estas mezclas se incubaron en baño de María a 37°C durante 30 minutos y se inocularon por vía intraperitoneal (ip) a grupos de cinco ratones (en volúmenes de 1 ml por animal). Los títulos de neutralización, calculados en miligramos de veneno neutralizado por mililitro de antiveneno, se basaron a partir de la cantidad menor de antiveneno que protegió por lo menos a cuatro de los cinco animales. El período de observación posterior a la inoculación para los animales de prueba fue de 72 horas.

Resultados y discusión

El cuadro 2 presenta los títulos de neutralización obtenidos con el antiveneno refinado y concentrado cuando se ensayó con venenos homólogos y heterólogos. La DL₅₀ ip para cada veneno y la dosis de confrontación ad-

ministrada a cada uno de los ratones también figuran en el cuadro. Puede observarse que se administraron en cada caso por lo menos tres DL₅₀ de veneno. Salvo el veneno de *M. surinamensis*, todos los demás se neutralizaron en cierta medida, lo que sugiere que el antiveneno es eficaz en el caso de mordedura de serpiente coral. Considerando las pequeñas cantidades de veneno que almacenan las serpientes coral (hecho que se verifica mediante la extracción exhaustiva de la ponzoña en el laboratorio), parece ser que dos o tres ampollas de 10 ml del antiveneno bastarían para neutralizar el veneno inyectado en una mordedura natural. Y esto parece también cierto incluso en el caso de que la mordedura fuera por *M. mipartitus* o *M. alleni*, las dos especies cuyas ponzoñas fueron neutralizadas a niveles más bajos de los títulos. Sin embargo, el hecho de que el veneno de *M. mipartitus* (y de *M. alleni*) quedara neutralizado a un bajo título sugiere la necesidad de aumentar la proporción de veneno de *M. mipartitus* en la fórmula de inmunización, o bien de modificar el procedimiento de inmunización a fin de administrar más dosis o cantidades mayores de veneno. En la actualidad esto no es posible debido a la escasez de veneno de *M. mipartitus*. No obstante, existe una buena oportunidad de capturar especímenes de esta serpiente en las regiones de los cafetales de Colombia.

CUADRO 2—Títulos de neutralización de un antiveneno de *Micrurus* polivalente ensayado contra diez de los venenos de *Micrurus* más importantes.

Especies de <i>Micrurus</i>	Toxicidad del veneno (una DL ₅₀ en µg por ratón ^a)	Neutralización observada	
		Veneno de prueba (µg por ratón ^a)	Título (mg de veneno por ml de suero)
<i>M. fulvius</i>	9	50	0.4-0.5
<i>M. nigrocinctus</i>	13	50	0.6-0.8
<i>M. carinicaudus</i>	17	50	1.0-1.5
<i>M. frontalis</i>	15-20	75	0.4-0.5
<i>M. corallinus</i>	20-25	75	1.5-2.0
<i>M. spixii</i>	10-15	50	0.3-0.4
<i>M. mipartitus</i>	23	75	0.2-0.3
<i>M. alleni</i>	12	50	0.2-0.3
<i>M. lemniscatus</i>	5	50	0.6-0.7
<i>M. surinamensis</i>	5-10	50	< 0.1

^aRatones de 16-18 gramos de ambos sexos.

El veneno de *M. surinamensis* no parece tener una estrecha relación inmunológica con ninguno de los demás venenos ensayados. Esto es importante porque conduce a la hipótesis de que ninguno de los sueros antiofídicos para las especies *Micrurus* que actualmente se encuentran en el mercado son eficaces contra este veneno.

Si se incluye el antiveneno polivalente que se acaba de describir, puede afirmarse que hoy se dispone de un total de seis antivenenos de serpiente coral. Los otros cinco son: el antiveneno anti-*M. fulvius* (E.U.A.), anti-*M. nigrocinctus* y *M. alleni* (Costa Rica), anti-*M. mipartitus* (Costa Rica) y anti-*M. frontalis* y *M. corallinus* (Brasil y Argentina). En este estudio se incluyeron todos estos venenos homólogos y ninguno parece tener reacciones inmunológicas cruzadas con *M. surinamensis*. Se considera que esta situación justifica la preparación de un antiveneno monovalente o, si se pudiera almacenar suficiente veneno, incluir el veneno de *M. surinamensis* en una fórmula de inmunización para elaborar un antídoto polivalente.

