

Reconocimiento y neutralización de un antiveneno anticoral polivalente colombiano sobre los venenos de *Micrurus mipartitus* y *Micrurus dumerilii*

Juan Diego Piedrahita¹, Paola Rey-Suárez²

¹Departamento de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

²Grupo de Investigación en Toxinología, Alternativas Terapéuticas y Alimentarias, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Autor de correspondencia:

Paola Rey-Suárez²

Grupo de Investigación en Toxinología, Alternativas Terapéuticas y Alimentarias, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. jessica.rey@udea.edu.co

Resumen

El accidente ofídico es considerado como una Enfermedad Tropical Desatendida, que ocasiona 1,8 a 2,7 millones de envenenamientos y entre 81 400 a 137 000 muertes en todo el mundo. En Colombia hay alrededor de 5000 casos cada año, la mayoría causados por víboras, pero hasta un 3% de los casos involucran serpientes del género *Micrurus*, más conocidas como serpientes corales. *Micrurus mipartitus* y *Micrurus dumerilii* son las dos especies de serpientes corales más importantes de Colombia, y el envenenamiento que causan se considera como un evento clínicamente grave, dado el alto riesgo de muerte por falla ventilatoria secundaria a parálisis neuromuscular generalizada. Por lo anterior, a los pacientes con signos de envenenamiento micrúrico se les debe administrar el tratamiento de primera línea en la actualidad: un antiveneno anticoral que neutralice las toxinas responsables del cuadro clínico. En Colombia contamos con dos fabricantes de este antiveneno: el Instituto Nacional de Salud (INS) y Laboratorios PROBIOL. En nuestro trabajo analizamos la inmunorreactividad y la capacidad neutralizante del Antiveneno Anticoral Polivalente del INS contra los venenos de *M. mipartitus* y *M. dumerilii*. El antiveneno mostró reconocimiento contra los venenos completos y sus fracciones cromatográficas más abundantes. Así mismo, hubo reactividad hacia las toxinas letales de cada veneno, con títulos más bajos para las toxinas de tres dedos en comparación contra las fosfolipasas neurotóxicas. Se realizó un protocolo de antivenómica de segunda generación infructuoso porque las fracciones no pudieron ser elucidadas por RP-HPLC. Finalmente, el antiveneno solo neutralizó el efecto letal del veneno de *M. dumerilii* en una proporción 0.1 mg de veneno por cada mL de antiveneno y no fue capaz de proteger frente al veneno de *M. mipartitus* en ninguna de las proporciones evaluadas (0,1 mg/mL y 0,2 mg/mL).

Palabras claves: Antiveneno anticoral, *Micrurus mipartitus*, *Micrurus dumerilii*, Colombia, Serpientes coral.

Introducción

El accidente ofídico es considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una Enfermedad Tropical Desatendida (NTD, por sus siglas en inglés) con 5,4 millones de casos por año, de los cuales 1,8 a 2,7 millones de casos producen envenenamiento que deriva en, aproximadamente, 81 400 a 137 000 muertes y el triple de amputaciones. Se ha descrito como un evento ligado a comunidades rurales en países de bajos recursos socioeconómicos y con sistemas de salud en donde escasean los insumos y el personal médico (1).

En Colombia se registraron 5640 casos que derivaron en 25 muertes durante el 2019, afectando principalmente a hombres agricultores en edad productiva, residentes del área rural y pertenecientes al régimen subsidiado del sistema de salud. Del total de casos, 64,8% fueron ocasionados por vipéridos y 1,1% por serpientes del género *Micrurus*, comúnmente conocidas como serpientes corales (2), de las cuales, *Micrurus mipartitus* y *Micrurus dumerilii* son responsables de la mayoría de las mordeduras (3–6).

El envenenamiento causado por estas especies del género *Micrurus* puede ocasionar la muerte o resultar en estancias prolongadas en unidades de cuidado intensivo debido a los efectos neurotóxicos del veneno, siendo la parálisis neuromuscular generalizada que requiere manejo con ventilación mecánica invasiva por falla ventilatoria asociada la principal complicación (7–9). El manejo médico anterior representa un gasto importante en los recursos hospitalarios.

El tratamiento farmacológico de elección para el envenenamiento micrúrico es la administración de un antiveneno anticoral (8,10–13). Estos antivenenos pueden ser monovalentes (con anticuerpos contra el veneno de una única especie de serpiente) o polivalentes (anticuerpos contra venenos de diferentes especies) (14). En el continente americano han sido varios los países productores de antiveneno anticoral: el Instituto Nacional de Producción de Biólogos (ANPB) en Argentina, el Instituto Clodomiro Picado (ICP) en Costa Rica, el Instituto Butantan en Brasil, el Instituto Bioclon en México y para Colombia, Laboratorios PROBIOL y el Instituto Nacional de Salud (INS) (15). Con respecto a estos últimos, el producido por Laboratorios PROBIOL es capaz

de neutralizar los venenos de *Micrurus mipartitus*, *M. surinamensis*, *M. dumerilii*, *M. psyches*, *M. medemi* y *M. spixii*, según el fabricante (16), y el producido por el INS ha demostrado eficacia contra los venenos de *M. dumerilii*, *M. isozonus*, *M. surinamensis*, *M. lemniscatus*, *M. spixii* y *M. medemi* (15).

