

## TOXICOLOGIE ENVENIMENTS/TOXICOLOGY ENVENOMATIONS



Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micrurus* venoms

Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micrurus*

Adolfo Rafael DE ROODT\*, Daniel DOZORETZ, Fernando Andrés MORÓN GOÑI, Marcela Alejandra DESIO, Carlos Fabián DAMÍN

**ABSTRACT Introduction.** Envenomation by *Micrurus* snakes is relatively infrequent, but constitutes a persistent public health concern throughout the Americas, due to its potentially severe clinical consequences. The venom of these snakes, like that of other elapids, primarily contains postsynaptic toxins ( $\alpha$ -neurotoxins, with a three-finger toxin (3-FTx) structure) and some species also produce presynaptic toxins ( $\beta$ -neurotoxins, with a phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) structure). Given this composition, the potential therapeutic value of combining an acetylcholinesterase inhibitor, neostigmine (N) plus atropine (A) with an anti-*Micrurus* antivenom (AV) was investigated. The efficacy of this combination therapy was evaluated in comparison to AV alone, using experimental envenomation models involving *Micrurus* venoms with different proportions of 3-FTxs and PLA<sub>2</sub>s.

**Methods.** Groups of mice were challenged with 1.2 minimal mortal doses of *M. pyrrhocryptus* (Mp), *M. altirostris* (Ma), *M. surinamensis* (Ms), *M. nigrocinctus* (Mn), or *M. fulvius* (Mf) venom. After 15 minutes, the animals received a single rescue treatment with either N+A, various doses of anti-*Micrurus* AV alone, or a combination of AV plus N+A. Survival was assessed at 24 hours. For the venom control groups and those treated with N+A alone, time to death was also recorded. The median effective dose of AV alone, or with the addition of N+A, was estimated for Mp and Ma venoms.

**Results.** Treatment with the N+A combination alone did not provide effective protection. However, N+A slightly delayed the time to death in animals envenomed with Ms, Ma, and Mp venoms ( $p < 0.05$ ). The combination of N+A with AV significantly improved survival compared to AV alone in mice challenged with Ma and Mp venoms ( $p < 0.05$ ). In contrast, higher AV doses were required to achieve similar effects in animals envenomed with Ms venom, while Mn and Mf venoms required the highest AV doses to show some level of protection. The estimated median effective dose of AV in combination with N+A was more potent, enhancing AV potency by 1.6-fold for Mp and up to 3.4-fold for Ma venom.

**Conclusion.** The survival of mice treated with AV plus N+A was higher in envenomations caused by Ma, Ms, and Mp venoms, which are characterized by prominent  $\alpha$ -neurotoxic activity and a lower proportion of PLA<sub>2</sub>s. The effect was less evident and only apparent at the highest AV doses for Mn and Mf venoms, which contain higher levels of PLA<sub>2</sub>s and exhibit strong experimental myotoxic capacity. The results show that the combined use of N+A and AV enhances the effectiveness of treatment in *Micrurus* envenomations, especially those involving predominantly postsynaptic neurotoxins, by reducing the AV dose required for recovery.

**Mots clés:** *Micrurus*, Coral snake, Venom, Envenomation, Neostigmine, Acetylcholinesterase Inhibitor, Atropine, Treatment, Antivenom,  $\alpha$ -neurotoxins,  $\beta$ -neurotoxins, Three-Finger toxins, Phospholipases, Neurotoxicity

**RÉSUMÉ Introduction.** Les envenimations causées par les serpents du genre *Micrurus* sont relativement rares, mais constituent un problème de santé publique persistant dans l'ensemble des Amériques en raison de leurs conséquences cliniques potentiellement graves. Le venin de ces serpents, à l'instar de celui d'autres élapidés, contient principalement des toxines postsynaptiques ( $\alpha$ -neurotoxines, de structure «trois doigts» (3-FTx)) et certaines espèces produisent également des toxines présynaptiques ( $\beta$ -neurotoxines, de structure phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)). Compte tenu de cette composition, la valeur thérapeutique potentielle de l'association d'un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, la néostigmine (N), et de l'atropine (A) avec un antivenin anti-*Micrurus* (AV) a été étudiée. L'efficacité de cette thérapie combinée a été évaluée par rapport à l'AV seul, à l'aide de modèles expérimentaux d'envenimation impliquant des venins de *Micrurus* contenant différentes proportions de 3-FTx et de PLA<sub>2</sub>.

**Méthodes.** Des groupes de souris ont été exposés à 1,2 dose létale minimale de venin de *M. pyrrhocryptus* (Mp), *M. altirostris* (Ma), *M. surinamensis* (Ms), *M. nigrocinctus* (Mn) ou *M. fulvius* (Mf). Au bout de 15 minutes, les animaux ont reçu un traitement de secours unique comprenant soit N+A, soit différentes doses d'AV anti-*Micrurus* seul, soit une combinaison d'AV et de N+A. La survie a été évaluée à 24 heures. Pour les groupes témoins exposés au venin et ceux traités par N+A seul, le délai avant la mort a également été enregistré. La dose efficace médiane de l'AV seul, ou en association avec N+A, a été estimée pour les venins de Mp et de Ma.

**Résultats.** Le traitement par la combinaison N+A seule n'a pas fourni de protection efficace. Cependant, N+A a légèrement retardé le délai avant la mort chez les animaux envenimés par les venins de Ms, Ma et Mp ( $p < 0,05$ ). La combinaison de N+A et d'AV a significativement amélioré la survie par rapport à l'AV seul chez les souris exposées aux venins de Ma et Mp ( $p < 0,05$ ).

En revanche, des doses plus élevées d'AV ont été nécessaires pour obtenir des effets similaires chez les animaux envenimés par le venin de Ms, tandis que les venins de Mn et de Mf ont nécessité les doses d'AV les plus élevées pour montrer un certain niveau de protection. La dose efficace médiane estimée d'AV en association avec N+A était plus puissante, augmentant la puissance de l'AV de 1,6 fois pour le venin de Mp et jusqu'à 3,4 fois pour le venin de Ma.

**Conclusion.** Le taux de survie des souris traitées par AV plus N+A était plus élevé dans les cas d'envenimations causées par les venins de Ma, Ms et Mp, qui se caractérisent par une activité  $\alpha$ -neurotoxique marquée et une proportion plus faible de PLA<sub>2</sub>. L'effet était moins évident et n'apparaissait qu'aux doses les plus élevées d'AV pour les venins de Mn et Mf, qui contiennent des niveaux plus élevés de PLA<sub>2</sub> et présentent une forte capacité myotoxique expérimentale. Les résultats montrent que l'utilisation combinée de N+A et d'AV améliore l'efficacité du traitement dans les envenimations par *Micrurus*, en particulier celles impliquant principalement des neurotoxines postsynaptiques, en réduisant la dose d'AV nécessaire à la guérison.

**Keywords:** *Micrurus*, Serpent corail, Venin, Envenimation, Néostigmine, Inhibiteur de l'acétylcholinestérase, Atropine, Traitement, Antivenin,  $\alpha$ -neurotoxines,  $\beta$ -neurotoxines, Toxines à trois doigts, Phospholipases, Neurotoxicité

## Utilidad de la combinación de una dosis única de neostigmina-atropina más antídoto en el tratamiento experimental de la envenenamiento causado por los venenos de *Micrurus*

**RESUMEN** **Introducción.** Los envenenamientos por *Micrurus* constituyen un problema sanitario de baja frecuencia, pero constante en América, siendo en todos los casos potencialmente graves. El veneno de estas serpientes como el de otros elápidos posee mayoritariamente toxinas postsinápticas ( $\alpha$ -neurotoxinas, con estructura de 3-FTx) y algunas, también poseen toxinas presinápticas ( $\beta$ -neurotoxinas, con estructura de fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>)). Dado que el uso de inhibidores de la acetil colinesterasa se mostró útil en algunos casos de envenenamiento por venenos con 3-FTxs, se evaluó la utilidad de la neostigmina (N) + atropina (A) y su combinación con la aplicación de antiveneno (AV) anti-*Micrurus*, respecto al uso de AV solamente, en el envenenamiento experimental por el veneno de *Micrurus* con diferentes proporciones de 3-FTxs y PLA<sub>2</sub>s.

**Métodos.** Grupos de ratones fueron desafiados con 1.2 dosis mínimas mortales de veneno de *M. pyrrhocryptus* (Mp), *M. altirostris* (Ma), *M. surinamensis* (Ms), *M. nigrocinctus* (Mn) o *M. fulvius* (Mf). A los 15 minutos se aplicaron diferentes dosis de AV solo o de AV más N+A y a las 24 horas se registró la sobrevida. En el caso de los controles de veneno y los tratados con N+A solamente, se registró el tiempo de muerte. Además se estimó la dosis efectiva media del AV aplicado solo, o con el agregado de N+A en los envenenamientos por venenos de Mp y Ma.

**Resultados.** La combinación N+A en una única dosis como único tratamiento, no protegió a los ratones, sin embargo enlenteció levemente el tiempo de muerte causada por los venenos de Ms, Ma y Mp ( $p < 0.05$ ). La combinación N+A con el AV, mejoró la sobrevida de los animales desafiados respecto al uso del AV solamente, sobre los venenos de Ma y Mp ( $p < 0.05$ ), requiriendo dosis de AV mayores en el caso de Ms y muy altas en los casos de Mn y Mf. La dosis efectiva media del AV en combinación con N+A, mejoró la potencia neutralizante entre 1.6 (Mp) y 3.4 (Ma) veces.

**Conclusión.** La sobrevida fue mucho más evidente en el caso de los envenenamientos por venenos de Ma, Ms y Mp, venenos con importante actividad  $\alpha$ -neurotóxica y menor proporción de PLA<sub>2</sub>, mientras que fue muy baja y solo evidente a las dosis de AV más altas sobre los venenos de Mn y Mf, venenos con mayor proporción de PLA<sub>2</sub>s y alta capacidad miotóxica experimental. Los resultados muestran que la combinación de N+A con el AV mejora el resultado de la terapéutica del envenenamiento por algunas *Micrurus*, disminuyendo la dosis de AV necesarias para la recuperación de los animales desafiados, especialmente en aquellos causados por venenos que causan preponderantemente parálisis por bloqueo postsináptico.

**Palabras clave:** *Micrurus*, Serpiente de coral, Veneno, Envenenamiento, Neostigmina, Inhibidor de acetilcolinesterasa, Atropina, Tratamiento, Antiveneno,  $\alpha$ -neurotoxinas,  $\beta$ -neurotoxinas, Toxinas de tres dedos, Fosfolipasas, Neurotoxicidad

## 1. Introduction

Coral snakes (genera *Micrurus*, *Micruroides* and *Leptomicrurus*) represent the most diversified group of snakes in the Americas. They are the only terrestrial American elapids and inhabit a wide range of terrestrial ecosystems —from sea level to elevations of approximately 3,000 m— from cold and hot desert regions to humid and hot tropical areas, and ranging geographically from northern Patagonia to Mexico and the southern USA [13]. The genus *Micrurus* comprises around 70 species [13,21,58].

The venom of *Micrurus* snakes induces loss of muscle strength and respiratory paralysis of peripheral origin. These neurotoxic effects are primarily due to the action of  $\alpha$ -neurotoxins (with a three-finger toxin (3-FTx) structure), which block acetylcholine receptors at the end plate, in the neuromuscular junction, and/or  $\beta$ -neurotoxins (with a phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) structure) that inhibit evoked acetylcholine release by the motor nerve endings at the presynaptic level. In some cases, these effects are further exacerbated by the additive action of myotoxic components on muscle fiber membranes [4,6,10,37,47,67,68,75]. Among the various toxic components of *Micrurus* venoms, the 3-FTx and PLA<sub>2</sub> neurotoxins are considered the most important [35,42].

The specific treatment for *Micrurus* envenomation is the administration of a corresponding antivenom (AV). Nevertheless, such AVs are scarce, difficult to produce, and currently manufactured by only a limited number of producers [26]. Unlike the broad cross-reactivity and neutralization often observed among AVs targeting viperid venoms in the Americas [5,22,24,61], coral snake AVs generally exhibit limited cross-reactivity [26,27]. This is likely attributable to the qualitative and quantitative differences in the composition of *Micrurus* venoms [42].

The use of acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs), such as neostigmine (N), as an adjunct treatment for envenomations due to coral snake bites is suggested by some South American ministries of health [45,46]. Experimental data support the potential usefulness of this type of compounds in reversing *Micrurus* venom induced neurotoxicity [12,20,67]. The AChEIs inhibit acetylcholinesterase activity, thereby increasing acetylcholine levels at the neuromuscular junction, where the excess of acetylcholine can competitively displace the  $\alpha$ -neurotoxins from nicotinic receptors [4,37,43]. In elapid envenomation, these drugs are typically administered in

## 1. Introduction

Les serpents corail (genres *Micrurus*, *Micruroides* et *Leptomicrurus*) constituent le groupe de serpents le plus diversifié d'Amérique. Ce sont les seuls élapidés terrestres d'Amérique et ils peuplent un large éventail d'écosystèmes terrestres — du niveau de la mer jusqu'à environ 3 000 m d'altitude —, allant des régions désertiques froides et chaudes aux zones tropicales humides et chaudes, et s'étendant géographiquement du nord de la Patagonie au Mexique et au sud des États-Unis [13]. Le genre *Micrurus* comprend environ 70 espèces [13,21,58].

Le venin des serpents *Micrurus* provoque une perte de force musculaire et une paralysie respiratoire d'origine périphérique. Ces effets neurotoxiques sont principalement dus à l'action des  $\alpha$ -neurotoxines (dotées d'une structure de toxine à trois doigts (3-FTx)), qui bloquent les récepteurs de l'acétylcholine au niveau de la plaque motrice, dans la jonction neuromusculaire, et/ou des  $\beta$ -neurotoxines (dotées d'une structure de phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)) qui inhibent la libération d'acétylcholine provoquée par les terminaisons nerveuses motrices au niveau présynaptique. Dans certains cas, ces effets sont encore exacerbés par l'action additive de composants myotoxiques sur les membranes des fibres musculaires [4,6,10,37,47,67,68,75]. Parmi les divers composants toxiques des venins de *Micrurus*, les neurotoxines 3-FTx et PLA<sub>2</sub> sont considérées comme les plus importantes [35,42].

Le traitement spécifique de l'envenimation par *Micrurus* consiste en l'administration d'un antivenin (AV) correspondant. Néanmoins, ces AV sont rares, difficiles à produire et ne sont actuellement fabriqués que par un nombre limité de producteurs [26]. Contrairement à la large réactivité croisée et à la neutralisation souvent observées parmi les AV ciblant les venins de vipéridés en Amérique [5,22,24,61], les AV contre les serpents corail présentent généralement une réactivité croisée limitée [26, 27]. Cela est probablement attribuable aux différences qualitatives et quantitatives dans la composition des venins de *Micrurus* [42].

L'utilisation d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (IACHÉ) comme la néostigmine (N) en traitement d'appoint en cas d'envenimation due à des morsures de serpents corail est suggérée par certains ministères de la santé sud-américains [45,46]. Des données expérimentales soutiennent l'utilité potentielle de ce type de composés pour réduire la neurotoxicité induite

combination with atropine (A) to mitigate their muscarinic effects [7,37,43]. Although AChEIs are extensively used in the treatment of envenomation by Asian elapids, whose venoms predominantly contain  $\alpha$ -neurotoxins [1,4,29,33,36,37,42,48,56,73,74,76], clinical data on their efficacy in *Micrurus* envenomation is not abundant.

