

HIPERINMUNIZACIÓN DE OVINOS CONTRA VENENO DE *Crotalus durissus cumanensis* DEL ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Hyperimmunization of Ovines against *Crotalus durissus cumanensis* Venom from the Zulia State, Venezuela

Juan R. Montilla F.¹, María V. Alvares de Montilla¹, Elvira Díaz Z.², Marcos Añez¹ y José Villavicencio¹

¹Unidad de Investigaciones Ofidiológicas. ²Cátedra de Microbiología.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15252. Maracaibo 4005-A, Edo. Zulia, Venezuela

RESUMEN

En este trabajo se estudió el desarrollo de la respuesta inmune inducida por la aplicación de un esquema de hiperinmunización preestablecido contra el veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, a un grupo de cinco ovinos sanos, nunca antes expuestos a este veneno. Se colectaron muestras de sangre cada siete días por un periodo de 70 días. Con el suero obtenido, se realizaron pruebas de neutralización en ratones, utilizando una dosis reto de veneno de 3 DL₅₀. Se determinó la DE₅₀, la cual se expresó en µg de veneno neutralizado por ml de suero. En los resultados se observaron variaciones individuales en la magnitud de la elevación del título de anticuerpos y rasgos comunes en el comportamiento de las curvas desarrolladas. El título promedio óptimo (602 µg/ml), fue obtenido el día 21 posterior a la primera inoculación. Para ese momento el ovino con título más alto fue de 978 µg/ml y el más bajo de 338 µg/ml. El promedio más bajo (115,2 µg/ml) fue observado el día 70. Se propone que cada ovino debe ser evaluado y seleccionado en base a una respuesta inmune satisfactoria, antes de ser utilizado para la producción de antiveneno.

Palabras clave: *Crotalus durissus cumanensis*, ovinos, hiperinmunización, neutralización, DL₅₀, DE₅₀, antiveneno, suero, veneno.

ABSTRACT

This research deals with the induced immune response by applying a pre-established hyperimmunization schedule against *Crotalus durissus cumanensis* venom to a group of five healthy ovines, which were not previously exposed to this venom. Blood samples were collected every 7 days during a

period of 70 days. Sera obtained was used for neutralization test on mice, by using a challenge dosage of 3 LD₅₀. The ED₅₀ was found and expressed as µg of the neutralized venom by each ml of sera. Results revealed individual variation in the magnitude of the antibody titers rise as well as, in common features on the curve pattern. The optimum average titer (602 µg/ml), was found on day 21 after the first inoculation which corresponded with the third day after the last challenge. By this time the ovine with the highest titer reached 978 µg/ml whereas the lowest was 338 µg/ml. On the other hand, the lowest average (115.2 µg/ml) was observed on day 70. Results suggest that each ovine must be evaluated and selected on the bases of a satisfactory immune response, before its utilization for antivenom production.

Key words: *Crotalus durissus cumanensis*, ovines, hyperimmunization, neutralization, LD₅₀, ED₅₀, antivenom, sera, venom.

INTRODUCCIÓN

La producción de suero antiofídico como único tratamiento comprobadamente efectivo contra el accidente producido por la mordedura de serpientes venenosas, se ha venido realizando en equinos desde finales del siglo pasado [3]. En la actualidad, poco se conoce del porqué de la escasez de investigaciones en otras especies y además relativamente, se ha hecho poco en términos de conseguir una nueva manera de producir un antiveneno más efectivo [16]; aunado a esto, existen escasos reportes sobre el desarrollo de la respuesta inmune en animales inoculados con veneno de serpiente para la producción de antivenenos [8, 12].

Los sueros equinos usados para el tratamiento del accidente ofídico, con frecuencia producen reacciones adversas

como la enfermedad del suero o en ocasiones, shock anafiláctico [2, 16, 17, 23, 24, 26]. La necesidad de disminuir los efectos alérgicos colaterales a la administración de antivenenos, así como el alto riesgo que representa una segunda exposición del paciente a un suero heterólogo cuyo origen sea la misma especie, ha obligado a buscar otras alternativas que minimicen estos efectos; habiéndose incorporado recientemente al ovino como fuente de producción de antivenenos, ya que ha mostrado una mejor compatibilidad con humanos, escasos problemas de seroreacción y de muy buena respuesta inmunológica [2, 17, 22, 23, 26].