A pesar de que las técnicas para producción de antivenenos son cada vez más sofisticadas y de que la disponibilidad de productores es cada vez mayor, es constante que los antivenenos anticoral tengan una limitada eficacia, evidenciada en las pruebas de inmunorreconocimiento cruzado y capacidad neutralizante, donde se ha demostrado la escasa actividad sobre el veneno de *M. mipartitus* por antivenenos como el producido por el ICP (monovalente anticoral), por laboratorios PROBIOL (polivalente anticoral) (16) e inclusive cuando se produjo un antiveneno anti-*Micrurus tener* enriquecido con una α -neurotoxina sintética (17), resaltando la necesidad de producir antivenenos que reaccionen adecuadamente contra el veneno de esta especie.

Por lo anterior, en el presente trabajo evaluamos el reconocimiento inmune y la capacidad neutralizante del antiveneno anticoral comercial del Instituto Nacional de Salud de Colombia, contra el veneno de las dos serpientes corales más importantes de nuestra nación: *M. mipartitus* y *M. dumerilii*.

Materiales y métodos

Venenos y antivenenos

Los venenos de *M. mipartitus* y *M. dumerilii* fueron extraídos de dos individuos adultos mantenidos en el Serpentario de la Universidad de Antioquia (Medellín, Antioquia), provenientes de la región suroeste del departamento de Antioquia. Los venenos fueron liofilizados y almacenados a -20 °C hasta su uso.

El Antiveneno anticoral polivalente evaluado fue producido por el Instituto Nacional de Salud Colombiano (Anticoral-INS) (lote No. 18AMP03; fecha de vencimiento abril de 2022), obtenido

por inmunización con los venenos de *M. dumerilii*, *M. mipartitus*, *M. isozonus* y *M. surinamensis* según indicaciones del fabricante.

Animales

Se realizaron experimentos en ratones Swiss-Webster de ambos sexos, de 16 a 18 g de peso. Los ensayos siguieron los protocolos aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Antioquia (Licencia No. 110 de 2017) cumpliendo con los Principios Directrices Internacionales para la Investigación Biomédica que Implique el Uso de Animales (18) .

Ensayos de Inmunorreactividad

El reconocimiento antigénico del antiveneno anticoral-INS se evaluó mediante ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas tipo sándwich (ELISA), siguiendo una metodología propuesta previamente (19,20). En un primer ensayo, se evaluaron los títulos de anticuerpos del antiveneno sobre los venenos completos de *M. mipartitus* y *M. dumerilii*. Para lo anterior, cada pozo de las microplacas (Falcon®) fue recubierto con 0.1 µg de veneno completo diluido en 100 µL de buffer de recubrimiento (Tris 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 9,0), y fue incubado toda la noche a temperatura ambiente. Luego fueron bloqueados los pozos con 100 µL de albúmina sérica bovina al 2% en buffer fosfato salino (fosfatos 0,04 M, NaCl 0,12 M, pH 7.2) durante 90 minutos. Fueron adicionadas diluciones seriadas dobles del antiveneno (1:500 hasta 1:256.000) y esto incubo durante 90 minutos a temperatura ambiente. Luego los platos fueron lavados y se adicionó el conjugado de inmunoglobulina equina marcada con peroxidasa marcado con peroxidasa en una dilución 1:8000, lo que posteriormente fue incubado durante 90 minutos nuevamente. Después de esto, los platos fueron lavados y se adicionó el sustrato de la peroxidasa (2 mg/mL de o-fenilendiamina, 0.1 M citrato de sodio, pH 5.0 y 4 µL de H₂O₂ 30%). La absorbancia fue medida a 492 nm.

Como segundo experimento, se evaluó el reconocimiento del antiveneno sobre los componentes de cada veneno obtenidos por RP-HPLC. Para esto, fueron fraccionados 2 mg de veneno utilizando

una columna C₁₈ RESTEK (250 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 µm) con detección de proteínas a 215 nm en un cromatógrafo Shimadzu 20A. Se realizó la elución siguiendo la metodología propuesta por Lomonte et al. (19), con un flujo de 1 mL/min en un gradiente lineal de ácido trifluoroacético al 0,1% (solución A) y acetonitrilo al 99% (solución B) de la siguiente manera: 0% de B isocráticamente durante 5 min, 0-15% de B durante 10 min, 15-45% de B durante 60 min, 45-70% de B durante 10 min y 70% de B durante 5 min. Finalmente, para identificar las proteínas presentes en las fracciones de los cromatogramas resultantes, se compararon los tiempos de elución y se asociaron con los obtenidos e identificados por espectrometría de masas en Rey-Suárez et al. (5,21).