Hasta la fecha no hemos tenido oportunidad de ensayar nuestro antiveneno contra las serpientes coral más importantes de México y Guatemala, ni tampoco contra *M. isozonus* que es importante en Sudamérica. No obstante, estamos convencidos de que resultará eficaz contra un porcentaje muy significativo de las mordeduras de serpiente coral que se registran en el Hemisferio Occidental. Este antiveneno podría prepararse fácilmente mediante un esfuerzo cooperativo por parte de científicos de diferentes países y podría distribuirse sin dificultad por conducto de organismos internacionales como la Organización Panamericana de la Salud.

Resumen

Se preparó un antiveneno polivalente contra las serpientes coral en caballos inmunizados con una mezcla de venenos de las especies *Micrurus nigrocinctus*, *M. mipartitus* y *M. frontalis*, siguiendo los procedimientos de inmunización notificados con anterioridad. El plasma de los caballos se fraccionó usando sulfato de amonio.

El antiveneno producido se ensayó contra venenos de 10 especies. Los títulos de neutralización obtenidos indican que dicho suero antiofídico sería útil para el tratamiento de las mordeduras de la mayoría de las especies importantes de serpientes coral de América del Norte y del Sur, a saber: *M. fulvius*, *M. alleni*, *M. carinicaudus dumerilii*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. mipartitus*, *M. nigrocinctus* y *M. spixii*. Los autores señalan que una cooperación apropiada de científicos de varios países facilitaría la producción de este antiveneno y que el producto podría ser convenientemente distribuido por conducto de la OPS u otros organismos internacionales. Indican asimismo que el antiveneno no mostró un efecto neutralizante significativo contra el veneno de *M. surinamensis*. Esta situación parece justificar la preparación de un antiveneno monovalente contra el veneno de *M. surinamensis* o bien incluir este veneno en una fórmula de inmunización para un antídoto polivalente. □

Agradecimientos

Esta investigación contó con el apoyo de una subvención del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica; de la Universidad de Costa Rica, y de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

REFERENCIAS

- (1) Roze, J. A. *Micrurus*. En: J. A. Peters y B. Orejas-Miranda, eds., *Catalogue of the neotropical squamata: Snakes*. 1a. Parte. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 1970.
- (2) Hoge, A. R. y S. A. Romano. Neotropical pit vipers, sea snakes, and coral snakes. En W. Bücherl y E. Buckley, eds. *Venomous animals and their venoms: Venomous vertebrates*. Vol. 2. Academic Press, Nueva York, 1971, págs. 211-396.

- (3) Parrish, H. M. Bites by coral snakes: Reports of 11 representative cases. *Am J Med Sci* 253:561, 1967.
- (4) Russell, F. E. Bites by the Sonoran coral snake *Micruroides euryxanthus*. *Toxicon* 5:39, 1967.
- (5) Cohen, P. y E. B. Seligmann, Jr. Immunology studies of coral snake venom. *Mem Inst Butantan* 33:339, 1966.
- (6) Cohen, P., J. H. Dawson y E. B. Seligmann, Jr. Cross neutralization of *Micrurus fulvius fulvius* (coral snake) venom by anti-*Micrurus carinicauda dumerilii* serum. *Am J Trop Med Hyg* 17:308, 1968.
- (7) Cohen, P., W. H. Berkeley y E. B. Seligmann, Jr. Coral snake venoms: *In vitro* relation of neutralizing and precipitating antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 20:646, 1971.
- (8) Bolaños, R., L. Cerdas y R. T. Taylor. Estudios inmunológicos de los venenos de las principales *Micrurus* de Norte América, Centro América, Panamá y Colombia (Abstract, Third Latin American Congress of Parasitology). *Antioquia Médica* 23:518, 1973.
- (9) Bolaños, R., L. Cerdas y R. T. Taylor. The production and characteristics of a coral snake (*Micrurus mipartitus hertwigi*) antivenin. *Toxicon* 13:139, 1975.