Una mejor respuesta a un antígeno ha sido demostrada, cuando éste ha sido utilizado en la inducción de los anticuerpos correspondientes. Los venenos de serpientes de una misma especie difieren de una región a otra; lo cual obliga a la utilización de venenos de serpientes autóctonas para garantizar la especificidad del suero [3, 6, 9, 14, 15].

En los centros de producción de sueros antiofídicos del mundo, los esquemas de inmunización difieren, ya que varían las condiciones ambientales, las características del manejo de los animales sometidos a las inoculaciones, las especies de serpientes existentes y la composición de sus venenos [15].

Venezuela ocupa el segundo lugar en lo referente al accidente ofídico, ocupando el primer lugar la India, el tercero Birmania y el cuarto Brasil [20].

La serpiente *Crotalus durissus cumanensis* (cascabel común) es una de las más distribuidas en el país y es responsable de numerosos casos de mordeduras, [11, 19] con el 25% de las muertes como consecuencia de emponzoñamientos fatales en el país [20].

Todas las observaciones antes mencionadas orientan este trabajo hacia la producción de antivenenos en ovinos con venenos provenientes de serpientes *Crotalus durissus cumanensis* propias de la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación geográfica

La presente investigación fue realizada en la Unidad de Investigaciones Ofidológicas (U.I.O.) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. El clima es cálido-húmedo con una temperatura promedio de 26 a 30°C [7].

Veneno

El veneno suministrado por la U.I.O. se obtuvo de un lote de 25 serpientes *Crotalus durissus cumanensis*, colectadas en diferentes regiones del Edo Zulia. Una vez obtenido, se congeló, liofilizó, se determinó su DL₅₀ (15 µg por ratón de 18 a 20g) y se mantuvo a una temperatura de -20°C [12].

Unidad experimental

Cinco ovinos adultos, de 12 a 17 meses de edad. Machos, sanos, raza mestizo Criollo-West African, cuyos pesos oscilaron entre 30 y 40 kg, y que nunca habían sido inoculados con ningún tipo de veneno, fueron utilizados para el experimento. En dichos animales, la condición general y parámetros clínicos de salud eran excelentes. Previo a la inmunización, los ovejoes se dejaron en un periodo de adaptación de dos meses, sometiéndose a un programa de control parasitario y de enfermedades infecciosas. Además, fueron evaluados clínicamente en varias ocasiones antes de ingresar al programa de inmunización. Su alimentación consistió en pasto de corte picado (Buffle), heno y una mezcla de alimento concentrado en pellets, reforzado con vitaminas y minerales en proporciones y calidades adecuadas a sus necesidades nutricionales.

Inóculos

A partir de una solución madre: 1% del veneno liofilizado en solución salina fisiológica (0,85% NaCl) y esterilizada por filtración (Millipore 0,22 µm), se prepararon los inóculos. Aquellos correspondientes a las dos primeras inoculaciones fueron elaborados preparando emulsiones con adyuvante Completo de Freund para la primera inoculación e Incompleto para la segunda; el inóculo fluido para las inoculaciones 3, 4, y 5, consistió en una mezcla de veneno más solución salina fisiológica. Las dosis administradas por animal se presentan en la TABLA I.

Inmunización y sangrías

Los ovejoes fueron inoculados por vía subcutánea, previo rasurado y desinfección, en la tabla del cuello y en la porción dorso-lateral de la región costal y lumbar [8].

Las dosis aplicadas se basaron en los esquemas de inmunización empleados en el Instituto Butantan, Brasil [18] y en el Centro de Biotecnología de la Universidad Central de Venezuela [25], modificados en el presente trabajo en los siguientes aspectos: 1) Se utilizó el ovino en sustitución del equino; 2) Las dosis de veneno y cantidades de adyuvante fueron ajustadas de acuerdo al peso del ovino; 3) El veneno usado en el presente trabajo fue obtenido exclusivamente de serpientes procedentes del estado Zulia.

Antes de comenzar el esquema de inmunización, se extrajo una muestra de sangre a cada ovejo con el objeto de demostrar, en ratones, la ausencia de anticuerpos neutralizantes contra el veneno crotálico que se empleó, y su posterior inclusión en el programa de inmunización, TABLA I.