Para analizar a mayor profundidad los títulos de anticuerpos presentes en el antiveneno sobre las toxinas de importancia en la letalidad de cada veneno, las fracciones Mm-8 y Mm-20 para *M. mipartitus* y Md-7 y Md-21 para *M. dumerilii* previamente reportadas como letales dentro de cada veneno, fueron obtenidas según se indica en Rey-Suarez et al. (5,22,23) y retadas a diferentes dosis de antiveneno anticoral-INS (1:500 – 1:4000).

En un experimento adicional, la habilidad del antiveneno anticoral-INS de reconocer de manera cruzada algunos venenos de especies de *Micrurus*, fue evaluado usando una dilución 1:1000 de antiveneno y siguiendo el mismo protocolo.

Ensayos de Antivenómica

Se llevó a cabo el enfoque de antivenómica de segunda generación propuesto por Pla et al. (24), siguiendo algunas variaciones (25). Para la preparación de matrices de inmovilización, se empaquetaron en una columna 2 mg de Sepharose™ 4B activada con CNBr, en 3 mL de HCl 1 mM, y se lavaron con 10-15 volúmenes de matriz del mismo tampón, seguido de dos volúmenes de matriz de tampón de acoplamiento (0,2 NaHCO₃ M, NaCl 0,5 M, pH 8,3) para ajustar el pH a 7,0-8,0. Después de esto y durante la noche, se incubaron 2 mL de antiveneno en 6 mL de tampón de acoplamiento, con la matriz de la columna a 4 °C y usando una rueda giratoria. Los grupos que no reaccionaron después del acoplamiento se bloquearon con un volumen de matriz de tampón

de bloqueo (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0), durante 2 horas y a temperatura ambiente, usando una rueda giratoria. Las columnas de afinidad se lavaron 12 veces, alternando entre dos tampones de lavado con diferente pH (0,1 M C₂H₃NaO₂, 0,5 M NaCl, pH 4,0; y 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0), utilizando tres volúmenes cada vez y terminando con el más básico.

Después de un equilibrado con cinco volúmenes de buffer fosfato salino (PBS) (20 mM tampón fosfato, 135 mM NaCl, pH 7,4), las columnas se incubaron con 1 mg de veneno de *M. mipartitus* o *M. dumerilii* disuelto en ½ volumen de matriz de PBS y esto se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas usando una rueda giratoria. Las fracciones no retenidas de las columnas se recuperaron con 2 volúmenes de matriz de PBS, mientras que las proteínas inmunocapturadas se eluyeron con 3 volúmenes de columna de tampón de elución (0,1 M glicina-HCl, pH 2,7) en 900 µL de un tampón receptor de neutralización (1 M Tris-HCl, pH 9,0). Las fracciones retenidas y no retenidas se analizaron por RP-HPLC usando el método descrito en el ítem anterior. Adicionalmente, también se obtuvo el perfil de RP-HPLC de 1 mg de cada veneno.

Ensayos de neutralización de la letalidad

La capacidad del antiveneno anticoral-INS de neutralizar la letalidad de los venenos de *M. mipartitus* y *M. dumerilii* se evaluó mediante experimentos de preincubación. Se utilizaron grupos de cuatro ratones por veneno y nivel de reto, los animales fueron inyectados vía intraperitoneal con 300 µl de una mezcla de 27 µg de veneno de *M. mipartitus* o 60 µg de veneno de *M. dumerilii* (cantidad de veneno equivalente a 3DL₅₀ (5,26)) y antiveneno anticoral-INS en una proporción de 0.1 mg o 0.2 mg de veneno por mL de antiveneno, estos fueron incubados por 30 min a 37 °C. Los grupos control recibieron la misma dosis de veneno, incubados solo con PBS. Los ratones que sobrevivieron fueron registrados después de 48 horas de observación.

Análisis estadístico

En primer lugar, para determinar si los conjuntos de datos se ajustaban a una distribución normal, se aplicó una prueba de Shappiro-Wilk ($p > 0.005$). Luego, se aplicó una prueba ANOVA seguida

de una prueba de Dunnett (en comparación con un control o entre todos los tratamientos, según el caso). Si la distribución no es normal, se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunnett.

Resultados y discusión

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la eficacia del antiveneno anticoral polivalente del Instituto Nacional de Salud de Colombia contra el veneno de las dos serpientes corales más importantes de Colombia: *M. mipartitus* y *M. dumerilii*, mediante estudios *in vitro* e *in vivo* de inmunorreconocimiento, antivenómica y neutralización de la letalidad.