Venoms of coral snakes (*Micrurus* spp.): Report on a multivalent antivenin for the Americas (Summary)

A multivalent coral snake antivenin was prepared in horses immunized with a mixture of venoms from the species *Micrurus nigrocinctus*, *M. mipartitus*, and *M. frontalis*, following immunization procedures previously reported. Plasma from the horses was fractionated with ammonium sulphate.

The antivenin produced was then tested against venoms from ten species. The neutralization titers obtained indicate it would be useful in treating bites received from most of the important coral snake species in North and South America, namely: *M. fulvius*, *M. alleni*, *M. carinicaudus dumerilii*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. lem-*

niscatus, *M. mipartitus*, *M. nigrocinctus*, and *M. spixii*. The authors note that appropriate cooperation by scientists in various countries would make production of this antivenin an easy matter, and that the product could conveniently be distributed via PAHO or other international agencies. They also note that the antivenin showed no significant neutralizing effect against *M. surinamensis* venom. This situation would appear to justify preparing a monovalent antivenin against *M. surinamensis*, or else including *M. surinamensis* venom in an immunization formula for a multivalent antidote.

Venenos de cobras-corais (*Micrurus* spp.): Relatório sobre um antídoto polivalente para as Américas (Resumo)

Com a observância dos procedimentos de imunização previamente notificados, preparou-se um antídoto polivalente contra cobras-corais em equinos imunizados com uma mistura de venenos das espécies *Micrurus nigrocinctus*, *M. mipartitus* e *M. frontalis*. O plasma equino foi fracionado com sulfato de amônio.

O antídoto produzido foi ensaiado contra venenos de dez espécies. Indicam os títulos de neutralização obtidos que o soro seria útil para o tratamento das picadas da maioria das principais espécies de cobras corais das Américas do Norte e do Sul, a saber: *M. fulvius*, *M. alleni*, *M. carinicaudus dumerilii*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M.*

lemniscatus, *M. mipartitus*, *M. nigrocinctus* e *M. spixii*. Assinalam os autores que a adequada cooperação de cientistas de diversos países facilitaria a produção do antídoto e que o produto poderia ser convenientemente distribuído por meio da OPAS ou de outros organismos internacionais. Observam também que o antídoto não revelou maior efeito neutralizante do veneno de *M. surinamensis*. A situação parece justificar a preparação de um antídoto monovalente para o veneno de *M. surinamensis*, ou então a inclusão deste veneno numa fórmula de imunização para um antídoto polivalente.

Venins de serpents corail (*Micrurus* spp.): Rapport sur un sérum multivalent pour les Amériques (Résumé)

On a préparé un sérum multivalent contre les serpents corail sur des chevaux immunisés avec un mélange de venins des espèces *Micrurus nigrocinctus*, *M. mipartitus* et *M. frontalis*, et ce, en suivant les procédures d'immunisation qui ont été décrites précédemment (9). Le plasma des chevaux a été fractionné avec du sulfate d'ammonium.

Le sérum produit a été essayé contre des venins de 10 espèces. Les titres de neutralisation obtenus montrent que ce sérum serait utile dans le traitement des morsures de la plupart des espèces les plus importantes de serpents corail en Amérique du Nord et en Amérique de Sud, à savoir: *M. fluvius*, *M. alleni*, *M. carinicaudus dumerilii*, *M.*

corallinus, *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. mipartitus*, *M. nigrocinctus* et *M. spixii*. Les auteurs notent que le concours de scientifiques de plusieurs pays rendrait la production de ce sérum une tâche facile et que le produit pourrait être distribué sans problème par l'intermédiaire de l'OPS et d'autres organisations internationales. Ils notent par ailleurs que le sérum n'a révélé aucun effet de neutralisation considérable sur le venin *M. surinamensis*. Cet état de choses semblerait justifier la préparation d'un sérum monovalent contre *M. surinamensis* ou encore l'inclusion du venin *M. surinamensis* dans une formule d'immunisation pour un antidote multivalent.