De cada ovino se obtuvo 100 ml de sangre de la vena yugular en 11 oportunidades. La misma fue recogida en Erlenmeyers estériles, en solución de citrato de sodio al 17,5%, en proporción de 5 ml de citrato por cada 100 ml de sangre. Se agitó suavemente durante la sangría. Luego, el plasma fue separado por centrifugación a 3000 rpm por 30 minutos y colocado en baño maría a 56°C por 30 minutos para eliminar el fibrinógeno y el complemento. Se filtró con Millipore 0,22 µm y se

TABLA I
ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN BÁSICO CON VENENO CROTÁLICO EN OVINOS

Días	Veneno mg	Adyuvante	Sangrías	Titulación de Anticuerpos
0	0,5	F.C.	Sí	sí
7	0,5	F.I.	sí	Sí
14	0,2	SSF	Sí	sí
16	0,2	SSF	No	No
18	0,2	SSF	No	No
21			Sí	Sí
28			Sí	Sí
35			Sí	Sí
42			Sí	Sí
49			Sí	Sí
56			Sí	Sí
63			Sí	Sí
70			Sí	Sí

F.C.: Adyuvante de Freund completo. F.I.: Adyuvante de Freund incompleto. C.S.F.: Solución Salina Fisiológica.

preservó a una concentración final de 0,4% con una solución de eter-fenol al 50%, a razón de 0,8 ml de este preparado por cada 100 ml de suero [25], distribuido en alícuotas de 3 ml y mantenido a -20°C hasta ser usado, [12].

Neutralización de la letalidad

La neutralización de la letalidad se determinó calculando la DE_{50} del suero de los ovinos hiperinmunizados utilizando el método de Spearman-Kärber y se expresó en μg de veneno neutralizado por ml de suero [5, 15, 25].

Se prepararon tubos de ensayo con una cantidad fija de veneno mas diluciones seriadas del suero problema y la dilución control positivo, se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Luego, cada una de las diluciones fue evaluada por triplicado en una cantidad no mayor de 1 ml, conteniendo 3 DL_{50} (45 μg) por ratón e inoculada intraperitonealmente [21] a grupos de 5 ratones albinos no isogénicos de 18 a 20g de peso corporal, [1, 10, 13]. Los ratones muertos y sobrevivientes se registraron durante 48 horas [1] y la data se utilizó para la determinación de la DE_{50} . Con la media correspondiente del triplicado de cada dilución, se graficó el comportamiento de la respuesta inmunológica de cada uno de los ovejos del grupo experimental durante 70 días.

Análisis estadístico

Se resume la información a través de métodos estadísticos de posición y dispersión, entre ellos: media geométrica, error standard geométrico, coeficiente de variación y número de muestras. Graficando, se obtiene la curva tiempo-respuesta para evidenciar el tiempo de aparición del título neutralizante óptimo.

Para analizar la relación entre el título de anticuerpos y el tiempo expresado en días, se ajustó un modelo de regresión no lineal. El paquete para estimar este modelo fue el "Curve

Expert" en su versión 1,2. Entre varios modelos probados, el de mejor ajuste resultó ser el conocido como "Función Racional" cuya expresión es:

$$y = \frac{a + bx}{1 + cx + dx}$$

donde a, b, c y d representan los parámetros a ser estimados, "x" el tiempo en días e "y" la tasa de neutralización expresada en μg de veneno neutralizado por ml de suero.

RESULTADOS

La producción de anticuerpos contra el veneno de *Crótalus durissus cumanensis* del estado Zulia, determinada por su capacidad para neutralizar la letalidad en ratones, mostró diferencias individuales en la magnitud de la respuesta de los 5 ovinos sometidos al esquema de hiperinmunización, observándose un incremento paralelo de μg de veneno neutralizado por ml de suero antiofídico desde el día cero 0 al día 14 del esquema, TABLA II y FIG. 1; a partir de este momento, se notan marcadas diferencias individuales en el aumento de los niveles de respuesta. A pesar de esta variabilidad, se evidencian rasgos comunes en el comportamiento de las cinco curvas.