Luego de realizar el ELISA del antiveneno contra el veneno completo de ambas serpientes, se evidenció reconocimiento con una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.005$) entre las dosis de mayor concentración de antiveneno (1:500 a 1:4000). Los títulos de anticuerpos en los siguientes niveles de reto presentaron un comportamiento similar para ambos venenos y se observó reconocimiento hasta un nivel de 1:128.000. El suero de caballo no inmunizado mostró un bajo reconocimiento antigénico sobre ambos venenos (figura 1). Lo anterior muestra que, en las primeras diluciones y comparativamente con el veneno de *M. dumerilii*, el veneno de *M. mipartitus* es menos reconocido. Esto pudiera deberse a que el antiveneno tiene una concentración o una afinidad de anticuerpos más baja contra el veneno de *M. mipartitus* que contra el veneno de *M. dumerilii*.

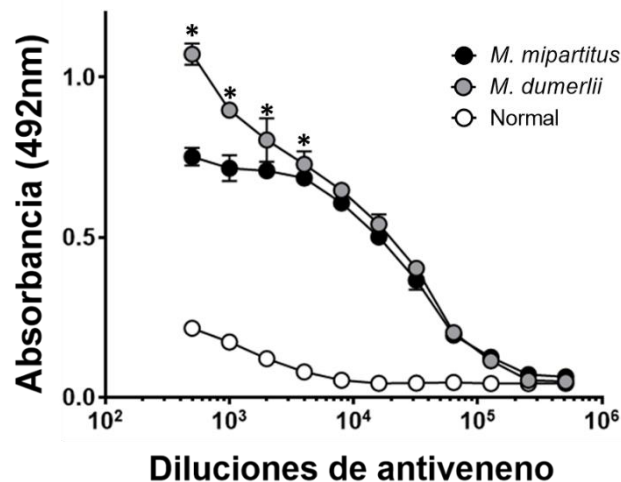


Figura 1. Inmunorreconocimiento del antiveneno anticoral-INS sobre los venenos de *M. mipartitus* y *M. dumerilii*. Los venenos fueron pegados sobre microplacas de ELISA y la unión de anticuerpos fue detectada con el conjugado IgG equina marcada con peroxidasa, como se describe en métodos. El suero de un caballo no inmunizado fue usado

como control negativo. Cada punto en el gráfico representa la media \pm la desviación estándar del triplicado. La diferencia significativa entre ambos venenos se muestra con * ($p < 0.005$).

A continuación, se ensayó el antiveneno mediante ELISA frente a los componentes cromatográficos más abundantes de los venenos obtenidos por fraccionamiento mediante HPLC y que fueron previamente identificados en los estudios proteómicos. Observamos que es mayor la cantidad de toxinas del veneno de *M. dumerilii* que son reconocidas por el antiveneno, en comparación con *M. mipartitus*. En particular y para *M. mipartitus*, se observó reconocimiento de todas las fracciones ensayadas, en un grado similar para las fracciones 9, 10, 11, 12 y 15, que incluyen proteínas tipo fosfolipasa A2 (PLA2) y serina proteasas (SP). La fracción 16, que corresponde a una metaloproteasa, mostró una señal ligeramente más alta que el resto. Las fracciones 2, 3, 4, 5, 13 y 14 presentaron señales intermedias (pertenecientes a la familia de toxinas de tres dedos, lectinas tipo-C y SP) y la fracción 7, una toxina de tres dedos (3FTx), la señal más baja (figura 2A). En contraste, se observó un mejor reconocimiento de todas las fracciones del veneno de *M. dumerilii*, y solo la fracción 12 (que corresponde a una PLA2) presentó una señal baja (figura 2B). Se puede decir entonces que hay una menor reacción contra las 3FTx de *M. mipartitus*, en comparación con las 3FTx de *M. dumerilii*, y que en general las PLA2 de cada veneno fueron bien reconocidas, con la excepción ya mencionada. La explicación a esto es que las PLA2 son más inmunogénicas que las 3FTx, posiblemente por su mayor tamaño molecular, lo que repercutiría en una producción de anticuerpos contra 3FTx comparativamente menor a la producida contra PLA2 al momento de la hiperinmunización de caballos (27).

