Estabilidad de la actividad neutralizante del antiveneno ofídico conservado a 4°C y 16°C contra el veneno de tayas (complejo *Bothrops atrox-asper*) de Colombia

Ramírez J.¹, Renjifo J.M.¹, Forero M.A.¹

Resumen

En este trabajo se informa acerca de la determinación de la actividad neutralizante de la letalidad de varios lotes de antiveneno ofídico en forma líquida, producidos en el Instituto Nacional de Salud y almacenados en completa oscuridad a 4°C y a 16°C. El veneno usado para retar el antiveneno fue una mezcla de venenos de tayas (complejo *Bothrops atrox-asper*), procedentes de diferentes regiones de Colombia. Se estableció el porcentaje de la potencia remanente de los lotes para cada año y para cada temperatura de almacenamiento, para así corroborar la fecha de expiración del producto en forma líquida. Los resultados de este estudio muestran que el antiveneno conservado en las condiciones de oscuridad a 4°C, luego de 3 años de almacenamiento mantiene casi la totalidad de la capacidad neutralizante (95%), mientras que el antiveneno almacenado bajo condiciones de oscuridad a 16°C, luego de 2 años mantiene el 87% de su capacidad neutralizante. Así, recomendamos desechar el producto mantenido bajo estas condiciones a los dos años de fabricación.

Palabras claves: antiveneno, estabilidad, neutralización, taya, *Bothrops*, *Bothrops atrox-asper*.

Summary

Neutralisation of the lethal activity of various batches of liquid antivenom maintained in complete darkness at 4°C and 16°C respectively, produced by the Instituto Nacional de Salud, were studied. The venoms used to challenge the antivenoms came from a mixture of the complex *Bothrops asper-atrox*, obtained from different geographical regions of Colombia. The protection is given as the percentage of neutralisation remaining for each batch per year at a given storage temperature, in order to confirm the expiry date of the liquid product. The results of the study show that when the antivenoms are kept at 4°C and in the dark, after three (3) years of storage, they maintain almost the totality of their neutralisation power (95%). Whereas, the antivenom stored at 16°C and in the dark, after two (2) years, has a neutralisation power of 87 per cent, therefore we recommend that the product, maintained under the conditions referred to for two (2) years, should be discarded.

---

¹ Grupo de Sueros, Instituto Nacional de Salud, Santafé de Bogotá, Colombia.

Desde 1974, el Grupo de Sueros del Instituto Nacional de Salud (INS) produce dos tipos de antivenenos en forma líquida; el antiveneno polivalente, efectivo contra envenenamientos causados por serpientes colombianas de los géneros *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Crotalus* y *Lachesis*, todos de la familia Viperidae (1); y el antiveneno monovalente, específico contra envenenamientos causados por serpientes de los géneros *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothriopsis* y *Porthidium*.

Los antígenos utilizados para la inmunización de los equinos dadores de plasma, así como para las pruebas de neutralización, son una mezcla representativa de venenos extraídos de tayas (*Bothrops atrox-asper*) y cascabel (*Crotalus durissus cumanensis*) procedentes de diferentes regiones geográficas de Colombia. El producto terminado son inmunoglobulinas plasmáticas de origen equino, purificadas mediante precipitación con sulfato de amonio. Se distribuye al usuario en forma líquida y para el correcto almacenamiento del antiveneno se recomienda que sea mantenido refrigerado (4°C) y al abrigo de la luz. Si se observan estas condiciones, se puede asegurar una vigencia de tres años.

La estabilidad del antiveneno, cuya presentación es líquida, puede verse afectada por factores como el pH y la concentración de proteínas, así como factores extrínsecos de temperatura, luz y tiempo de almacenamiento (2).

Con el fin de garantizar la potencia del antiveneno se recomienda determinar experimentalmente la validez de la fecha de vencimiento presuntiva a los antivenenos almacenados bajo las condiciones recomendadas de refrigeración y oscuridad (3 y 4).

Gené y colaboradores (3) corroboraron la estabilidad del antiveneno mantenido en las condiciones recomendadas para varios lotes del suero antiofídico polivalente en forma líquida producido por el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica. Recientemente (5) informaron de la estabilidad de un lote de los mismos productores, por un período de un año mantenido a 4 diferentes temperaturas (4°C, 23°C, 30°C y 37°C), con lo cual demostraron que a estas temperaturas el

antiveneno no presenta disminución significativa en su poder neutralizante.

Como productor de antiveneno, el Laboratorio de Sueros del Instituto Nacional de Salud está interesado en la validación de la fecha de vencimiento del producto, el cual ha sido mantenido bajo las condiciones recomendadas y a diferentes temperaturas de almacenamiento. De esta forma, es importante conocer el comportamiento del poder neutralizante del antiveneno, teniendo en cuenta que un alto porcentaje del territorio colombiano tiene una temperatura ambiental alta (con promedio anual superior a 25°C) y, en muchos casos, los usuarios no poseen las condiciones adecuadas de mantenimiento de este producto. Con este fin, se estudió el posible cambio del poder neutralizante, almacenado el antiveneno a 4°C y a la temperatura del laboratorio que en promedio es de 16°C, con variaciones diarias entre 13°C y 17°C, y todas las muestras al abrigo de la luz.