Según el modelo utilizado, resultó una curva característica mostrando un título promedio, máximo y óptimo en las muestras, correspondientes al día 21 posterior a la primera inoculación; luego se observa un descenso paulatino del título neutralizante hasta el día 70, última sangría, donde muestra el título promedio más bajo, FIG. 2, con un coeficiente de determinación $r^2 = 0,6021$, lo cual evidencia que aproximadamente el 60% de la variabilidad de la respuesta total (título de neutralización) se puede explicar por el tiempo en días transcurridos

TABLA II
NEUTRALIZACIÓN DEL VENENO DE *Crotalus durissus cumanensis* DEL ESTADO ZULIA, EXPRESADO EN µg/ml DE SUERO

	Ovejo 1	Ovejo 2	Ovejo 3	Ovejo 4	Ovejo 5
Sangría 0	0	0	0	0	0
Sangría 7	86	75	75	69	67
Sangría 14	145	131	134	129	112
Sangría 21	978	722	611	542	338
Sangría 28	624	424	404	349	219
Sangría 35	601	403	247	303	169
Sangría 42	432	367	236	236	135
Sangría 49	355	254	202	203	99
Sangría 56	272	218	152	186	92
Sangría 63	245	178	117	140	85
Sangría 70	212	154	85	92	80

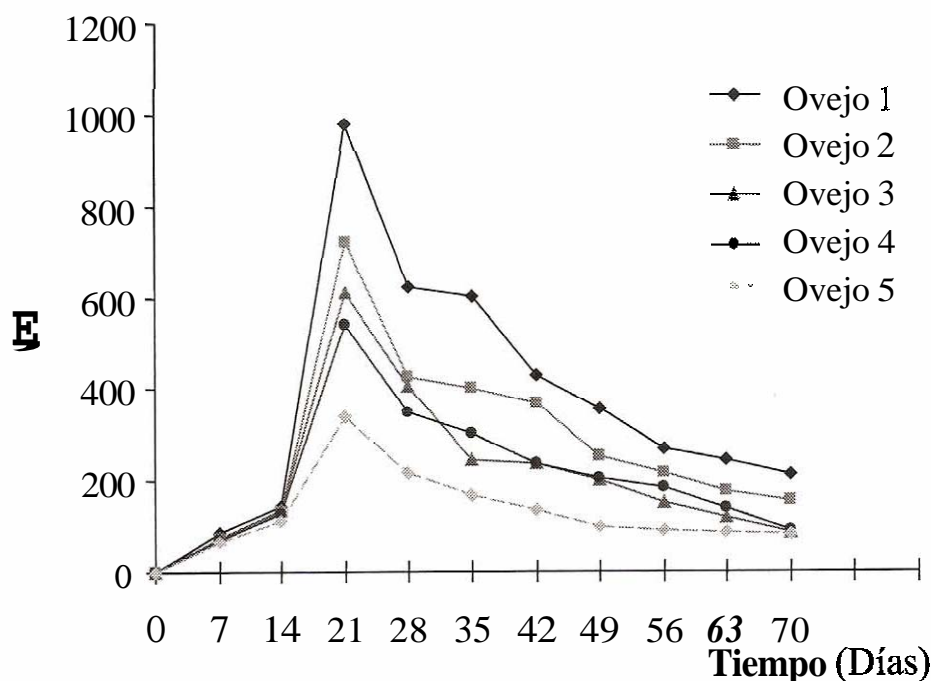


FIGURA 1. NIVELES DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA VENENO CROTÁLICO.

desde el día cero 0 al 70. El 40% restante de la variabilidad, puede estar representada por la zona geográfica, razones climatológicas, raza, factores de especie, factores individuales, ambientales y esquemas de inmunización, incidiendo en forma definitiva sobre la respuesta; los mismos fueron estrictamente controlados en el presente trabajo, pero no se obtuvo reportes de observaciones de este tipo para poder comparar.

De acuerdo a la magnitud de las medias geométricas de las sangrías por día, TABLA III, se aprecia que el título de anticuerpos óptimo fue de 602 µg/ml de suero, alcanzado en la sangría del día 21, tres días después de la última inoculación y la más baja fue de 115,2 µg/ml de suero en la sangría del día 70.

DISCUSIÓN

Frente a observaciones de investigadores que siguen la trayectoria de la producción de antivenenos en equinos, con los mismos programas y esquemas de inmunización sin resolver los problemas adversos que con este producto manifiestan los pacientes [26], el resultado del presente estudio se considera como una alternativa para minimizar dichos efectos, así como, una posibilidad de competencia contra los que tradicionalmente vienen trabajando con la producción de suero en equinos.