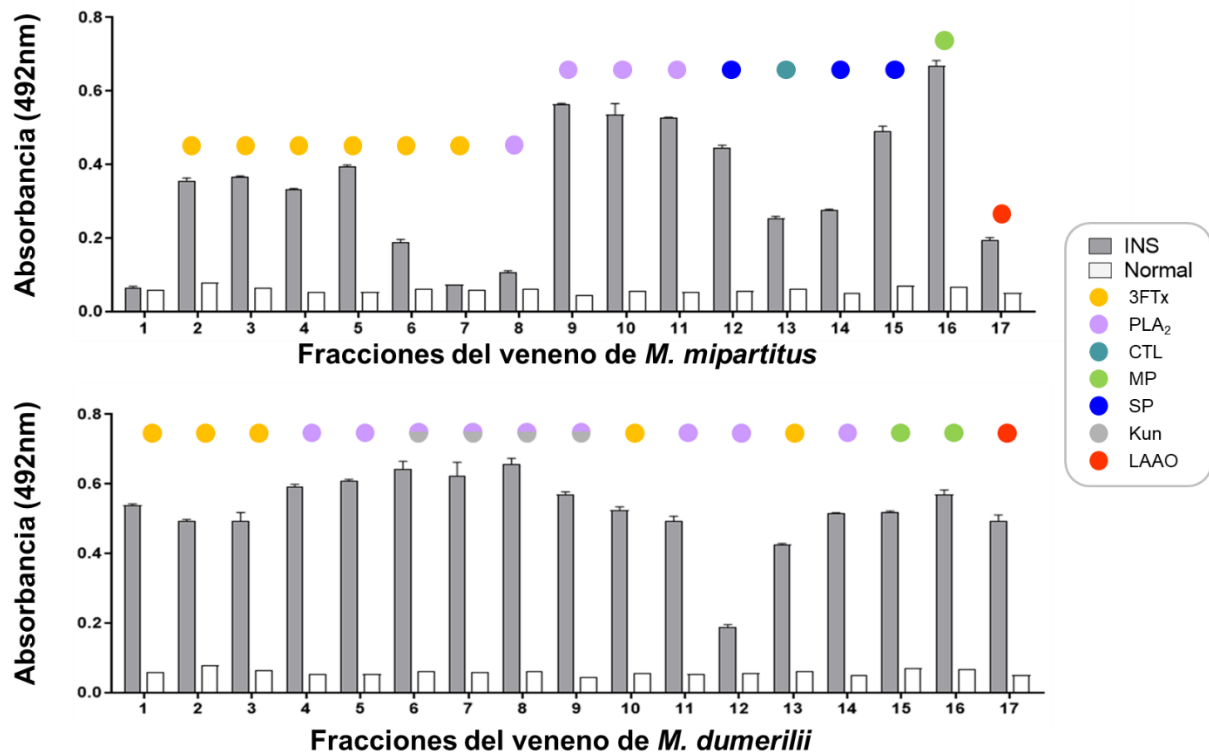


Figura 2. Inmunorreconocimiento de las fracciones RP-HPLC del veneno de *M. mipartitus* y *M. dumerilii* por el antiveneno comercial anticoral-INS por ELISA. Platos de 96 pozos fueron recubiertos con las fracciones de cada veneno de cada especie como se describe en materiales y métodos. Se utilizaron inmunoglobulinas equinas marcadas con peroxidasa y OPD como sustrato. El plasma de caballo no inmunizado se utilizó como control negativo. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar de los triplicados. Los círculos coloreados sobre las barras indican la familia proteica a la que pertenece según los estudios proteómicos (5,22).

Lo observado en los ELISA contra el veneno completo y contra las toxinas más abundantes también es explicado porque el veneno de *M. mipartitus* tiene una mayor proporción de 3FTx en comparación con el veneno de *M. dumerilii* (61.1% vs 28.1%). Este último, a su vez, es más abundante en fosfolipasas A2 (PLA₂) que el veneno de *M. mipartitus* (52% vs 29%) (5,21).

Con respecto al reconocimiento antigénico sobre cuatro toxinas reportadas como letales de cada veneno, observamos que las PLA2 son mejor reconocidas que las 3FTx, y en comparación, la toxina Md-7 es mejor reconocida que Mm-8. Vemos entonces que el reconocimiento por las toxinas letales es dependiente de la concentración y la cantidad inicial de anticuerpos en el antiveneno (figura 3).

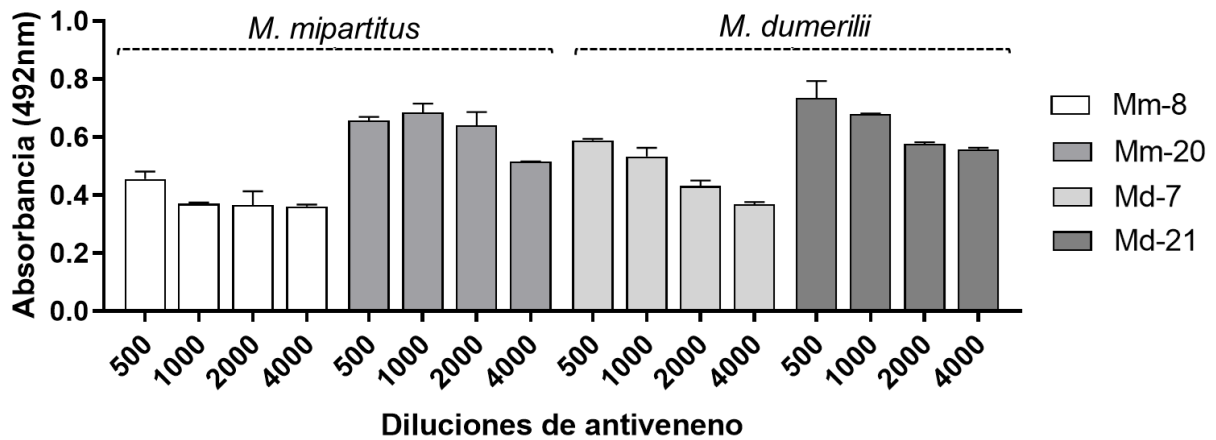


Figura 3. Inmunorreconocimiento del antiveneno anticoral-INS sobre cuatro fracciones letales de los venenos de *M. mipartitus* y *M. dumerilii*.