In envenomations registered in Brazil, the response to treatment was reported to be favorable when AChEIs were used as an ancillary to AV treatment [10,11]. However, the clinical response to these drugs depends on the presence of  $\alpha$ -neurotoxins and the absence or low abundance of  $\beta$ -neurotoxins. Their mechanism of action, as mentioned above, is limited to displacing  $\alpha$ -neurotoxins from nicotinic receptors through elevated acetylcholine concentrations at the end-plate [4,37]. *In vitro* studies have demonstrated the effectiveness of AChEIs against experimental envenomation by *M. pyrrhocryptus*, *M. frontalis* and *M. lemniscatus* venoms [12,67], three venoms that contain  $\alpha$ -neurotoxins [15, 51,60]. On the other hand, their efficacy was not observed against venoms with a higher content of  $\beta$ -neurotoxins, such as that of *M. corallinus* [19,70]. Beyond the foundational studies of Vital Brazil, experimental *in vivo* research on the use of AChEIs in South American coral snake envenomation is very scarce or lacking entirely [67].

In Argentina eight species of *Micrurus* have been described: *M. pyrrhocryptus*, *M. altirostris*, *M. balyocoriphus*, *M. tricolor*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus carvalhoi*, *M. silviae* and *M. corallinus* [26,45]. Among these, *M. pyrrhocryptus* has the widest distribution and is likely responsible for the majority of coral snakebites in the country [26]. Its venom is the primary immunogen used in the production of the AV currently employed in Argentina [23,26]. Only limited data are available on the venoms of species of *Micrurus* described in Argentina [12,25,26,27,28,51], nevertheless the presence of  $\alpha$ -neurotoxins in the venoms of these species was described [12,19,28,31,51,60]. This supports the potential role of AChEIs as adjunctive therapies in the treatment of envenomations caused by most of these species.

In this study, we evaluated the efficacy of a single dose of an AChEI, the administration of a South-American *Micrurus* AV alone, and the combination of AChEI plus AV, in experimental murine models of *Micrurus* envenomation. Rescue experiments (experiments in which the antivenom is applied a determinate time after the injection of a lethal dose of venom) were conducted in *M. pyrrhocryptus* (Fig. 1), *M. altirostris*

par le venin de *Micrurus* [12,20,67]. Les IChE inhibent l'activité de l'acétylcholinestérase, augmentant ainsi les taux d'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire, où l'excès d'acétylcholine peut déplacer de manière compétitive les  $\alpha$ -neurotoxines des récepteurs nicotiniques [4,37,43]. En cas d'envenimation par des élapidés, ces médicaments sont généralement administrés en association avec de l'atropine (A) afin d'atténuer leurs effets muscariniques [7,37,43]. Bien que les IMACH soient largement utilisés dans le traitement des envenimations par les élapidés asiatiques, dont les venins contiennent principalement des  $\alpha$ -neurotoxines [1,4,29,33,36,37,42,48,56,73,74,76], les données cliniques sur leur efficacité dans les envenimations par *Micrurus* sont peu nombreuses.

Dans les cas d'envenimations enregistrés au Brésil, la réponse au traitement a été jugée favorable lorsque les IMA ont été utilisés en complément d'un traitement antivenimeux [10,11]. Cependant, la réponse clinique à ces médicaments dépend de la présence de neurotoxines  $\alpha$  et de l'absence ou de la faible concentration de neurotoxines  $\beta$ . Leur mécanisme d'action, comme mentionné ci-dessus, se limite à déplacer les neurotoxines  $\alpha$  des récepteurs nicotiniques grâce à des concentrations élevées d'acétylcholine au niveau de la plaque motrice [4,37]. Des études *in vitro* ont démontré l'efficacité des IMA contre l'envenimation expérimentale par les venins de *M. pyrrhocryptus*, *M. frontalis* et *M. lemniscatus* [12,67], trois venins contenant des neurotoxines  $\alpha$  [15, 51,60]. En revanche, leur efficacité n'a pas été observée contre des venins à plus forte teneur en neurotoxines  $\beta$ , comme celui de *M. corallinus* [19,70]. Au-delà des études fondatrices de Vital Brazil, les recherches expérimentales *in vivo* sur l'utilisation des IMA dans l'envenimation par les serpents corail d'Amérique du Sud sont très rares, voire inexistantes [67].

En Argentine, huit espèces de *Micrurus* ont été décrites: *M. pyrrhocryptus*, *M. altirostris*, *M. balyocoriphus*, *M. tricolor*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus carvalhoi*, *M. silviae* et *M. corallinus* [26,45]. Parmi celles-ci, *M. pyrrhocryptus* présente la plus large distribution et est probablement responsable de la majorité des morsures de serpents corail dans le pays [26]. Son venin est le principal immunogène utilisé dans la production du sérum antivenimeux actuellement employé en Argentine [23,26]. On ne dispose que de données limitées sur les venins des espèces de *Micrurus* décrites en Argentine [12,25,26,27,28,51]; néanmoins, la présence d' $\alpha$ -neurotoxines dans les venins de ces espèces a été

(Fig. 2), *M. surinamensis* (Fig. 3), *M. nigrocinctus* and *M. fulvius* experimental envenomations.

décrite [12,19,28,31,51,60]. Cela confirme le rôle potentiel des inhibiteurs de l'AChE (IACHe) en tant que traitements d'appoint dans la prise en charge des envenimations causées par la plupart de ces espèces.

Dans cette étude, nous avons évalué l'efficacité d'une dose unique d'un IACHe, de l'administration d'un AV sud-américain de *Micrurus* seul, et de l'association IACHe + AV, dans des modèles murins expérimentaux d'envenimation par *Micrurus*. Des expériences de sauvetage (expériences dans lesquelles l'antivenin est administré à un moment déterminé après l'injection d'une dose létale de venin) ont été menées sur des envenimations expérimentales par *M. pyrrhocryptus* (Fig. 1), *M. altirostris* (Fig. 2), *M. surinamensis* (Fig. 3), *M. nigrocinctus* et *M. fulvius*.



Figure 1: *Micrurus pyrrhocryptus*, province of Córdoba, Argentina (photo credit: Adolfo Rafael de Roodt)

Figure 1 : *Micrurus pyrrhocryptus*, province de Córdoba, Argentine (crédit photo : Adolfo Rafael de Roodt)



Figure 2: *Micrurus altirostris*, province of Misiones, Argentina (photo credit: Adolfo Rafael de Roodt)

Figure 2 : *Micrurus altirostris*, province de Misiones, Argentine (crédit photo : Adolfo Rafael de Roodt)



Figure 3: *Micrurus surinamensis*, Letizia, Colombia (photo credit: Juan Silva Haad)

Figure 3 : *Micrurus surinamensis*, Leticia Colombie (crédit photo : Juan Silva Haad)

## 2. Materials and methods

### 2.1 Venoms

The venom of *M. pyrrhocryptus* was obtained from specimens collected in various regions of Argentina and kindly provided by Dr. Eduardo Gould (*Fundación de Estudios Biológicos*, Buenos Aires, Argentina). *M. altirostris* venom was donated by Dr. Alejandro Urs Vogt (*Centro Toxicológico de Misiones*, Oberá, Misiones, Argentina). The venom of Colombian *M. surinamensis* was a gift from Dr. Juan Silva Haad (Leticia, Colombia). *M. fulvius* venom from Florida, USA, was sourced from the Miami Serpentarium (Florida, USA) and *M. nigrocinctus* venom from Costa Rica was acquired from the *La Nauyaca Serpentarium* (Cuernavaca, Mexico). All venoms were obtained by manual extraction, immediately vacuum dried or lyophilized, and stored at -20°C until use.

### 2.2 Animals

All experiments were conducted using 18–22 g CF-1 mice obtained from the Animal Facility of the Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB). The animals were housed under controlled environmental conditions and received rodent chow and filtered water *ad libitum*. Ethical approval for animal handling was granted by the INPB – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, in agreement with the guidelines of the National Research Council [49,50] and the Federation of European Laboratory Animal Science Associations [30].

### 2.3 Neostigmine (N) and atropine (A)

Neostigmine (Neostigmina Drawer, Laboratory Drawer) was used in 1 mL ampoules at a concentration of 0.5 mg/mL. Atropine (Klonatropina, Klonal Laboratorios), was used in 1 mL ampoules at a concentration of 1 mg/mL. All drugs were used prior to their expiration date.

### 2.4 Antivenom

The AV used was *Antiveneno Elapídico*, produced by the INPB through the immunization of horses with venoms from Argentine *Micrurus* species, primarily *M. pyrrhocryptus* [26], batch No. 133, Exp. Date August 31, 2017. The AV is constituted of F(ab')<sub>2</sub> fragments. Although the efficacy of AVs after their expiration date has been documented [17,52,53,59,63], this AV was tested for its physicochemical properties and neutralizing capacity prior to use, confirming that it retained all characteristics declared by the manufacturer.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Venins

Le venin de *M. pyrrhocryptus* a été obtenu à partir de spécimens collectés dans diverses régions d'Argentine et aimablement fournis par le Dr Eduardo Gould (*Fundación de Estudios Biológicos*, Buenos Aires, Argentine). Le venin de *M. altirostris* a été donné par le Dr Alejandro Urs Vogt (*Centro Toxicológico de Misiones*, Oberá, Misiones, Argentine). Le venin de *M. surinamensis* colombien était un don du Dr Juan Silva Haad (Leticia, Colombie). Le venin de *M. fulvius* provenant de Floride (États-Unis) a été obtenu auprès du Miami Serpentarium (Floride, États-Unis) et celui de *M. nigrocinctus* provenant du Costa Rica a été acquis auprès du *La Nauyaca Serpentarium* (Cuernavaca, Mexique). Tous les venins ont été obtenus par extraction manuelle, immédiatement séchés sous vide ou lyophilisés, puis conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

### 2.2 Animaux

Toutes les expériences ont été menées sur des souris CF-1 de 18 à 22 g provenant de l'animalerie de l'Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB). Les animaux ont été hébergés dans des conditions environnementales contrôlées et ont reçu de la nourriture pour rongeurs et de l'eau filtrée *ad libitum*. L'autorisation éthique pour la manipulation des animaux a été accordée par l'INPB – ANLIS « Dr Carlos G. Malbrán », conformément aux directives du Conseil national de la recherche [49,50] et de la Fédération des associations européennes des sciences des animaux de laboratoire [30].

### 2.3 Néostigmine (N) et atropine (A)

La néostigmine (Neostigmina Drawer, Laboratory Drawer) a été utilisée en ampoules de 1 ml à une concentration de 0,5 mg/ml. L'atropine (Klonatropina, Klonal Laboratorios) a été utilisée en ampoules de 1 ml à une concentration de 1 mg/ml. Tous les médicaments ont été utilisés avant leur date de péremption.

### 2.4 Antivenin

L'antivenin utilisé était l'*Antiveneno Elapídico*, produit par l'INPB après immunisation de chevaux avec des venins d'espèces argentines du genre *Micrurus*, principalement *M. pyrrhocryptus* [26], lot n° 133, date d'expiration 31 août 2017. L'AV est constitué de fragments F(ab')<sub>2</sub>. Bien que l'efficacité des AV après leur date de péremption

## 2.5 Determination of the median lethal doses, minimal mortal doses and time to death

The lethal potency of the venoms was determined via the subcutaneous (s.c.) route. Groups of mice ( $n = 5$  per dose level) were injected with various amounts of venom diluted in 0.15 M NaCl, in a final volume of 0.3 mL. Mortality was recorded 24 h post-injection. Lethal potency was defined as 1) the median lethal dose ( $LD_{50}$ ) representing the dose of venom required to kill 50% of the challenged mice within a period of 24 h, and 2) the minimal mortal dose (MMD), the lowest dose of venom that caused 100% mortality in the same period (equivalent to  $LD_{100}$ ). The venom doses versus mortality plots were analyzed using a sigmoidal dose-response model with a variable slope [14].

Once the MMD was established, groups of mice were injected with 1.2 MMD of each of the venoms, and time to death (from injection to death) was recorded. Group comparisons were performed using the Mann-Whitney test or Student's  $t$  test, as appropriate.

## 2.6 Dosages of Neostigmine and Atropine

Several doses of N and A were evaluated based on dose ranges previously used in murine models of intoxication and envenomation involving AChE inhibition [18,34,38,41]. The final selected doses were 0.25  $\mu\text{g/g}$  of N and 2.0  $\mu\text{g/g}$  of A. Both drugs were administered via the intraperitoneal (i.p.) route in a final volume of 0.5 ml/mouse, diluted in 0.15 M NaCl. In combination with AV, the same final volume and diluent were used, with appropriate adjustments for AV volume. The doses of A and N were tested alone and in combination, up to threefold higher than the final experimental dose, in groups of five mice to ensure the absence of toxicity. No adverse effects were observed at these levels. Severe signs of intoxication and mortality (2 out of 5 animals challenged) were only observed at fivefold the selected doses.

## 2.7 Experiments on toxicity reduction

### 2.7.1 Effect of different doses of AV with or without N+A

#### 2.7.1.1 Experimental groups

Groups of five mice were injected subcutaneously with 1.2 MMD of each venom, diluted in 0.15 M NaCl to a final volume of 0.3 mL. Fifteen min after envenomation, mice received an intraperitoneal (i.p.) rescue treatment consisting in AV alone (50 or 100  $\mu\text{L}$ ) or AV combined with N+A,

ait été documentée [17,52,53,59,63], cet AV a été testé pour ses propriétés physicochimiques et sa capacité neutralisante avant utilisation, confirmant qu'il conservait toutes les caractéristiques déclarées par le fabricant.

## 2.5 Détermination des doses létales médianes, des doses mortelles minimales et du délai avant la mort

La puissance létale des venins a été déterminée par voie sous-cutanée (s.c.). Des groupes de souris ( $n = 5$  par dose) ont reçu des injections de différentes quantités de venin dilué dans du NaCl 0,15 M, pour un volume final de 0,3 ml. La mortalité a été enregistrée 24 h après l'injection. La puissance létale a été définie comme 1) la dose létale médiane ( $DL_{50}$ ), représentant la dose de venin nécessaire pour tuer 50 % des souris exposées dans un délai de 24 h, et 2) la dose mortelle minimale (DMM), la dose la plus faible de venin ayant entraîné une mortalité de 100 % dans le même délai (équivalente à la  $DL_{100}$ ). Les courbes dose-mortalité ont été analysées à l'aide d'un modèle dose-réponse sigmoïdal à pente variable [14].

Une fois la DMM établie, des groupes de souris ont reçu une injection de 1,2 DMM de chacun des venins, et le délai entre l'injection et la mort a été enregistré. Les comparaisons entre groupes ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney ou du test  $t$  de Student, selon le cas.

## 2.6 Dosages de la néostigmine et de l'atropine

Plusieurs doses de N et d'A ont été évaluées sur la base des plages de doses précédemment utilisées dans des modèles murins d'intoxication et d'envenimation impliquant une inhibition de l'AChE [18,34,38,41]. Les doses finales retenues étaient de 0,25  $\mu\text{g/g}$  de N et de 2,0  $\mu\text{g/g}$  d'A. Les deux médicaments ont été administrés par voie intrapéritonéale (i.p.) dans un volume final de 0,5 ml/souris, dilués dans une solution de NaCl 0,15 M. En association avec l'AV, le même volume final et le même diluant ont été utilisés, avec des ajustements appropriés pour le volume d'AV. Les doses d'A et de N ont été testées seules et en association, jusqu'à trois fois supérieures à la dose expérimentale finale, sur des groupes de cinq souris afin de s'assurer de l'absence de toxicité. Aucun effet indésirable n'a été observé à ces niveaux. Des signes graves d'intoxication et de mortalité (2 animaux sur 5 exposés) n'ont été observés qu'à des doses cinq fois supérieures à celles sélectionnées.

diluted in 0.15 M NaCl to a final volume of 0.5 mL. Treatment groups were as follows: group 1) N (5 µg) + A (40 µg); group 2) different doses of AV (50 or 100 µL) plus N (5 µg) +A (40 µg); group 3) AV alone (50 or 100 µL); group 4) venom alone diluted in 0.15 M NaCl (positive control).