Considerando que en el mundo hay muchos centros donde se producen antivenenos [4], existen muy pocas publi-

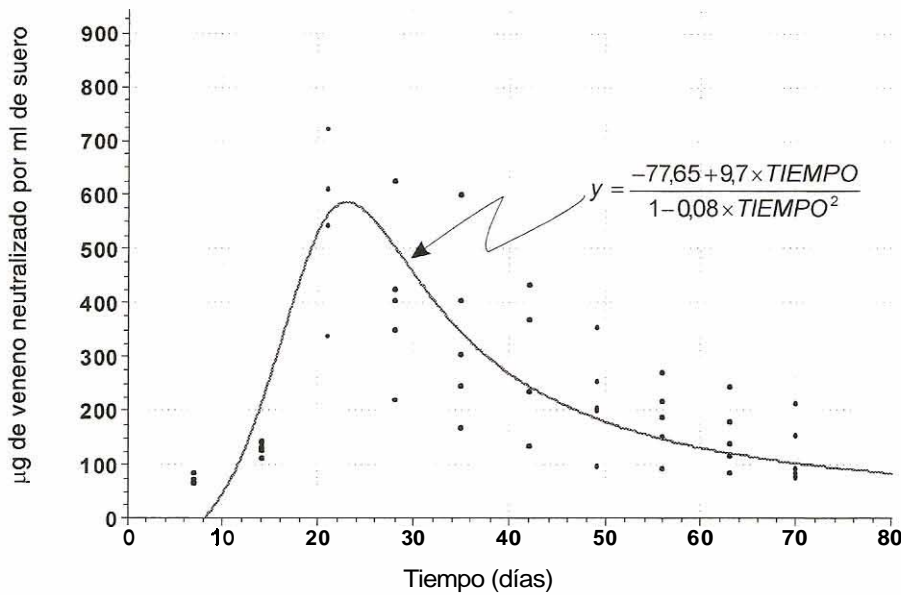


FIGURA 2. NIVELES DE ANTICUERPOS EN OVINOS SOMETIDOS AL ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN.

TABLA 111
RESUMEN DE LA ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Día de Sangría	\bar{X}_g	g	Cv	N
0	0 µg/ml	0	0	5
7	74,1 µg/ml	9,55	12,88	5
14	129,8 µg/ml	10,99	8,47	5
21	602,0 µg/ml	15,09	2,50	5
28	382,3 µg/ml	13,7	3,58	5
35	314,2 µg/ml	13,1	4,17	5
42	260,2 µg/ml	12,6	4,84	5
49	205,5 µg/ml	11,9	5,78	5
56	172,8 µg/ml	11,5	6,64	5
63	143,4 µg/ml	10,9	7,61	5
70	115,4 µg/ml	10,4	9,00	5

caciones relacionadas con el desarrollo de la respuesta inmune en animales inyectados con venenos de serpientes. En el presente trabajo, se monitoreó la producción de anticuerpos contra los componentes responsables de la letalidad en el veneno, utilizando ovejos no expuestos con anterioridad a estos antígenos. Los resultados indican una notable variabilidad en la respuesta de anticuerpos de los cinco ovinos, aun cuando durante las primeras etapas del esquema de inmunización, fue homogénea, coincidiendo con los reportes de Estrada y col. y Gutiérrez y col. [8, 12].

Inoculándose ovinos con veneno crotálico, se obtuvo un título neutralizante máximo a los 21 días de iniciadas las inoculaciones, tres días después de la última inoculación, lo que difie-

re con lo reportado por Rolim y col. [18] inoculando veneno crotálico y el Centro de Biotecnología de la Universidad Central de Venezuela (U.C.V.) [25], inoculando un pool de veneno crotálico y bothrópico, los que inmunizando equinos, encontraron respuestas máximas de anticuerpos a los 28 días, diez días después de la última inoculación. Estrada y col. [8] reportaron en equinos inoculados con un pool de veneno bothrópico, crotálico y lachésico, títulos neutralizantes de la actividad de la fosfolipasa A máximos a los 110 días. Bolaños y Cerdas [2] reportaron en ovinos y equinos, entre los 230 y 255 días la obtención de una respuesta máxima de anticuerpos neutralizantes del veneno crotálico para el caso de los ovinos, así como para venenos crotalinae, en el caso de los equinos.