De la misma manera y en forma exploratoria se evaluó la reactividad cruzada del antiveneno sobre diferentes venenos de *Micrurus* mediante ELISA. Todos los venenos incluidos fueron reconocidos por el antiveneno, mostrando diferencias significativas con el suero de caballo no inmunizado. Los venenos de *M. dumerilii*, *M. nigrocinctus*, *M. mosquitensis*, *M. clarki* y *M. fulvius* mostraron un mayor reconocimiento que los venenos de *M. mipartitus*, *M. alleni* y *M. ancoralis*, estos últimos siendo predominantemente compuestos por 3FTx (figura 4). Este ensayo refuerza nuestra hipótesis de mayor afinidad del antiveneno por venenos con predominio de PLA2 en su composición.

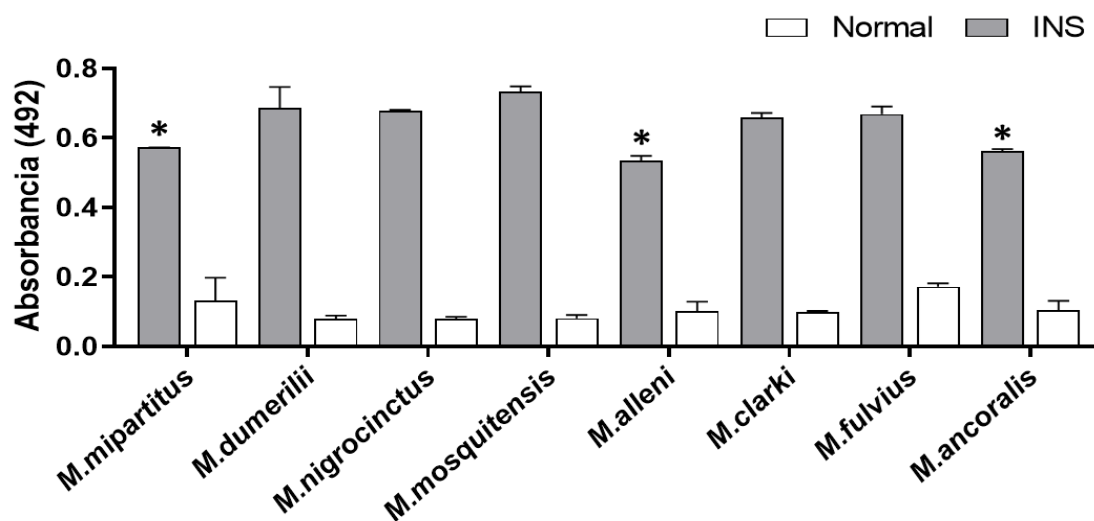


Figura 4. Reconocimiento cruzado de diferentes venenos de *Micurus* por el antiveneno anticoral-INS. El suero de un caballo no inmunizado fue usado como control negativo. Cada punto en el grafico representa la media \pm SD del triplicado. La diferencia significativa entre los títulos de anticuerpos para cada veneno se muestra con * ($p < 0.005$).

En un intento de complementar la exploración frente al reconocimiento de los componentes del veneno se realizó un protocolo de antivenómica de segunda generación, sin embargo, las fracciones retenidas y no retenidas de los venenos por la columna de afinidad no pudieron ser elucidadas por RP-HPLC, al no detectarse ninguna señal a 215nm.

Finalmente, el antiveneno solo neutralizó el efecto letal del veneno de *M. dumerilii* en una proporción de 0.1 mg de veneno por cada mL de antiveneno, lo que difiere de lo establecido por el fabricante en su inserto, quienes refieren que cada mL de antiveneno neutraliza 2 mg de veneno de *M. dumerilii* (28); además, no fue capaz de proteger frente al veneno de *M. mipartitus* en ninguna de las proporciones evaluadas (0,1 mg/mL y 0,2 mg/mL). Este resultado concuerda con los obtenidos *in vitro* en donde vimos que, si bien el veneno completo de ambas especies es reconocido por el antiveneno, las toxinas letales de cada uno son pobremente reconocidas, posiblemente por la escasa cantidad de anticuerpos específicos para estas dentro del antiveneno. Dados estos hallazgos, hicimos un ensayo de neutralización contra las toxinas reportadas como

letales de *M. mipartitus*, usando la metodología ya explicada. En este ensayo tampoco se observó neutralización de la letalidad, lo que confirma nuestras hipótesis.