### 2.7.1.2 Data Interpretation

The protection provided by each treatment was expressed as the percentage of mice surviving 24 h post-injection. Survival data (the number of deaths and survivors per group) were analyzed using Fisher's exact test to compare the effectiveness of AV alone versus AV combined with N+A.

### 2.7.1.3 Relative delay in death with N+A alone

Due to the rather different times to death observed following administration of 1.2 MMD of the various venoms, the time to death was recorded for each animal. To assess the potential benefit of treatment with N+A in delaying or preventing death for each venom tested, the relative delay in death (RDD) was defined as the ratio between the mean time to death in mice treated with N+A and the mean time to death in controls (venom only), according to the formula:  $RDD = (\text{time to death using N+A}) / (\text{time to death in controls})$ .

### 2.7.1.4 Analysis of survival data

Median survival outcomes from the various experiments were analyzed using linear and non-linear regression models. The median values derived from sigmoidal dose-response analyses were considered Theoretical Median Doses (T-MED). Additionally, the ratios between the T-MED values obtained with and without N+A treatment, were calculated and analyzed.

## 2.7.2 Effect of N+A on the rescue Median Effective Dose of the AV on *M. pyrrhocryptus* and *M. altirostris* venoms

In order to evaluate whether the use of N+A alters the Median Effective Dose ( $ED_{50}$ ) of the AV against envenomation by *M. pyrrhocryptus* and *M. altirostris* venoms, rescue  $ED_{50}$  ( $r-ED_{50}$ ) values were estimated in  $ED_{50}$  assays with and without N+A co-administration. Groups of 5 mice were s.c. injected in the dorsal region with 1.2 MMD of the venoms in a final volume of 0.3 mL of 0.15 M NaCl. After fifteen minutes, the mice received an i.p. injection of different doses of AV alone or AV plus N+A, in a final volume of 0.5 ml/mouse, in 0.15 M NaCl. Mice were monitored and after

## 2.7 Expériences de neutralisation

### 2.7.1 Effet de différentes doses d'AV avec ou sans N+A

#### 2.7.1.1 Groupes expérimentaux

Des groupes de cinq souris ont reçu une injection sous-cutanée de 1,2 DMM de chaque venin, dilué dans une solution de NaCl 0,15 M pour un volume final de 0,3 ml. Quinze minutes après l'envenimation, les souris ont reçu un traitement de secours intrapéritonéal (i.p.) consistant en AV seul (50 ou 100 µl) ou en AV associé à N+A, dilué dans 0,15 M de NaCl pour un volume final de 0,5 ml. Les groupes de traitement étaient les suivants: groupe 1) N (5 µg) + A (40 µg); groupe 2) différentes doses d'AV (50 ou 100 µl) plus N (5 µg) + A (40 µg); groupe 3) AV seul (50 ou 100 µl); groupe 4) venin seul dilué dans du NaCl 0,15 M (témoin positif).

#### 2.7.1.2 Interprétation des données

La protection conférée par chaque traitement a été exprimée en pourcentage de souris survivantes 24 h après l'injection. Les données de survie (nombre de décès et de survivants par groupe) ont été analysées à l'aide du test exact de Fisher afin de comparer l'efficacité de l'AV seul à celle de l'AV associé à N+A.

#### 2.7.1.3 Retard relatif de la mort avec N+A seul

En raison des délais de mort assez différents observés après l'administration de 1,2 DMM des différents venins, le délai de mort a été enregistré pour chaque animal. Afin d'évaluer le bénéfice potentiel du traitement par N+A pour retarder ou prévenir la mort pour chaque venin testé, le délai relatif avant la mort (DRM) a été défini comme le rapport entre le délai moyen avant la mort chez les souris traitées par N+A et le délai moyen avant la mort chez les témoins (venin seul), selon la formule:  $DRM = (\text{délai avant la mort avec N+A}) / (\text{délai avant la mort chez les témoins})$ .

#### 2.7.1.4 Analyse des données de survie

Les résultats de survie médiane issus des différentes expériences ont été analysés à l'aide de modèles de régression linéaires et non linéaires. Les valeurs médianes dérivées des analyses dose-réponse sigmoïdales ont été considérées comme des doses médianes théoriques (T-MED). De plus, les rapports entre les valeurs T-MED obtenues avec et sans traitement par N+A ont été calculés et analysés.

24 h survival deaths were recorded. The rescue median effective dose (r-ED<sub>50</sub>) was defined as the AV dose that protected 50% of the mice [54] and was estimated using a sigmoidal dose-response model with variable slope [14].

## 2.8 Statistics

The distribution of the data was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. For comparison of groups, Mann-Whitney or Student's *t* test were used. For multiple comparison analysis, ANOVA or Kruskal-Wallis tests with Bonferroni's or Dunn's adjustment tests were used. Differences in frequencies were analyzed using Fisher's exact test. The dose-response experiments were analyzed by linear regression or non-linear regression using a sigmoidal dose-response model with variable slope. All statistical analyses were performed using the software Prism 6.0 (GraphPad Inc., CA, USA) for Mac. A *p*-value ≤ 0.050 was considered statistically significant.

## 2.7.2 Effet du N+A sur la dose efficace médiane de sauvetage de l'AV contre les venins de *M. pyrrhocryptus* et *M. altirostris*

Afin d'évaluer si l'utilisation du N+A modifie la dose efficace médiane (DE<sub>50</sub>) de l'AV contre l'envenimation par les venins de *M. pyrrhocryptus* et *M. altirostris*, les valeurs de sauvetage DE<sub>50</sub> (r-DE<sub>50</sub>) ont été estimées dans des tests DE<sub>50</sub> avec et sans co-administration de N+A. Des groupes de 5 souris ont reçu une injection sous-cutanée dans la région dorsale de 1,2 DMM de venin dans un volume final de 0,3 ml de NaCl 0,15 M. Au bout de quinze minutes, les souris ont reçu une injection intraperitoneale de différentes doses d'AV seul ou d'AV associé à N+A, dans un volume final de 0,5 ml/souris, dans une solution de NaCl 0,15 M. Les souris ont été surveillées et les décès ont été enregistrés après 24 heures. La dose efficace médiane de sauvetage (r-DE<sub>50</sub>) a été définie comme la dose d'AV protégeant 50 % des souris [54] et a été estimée à l'aide d'un modèle dose-réponse sigmoïdal à pente variable [14].

## 2.8 Statistiques

La distribution des données a été évaluée à l'aide du test de Kolmogorov-Smirnov. Pour la comparaison des groupes, le test de Mann-Whitney ou le test *t* de Student ont été utilisés. Pour l'analyse des comparaisons multiples, des tests ANOVA ou de Kruskal-Wallis avec ajustement de Bonferroni ou de Dunn ont été utilisés. Les différences de fréquences ont été analysées à l'aide du test exact de Fisher. Les expériences dose-réponse ont été analysées par régression linéaire ou non linéaire à l'aide d'un modèle dose-réponse sigmoïdal à pente variable. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 6.0 (GraphPad Inc., CA, États-Unis) pour Mac. Une valeur de *p* ≤ 0,050 a été considérée comme statistiquement significative.

### 3 Results

#### 3.1 Lethal potencies

The s.c. LD<sub>50</sub>s, LD<sub>100</sub>s (MMDs) of the venoms used in this study were 31 µg and 45 µg for *M. pyrrhocryptus*, 26 µg and 30 µg for *M. altirostris*, 28 µg and 40 µg for *M. surinamensis*, 27 µg and 57 µg for *M. nigrocinctus* and, 22 µg and 40 µg for *M. fulvius* venoms. These doses and the venom masses that represent the 1.2 MMD challenge doses used in this study, are detailed in Table I.

### 3 Résultats

#### 3.1 Puissances létales

Les DL<sub>50</sub> et DL<sub>100</sub> (DMM) par voie sous-cutanée des venins utilisés dans cette étude étaient de 31 µg et 45 µg pour *M. pyrrhocryptus*, 26 µg et 30 µg pour *M. altirostris*, 28 µg et 40 µg pour *M. surinamensis*, 27 µg et 57 µg pour *M. nigrocinctus* et 22 µg et 40 µg pour les venins de *M. fulvius*. Ces doses et les masses de venin correspondant aux doses d'essai de 1,2 DMM utilisées dans cette étude sont détaillées dans le Tableau I.

Table I: Median lethal dose (LD<sub>50</sub>), minimal mortal dose (MMD or LD<sub>100</sub>) and challenge dose (1.2 MMD) of the *Micrurus* venoms used in this study, expressed in micrograms per 20 g mouse

Tableau I: Dose létale médiane (DL<sub>50</sub>), dose mortelle minimale (DMM ou DL<sub>100</sub>) et dose de provocation (1,2 DMM) des venins de *Micrurus* utilisés dans cette étude, exprimées en microgrammes par souris de 20 g

Venom / Venin	Toxic Doses / Doses toxiques		
	LD <sub>50</sub> s.c. (µg/mouse) / DL <sub>50</sub> s.c. (µg/souris)	LD <sub>100</sub> s.c. (MMD) (µg/mouse) / DL <sub>100</sub> s.c. (DMM) (µg/souris)	Challenge dose (1.2 MMD) (µg/mouse) / Dose de provocation (1,2 DMM) (µg/souris)
<i>M. pyrrhocryptus</i>	31 (28 to 35)*	45	54
<i>M. altirostris</i>	26 (25-27)*	30	36
<i>M. surinamensis</i>	28 (25 to 30)*	40	48
<i>M. nigrocinctus</i>	27 (21 to 35)*	57	68
<i>M. fulvius</i>	22 (19 to 27)*	40	48

\*values between prenteses are the 95% confidence intervals / les valeurs entre parenthèses correspondent aux intervalles de confiance à 95 %

#### 3.2 Time to death of mice injected with venom with or without treatment with N+A

The venom of *M. surinamensis* caused the most rapid lethality, with a mean time to death of 25 ± 6 min while *M. fulvius* venom resulted in the slowest progression to death, with a mean time of 157 ± 35 min (ANOVA-Bonferroni p < 0.025 and p < 0.0001 for *M. surinamensis* and *M. fulvius* respectively). The mean time to death for the remaining venoms were 43 ± 6 min, 47 ± 11 min and 54 ± 9 min for *M. nigrocinctus*, *M. pyrrhocryptus* and *M. altirostris* venoms respectively (Table II). The RDD is shown in Figure 4.

The combination of N+A did not protect mice of the challenge dose, but delayed the time of death of *M. surinamensis*, *M. altirostris* and *M. pyrrhocryptus* venoms. Only in the case of *M. altirostris* the survival of 2 mice out 15 treated with venom and N+A was observed (Table II).

#### 3.2 Délai avant la mort des souris injectées de venin avec ou sans traitement par N+A

Le venin de *M. surinamensis* a provoqué la létalité la plus rapide, avec un délai moyen avant la mort de 25 ± 6 min, tandis que le venin de *M. fulvius* a entraîné la progression la plus lente vers la mort, avec un délai moyen de 157 ± 35 min (ANOVA-Bonferroni p < 0,025 et p < 0,0001 pour *M. surinamensis* et *M. fulvius* respectivement). Le délai moyen avant la mort pour les autres venins était de 43 ± 6 min, 47 ± 11 min et 54 ± 9 min pour les venins de *M. nigrocinctus*, *M. pyrrhocryptus* et *M. altirostris* respectivement (Tableau II). Le DRM est représentée sur la Figure 4.

L'association N+A n'a pas protégé les souris contre la dose de provocation, mais a retardé le délai de mort pour les venins de *M. surinamensis*, *M. altirostris* et *M. pyrrhocryptus*. Ce n'est que dans le cas de *M. altirostris* que la survie de 2 souris sur 15 traitées par le venin et N+A a été observée (Tableau II).

Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micurus* venoms  
Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micurus*

Table II: Times of death caused by the injection of 1.2 MMD of the different venom and with and without the injection of N+A

Tableau II: Délai avant la mort provoquée par l'injection de 1,2 DMM des différents venins, avec et sans injection de N+A

Venom / Venin	Treatment / Traitement	Time of death (min) / Délai avant la mort (min)				n / n	p / p
		Mean $\pm$ SD / Moyenne $\pm$ écart-type	Median / Médiane	Minimum / Minimum	Maximum / Maximum		Statistic / Statistique
<i>M. pyrrhocryptus</i>	Venom alone / Venin seul	47 $\pm$ 11	48	30	75	22	< 0.05 (U= 174,5; t= 2.09)*
	Venom plus N+A / Venin plus N+A	55 $\pm$ 15	50	45	114	24	
<i>M. altirostris</i>	Venom alone/ Venin seul	54 $\pm$ 9	54	41	70	17	< 0.001 (U= 20.5)
	Venom plus N+A / Venin plus N+A	76 $\pm$ 14	78	51	101	15	
<i>M. surinamensis</i>	Venom alone/ Venin seul	25 $\pm$ 6	24	18	42	18	< 0.001 (U= 0.0)
	Venom plus N+A / Venin plus N+A	60 $\pm$ 27	53	43	122	8	
<i>M. nigrocinctus</i>	Venom alone/ Venin seul	43 $\pm$ 6	42	34	56	13	0.69 (U= 76.5)
	Venom plus N+A / Venin plus N+A	43 $\pm$ 4	42	36	51	13	
<i>M. fulvius</i>	Venom alone/ Venin seul	157 $\pm$ 35	151	110	217	12	0.29 (U= 53.5)
	Venom plus N+A / Venin plus N+A	132 $\pm$ 46	147	59	190	12	

n: number of animals U: value (Mann-Whitney) \*: t Student test) in this case (*M. pyrrhocryptus* venom), the differences between groups were studied by t Student and Mann-Whitney methods / n: nombre d'animaux; U: valeur (test de Mann-Whitney); \*: test t de Student); dans ce cas (venin de *M. pyrrhocryptus*), les différences entre les groupes ont été analysées à l'aide des méthodes du test t de Student et du test de Mann-Whitney

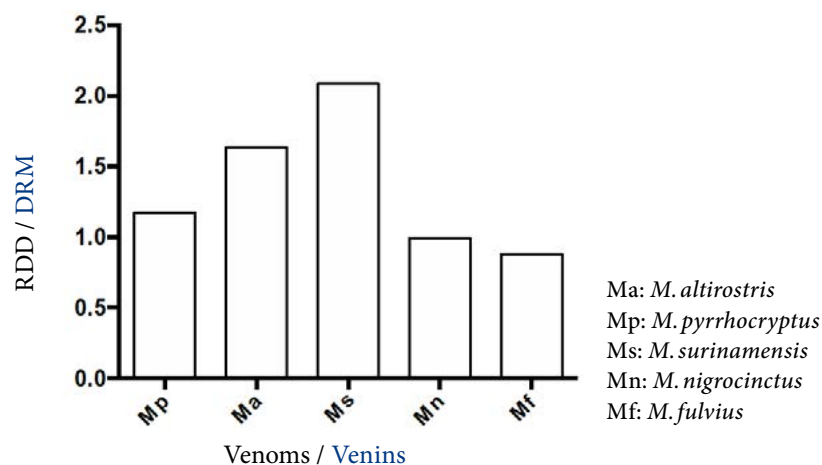


Figure 4: Relative delay in time to death (RDD) following treatment with N+A. Bars represent the ratio between the time to death of mice injected with V and treated with N+A, and the time to death of the controls injected with V alone (RDD = V + N+A/V alone)

Figure 4: Délai relatif avant la mort (DRM) après traitement par N+A. Les barres représentent le rapport entre le temps jusqu'au décès des souris ayant reçu une injection de V et un traitement par N+A, et le temps jusqu'au décès des souris témoins ayant reçu uniquement une injection de V (DRM = V + N+A/V seul)

Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micurus* venoms  
 Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micurus*

Table III: Percentual survival of mice challenged with 1.2 MMD of venom and rescued with different fixed doses of AV alone or combined with N+A

Tableau III: Pourcentage de survie des souris exposées à 1,2 DMM de venin et sauvées par différentes doses fixes d'AV seul ou en association avec N+A

Venom / Venin	Treatment / Traitement	Dose AV (µL) / AV dose (µl)	Protection (%) / Protection (%)			Number of experiments / Nombre d'expériences
			Median / Médiane	Minimum / Minimum	Maximum / Maximum	
<i>M. pyrrhocryptus</i>	AV alone / AV seul	50	20	0	60	5
		100	40	20	60	5
		250	100	*	*	1
	AV plus N+A / AV plus N+A	50	60	0	100	5
		100	80	60	100	5
		250	100	*	*	1
<i>M. altirostris</i>	AV alone / AV seul	50	60	0	60	5
		100	60	40	80	5
		250	100	*	*	1
	AV plus N+A / AV plus N+A	50	100	60	100	5
		100	100	80	100	5
		250	100	*	*	1
<i>M. surinamensis</i>	AV alone / AV seul	50	0	0	0	2
		100	0	0	0	2
		250	20	0	20	3
	AV plus N+A / AV plus N+A	50	0	0	0	2
		100	20	0	80	5
		250	60	0	100	5
<i>M. nigrocinctus</i>	AV alone / AV seul	50	0	0	0	3
		100	0	0	0	4
		250	40	*	*	1
	AV plus N+A / AV plus N+A	50	0	0	0	3
		100	10	0	20	4
		250	40	*	*	1
<i>M. fulvius</i>	AV alone / AV seul	50	10	0	20	2
		100	0	0	0	3
		200	40	*	*	1
		400	60	*	*	1
	AV plus N+A / AV plus N+A	50	10	0	20	2
		100	20	0	20	3
		200	40	*	*	1
		400	100	*	*	1

There were used 5 mice by experiment / Cinq souris ont été utilisées par expérience.