El título neutralizante óptimo en suero crudo obtenido en el presente estudio fue de 602 $\mu\text{g/ml}$ de suero, mientras Bolaños y Cerdas [2] reportan que el suero crudo preparado en ovinos presenta una actividad neutralizante frente al veneno crotálico de 600 $\mu\text{g/ml}$ a 1200 $\mu\text{g/ml}$ y en equinos de 1000 a 2000 $\mu\text{g/ml}$ para venenos de la subfamilia crotalinae. Roiim y col. [18] reportan contra veneno crotálico 500 $\mu\text{g/ml}$ de suero de origen equino en 28 días como títulos considerados satisfactorios en el Instituto Butantan en Brasil. Es probable que la diferencia de los resultados reportados se deba a que dichos autores han trabajado con otras especies animales, distintas zonas geográficas, diferentes venenos y/o esquemas de inmunización.

Es de hacer notar que, durante la ejecución del presente trabajo, los ovejos no presentaron ningún tipo de alteración aparente de salud, a excepción de unos pequeños nódulos, que aparecieron a nivel del cuello en los puntos de inoculación, cuando el preparado tenía el adyuvante, desapareciendo sin tratamiento alguno, lo que difiere de Estrada y col. [8], quienes reportan que, de los 8 equinos inmunizados en su trabajo, todos desarrollaron abscesos, fístulas y fibrosis en el sitio de la inoculación del veneno y uno manifestó alteraciones generales moderadas, sugiriendo así, una mayor resistencia del ovino cuando es sometido a inoculaciones de venenos de serpientes en comparación con el equino.

CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación, constituyen el primer paso imprescindible para el desarrollo de la producción, a escala comercial, de suero antiofídico específico o autóctono, dado que en Venezuela no se ha reportado este tipo de investigación. La inmunización de ovinos, con venenos procedentes de especies de serpientes autóctonas, garantiza la obtención de un antiveneno de alta especificidad.

La variabilidad observada en la respuesta de animales inoculados por primera vez, demuestra la necesidad de evaluar individualmente el desarrollo del título neutralizante, lo que ayudaría en la selección de animales con un buen título de anticuerpos, con el propósito de sangrarlos y obtener un pool de plasma con altos niveles neutralizantes.

Los altos títulos de anticuerpos (600 $\mu\text{g/ml}$ de suero crudo) alcanzados en un corto periodo, 21 días, en condiciones climáticas adversas como lo son la temperatura y humedad relativa altas de la ciudad de Maracaibo, indican que el ovino es un animal cuya respuesta al esquema de inmunización básico contra veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, es excelente.

RECOMENDACIONES

Se hace necesario realizar esfuerzos para la producción de suero antiofídico con los venenos de las serpientes de las

regiones donde se va a aplicar, ya que, por ser más específico reduce la cantidad del mismo a utilizar, disminuyendo los riesgos de seroreacción, lo cual, se traduce en beneficios para la comunidad, contribuyendo a la solución de problemas tanto de salud pública, como económicos a nivel de producción animal ocasionados por este tipo de accidente.

Utilizar el ovino por constituir una especie más económica, accesible, de fácil manejo, no exigente en la calidad de alimento y de gran resistencia, lo que la favorece cuando se compara en los mismos aspectos con el equino.

La producción de sueros antiofídicos debe obtenerse adecuando el esquema de inmunización para conseguir el más apropiado, que se ajuste a las condiciones particulares de nuestra región con el fin de obtener inmunosueros dotados de títulos satisfactorios, con el menor gasto de antígeno y en el menor tiempo posible, más específicos, con menos reacciones colaterales y más económicos.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer a la Corporación de Desarrollo del Zulia (CORPOZULIA), por su apoyo financiero para la realización de esta investigación, así como también al personal de la Unidad de Investigaciones Ofidológicas adscrita a la División de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia y al Centro de Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BOLAÑOS, R. Toxicity of costa rican snake venoms for the white mouse. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 21(3): 360-363. 1972.
- [2] BOLAÑOS, R.; CERDAS, L. Producción y control de sueros antiofídicos en Costa Rica. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. LXXXVIII(3): 188-196. 1980.
- [3] BRAZIL, V. History of the primordia of snake-bite accident serotherapy. *Memórias do Instituto Butantan*. 49(1): 7-20. 1987.
- [4] CHIPPAUX, J.; GOYFFON, M. Producers of antivenorrtous sera. *Toxicon*. 21: 739-752. 1983.
- [5] COHEN, P.; BERKELEY, W.; SELINGMAN, E. Coral snake venoms. In vitro relation of neutralizing and precipitating antibodies. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 8(4): 646-649. 1971
- [6] COLIMODIO, H.; AGUILAR, M. Envenenamiento ofídico en Venezuela. *Medicina Crítica Venezolana*. 8(1): 23-38. 1993.
- [7] COMISION DEL PLAN NACIONAL DE APROVECHAMIENTO DE LOS RECURSOS HIDRAULICOS CC-