Conclusiones

Nuestro estudio muestra que, aunque en los inmunoensayos hay buena reactividad del Antiveneno Anticoral Polivalente del Instituto Nacional de Salud de Colombia hacia el veneno de *M. mipartitus* y *M. dumerilii*, esta no se correlaciona con la capacidad neutralizante de la letalidad en ratones, dado que solo sobrevivieron los individuos en los que se probó la dosis más alta de antiveneno contra el veneno de *M. dumerilii* (0.1 mg de veneno por cada mL de antiveneno). Mediante ELISA logramos establecer la razón de lo anterior: el antiveneno no presenta buena reactividad ante 3FTx, toxinas que se sabe que son letales. Por esta misma razón se observó la diferencia entre ambos venenos en las pruebas de letalidad: *M. mipartitus* tiene un veneno en donde predominan las 3FTx, mientras que el veneno de *M. dumerilii* tiene predominantemente PLA2, que como logramos determinar, tiene buena reactividad en los ensayos in vitro. El anterior razonamiento es apoyado por el inmunoensayo exploratorio contra otros venenos de serpientes coral, en donde observamos que los venenos en donde predominan las 3FTx son menos reactivos ante el antiveneno.

Es de resaltar que nuestra principal limitación es haber utilizado un único vial de un lote del antiveneno. No obstante, se espera que sea cual sea el lote utilizado, haya una buena eficacia de este en los resultados de la experimentación, puesto que son lotes disponibles comercialmente que pueden ser utilizados en el contexto clínico. Esta última consideración también se convierte en otra limitante, debido a que los resultados aquí demostrados no pueden ser extrapolados al contexto clínico sin tener en cuenta otras consideraciones no abordadas en el experimento. También se debe tener presente que al experimentar con venenos de corales de diferentes zonas geográficas, pueden darse variaciones sustanciales en los resultados, aunque se trate de la misma especie (29). Estos escenarios podrían explicar la diferencia entre nuestros resultados y los publicados por Castillo-Beltrán et al (15).

Finalmente, nuestros hallazgos revelan varias necesidades: primero, se debe mejorar la capacidad neutralizante del antiveneno anticoral polivalente del INS contra los venenos de las principales especies de serpientes corales de nuestra región; segundo, es necesario un control de calidad constante a los lotes producidos de estos antivenenos, dado que entre cada lote de producción pueden haber diferencias importantes en la eficacia contra el veneno de las serpientes corales, y tercero, se debe optimizar el perfil de inmunorreconocimiento del antiveneno para lograr mayor cubrimiento contra el veneno de especies de serpientes corales que son ricas en 3FTx, en particular contra el veneno de *M. mipartitus* dada su importancia epidemiológica.

Bibliografía

1. World Health Organization. Snakebite envenoming [Internet]. 2021. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
2. Castaño Mora SP. Informe del evento Accidente Ofídico Colombia 2019 [Internet]. Vol. Version 04, Instituto Nacional de Salud, Direccion de vigilancia y análisis del riesgo en Salud Pública. Bogotá DC. 2019. Available from: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ACCIDENTE_OFÍDICO_2019.pdf
3. Rios-Soto JA, Arango-Lozano J, Rivera-Molina FA. *Micrurus mipartitus* (Duméril, Bibron y Duméril, 1854). Catálogo Anfibios y Reptil Colomb. 2018;4(1):37–44.
4. Otero-Patiño R. Snake Bites in Colombia. In: Springer, editor. Clinical Toxinology [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014 [cited 2021 Apr 6]. p. 1–42. Available from: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-94-007-6288-6_41-2
5. Rey-Suárez P, Núñez V, Fernández J, Lomonte B. Integrative characterization of the venom of the coral snake *Micrurus dumerilii* (Elapidae) from Colombia: Proteome, toxicity, and cross-neutralization by antivenom. J Proteomics [Internet]. 2016;136:262–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.006>
6. Auerbach PS. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere [Internet]. First. Campbell JA, Lamar WW, Brodie Jr. ED, editors. Vol. 16, Wilderness & Environmental Medicine. Ithaca, United States: Cornell University Press; 2005. 13–13 p. Available from: <https://www.amazon.es/Venomous-Reptiles-Western-Hemisphere-Historicizing/dp/0801441412>
7. Cañas CA, Castro-Herrera F, Castaño-Valencia S. Envenomation by the red-tailed coral snake (*Micrurus mipartitus*) in Colombia. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2017;23(1):1–4.
8. Bucarety F, De Capitani EM, Vieira RJ, Rodrigues CK, Zannin M, Da Silva NJ, et al. Coral snake bites (*Micrurus* spp.) in Brazil: A review of literature reports. Clin Toxicol [Internet]. 2016 Mar 15 [cited 2019 Oct 14];54(3):222–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26808120/>
9. Sasaki J, Khalil PA, Chegondi M, Raszynski A, Meyer KG, Totapally BR. Coral snake