### 3.3 Survival of mice injected with venom and rescued with AV alone or with AV plus N+A

The combination of the treatment with AV plus N+A resulted in improved outcomes in envenomations by South American *Micrurus* species.

#### 3.3.1 *M. pyrrhocryptus* venom

The addition of N+A to AV resulted in better outcomes than treatment with AV alone (Table III; Appendix 2). Among mice challenged with this venom, survival was higher in the group treated with 100 µL of AV plus N+A (21/25 mice survived with the addition of N+A, compared to 11/25 in the AV-alone group) or using 50 µL of AV (13/25 survivors with N+A vs 7/25 using AV alone). Fisher's exact test confirmed a statistically significant improvement with 100 µL of AV plus N+A compared to 100 µL of AV alone ( $p=0.0072$ ) (Fig. 5; Fig. 6; Appendix 2). Although protection appeared higher with 50 µL AV plus N+A compared to 50 µL of AV alone, in this assay the difference did not reach statistical significance ( $p=0.0833$ ). Nevertheless, statistical differences were observed when the protection provided by this dose of AV plus N+A regarding AV alone in  $ED_{50}$  experiments (n: 30 mice) were analyzed ( $p=0.0352$ ) (Appendix 3.a). This difference when all data using a dose of 50 µL of AV alone or plus N+A (fixed doses +  $ED_{50}$  assays, n: 80 mice) were analyzed ( $p=0.0032$ ) (Appendix 3.b).

#### 3.3.2 *M. altirostris* venom

The adding of N+A to the treatment with AV improved the survival. Among mice challenged, the use of the combination showed a better outcome (Table III; Appendix 2), when using 100 µL of AV, 16/25 mice survived in the AV-alone group while 23/25 survived in the AV plus N+A group. When the dose of AV was 50µL, the combination of AV plus N+A protected 22/25 while the use of AV alone only protected 12/25 challenge mice. Fisher's exact test showed that combining either 100 or 50 µL of AV with N+A offered significantly better protection than AV alone ( $p=0.0374$  and 0.0054, respectively) (Fig. 5; Fig. 6; Appendix 2).

#### 3.3.3 *M. surinamensis* venom

Overall, AV alone protected just 1 of 15 mice at a dose of 250 µL (1/15), while 100 or 250 µL of AV plus N+A protected 8/25 and 15/25 respectively. No protection was observed with 50 µL of AV plus N+A (0/10) (Table III). Fisher's exact test showed that the best outcome was achieved using 250 µL

### 3.3 Survie des souris injectées de venin et sauvées par l'AV seule ou par l'AV associée à N+A

L'association du traitement par l'AV et N+A a permis d'obtenir de meilleurs résultats dans les cas d'envenimations par des espèces sud-américaines de *Micrurus*.

#### 3.3.1 Venin de *M. pyrrhocryptus*

L'ajout de N+A à l'AV a donné de meilleurs résultats que le traitement par l'AV seule (Tableau III; Annexe 2). Parmi les souris exposées à ce venin, le taux de survie était plus élevé dans le groupe traité avec 100µl d'AV plus N+A (21 souris sur 25 ont survécu avec l'ajout de N+A, contre 11 sur 25 dans le groupe AV seul) ou avec 50µl d'AV (13 survivants sur 25 avec N+A contre 7 sur 25 avec l'AV seul). Le test exact de Fisher a confirmé une amélioration statistiquement significative avec 100µl d'AV plus N+A par rapport à 100µl d'AV seul ( $p=0,0072$ ) (Fig. 5; Fig. 6; Annexe 2). Bien que la protection semblait plus élevée avec 50µl d'AV plus N+A par rapport à 50µl d'AV seul, dans ce test, la différence n'a pas atteint le seuil de signification statistique ( $p=0,0833$ ). Néanmoins, des différences statistiques ont été observées lorsque la protection fournie par cette dose d'AV plus N+A par rapport à l'AV seul dans les expériences  $DE_{50}$  (n: 30 souris) a été analysée ( $p=0,0352$ ) (Annexe 3.a). Cette différence a été observée lorsque toutes les données utilisant une dose de 50µl d'AV seul ou associé à N+A (doses fixes + essais  $DE_{50}$ , n: 80 souris) ont été analysées ( $p=0,0032$ ) (Annexe 3.b).

#### 3.3.2 Venin de *M. altirostris*

L'ajout de N+A au traitement par AV a augmenté la survie. Parmi les souris exposées, l'utilisation de la combinaison a donné de meilleurs résultats (Tableau III; Annexe 2): avec une dose de 100µl d'AV, 16 souris sur 25 ont survécu dans le groupe AV seul, contre 23 sur 25 dans le groupe AV plus N+A. Lorsque la dose d'AV était de 50µl, la combinaison AV plus N+A a protégé 22 sur 25, tandis que l'utilisation de l'AV seul n'a protégé que 12 souris sur 25. Le test exact de Fisher a montré que l'association de 100 ou 50µl d'AV avec N+A offrait une protection significativement meilleure que l'AV seul ( $p=0,0374$  et 0,0054, respectivement) (Fig. 5; Fig. 6; Annexe 2).

#### 3.3.3 Venin de *M. surinamensis*

Dans l'ensemble, l'AV seul n'a protégé qu'une seule souris sur 15 à une dose de 250µl (1/15), tandis

of AV plus N+A ( $p = 0.0009$ ). The use of 100  $\mu\text{L}$  of AV and N+A, although seemingly better, did not differ significantly from AV alone ( $p = 0.0734$ ) (Fig. 5; Fig. 6; Appendix 2).

### 3.3.4 *M. nigrocinctus* venom

No meaningful differences in survival were observed between AV alone and AV combined with N+A; 2/40 versus 5/40 mice survived ( $n = 80$ ) (Table III; Fig. 6). When each dose was analyzed separately using Fisher's exact test, no statistically significant differences were found ( $p > 0.4$  in all cases) (Fig. 5; Fig. 6; Appendix 2).

### 3.3.5 *M. fulvius* venom

No statistically significant differences in survival were observed between treatment with AV alone or AV combined with N+A. When considering the different doses, some degree of protection was observed (Table III), but Fisher's exact test showed no significant differences ( $p > 0.4$  in all cases) (Fig. 5; Fig. 6; Appendix 2).

## 3.4 Variation in the Rescue Median Effective dose of AV with or without N+A

The addition of N+A to the AV treatment enhanced its neutralizing potency against both venoms, although the magnitude of the improvement varied. For *M. altirostris* venom, the  $\text{ED}_{50}$  of AV alone was 55  $\mu\text{L}$  (95% CI: 46–67  $\mu\text{L}$ ,  $R^2 = 0.9781$ ), which decreased to 16  $\mu\text{L}$  (9–28  $\mu\text{L}$ ,  $R^2 = 0.7655$ ) when combined with N+A, reflecting a 3.4-fold increase in neutralizing potency. In contrast, for *M. pyrrhocryptus* venom, the  $\text{ED}_{50}$  of AV alone was 94  $\mu\text{L}$  (81–108  $\mu\text{L}$ ,  $R^2 = 0.7727$ ), and this was reduced to 59  $\mu\text{L}$  (47–74  $\mu\text{L}$ ,  $R^2 = 0.8273$ ) with the addition of N+A, corresponding to a 1.6-fold improvement (Fig. 7).

## 3.5 Analysis of the doses used and protection

In all cases, treatment improved the outcome of experimental envenomations to varying degrees. However, statistically significant differences were observed only for *M. altirostris* and *M. pyrrhocryptus* venoms and for *M. surinamensis* venom but only using high doses of AV (Fig. 5 and 6). A preliminary analysis using linear and non-linear regression of median protection values against AV doses confirmed this trend (Appendix 4 and 5). The data indicate that the addition of N+A allows for a reduction in the required AV dose to achieve the same level of protection across all venoms tested (Table III; Fig. 5; Fig. 8; Appendix 4 and 5).

que 100 ou 250  $\mu\text{L}$  d'AV associés à N+A ont protégé respectivement 8/25 et 15/25 souris. Aucune protection n'a été observée avec 50  $\mu\text{L}$  d'AV associés à N+A (0/10) (Tableau III). Le test exact de Fisher a montré que le meilleur résultat a été obtenu avec 250  $\mu\text{L}$  d'AV plus N+A ( $p = 0,0009$ ). L'utilisation de 100  $\mu\text{L}$  d'AV et de N+A, bien qu'apparemment plus efficace, ne différait pas significativement de l'AV seul ( $p = 0,0734$ ) (Fig. 5; Fig. 6; Annexe 2).

### 3.3.4 Venin de *M. nigrocinctus*

Aucune différence significative en termes de survie n'a été observée entre l'AV seul et l'AV combiné à N+A; 2/40 contre 5/40 souris ont survécu ( $n = 80$ ) (Tableau III; Fig. 6). Lorsque chaque dose a été analysée séparément à l'aide du test exact de Fisher, aucune différence statistiquement significative n'a été constatée ( $p > 0,4$  dans tous les cas) (Fig. 5; Fig. 6; Annexe 2).

### 3.3.5 Venin de *M. fulvius*

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée en termes de survie entre le traitement par AV seul et celui par AV associé à N+A. En examinant les différentes doses, un certain degré de protection a été observé (Tableau III), mais le test exact de Fisher n'a révélé aucune différence significative ( $p > 0,4$  dans tous les cas) (Fig. 5; Fig. 6; Annexe 2).

## 3.4 Variation de la dose médiane efficace de sauvetage de l'AV avec ou sans N+A

L'ajout de N+A au traitement par AV a renforcé son pouvoir neutralisant contre les deux venins, bien que l'ampleur de l'amélioration ait varié. Pour le venin de *M. altirostris*, la  $\text{DE}_{50}$  de l'AV seul était de 55  $\mu\text{L}$  (IC à 95% : 46–67  $\mu\text{L}$ ,  $R^2 = 0,9781$ ), valeur qui est tombée à 16  $\mu\text{L}$  (9–28  $\mu\text{L}$ ,  $R^2 = 0,7655$ ) lorsqu'il était associé à N+A, ce qui reflète une multiplication par 3,4 du pouvoir neutralisant. En revanche, pour le venin de *M. pyrrhocryptus*, la  $\text{DE}_{50}$  de l'AV seule était de 94  $\mu\text{L}$  (81–108  $\mu\text{L}$ ,  $R^2 = 0,7727$ ), et celle-ci a été réduite à 59  $\mu\text{L}$  (47–74  $\mu\text{L}$ ,  $R^2 = 0,8273$ ) avec l'ajout de N+A, ce qui correspond à une amélioration de 1,6 fois (Fig. 7).

## 3.5 Analyse des doses utilisées et de la protection

Dans tous les cas, le traitement a amélioré l'issue des envenimations expérimentales à des degrés divers. Cependant, des différences statistiquement significatives n'ont été observées que pour les venins de *M. altirostris* et de *M. pyrrhocryptus*, ainsi que pour le venin de *M. surinamensis*, mais

For the neutralization of *M. pyrrhocryptus* and *M. altirostris* venoms in particular, although the ED<sub>50</sub> and T-MED values differed by nearly two-fold, their 95% confidence intervals overlapped (Fig. 7; Appendix 6).

uniquement avec des doses élevées d'AV (Fig. 5 et Fig. 6). Une analyse préliminaire utilisant une régression linéaire et non linéaire des valeurs médianes de protection en fonction des doses d'AV a confirmé cette tendance (Annexes 4 et 5). Les données indiquent que l'ajout de N+A permet de réduire la dose d'AV nécessaire pour obtenir le même niveau de protection pour tous les venins testés (Tableau III; Fig. 5 et Fig. 8; Annexe 4 et Annexe 5).

En ce qui concerne la neutralisation des venins de *M. pyrrhocryptus* et de *M. altirostris* en particulier, bien que les valeurs de la dose efficace (DE<sub>50</sub>) et de la dose médiane (T-MED) différaient de près du double, leurs intervalles de confiance à 95 % se chevauchaient (Fig. 7; Annexe 6).