A partir de 1987, se realizaron anualmente, pruebas de potencia de neutralización a cada uno de los lotes producidos a partir de 1983.

El presente trabajo presenta los resultados obtenidos hasta 1989, contra mezcla de venenos del complejo *Bothrops atrox-asper* de diferentes regiones del país.

Materiales y metodos

Una vez que se ha terminado el proceso de producción y los lotes han pasado las pruebas de control de calidad para ser liberados al mercado, se selecciona al azar una muestra representativa (10 frascos), la cual es almacenada en el laboratorio bajo condiciones ideales de oscuridad y refrigeración (4°C). Una segunda muestra se mantiene a temperatura ambiente del laboratorio que en promedio es de 16°C con variaciones diarias entre 13°C a 17°C y oscuridad.

Se usaron 19 lotes para los ensayos de potencia de neutralización, a los cuales en ningún caso se pudo hacer el seguimiento durante 5 años consecutivos. En la mayoría de los casos por la diferencia entre el año de producción (1983-89) y los años en los que se hicieron las pruebas (1987-89) y en unos pocos casos porque no se pudieron realizar las respectivas pruebas.

Los ensayos de potencia de neutralización de los antivenenos se realizaron siguiendo la técnica propuesta por la O.P.S. (6), utilizando ratones de la cepa Suizo, de 16 a 18 g de peso ($n=5$), a los cuales se les inocula una cantidad fija de veneno (4 DL_{50}) en presencia de cantidades variables de antiveneno, para completar a un volumen constante con solución salina al 0,85%. Como control positivo del veneno se usa una mezcla a la cual se reemplaza el antiveneno por solución salina. Luego de la incubación en baño de María a 37°C por 30 minutos, se inocula 0,2 ml de la mezcla (veneno-antiveneno y veneno-solución salina como control) por vía intraperitoneal. La lectura de la mortalidad de los ratones se realiza a las 48 horas después de la inoculación y el título del antiveneno es aquél que protege el 100% de los ratones. Los resultados se expresan como miligramos de veneno (peso seco) neutralizado por mililitro de antiveneno.

La protección efectiva de cada uno de los lotes estudiados, se realizó comparando la potencia original (al ser liberado al mercado) con la potencia determinada en los años subsiguientes, y se expresa como el porcentaje remanente del título original.

Resultados

En la tabla 1 se presentan los resultados de las pruebas de potencia realizadas a los diferentes lotes almacenados a 4°C y a 16°C , contra la mezcla de venenos del complejo *Bothrops atrox-asper* de diferentes regiones del país.

El título original contra el veneno de *B. atrox-asper*, en promedio es más alto de lo informado, lo que se demuestra por la potencia de neutralización para el año 1, tanto para el antiveneno almacenado a 4°C como a 16°C , siendo de 107% y de 103% respectivamente; sin embargo, se encuentra dentro de los límites de confianza al 95% (figura 1).

Tabla 1. Determinación de la potencia residual de varios lotes de antiveneno almacenados a 4°C y 16°C , contra una mezcla de venenos del complejo *Bothrops atrox-asper*.

Lote N°	Fecha de envase	Título original (mg/ml)	Potencia residual del título original dado en porcentaje									
			Almacenamiento a 4°C (años)					Almacenamiento a 16°C (años)				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
30	Ago/84	10	-	-	80	80	80	-	60	60	60	60
31	Jun/83	7	-	-	-	86	86	-	-	-	86	86
32	Mar/83	7	-	-	-	-	86	-	-	-	71	-
33	Feb/84	6	-	-	-	100	100	-	-	83	83	83
34	Oct/84	8	-	-	100	100	-	-	75	-	-	75
35	Mar/85	12	-	-	83	83	-	-	83	83	67	67
36	Jul/85	8	-	100	100	100	-	100	75	75	75	-
37	Dic/85	8	-	100	-	100	-	100	-	100	100	-
39	Nov/86	10	120	120	120	-	-	100	100	100	-	-
150986	Ene/87	10	100	100	100	-	-	-	100	100	-	-
101186	May/87	6	100	100	83	-	-	100	100	83	-	-
260187	Jun/87	12	100	83	-	-	-	-	83	67	-	-
040587	Sep/87	10	120	100	-	-	-	100	80	-	-	-
051087	Mar/88	5	-	-	-	-	-	120	120	-	-	-
020588	Ago/88	12	83	-	-	-	-	83	-	-	-	-
080888	Nov/88	10	120	-	-	-	-	120	-	-	-	-
260988	Ene/89	10	120	-	-	-	-	120	-	-	-	-
160189	May/89	10	-	-	-	-	-	80	-	-	-	-
100489	Jul/89	7	-	-	-	-	-	114	-	-	-	-

Figura 1. Promedio de la potencia residual del título original de los lotes de antiveneno almacenados a 4°C y 16°C, contra una mezcla de venenos del complejo *Bothrops atrox-asper*, con los respectivos límites de confianza al 95%. (---) 4°C; (—•—) 16°C. Se expresa como el porcentaje remanente del título original.