- bites and envenomation in children: A case series. *Pediatr Emerg Care*. 2014;30(4):262–5.
10. Wood A, Schauben J, Thundiyil J, Kunisaki T, Sollee D, Lewis-Younger C, et al. Review of Eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) exposures managed by the Florida Poison Information Center Network: 1998-2010. Vol. 51, *Clinical Toxicology*. 2013. p. 783–8.
 11. Pérez ML, Fox K, Schaer M. A retrospective evaluation of coral snake envenomation in dogs and cats: 20 cases (1996-2011). *J Vet Emerg Crit Care*. 2012 Dec;22(6):682–9.
 12. Camargo TM, de Roodt AR, da Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. The neuromuscular activity of *Micrurus pyrrhocryptus* venom and its neutralization by commercial and specific coral snake antivenoms. *J Venom Res* [Internet]. 2011 [cited 2019 Sep 7];2:24–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858249><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3132105>
 13. De Abreu VA, Leite GB, Oliveira CB, Hyslop S, Furtado MFD, Simioni LR. Neurotoxicity of *Micrurus altirostris* (Uruguayan coral snake) venom and its neutralization by commercial coral snake antivenom and specific antiserum raised in rabbits. *Clin Toxicol*. 2008 Jul;46(6):519–27.
 14. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. Vol. 3, *Nature reviews. Disease primers*. 2017. 17063 p.
 15. Castillo-Beltrán MC, Hurtado-Gómez JP, Corredor-Espinel V, Ruiz-Gómez FJ. A polyvalent coral snake antivenom with broad neutralization capacity. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018;13(3):e0007250. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007250>
 16. Rey-Suárez P, Lomonte B. Immunological cross-recognition and neutralization studies of *Micrurus mipartitus* and *Micrurus dumerilii* venoms by two therapeutic equine antivenoms. *Biologicals* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Mar 18];68:40–5. Available from: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2062/science/article/pii/S1045105620301093#bib25>

17. Archundia IG, de la Rosa G, Olvera F, Calderón A, Benard-Valle M, Alagón A, et al. Assessment of neutralization of *Micrurus* venoms with a blend of anti-*Micrurus tener* and anti-ScNtx antibodies. *Vaccine*. 2021 Feb 5;39(6):1000–6.
18. CIOMS International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. [Internet]. Vol. 12, Alternatives to laboratory animals : ATLA. 1985 [cited 2021 Apr 25]. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/26848>
19. Gutiérrez JM, Lomonte B, Sanz L, Calvete JJ, Pla D. Immunological profile of antivenoms: Preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. Vol. 105, *Journal of Proteomics*. Elsevier; 2014. p. 340–50.
20. Lomonte B. *Métodos Inmunológicos* [Internet]. 4th ed. Universidad de Costa Rica. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado; 2007. 138 p. Available from: http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/9244/2007_Manual_Metodos_Inmunologicos_completo_web.pdf?sequence=1&isAllowed=y
21. Rey-Suárez P, Núñez V, Gutiérrez JM, Lomonte B. Proteomic and biological characterization of the venom of the redbellied coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *J Proteomics* [Internet]. 2011;75(2):655–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.003>
22. Rey-Suárez P, Floriano RS, Rostelato-Ferreira S, Saldarriaga-Córdoba M, Núñez V, Rodrigues-Simioni L, et al. Mipartoxin-I, a novel three-finger toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redbellied coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae). *Toxicon*. 2012;60(5):851–63.
23. Rey-Suárez P, Núñez V, Saldarriaga-Córdoba M, Lomonte B. Primary structures and partial toxicological characterization of two phospholipases A2 from *Micrurus mipartitus* and *Micrurus dumerilii* coral snake venoms. *Biochimie* [Internet]. 2017;137:88–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.03.008>
24. Pla D, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Second generation snake antivenomics: Comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. *Toxicon* [Internet]. 2012 Sep 15 [cited 2021 Mar 27];60(4):688–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22561422/>

25. Pla D, Rodríguez Y, Calvete JJ. Third generation antivenomics: Pushing the limits of the in vitro preclinical assessment of antivenoms. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2017 May 10 [cited 2021 Apr 6];9(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28489039/>
26. Otero R, Osorio RG, Valderrama R, Giraldo CA. Efectos farmacologicos y enzimaticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Choco (Colombia). *Toxicon*. 1992;30(5–6):611–20.
27. Laustsen AH, Engmark M, Clouser C, Timberlake S, Vigneault F, Gutiérrez JM, et al. Exploration of immunoglobulin transcriptomes from mice immunized with three-finger toxins and phospholipases A2 from the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus*. *PeerJ* [Internet]. 2017 [cited 2021 May 27];2017(1). Available from: </pmc/articles/PMC5267563/>
28. INS. Producción y Venta de Antivenenos [Internet]. Minsalud. 2019 [cited 2021 May 28]. p. 1. Available from: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/Produccion/Paginas/Suero-antiofidico-polivalente.aspx>
29. Lomonte B, Rey-Suárez P, Fernández J, Sasa M, Pla D, Vargas N, et al. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. Vol. 122, *Toxicon*. Elsevier Ltd; 2016. p. 7–25.