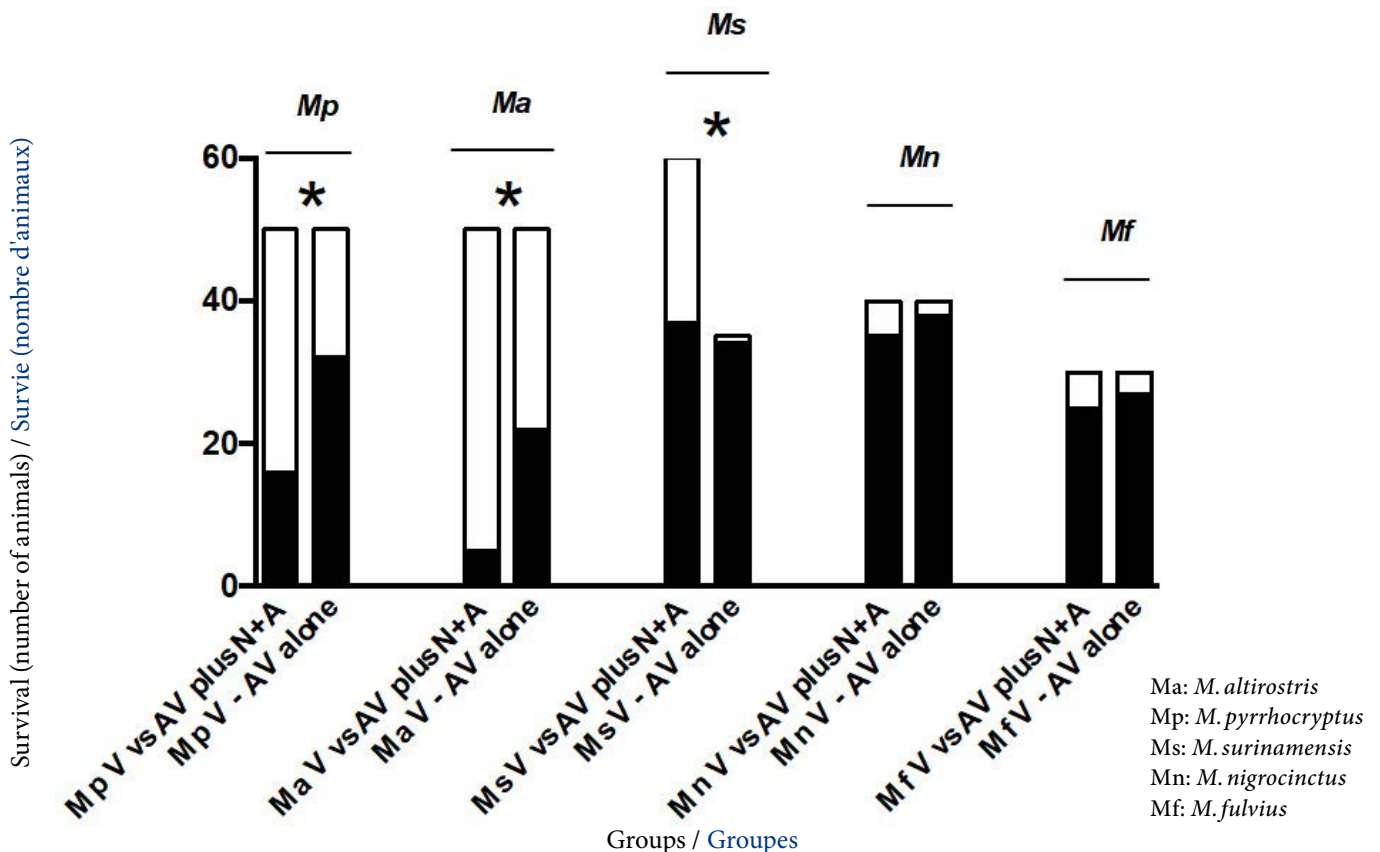


Figure 5: General response to the different treatments. Survival and mortality outcomes of mice challenged with 1.2 MMD of venom and treated with either AV alone or AV plus N and A (doses up to 250  $\mu$ L were included). The bars represent the cumulative results from all experiments. Black portions indicate deceased mice, and white portions indicate surviving mice. Asterisks indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ , Fisher's exact test) comparing survival and mortality rates between mice treated with AV alone and those receiving AV plus N+A

Figure 5: Réponse générale aux différents traitements. Résultats de survie et de mortalité chez des souris exposées à 1,2 DMM de venin et traitées soit par AV seul, soit par AV associé à N et A (des doses allant jusqu'à 250  $\mu$ L ont été incluses). Les barres représentent les résultats cumulés de toutes les expériences. Les parties noires indiquent les souris décédées, et les parties blanches indiquent les souris survivantes. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives ( $p < 0,05$ , test exact de Fisher) entre les taux de survie et de mortalité des souris traitées par AV seul et celles recevant AV plus N+A

Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micurus* venoms  
 Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micurus*

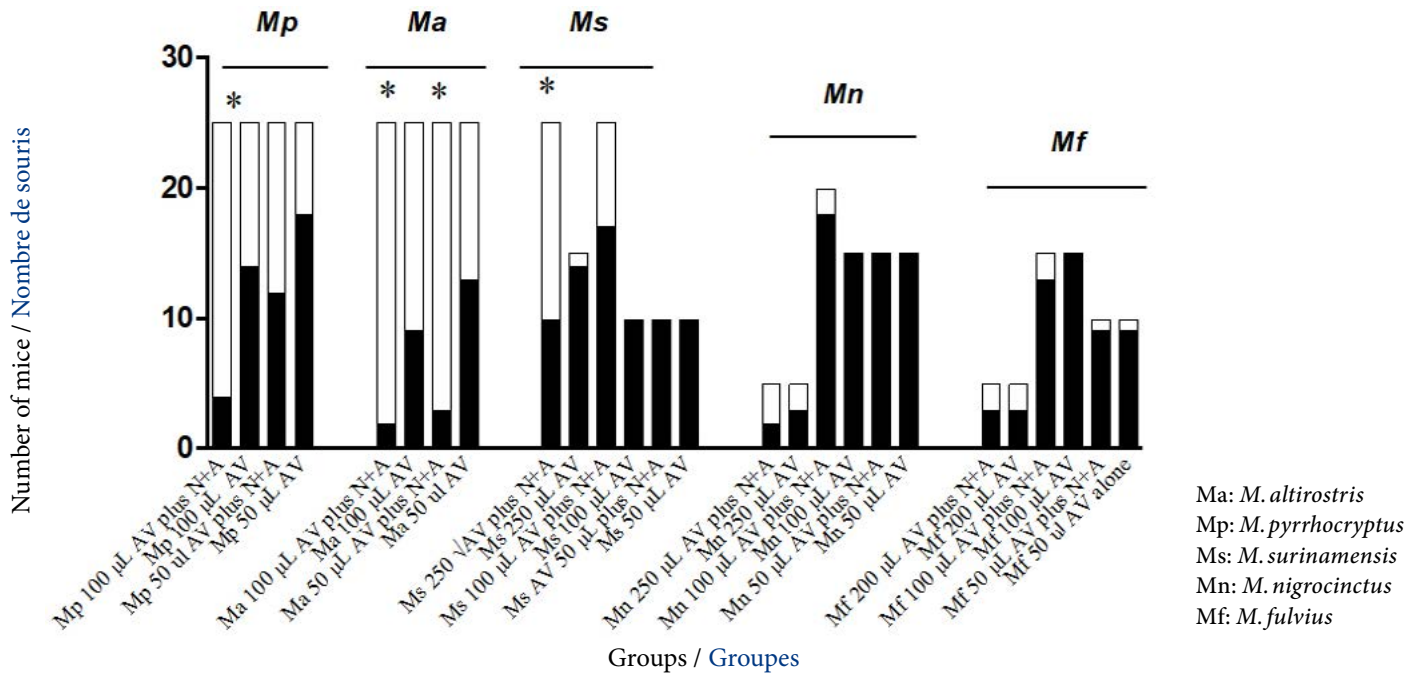


Figure 6: Response to different doses of AV with or without N+A. Survival and mortality outcomes in mice challenged with 1.2 MMD of venom (V) and treated with different doses of either AV alone or with AV plus N+A were compared using Fisher's exact test. Bars represent cumulative data per dose. Black portions indicate deceased mice, and white portions indicate surviving mice. Asterisks indicate statistically significant differences (p < 0.05).

Figure 6 : Réponse à différentes doses d'AV avec ou sans N+A. Les résultats de survie et de mortalité chez les souris exposées à 1,2 DMM de venin (V) et traitées avec différentes doses d'AV seul ou d'AV associé à N+A ont été comparés à l'aide du test exact de Fisher. Les barres représentent les données cumulées par dose. Les parties noires indiquent les souris décédées, et les parties blanches indiquent les souris survivantes. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives (p < 0,05).

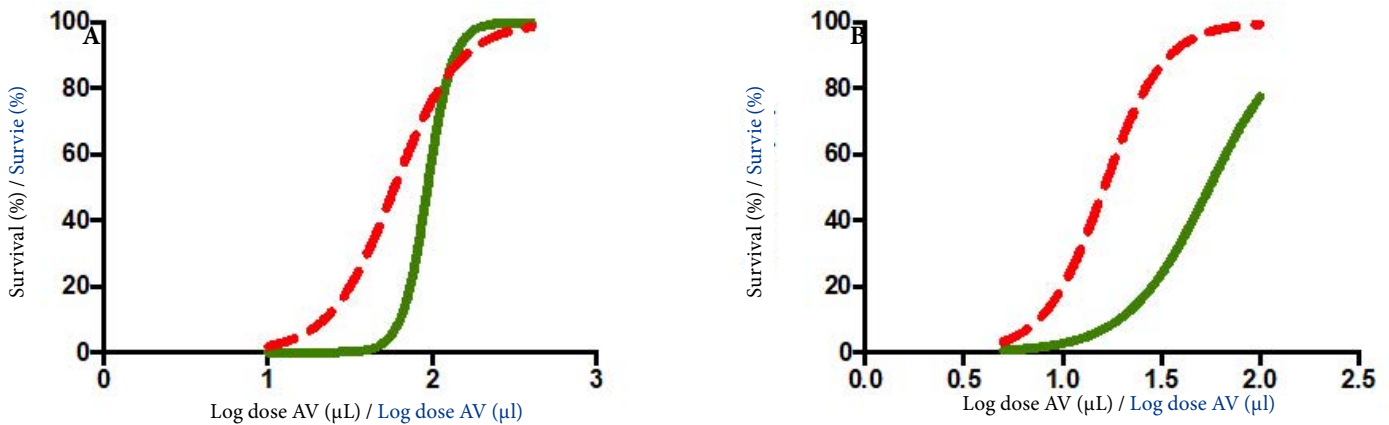


Figure 7: Median effective dose of AV, administered alone or in combination with N+A, in rescue experiments. AV or AV plus N+A was injected intraperitoneally 15 min after subcutaneous injection of 1.2 minimal mortal doses (MMD) of the respective venoms. The solid line represents the response to AV alone, while the dashed line represents the response to AV plus N+A. In both cases, the addition of N+A reduced the dose of AV required to rescue 50% of challenged mice. A. Against *M. pyrrhocryptus* venom, the ED<sub>50</sub> of AV alone was 94 µL (95% CI: 81 – 108 µL, R<sup>2</sup> = 0.7727), while the addition of N+A reduced the ED<sub>50</sub> to 59 µL (47–74 µL, R<sup>2</sup> = 0.8273), increasing neutralizing potency by 1.6-fold. B. For *M. altirostris* venom, the ED<sub>50</sub> of AV alone was 55 µL (46–67 µL, R<sup>2</sup> = 0.9781), reduced to 16 µL (9–28 µL, R<sup>2</sup> = 0.7655) when combined with N+A, corresponding to a 3.4-fold increase in neutralizing potency.

Figure 7 : Dose efficace médiane d'AV, administrée seule ou en association avec N+A, dans les expériences de sauvetage. L'AV ou l'AV plus N+A a été injecté par voie intrapéritonéale 15 minutes après l'injection sous-cutanée de 1,2 dose minimale mortelle (MMD) des venins respectifs. La ligne continue représente la réponse à l'AV seul, tandis que la ligne pointillée représente la réponse à l'AV plus N+A. Dans les deux cas, l'ajout de N+A a réduit la dose d'AV nécessaire pour sauver 50% des souris exposées. A. Contre le venin de *M. pyrrhocryptus*, la DE<sub>50</sub> de l'AV seul était de 94 µl (IC à 95% : 81 – 108 µl, R<sup>2</sup> = 0,7727), tandis que l'ajout de N+A a réduit la DE<sub>50</sub> à 59 µl (47–74 µl, R<sup>2</sup> = 0,8273), multipliant ainsi par 1,6 le pouvoir neutralisant. B. Pour le venin de *M. altirostris*, la DE<sub>50</sub> de l'AV seule était de 55 µl (46–67 µl, R<sup>2</sup> = 0,9781), réduite à 16 µl (9–28 µl, R<sup>2</sup> = 0,7655) lorsqu'elle était combinée avec N+A, ce qui correspond à une augmentation de 3,4 fois de la puissance neutralisante.

Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micurus* venoms  
Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micurus*

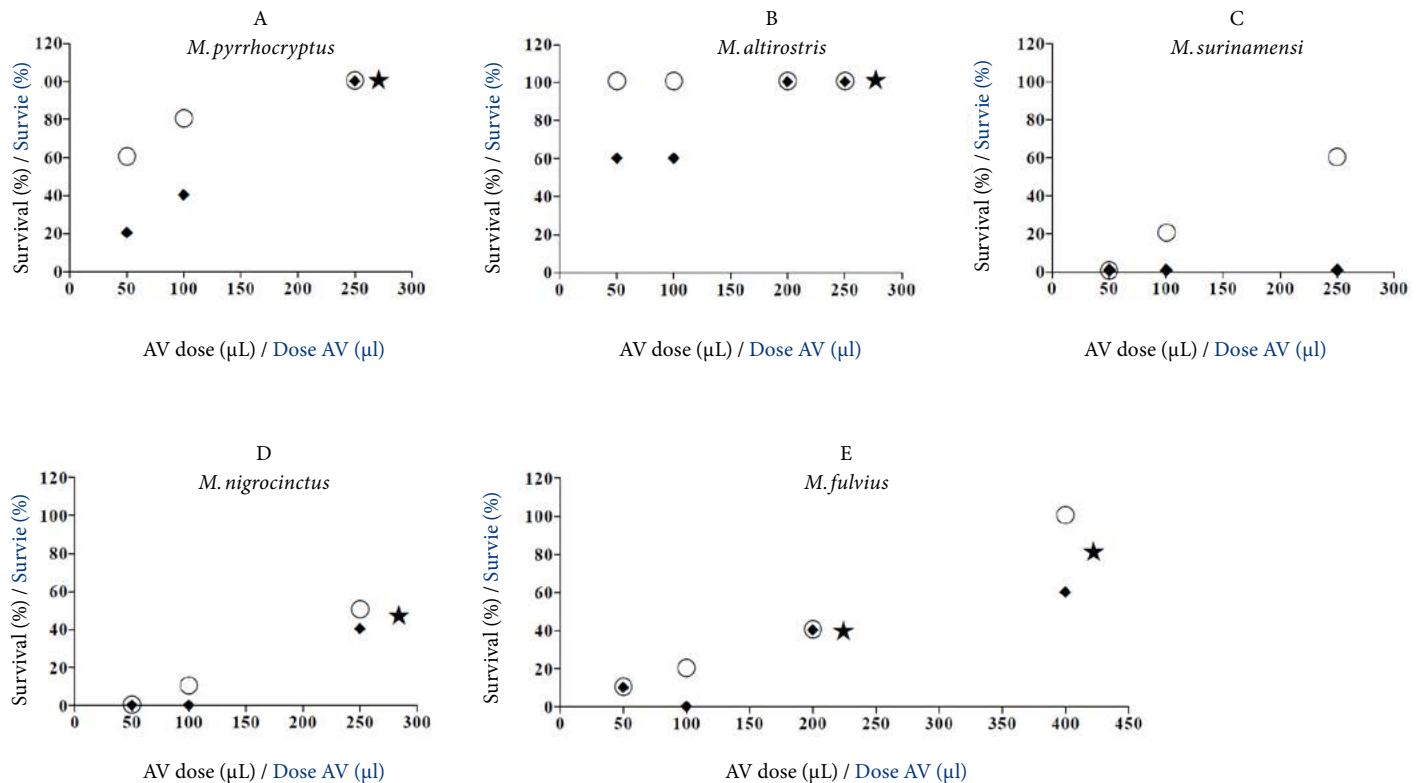


Figure 8: The median survival values from the different rescue experiments are plotted as percentages against the corresponding AV doses. Treatments using AV alone are represented by black rhombi: ♦ and treatments using AV plus N+A by white circles: ○. Stars (★) denote data points for which only a single experiment was performed (highest doses).

Figure 8: Les valeurs de survie médiane issues des différentes expériences de sauvetage sont représentées sous forme de pourcentages en fonction des doses d'AV correspondantes. Les traitements utilisant l'AV seul sont représentés par des losanges noirs: ♦ et les traitements utilisant l'AV plus N+A par des cercles blancs: ○. Les étoiles (★) indiquent les points de données pour lesquels une seule expérience a été réalisée (doses les plus élevées).

## 4. Discussion

Envenomation by coral snakes is uncommon, but when it does occur it constitutes a medical emergency for which the only effective treatment is the administration of specific AV [45,46]. This AV is difficult to produce and is of limited availability, even in countries with local manufacturing capabilities [10,11,23,25,27].