- PLANARH). Atlas Inventario Nacional de Tierras Región Lago de Maracaibo. Ministerio de Agricultura y Cría: 3-4. 1975.
- [8] ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J.; ALVARADO, J.; ROBLES, A.; ÁVILA, C.; GONZÁLEZ, N. Desarrollo de anticuerpos anti-fosfolipasa A₂ en caballos inoculados con veneno para la producción de suero antiofídico polivalente en Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. **37(2)**: 187-191. 1989.
- [9] FERRI, V. El libro de las serpientes de todo el mundo. 1^{era} Edición Editorial De Vecchi S.A. Balmes, Barcelona: 23-25, 55. 1992
- [10] FURTADO, M.; COLLETO, G.; DA SILVA, W. Controle do qualidade dos venenos animais en dos correspondentes antivenenos. *Memórias do Instituto Butantan*. **53(2)**: 149-159. 1991.
- [11] GRILLO, O.; SCANNONE, H. Fraccionation of *Crotalus durissus cumanensis* by gel filtration. *Toxicon*. **14**: 400-403. 1976.
- [12] GUTIÉRREZ, J.; CHÁVEZ, F.; ELIZONDO, J.; ÁVILA, C.; CERDAS, L. Production of monovalent anti-Bothrops asper antivenom: development of immune response in horses and neutralizing ability. *Revista de Biología Tropical*. **36(2B)**: 511-517. 1988.
- [13] GUTIÉRREZ, J.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENEN, J.; CHÁVEZ, F. La evaluación de la capacidad neutralizante de los antivenenos en América. Instituto Clodomiro Picado. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica (Mimeo): 1-21. 1990.
- [14] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. II Curso internacional sobre producción y control de productos biológicos. Manual de Laboratorio. México: 1-16. 1978.
- [15] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Progress in the characterization of venoms and standarization of antivenoms. *Laboratory Manual*. Geneva: 5-44. 1981.
- [16] QUANZHI, L.; CHARLOTTE, L. Evaluation of four different immunogenes for the production of snake antivenoms. *Toxicon*. **30(11)**: 1319-1330. 1992.
- [17] RAWAT, S.; LAING, G.; SMITH, D.; THEAKSTON, D.; LANDOM, J. A new antivenom to treat Eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) envenoming. *Toxicon*. **32(2)**: 185-190. 1994.
- [18] ROLIM, R.; GÓMEZ, E.; SILLES, M.; QUEIROGA, Y.; IIZUKA, H. Análise comparativa entre os diferentes esquemas de hiperinmunizacao empregados na producao de soros antiofídicos pelo Instituto Butantan (1957-1979). *Memorias do Instituto Butantan*. Vol. 44/45: 259-270. 1980-81.
- [19] ROZE, J. La taxonomía y zoogeografía de los ofidios en Venezuela. Universidad Central de Venezuela, Ediciones De La Biblioteca. Caracas: 293-294. 1966.
- [20] SANDNER, M. Manual de las serpientes **ponzoñosas** de Venezuela. Talleres Tipográficos de Miguel Angel García e Hijo. Caracas: 20-21. 1975.
- [21] SILLES, M. Padronizacao da avaliacao da potencia de antivenenos bothropicos, em camundongos. *Memórias do Instituto Butantan*. Vol. 42/43: 325-336. 1978/79.
- [22] SJOSTROM, L.; ABDULLA, I.; RAWAT, S.; SMITH, D.; LANDOM, J. A comparison of ovine and equine antivenoms. *Toxicon*. **32(4)**: 427-433. 1994.
- [23] SMITH, D.; REDDI, K.; LAING, G.; THEAKSTON, D.; LANDOM, L. An affinity purified ovine antivenom for the treatment of *Vipera berus* envenoming. *Toxicon*. **30(8)**: 865-871. 1992.
- [24] THALLEY, D.; CAROLL, S. Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens. *Bio-Technology*. **8(10)**: 934-938. 1990.
- [25] UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA Manual "Suero antiescorpiónico, elaboración y control". Facultad de Farmacia. Centro de Biotecnología: 7-24. 1994.
- [26] WEISS, R. Researchers foresee antivenin improvements. *Science News*. Vol. 138: 360-362. 1990.