En cuanto a la pérdida de potencia en antivenenos almacenados a 4°C, el promedio de la capacidad neutralizante decrece lentamente a partir del segundo año, reduciendo la potencia original al 95% en el tercer año (fecha de expiración del producto), llegando hasta un 88% en el quinto año (figura 1). En el antiveneno almacenado a 16°C, la capacidad neutralizante disminuye rápidamente al segundo año llegando a un 87% del título original, luego del cual, aparentemente disminuye la velocidad de pérdida hasta el año quinto, alcanzando el 74% (figura 1).

Discusión

Los antivenenos producidos en forma líquida usualmente tienen un tiempo de vigencia de 3 años cuando se mantienen bajo condiciones de refrigeración (4°C) y oscuridad. Sin embargo, el tiempo que el antiveneno conserva su actividad neutralizante depende de las condiciones de fabricación; por estas razones, Gené y colaboradores (3) recomiendan que cada fabricante determine experimentalmente la estabilidad de su producto. Así, los resultados de este estudio demuestran que el antiveneno producido en el Instituto Nacional de Salud, almacenado a 4°C y oscuridad, mantiene en promedio el 95% de la

capacidad neutralizante al tercer año (tabla 1). Esto demuestra que la fecha de expiración de 3 años para este producto es adecuada, cuando se almacena en las condiciones recomendadas de temperatura y oscuridad.

Sin embargo, para antivenenos almacenados a temperaturas mayores (16°C), se presenta una tendencia a una disminución más rápida de su capacidad neutralizante, la cual se refleja desde el segundo año, conservando en promedio el 87% de su capacidad neutralizante de la letalidad, pérdida de potencia que sólo a los cinco años es alcanzada por el antiveneno almacenado a 4°C (tabla 1). Esto demuestra que, a pesar de que en estas condiciones de temperatura el antiveneno es utilizable hasta la fecha de vencimiento, teniendo en cuenta la disminución en la neutralización (promedio de potencia remanente de 83%), se recomienda desechar el antiveneno a los dos años de fabricación.

El comportamiento general de la actividad neutralizante del antiveneno en forma líquida producido en Costa Rica, contra veneno de *Bothrops asper* (3, figura 1), es diferente al hallado en nuestros resultados para el veneno de *Bothrops atrox-asper*, ya que para Gené, la pérdida del poder neutralizante en el tiempo presenta tres etapas: la primera, donde no se presenta pérdida del título hasta los tres años de postenvase; una segunda etapa, donde hay una rápida disminución de la capacidad neutralizante hasta cerca del cuarto año (los cincuenta meses) y, finalmente, un período donde la pérdida es más lenta.

Este estudio muestra que el antiveneno almacenado a 4°C, desde el segundo año de postenvase, presenta una disminución del poder neutralizante comparado con el año 1, siendo esta pérdida constante hasta el año 5. El antiveneno almacenado a 16°C, presenta una acelerada pérdida entre el primer y segundo año, seguido por un período donde la pérdida es constante, hasta el quinto año (figura 1).

Estos resultados muestran una aparente concordancia con los resultados obtenidos por Rojas y colaboradores (5), donde en el primer año de postenvase no presenta disminución significativa del poder neutralizante debido a la variación de temperatura de almacenamiento.

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. A los doctores Luis Carlos Orozco, Grupo de Patología (INS), Akira Homma, Asesor Regional de Biológicos OPS/OMS, Washington, y a Francisco Oscar de Siqueira França, médico del Hospital Vital Brasil y consultor en la OPS, Washington, por la revisión del manuscrito y sus valiosas sugerencias.

Referencias

1. **Campbell JA, Lamar WW.** The venomous reptiles of Latin America. New York: Cornell University Press 1989.
2. **World Health Organization.** Progress in the characterization of venom and standardization of antivenom, W.H.O. offset publication N° 58, Geneva: World Health Organization 1981; 7.
3. **Gene JA, Gómez M, Cerdas L.** Estudio sobre la estabilidad de la actividad neutralizante del suero antiofídico contra veneno de terciopelo (*Bothrops asper*). Rev Costarric Cienc Med 1986; 7:3.
4. **Jerne NK, Perry WLM.** The stability of biological standards. Bull World Hlth Org 1956; 14:167.
5. **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; 28:101.
6. **Organización Panamericana de la Salud (OPS).** Manual de procedimientos: producción y pruebas de control en la preparación de antisueros diftérico, tetánico, butolínico, antivenenos y de la gangrena gaseosa. 1977; 104.