The AChEIs alone or combined with AVs have been used for the treatment of envenomation by other elapids [4,37,48]. Despite that some experimental benefits were observed on envenomation caused by venoms with both pre and postsynaptic neurotoxins [76], in envenomation by other elapids, clinical experience shows absence or low benefits. In envenomations caused by venoms with pre-synaptic neurotoxins like *Bungarus* or *Oxyuranus* species [2,62,65,72] the benefit is lower or absent regarding their use on envenomations with venoms with predominantly postsynaptic neurotoxins like *Naja* [29,36,56,73,74,76]. In the case of coral snakes, the use of AChEIs is particularly recommended in case of envenomation

## 4. Discussion

L'envenimement par les serpents corail est rare, mais lorsqu'elle survient, elle constitue une urgence médicale pour laquelle le seul traitement efficace est l'administration d'un antivenin spécifique [45,46]. Cet antivenin est difficile à produire et sa disponibilité est limitée, même dans les pays disposant de capacités de fabrication locales [10,11,23,25,27].

Les inhibiteurs de l'AChE, seuls ou associés à des antivenins, ont été utilisés pour le traitement de l'envenimement par d'autres élapidés [4,37,48]. Bien que certains bénéfices expérimentaux aient été observés dans les cas d'envenimement causée par des venins contenant à la fois des neurotoxines présynaptiques et postsynaptiques [76], l'expérience clinique montre une absence ou de faibles bénéfices dans les cas d'envenimement par d'autres élapidés. Dans les cas d'envenimement causée par des venins contenant des neurotoxines présynaptiques, comme les espèces des genres *Bungarus* ou *Oxyuranus* [2,62,65,72], les bénéfices sont moindres ou inexistantes par rapport à leur

by snakes whose venom consists exclusively of postsynaptic neurotoxins [9,10,46,67].

As previously mentioned, the use of AChEIs has been proposed as a therapeutic approach for *Micrurus* envenomations [32,67,69,70,71], nevertheless, some *Micrurus* venoms, such as those of *M. corallinus* and *M. fulvius*, also cause presynaptic neurotoxicity via  $\beta$ -neurotoxins [19,66,67]. The action of these  $\beta$ -neurotoxins, along with certain non-neurotoxic PLA<sub>2</sub>s, involves additional mechanisms that can cause lesions in cellular membranes, potentially complicating the course of envenomation [4,6,47]. Due to this significant variability, AChEIs are not always effective and their role may be more appropriate as an adjunctive rather than a primary treatment modality [8,10,11].

As mentioned above, the outcome of mice treated is related with the composition of the venoms, especially by the type of neurotoxins. The addition of N+A might have been expected to yield good results in venoms with higher proportions of  $\alpha$ -neurotoxins, such as *M. surinamensis* (95.4%) [60] and *M. altirostris* (79.5%) [19]. In the case of *M. altirostris* the benefits were clear but in the case of *M. surinamensis* the results may be possibly related to the differential characteristics of this venom [55,64], the non specificity of the antivenom as observed in previous studies [26,27] and the difficult in neutralize this venom inclusive with specific antivenom [26]. Nonetheless, the use of N+A at high doses improves the effectiveness of the AV against this venom.

However, despite the presence of 3-FTxs in *M. nigrocinctus* venom (38%) [31] and in *M. fulvius* venom (24.9%) [44,66], the improvement was lower than that observed on *M. pyrrhocryptus* venom, with 27%. The limited or absent effectiveness of the combination AV plus N+A against envenomations by *M. fulvius* and *M. nigrocinctus* at the doses tested may be due to the presence of myotoxic and neurotoxic PLA<sub>2</sub>s in *M. fulvius* [44,66], over 58% of the venom mass, and myotoxic PLA<sub>2</sub>s representing 48% of the venom mass in *M. nigrocinctus* venom [25,35,44,57,66] (Appendix 7).

In experimental envenomations using *M. fulvius* venom, good neutralization has been observed using PLA<sub>2</sub> inhibitors [39,40], which reinforces the important role of  $\beta$ -neurotoxicity in this envenomation. On the other hand, despite the high concentration of PLA<sub>2</sub> in the venom of *M. nigrocinctus*, its  $\beta$ -neurotoxicity does not appear to play a significant role in envenomation [31], unlike

utilisation dans les envenimations par des venins contenant principalement des neurotoxines postsynaptiques comme *Naja* [29,36,56,73,74,76]. Dans le cas des serpents corail, l'utilisation d'inhibiteurs de l'AChE est particulièrement recommandée en cas d'envenimation par des serpents dont le venin se compose exclusivement de neurotoxines postsynaptiques [9,10,46,67].

Comme mentionné précédemment, l'utilisation d'inhibiteurs de l'AChE a été proposée comme approche thérapeutique pour les envenimations par *Micrurus* [32,67,69,70,71]; néanmoins, certains venins de *Micrurus*, tels que ceux de *M. corallinus* et de *M. fulvius*, provoquent également une neurotoxicité présynaptique via des  $\beta$ -neurotoxines [19,66,67]. L'action de ces  $\beta$ -neurotoxines, ainsi que de certaines PLA<sub>2</sub> non neurotoxiques, implique des mécanismes supplémentaires pouvant causer des lésions au niveau des membranes cellulaires, ce qui peut compliquer l'évolution de l'envenimation [4,6,47]. En raison de cette variabilité importante, les inhibiteurs de l'AChE ne sont pas toujours efficaces et leur rôle pourrait être plus approprié en tant que traitement d'appoint plutôt que comme modalité thérapeutique principale [8,10,11].

Comme mentionné ci-dessus, l'issue chez les souris traitées est liée à la composition des venins, en particulier au type de neurotoxines. On aurait pu s'attendre à ce que l'ajout de N+A donne de bons résultats avec des venins présentant des proportions plus élevées d' $\alpha$ -neurotoxines, tels que *M. surinamensis* (95,4%) [60] et *M. altirostris* (79,5%) [19]. Dans le cas de *M. altirostris*, les bénéfices étaient évidents, mais dans le cas de *M. surinamensis*, les résultats pourraient être liés aux caractéristiques particulières de ce venin [55,64], à la non-spécificité de l'antivenin telle qu'observée dans des études précédentes [26, 27] et à la difficulté à neutraliser ce venin, même avec un antivenin spécifique [26]. Néanmoins, l'utilisation de N+A à fortes doses améliore l'efficacité de l'AV contre ce venin.

Cependant, malgré la présence de 3-FTx dans le venin de *M. nigrocinctus* (38%) [31] et dans celui de *M. fulvius* (24,9%) [44,66], l'amélioration a été inférieure à celle observée avec le venin de *M. pyrrhocryptus*, avec 27%. L'efficacité limitée ou absente de l'association AV plus N+A contre les envenimations par *M. fulvius* et *M. nigrocinctus* aux doses testées peut être due à la présence de PLA<sub>2</sub> myotoxiques et neurotoxiques chez *M. fulvius* [44,66], représentant plus de 58% de la masse du venin, et de PLA<sub>2</sub> myotoxiques représentant 48% de la masse du venin chez *M. nigrocinctus* [25,35,44,57,66] (Annexe 7).

its myotoxicity [25,31,57]. The venom of *M. pyrrhocryptus* has low experimental myotoxicity [12,25], activity not observed in *M. surinamensis* and *M. altirostris* venoms [25]. Since N+A does not counteract these toxic mechanisms, this may explain the results obtained in these envenomations in the present study.

In Brazil, the use of AChEIs is suggested as an ancillary intervention when AV obtaining is unavailable, delayed, or insufficient, or in patients who do not improve after receiving the highest recommended doses of AV, or who experience delayed recovery or even recurrent systemic neurotoxic manifestations [9,10]. *In vitro* studies have shown that the neuromuscular blockade induced by various *Micrurus* species, e.g., *M. altirostris*, *M. laticollaris*, *M. nigrocinctus*, *M. pyrrhocryptus* and *M. spixii*, involves interactions with post-synaptic nicotinic receptors. However, reversal by N is typically transitory and often minimal or discrete (generally <30%), offering no substantial long-term protection against progressive neuromuscular blockade. Complete reversal of postsynaptic neurotoxicity has only been achieved with the administration of AV [9,10,11]. Magalhães Camargo *et al.* demonstrated that treatment with N transiently reversed neuromuscular blockade following 50% inhibition induced by *M. pyrrhocryptus* venom, but complete and irreversible blockade occurred after 60 min. This may explain the limited protection afforded by N+A alone in one dose and the improved survival observed when combining N+A with AV [1,4, 33,38].

In the envenomation by snakes it is very important the rapid instauration of the specific treatment, but in the case of neurotoxic envenomations this is specially important since the best effectiveness is obtained when the AV avoid the union of the toxins to their targets [3,16]. The same occurs with the use of N, which would provide better results in the beginning of the envenomation. In Brazil there were observed good outcomes in the envenomation by *Micrurus* using the combination of AV plus N+A, when applied 2 hours and 5 hours after the bite but, using two doses of N+A [11]. Nevertheless efforts must be directed to the early use of the N+A.

Unfortunately dose-response studies conducted to compare ED<sub>50</sub>s of the AVs alone or combined with N+A could only be done for *M. pyrrhocryptus* and *M. altirostris* venoms. We did not have enough material to determine ED<sub>50</sub>s for all venoms in dedicated experiments. We hope to obtain sufficient venom and AV in the future to conduct further studies.

Dans les envenimations expérimentales utilisant le venin de *M. fulvius*, une bonne neutralisation a été observée à l'aide d'inhibiteurs de la PLA<sub>2</sub> [39,40], ce qui renforce le rôle important de la β-neurotoxicité dans cette envenimation. En revanche, , malgré la forte concentration en PLA<sub>2</sub> dans le venin de *M. nigrocinctus*, sa β-neurotoxicité ne semble pas jouer un rôle significatif dans l'envenimation [31], contrairement à sa myotoxicité [25, 31, 57]. Le venin de *M. pyrrhocryptus* présente une faible myotoxicité expérimentale [12,25], activité non observée dans les venins de *M. surinamensis* et *M. altirostris* [25]. Étant donné que les N+A ne neutralisent pas ces mécanismes toxiques, cela pourrait expliquer les résultats obtenus dans ces envenimations dans la présente étude.

Au Brésil, l'utilisation d'inhibiteurs de l'AChE est recommandée comme intervention d'appoint lorsque l'administration d'antidotes antivenimeux (AV) n'est pas disponible, retardée ou insuffisante, ou chez les patients qui ne présentent pas d'amélioration après avoir reçu les doses maximales recommandées d'AV, ou qui présentent un rétablissement retardé, voire des manifestations neurotoxiques systémiques récurrentes [9,10]. Des études *in vitro* ont montré que le blocage neuromusculaire induit par diverses espèces de *Micrurus*, par exemple *M. altirostris*, *M. laticollaris*, *M. nigrocinctus*, *M. pyrrhocryptus* et *M. spixii*, implique des interactions avec les récepteurs nicotiques postsynaptiques. Cependant, la réversion induite par la N est généralement transitoire et souvent minime ou discrète (généralement < 30 %), n'offrant aucune protection substantielle à long terme contre le blocage neuromusculaire progressif. Une réversion complète de la neurotoxicité postsynaptique n'a été obtenue qu'avec l'administration d'AV [9, 10,11]. Magalhães Camargo *et al.* ont démontré que le traitement par N inversait de manière transitoire le blocage neuromusculaire après une inhibition de 50 % induite par le venin de *M. pyrrhocryptus*, mais qu'un blocage complet et irréversible survenait après 60 minutes. Cela pourrait expliquer la protection limitée offerte par une dose unique de N+A et l'amélioration de la survie observée lors de l'association de N+A avec l'AV [1,4, 33,38].

Dans les cas d'envenimation par des serpents, il est très important d'instaurer rapidement le traitement spécifique, mais cela est particulièrement important dans le cas des envenimations neurotoxiques, car l'efficacité optimale est obtenue lorsque l'AV empêche la liaison des toxines à leurs cibles [3,16]. Il en va de même pour l'utilisation de

N, qui donnerait de meilleurs résultats au début de l'envenimation. Au Brésil, de bons résultats ont été observés dans les cas d'envenimation par *Micurus* grâce à l'association d'AV et de N+A, lorsqu'elle était administrée 2 heures et 5 heures après la morsure, mais en utilisant deux doses de N+A [11]. Néanmoins, les efforts doivent être orientés vers l'utilisation précoce du N+A.

Malheureusement, les études dose-réponse menées pour comparer les  $DE_{50}$  des AV seules ou combinées avec N+A n'ont pu être réalisées que pour les venins de *M. pyrrhocryptus* et *M. altirostris*. Nous ne disposons pas de suffisamment de matériel pour déterminer les  $DE_{50}$  de tous les venins dans le cadre d'expériences dédiées. Nous espérons obtenir à l'avenir suffisamment de venin et d'AV pour mener d'autres études.

## 5 Conclusions

In this study, we observed improved outcomes when combined N+A with AV, being the AV used non species specific for 4 of 5 of the venoms studied. For the three South American coral snake venoms tested, this combination allowed the use of lower AV doses compared to AV alone. In these scenarios, the combination may prove useful when increasing AV dosage is not feasible or when other complementary measures, such as respiratory assistance [11], are unavailable.

We did not observe positive outcomes in the cases of *M. nigrocinctus* and *M. fulvius* envenomations. However, it should be noted that the AV used was neither specific nor closely related to these venoms, and previous studies have shown low protection with this AV against these venoms [26,27]. Further studies on the combination AV plus N+A (or other AChEIs) using specific or more closely related AVs, or higher doses of paraspecific AVs, may yield more conclusive results on the potential benefit of using AChEIs in these envenomations.

The combination of AChEIs with AVs, and potentially with  $PLA_2$  inhibitors, should be explored further as a strategy to improve existing treatments or to provide alternative therapeutic options for these rare but very serious envenomations, particularly in regions where AV may be scarce or unavailable.

Our findings agree with several observations on the usefulness of the combination N+A in some Elapidae envenomations and although experimental, show the potential help of the combination of N+A plus antivenom in this type of

## 5 Conclusions

Dans cette étude, nous avons observé de meilleurs résultats lors de l'association de N+A et d'AV, l'AV utilisé n'étant pas spécifique à l'espèce pour 4 des 5 venins étudiés. Pour les trois venins de serpents corail d'Amérique du Sud testés, cette association a permis d'utiliser des doses d'AV plus faibles par rapport à l'AV seul. Dans ces scénarios, l'association peut s'avérer utile lorsqu'il n'est pas possible d'augmenter la dose d'AV ou lorsque d'autres mesures complémentaires, telles que l'assistance respiratoire [11], ne sont pas disponibles.

Nous n'avons pas observé de résultats positifs dans les cas d'envenimations par *M. nigrocinctus* et *M. fulvius*. Il convient toutefois de noter que l'AV utilisé n'était ni spécifique ni étroitement apparenté à ces venins, et des études antérieures ont montré une faible protection avec cet AV contre ces venins [26,27]. Des études supplémentaires sur l'association AV plus N+A (ou d'autres IMAH) utilisant des AV spécifiques ou plus étroitement apparentés, ou des doses plus élevées d'AV paraspécifiques, pourraient fournir des résultats plus concluants sur le bénéfice potentiel de l'utilisation des IMAH dans ces envenimations.

L'association d'AChEI avec des antivenins, et éventuellement avec des inhibiteurs de la  $PLA_2$ , devrait être davantage explorée en tant que stratégie visant à améliorer les traitements existants ou à offrir des options thérapeutiques alternatives pour ces envenimations rares mais très graves, en particulier dans les régions où les antivenins peuvent être rares ou indisponibles.

Nos résultats concordent avec plusieurs observations sur l'utilité de l'association N+A dans

envenomations. Although our study, made in mice, not necessarily can be extrapolated for the therapeutic in humans, the results strongly provide important information on the use of N+A plus antivenom in envenomations by species *Micrurus* with venoms of different venom composition.

To our knowledge, this is the first *in vivo* study on the usefulness of the combination of an anti-*Micrurus* AV with AChEIs in the treatment of envenomation by the southernmost American coral snakes, *M. pyrrhocryptus* and *M. altirostris*.

## Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Authors' contributions

ARdR designed the study, DD, FAMG, MAD and ArdR conducted the fieldwork, ARdR conducted the data analysis, CFD and ARdR supervised the study, ArdR and DD reviewed and edited the final version. All authors read and approved the final manuscript.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Auteurs et autrices / Authors

Adolfo Rafael DE ROODT\* (1,2, ORCID: 0000-0003-2607-8060), Daniel DOZORETZ (1, dozoretz@gmail.com, ORCID:0009-0007-1776-847X), Fernando Andrés MORÓN GOÑI (1, mgfernando2012@gmail.com, ORCID:0009-0002-7378-6748), Marcela Alejandra DESIO (2, marcela.madmad@gmail.com; ORCID:0009-0009-7550-6878), Carlos Fabián DAMÍN (1, cdamin@fmed.uba.ar)

1. Primera Cátedra de Toxicología, Carrera de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2155, CP 1121, CABA, Argentina.

2. Área Investigación y Desarrollo – Venenos. Instituto Nacional de Producción de Biológicos, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”. Av. Velez Sarsfield 563, CP1282, CABA, Argentina.

Corresponding author: aderoodt@anlis.gob.ar; aderoodt@gmail.com

certaines envenimations par des Elapidae et, bien qu'expérimentaux, montrent l'aide potentielle de l'association N+A plus antivenin dans ce type d'envenimations. Bien que notre étude, réalisée chez la souris, ne puisse pas entièrement être extrapolée à un usage thérapeutique chez l'homme, les résultats fournissent des informations importantes sur l'utilisation de la combinaison N+A plus antivenin dans les envenimations par des espèces de *Micrurus* dont les venins présentent une composition différente.

À notre connaissance, il s'agit de la première étude *in vivo* sur l'utilité de l'association d'un antivenin anti-*Micrurus* avec des inhibiteurs de l'AChE dans le traitement de l'envenimation par les serpents corail les plus méridionaux d'Amérique, *M. pyrrhocryptus* et *M. altirostris*.

## Financement

Cette recherche n'a bénéficié d'aucune subvention spécifique de la part d'un organisme de financement, qu'il soit public, privé ou à but non lucratif.

## Contribution des auteurs et autrices

ARdR a conçu l'étude; DD, FAMG, MAD et ArdR ont mené les travaux sur le terrain; ARdR a réalisé l'analyse des données; CFD et ARdR ont supervisé l'étude; ArdR et DD ont relu et révisé la version finale. Tous les auteurs et autrices ont lu et approuvé le manuscrit final.

## Déclaration de liens d'intérêt

Aucun lien d'intérêt n'a été déclaré.

## Références / References

1. ALfaifi MS, ALOtaibi AE, ALQahtani SA, ALSahrani OA, ALSahrani KM, ALBshabshi AO, ALZahrani HM, ALAli HE. Cobra snakebite mimicking brain death treated with a novel combination of polyvalent snake antivenom and anticholinesterase. *Am J Emerg Med.* 2020;38(11):2490.e5-2490.e7. doi: 10.1016/j.ajem.2020.05.111.
2. Anil A, Singh S, Bhalla A, Sharma N, Agarwal R, Simpson ID. Role of neostigmine and polyvalent antivenom in Indian common krait (*Bungarus caeruleus*) bite. *J Infect Public Health.* 2010;3(2):83-7. doi: 10.1016/j.jiph.2010.01.002.
3. Baudou FG, Litwin S, Lanari LC, Laskowicz RD, Damin CF, Chippaux JP, de Roodt AR. Antivenom against *Crotalus durissus terrificus* venom: Immunochemical reactivity and experimental neutralizing capacity. *Toxicon.* 2017;140: 11-17. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.10.009.
4. Bickler PE, Abouyannis M, Bhalla A, Lewin MR. Neuromuscular Weakness and Paralysis Produced by Snakebite Envenoming: Mechanisms and Proposed Standards for Clinical Assessment. *Toxins (Basel).* 2023;15(1):49. doi: 10.3390/toxins15010049.

5. Bogarín G, Morais JF, Yamaguchi IK, Stephano MA, Marcelino JR, Nishikawa AK, Guidolin R, Rojas G, Higashi HG, Gutiérrez JM. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon*. 2000;38(10):1429-41. doi: 10.1016/s0041-0101(99)00236-6.
6. Bon C. Venenos de Serpientes y Farmacopea. In: Bauchot R (eds) *Materia Viva. Serpientes*. TusQuets Eds., Barcelona. fundació "La Caixa" Museu de la Ciència. 1996;194-209.
7. Broadley KJ, Kelly DR. Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists. *Molecules*. 2001;6(3):142-93. doi: 10.3390/60300142.
8. Bucarety F, Borrasca-Fernandes CF, Mello De Capitani E, Hyslop S. Consecutive envenomation of two men bitten by the same coral snake (*Micrurus corallinus*). *Clin Toxicol (Phila)*. 2019;58(2):132-135. doi: 10.1080/15563650.2019.1610568.
9. Bucarety F, Capitani EM, Vieira RJ, Rodrigues CK, Zannin M, Da Silva NJ Jr, Casais-e-Silva LL, Hyslop S. Coral snake bites (*Micrurus* spp.) in Brazil: a review of literature reports. *Clin Toxicol (Phila)*. 2016;54(3):222-34. doi: 10.3109/15563650.2015.1135337.
10. Bucarety F, Hyslop S, Vieira RJ, Toledo AS, Madureira PR, de Capitani EM. Bites by coral snakes (*Micrurus* spp.) in Campinas, State of São Paulo, Southeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006;48(3):141-5. doi: 10.1590/s0036-46652006000300005.
11. Bucarety F, Mello de Capitani E, Hyslop S. Aspectos clínicos do envenenamento causado por cobras-corais no Brasil. In: Da Silva N.J., As cobras-corais do Brasil: biologia, taxonomia, venenos e envenenamentos. Editora da Pontificia Universidad Católica de Goiás, Goiânia. Ch. 2016;9:346-379. "B"
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*. 2011;2:24-31. Epub 2011 Jun 24. PMID: 21858249.
13. Campbell JA, Lamar WW. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, NY. 2004:1-870.
14. Casasola A, Ramos-Cerrillo B, de Roodt AR, Carbajal Saucedo A, Chippaux JP, Alagón A, Stock RP. Paraspecific neutralization of the venom of African species of cobra by an equine antiserum against *Naja melanoleuca*: a comparative study. *Toxicon*. 2009;53(6):602-8. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.01.011.
15. Ciscotto PH, Rates B, Silva DA, Richardson M, Silva LP, Andrade H, Donato MF, Cotta GA, Maria WS, Rodrigues RJ, Sanchez E, De Lima ME, Pimenta AM. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J Proteomics*. 2011;74(9):1810-25. doi: 10.1016/j.jprot.2011.07.011.
16. Chippaux JP. Clinic and treatment of envenomations. *Snake Venoms and Evenomations*. Chapter 6. Chippaux. IRD (eds). Krieger Publishing Co. Malabar, FL. 2006; 211-24. ISBN: 1-57524-272-9
17. Chippaux JF. Debate-Con: Use of expired antivenoms: a flawed good idea. *Emerg Med J*. 2024 Aug 21;41(9):561-562. doi: 10.1136/emmermed-2024-213923.
18. Clement JG. Toxicity of the combined nerve agents GB/GF in mice: efficacy of atropine and various oximes as antidotes. *Arch Toxicol*. 1994;68(1):64-6. doi: 10.1007/BF03035710.
19. Corrêa-Netto C, Junqueira-de-Azevedo Ide L, Silva DA, Ho PL, Leitão-de-Araújo M, Alves ML, Sanz L, Foguel D, Zingali RB, Calvete JJ. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J Proteomics*. 2011;74(9):1795-809. doi: 10.1016/j.jprot.2011.04.003.
20. Cruz Höfling MA, Rodriguez-Simioni L, Vital Brazil OV. Ultrastructural changes in neuromuscular junctions of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*. *Mem. Inst. Butantan*. 1983;84:(47/48), 95-105.
21. Da Silva NR Jr, Godoy-Pires M, Tavares-Feitosa D. Chapter 7: Diversidade das cobras corais do Brasil. In: Da Silva NJ. *As cobras corais do Brasil*. Biología. Taxonomía, venenos e envenenamentos. Pontificia Universidad Católica de Goiás. 2016:79-167.
22. de Roodt AR, Clement H, Dolab JA, Litwin S, Hajos SE, Boyer L, Alagón A. Relationship content of antivenoms and protein with their immunochemical reactivity and neutralization assays. *Clin Toxicol (Phila)*. 2014 Jul;52(6):594-603. doi: 10.3109/15563650.2014.925561.
23. de Roodt AR, De Titto E, Dolab JA, Chippaux JP. Envenoming by coral snakes (*Micrurus*) in Argentina, during the period between 1979-2003. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(1):13-8. doi: 10.1590/s0036-46652013000100003.
24. de Roodt AR, Dolab JA, Galarce PP, Gould E, Litwin S, Dokmetjian JC, Segre L, Vidal JC. A study on the venom yield of venomous snake species from Argentina. *Toxicon*. 1998;36(12):1949-57. doi: 10.1016/s0041-0101(98)00119-6.
25. de Roodt AR, Lago NR, Stock RP. Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental envenomation. *Toxicon*. 2012;59(2):356-64. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.11.009.
26. de Roodt AR, Lanari LC, Ramírez JE, Gómez C, Barragán J, Litwin S, Henriët van Grootheest J, Desio M, Dokmetjian JC, Dolab JA, Damin CF, Alagón A. Cross-reactivity of some *Micrurus* venoms against experimental and therapeutic anti-*Micrurus* antivenoms. *Toxicon*. 2021; 200:153-164. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.07.011.
27. de Roodt AR, Paniagua-Solis JF, Dolab JA, Estévez-Ramírez J, Ramos-Cerrillo B, Litwin S, Dokmetjian JC, Alagón A. Effectiveness of two common antivenoms for North, Central, and South American *Micrurus* envenomations. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2004;42(2):171-8. doi: 10.1081/CLT-120030943.
28. Dokmetjian JC, Del Canto S, Vinzón S, de Jiménez Bonino MB. Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon*. 2009;53(3):375-82. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.12.015.
29. Dutta TK. Neurotoxic Snake Bite: Management *J Neurosci Clin Res*. 2023;8:3. doi: 10.4172/JNSCR.1000161.
30. Federation of European Laboratory Animal Science Association. EUROGUIDE On the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. United Kingdom. 2007; 73 p. ISBN: 978-1-85315-751-6.
31. Fernández J, Alape-Girón A, Angulo Y, Sanz L, Gutiérrez JM, Calvete JJ, Lomonte B. Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *J Proteome Res*. 2011 Apr 1;10(4):1816-27. doi: 10.1021/pr101091a.
32. Francis BR, da Silva Júnior NJ, Seebart C, Casais e Silva LL, Schmidt JJ, Kaiser II. Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A2 and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon*. 1997;35(8):1193-203. doi: 10.1016/s0041-0101(97)00031-7.
33. Gold BS. Neostigmine for the treatment of neurotoxicity following envenomation by the Asiatic cobra. *Ann Emerg Med*. 1996;28(1):87-9. doi: 10.1016/s0196-0644(96)70142-7.
34. Guieu R, Rosso JP, Rochat H. Anticholinesterases and experimental envenomation by *Naja*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1994 Nov;109(3):265-8. PMID: 7894888.
35. Gutiérrez JM, Lomonte B, Aird S, da Silva NJ. capítulo 7: Mecanismo de Ação dos Venenos das Cobras-Corais. In: Da Silva N.J., *As cobras corais do Brasil*. Biología. Taxonomía, venenos e envenenamentos. Pontificia Universidad Católica de Goiás. 2016:303-329. ISBN: 978-8571039131.
36. Kakati H, Giri S, Patra A, Taye SJ, Agarwalla D, Boruah H, Choudhary G, Kalita B, Mukherjee AK. A retrospective analysis of epidemiology, clinical features of envenomation, and in-patient management of snakebites in a model secondary hospital of Assam, North-east India. *Toxicon*. 2023;230:107175. doi: 10.1016/j.toxicon.2023.107175.
37. Larréché S, Mion G, Clapson P, Debien B, Wybrecht D, Goyffon M. Neurotoxins from snake venom. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2008;27(4):310-6. doi: 10.1016/j.annfar.2008.02.010.
38. Lee CY, Chen YM, Joubert FJ. Protection by atropine against synergistic lethal effects of the Angusticeps-type toxin F7 from eastern green mamba venom and toxin I from black mamba venom. *Toxicon*. 1982;20(3):665-7. doi: 10.1016/0041-0101(82)90062-9.
39. Lewin MR, Gilliam LL, Gilliam J, Samuel SP, Bulfone TC, Bickler PE, Gutiérrez JM. Delayed LY333013 (Oral) and LY315920 (Intravenous) Reverse Severe Neurotoxicity and Rescue Juvenile Pigs from Lethal Doses of *Micrurus fulvius* (Eastern Coral Snake) Venom. *Toxins (Basel)*. 2018;10(11):479. doi: 10.3390/toxins10110479.
40. Lewin M, Samuel S, Merkel J, Bickler P. Varespladib (LY315920) Appears to Be a Potent, Broad-Spectrum, Inhibitor of Snake Venom Phospholipase A2 and a Possible Pre-Referral Treatment for Envenomation. *Toxins (Basel)*. 2016;8(9):248. doi: 10.3390/toxins8090248.
41. Liu WF. A symptomatological assessment of organophosphate-induced lethality in mice: comparison of atropine and clonidine protection. *Toxicol Lett*. 1991;56(1-2):19-32. doi: 10.1016/0378-4274(91)90086-1.
42. Lomonte B, Rey-Suárez P, Fernández J, Sasa M, Pla D, Vargas N, Bénard-Valle M, Sanz L, Corrêa-Netto C, Núñez V, Alape-Girón A, Alagón A, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon*. 2016;122:7-25. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.09.008.

43. Luo J, Chen S, Min S, Peng L. Reevaluation and update on efficacy and safety of neostigmine for reversal of neuromuscular blockade. *Ther Clin Risk Manag.* 2018;14:2397-2406. doi: 10.2147/TCRM.S179420.
44. Margres MJ, Aronow K, Loyacano J, Rokyta DR. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC Genomics.* 2013;14:531. doi: 10.1186/1471-2164-14-531.
45. Ministerio de Salud. Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos. Ministerio de Salud, Buenos Aires. 2014. ISBN: 978-950-38-0158-1.
46. Ministerio de Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde, Brasília. 2001; 112 p. ISBN: 85-7346-014-8.
47. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(18):2897-912. doi: 10.1007/s00018-008-8113-3.
48. Naphande RW, Shetti RN. Use of neostigmine after snake bite. *Br J. Anaesth.* 1977;49: 1065-1068. doi: 10.1093/bja/49.10.1065.
49. National Research Council. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission of Life Sciences. Academia Nacional de Medicina, Eds. México DF. 2002.
50. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, eighth ed. Academic Press, Washington (DC). 2011; 246 p. ISBN: 978-0-309-15401-7.
51. Olamendi-Portugal T, Batista CVF, Pedraza-Escalona M, Restano-Cassulini R, Zamudio FZ, Benard-Valle M, de Roodt AR, Possani LD. New insights into the proteomic characterization of the coral snake *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon.* 2018;153:23-31. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.08.003.
52. O'Leary MA, Kornhauser RS, Hodgson WC, Isbister GK. An examination of the activity of expired and mistreated commercial Australian antivenoms. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(9):937-42. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.11.011.
53. Organisation mondiale de la santé. Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms. Offset Publication, WHO, Geneva, 1981; 44 p.
54. Organisation mondiale de la santé. Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. 2016; 192 p.
55. Pardal PP, Pardal JS, Gadelha MA, Rodrigues Lda S, Feitosa DT, Prudente AL, Fan HW. Envenomation by *Micrurus* coral snakes in the Brazilian Amazon region: report of two cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010;52(6):333-7. doi: 10.1590/s0036-46652010000600009.
56. Ranawaka UK, Lalloo DG, de Silva HJ. Neurotoxicity in snakebite--the limits of our knowledge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Oct 10;7(10):e2302. doi: 10.1371/journal.pntd.0002302.
57. Rosso JP, Vargas-Rosso O, Gutiérrez JM, Rochat H, Bougis PE. Characterization of alpha-neurotoxin and phospholipase A2 activities from *Micrurus* venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major alpha-neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Eur J Biochem.* 1996;238(1):231-9. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0231q.x.
58. Roze JA. Coral snakes of Americas: Biology, identification and venoms. Krieger. U.S.A. 1996. 328 p. ISBN 978-0894648472.
59. Sánchez EE, Migl C, Suntravat M, Rodriguez-Acosta A, Galan JA, Salazar E. The neutralization efficacy of expired polyvalent antivenoms: An alternative option. *Toxicon.* 2019;168:32-39. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.06.216.
60. Sanz L, de Freitas-Lima LN, Quesada-Bernat S, Graça-de-Souza VK, Soares AM, Calderón LA, Calvete JJ, Caldeira CAS. Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii*, and *Micrurus surinamensis*. *Toxicon.* 2019;166:39-45. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.05.001.
61. Segura A, Castillo MC, Núñez V, Yarlequé A, Gonçalves LR, Villalta M, Bonilla C, Herrera M, Vargas M, Fernández M, Yano MY, Araújo HP, Boller MA, León P, Tintaya B, Sano-Martins IS, Gómez A, Fernández GP, Geoghegan P, Higashi HG, León G, Gutiérrez JM. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. *Toxicon.* 2010;56(6):980-9. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.07.001.
62. Singh G, Pannu HS, Chawla PS, Malhotra S. Neuromuscular transmission failure due to common krait (*Bungarus caeruleus*) envenomation. *Muscle Nerve.* 1999;22(12):1637-43. doi: 10.1002/(sici)1097-4598(199912)22:12<1637::aid-mus4>3.0.co;2-a.
63. Tan KY, Liew ST, Tan QY, Abdul-Rahman FN, Azmi NI, Sim SM, Tan NH, Khomvilai S, Sitprija V, Tan CH. Evaluating the physicochemical properties and efficacy of recently expired and aged antivenom products from Thailand and Taiwan. *Toxicon.* 2019;160:55-58. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.02.010.
64. Tanaka GD, Furtado Mde F, Portaro FC, Sant'Anna OA, Tambourgi DV. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(3):e622. doi: 10.1371/journal.pntd.0000622.
65. Trevett AJ, Lalloo DG, Nwokolo NC, Naraqi S, Kevau IH, Theakston RD, Warrell DA. Failure of 3,4-diaminopyridine and edrophonium to produce significant clinical benefit in neurotoxicity following the bite of Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995;89(4):444-6. doi: 10.1016/0035-9203(95)90051-9.
66. Vergara I, Pedraza-Escalona M, Paniagua D, Restano-Cassulini R, Zamudio F, Batista CV, Possani LD, Alagón A. Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. *J Proteomics.* 2014;105:295-306. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.027.
67. Vital Brazil O. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation (1). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1987;29(3):119-26. doi: 10.1590/s0036-46651987000300001.
68. Vital Brazil O. Sinais e sintomas neurotóxicos do envenenamento ofídico: ação do envenenamento ofídico: ação central ou periférica da peçonha das serpentes. *AMB Rev Assoc Med Bras.* 1990;36(2):63-5. PMID: 1965668.
69. Vital Brazil O, Fontana MD, Heluany NF, Laure CJ. Mode of action of the coral snake *Micrurus spixii* venom at the neuromuscular junction. *J Nat Toxins.* 1995;4(1):19-33. ISSN/ISBN: 1058-8108.
70. Vital Brazil O, Fontana MD, Pelligrini AF. Physiopathologie et thérapeutique de l'envenomation expérimentale causée para le venin de *Micrurus frontalis*. *Mem Inst Butantan.* 1976/77. 40/41, 221-40.
71. Vital Brazil O, Vieira RJ. Neostigmine in the treatment of snake accidents caused by *Micrurus frontalis*: report of two cases (1). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1996;38(1):61-7. doi: 10.1590/s0036-46651996000100012.
72. Warrell DA, Looareesuwan S, White NJ, Theakston RD, Warrell MJ, Kosakarn W, Reid HA. Severe neurotoxic envenoming by the Malayan krait *Bungarus candidus* (Linnaeus): response to antivenom and anticholinesterase. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1983;286(6366):678-80. doi: 10.1136/bmj.286.6366.678.
73. Watt G, Meade BD, Theakston RD, Padre LP, Tuazon ML, Calubaquib C, Santiago E, Ranoa CP. Comparison of Tensilon and antivenom for the treatment of cobra-bite paralysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989 Jul-Aug;83(4):570-3. doi: 10.1016/0035-9203(89)90301-5.
74. Watt G, Theakston RD, Hayes CG, Yambao ML, Sangalang R, Ranoa CP, Alquizalas E, Warrell DA. Positive response to edrophonium in patients with neurotoxic envenoming by cobras (*Naja naja philippinensis*). A placebo-controlled study. *N Engl J Med.* 1986;315(23):1444-8. doi: 10.1056/NEJM198612043152303.
75. Weis R, McIsaac RJ. Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. *Toxicon.* 1971;9(3):219-28. doi: 10.1016/0041-0101(71)90073-0.
76. Zhang G, He M, Sun T, Lee WH. Protective effects of clinical anticholinergic and anticholinesterase agents against *Bungarus multinctus* venom and neurotoxin-rich snake venoms. *PLoS Negl Trop Dis.* 2025 Dec 4;19(12):e0013759. doi: 10.1371/journal.pntd.0013759.

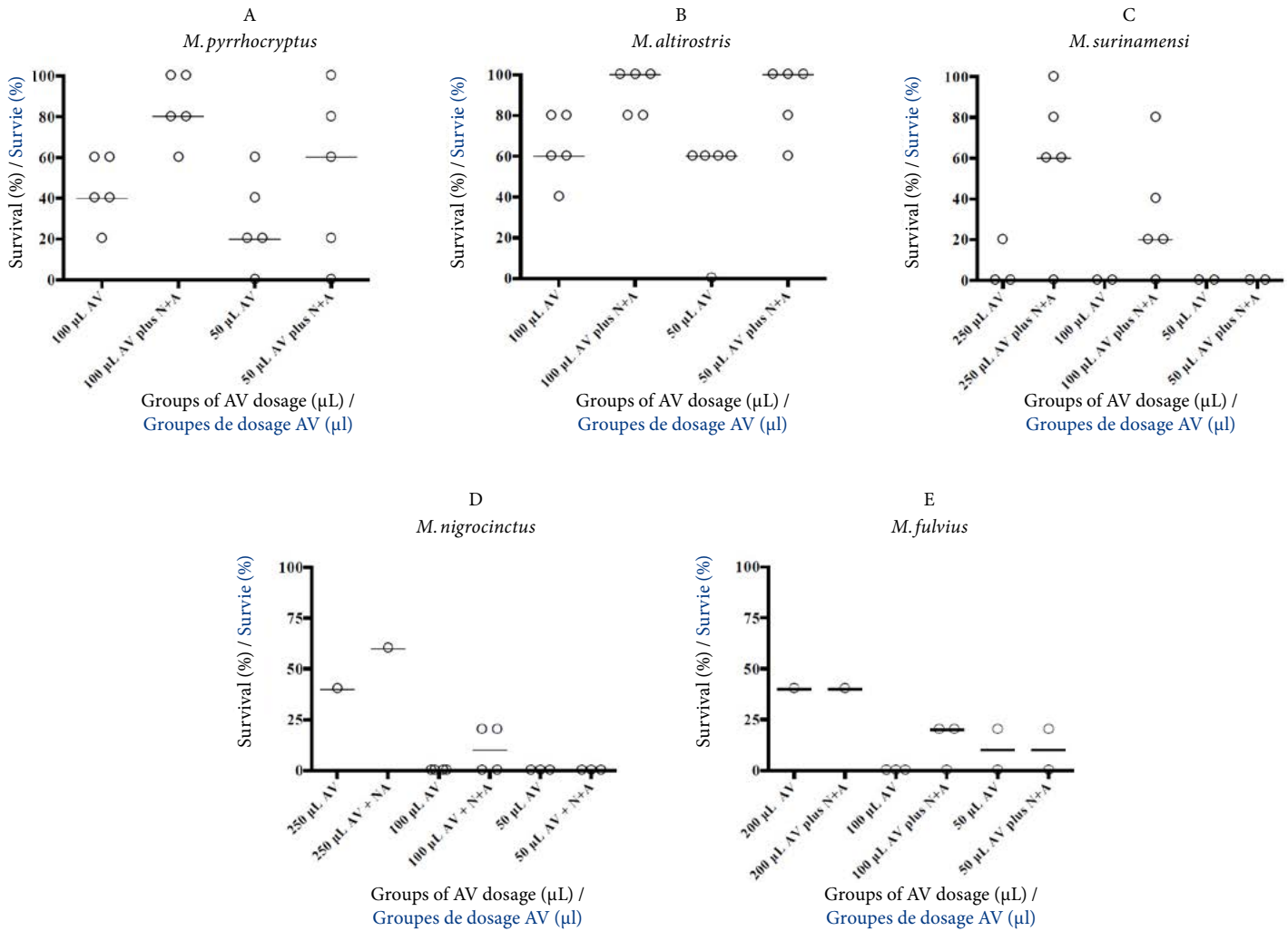
Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micurus* venoms  
Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micurus*

---

## Appendixes

### Annexes

Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micrurus* venoms  
 Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micrurus*



Appendix I: Survival (percentage) of mice challenged with 1.2 MMD of different *Micrurus* venoms and treated with AV alone or a combination of AV plus N+A

- A: *M. pyrrhocryptus* venom
- B: *M. altirostris* venom
- C: *M. surinamensis* venom
- D: *M. nigrocinctus* venom
- E: *M. fulvius* venom

Bars indicate the median survival for each group of experiments. Each point represents one experiment

Annexel: Taux de survie (en pourcentage) de souris ayant reçu une dose de 1,2 DMM de différents venins de *Micrurus* et traitées soit par AV seul, soit par une association d'AV et de N+A

- A: venin de *M. pyrrhocryptus*
- B: venin de *M. altirostris*
- C: venin de *M. surinamensis*
- D: venin de *M. nigrocinctus*
- E: venin de *M. fulvius*

Les barres indiquent la survie médiane pour chaque groupe d'expériences. Chaque point représente une expérience.

Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micurus* venoms  
Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micurus*

Appendix II: Fisher exact test of the survival of mice challenged with the different venoms and treated with different doses of AV injected alone or in combination with N+A (neostigmine plus atropin).

Annex II: Test exact de Fisher sur la survie de souris exposées à différents venins et traitées avec différentes doses d'AV, injectées seules ou en association avec N+A (néostigmine et atropine)

<i>M. pyrrhocryptus</i> / <i>M. pyrrhocryptus</i>	Use of AV Alone or with N+A 100 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 100 µl AV				Use of AV Alone or with N+A 50 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 50 µl AV					
	<i>M. pyrrhocryptus</i> / <i>M. pyrrhocryptus</i>		Deaths / Décès		Total / Total	<i>M. pyrrhocryptus</i> / <i>M. pyrrhocryptus</i>		Deaths / Décès		Total / Total
	N+A / N+A	Yes / Oui	Yes / Oui	No / Non		Yes / Oui	No / Non			
		No / Non	4	21	25	12	13	25		
	Total / Total		18	32	50	Total / Total		30	20	50
Fisher's exact test = p 0.0072 / Test exact de Fisher = p 0,0072				Fisher's exact test = p 0.0833 / Test exact de Fisher = p 0,0833						
<i>M. altirostris</i> / <i>M. altirostris</i>	Use of AV Alone or with N+A 100 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 100 µl AV				Use of AV Alone or with N+A 50 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 50 µl AV					
	<i>M. altirostris</i> / <i>M. altirostris</i>		Deaths / Décès		Total / Total	<i>M. altirostris</i> / <i>M. altirostris</i>		Deaths / Décès		Total / Total
	N+A / N+A	Yes / Oui	Yes / Oui	No / Non		Yes / Oui	No / Non			
		No / Non	2	23	25	3	22	25		
	Total / Total		11	39	50	Total / Total		16	34	50
Fisher's exact test = p 0.0374 / Test exact de Fisher = p 0,0374				Fisher's exact test = p 0.0054 / Test exact de Fisher = p 0,0054						
<i>M. surinamensis</i> / <i>M. surinamensis</i>	Use of AV Alone or with N+A 250 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 250 µl AV				Use of AV Alone or with N+A 100 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 100 µl AV					
	<i>M. surinamensis</i> / <i>M. surinamensis</i>		Deaths / Décès		Total / Total	<i>M. surinamensis</i> / <i>M. surinamensis</i>		Deaths / Décès		Total / Total
	N+A / N+A	Yes / Oui	Yes / Oui	No / Non		Yes / Oui	No / Non			
		No / Non	10	15	25	17	8	25		
	Total / Total		24	16	40	Total / Total		27	8	35
Fisher's exact test = p 0.0009 / Test exact de Fisher = p 0,0009				Fisher's exact test = p 0.074 / Test exact de Fisher = p 0,074						
<i>M. surinamensis</i> / <i>M. surinamensis</i>	Use of AV Alone or with N+A 50 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 50 µl AV									
	<i>M. surinamensis</i> / <i>M. surinamensis</i>		Deaths / Décès		Total / Total					
	N+A / N+A	Yes / Oui	Yes / Oui	No / Non						
		No / Non	10	0	10					
	Total / Total		20	0	20					
Fisher's exact test = p 1.0 / Test exact de Fisher = p 1,0										

Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micurus* venoms  
 Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micurus*

<i>M. nigrocinctus</i> / <i>M. nigrocinctus</i>	Use of AV Alone or with N+A 250 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 250 µl AV				Use of AV Alone or with N+A 100 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 100 µl AV					
	<i>M. nigrocinctus</i> / <i>M. nigrocinctus</i>		Deaths / Décès		Total / Total	<i>M. nigrocinctus</i> / <i>M. nigrocinctus</i>		Deaths / Décès		Total / Total
	N+A / N+A	Yes / Oui	Yes / Oui	No / Non	5	N+A / N+A	Yes / Oui	Yes / Oui	No / Non	20
		No / Non	2	3			3	2	20	
Total / Total		5	5	10	Total / Total		38	2	40	
Fisher's exact test = p 1.0 / Test exact de Fisher = p 1,0					Fisher's exact test = p 0.4872 / Test exact de Fisher = p 0,4872					
<i>M. nigrocinctus</i> / <i>M. nigrocinctus</i>	Use of AV Alone or with N+A 50 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 50 µl AV									
	<i>M. nigrocinctus</i> / <i>M. nigrocinctus</i>		Deaths / Décès		Total / Total					
	N+A / N+A	Yes / Oui	Yes / Oui	No / Non	15					
		No / Non	15	0		15				
Total / Total		30	0	30						
Fisher's exact test = p 1.0 / Test exact de Fisher = p 1,0										
<i>M. fulvius</i> / <i>M. fulvius</i>	Use of AV Alone or with N+A 250 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 250 µl AV				Use of AV Alone or with N+A 100 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 100 µl AV					
	<i>M. fulvius</i> / <i>M. fulvius</i>		Deaths / Décès		Total / Total	<i>M. fulvius</i> / <i>M. fulvius</i>		Deaths / Décès		Total / Total
	N+A / N+A	Yes / Oui	Yes / Oui	No / Non	5	N+A / N+A	Yes / Oui	Yes / Oui	No / Non	15
		No / Non	3	2			3	2	15	
Total / Total		6	4	10	Total / Total		28	2	30	
Fisher's exact test = p 0.7401 / Test exact de Fisher = p 0,7401					Fisher's exact test = p 0.4828 / Test exact de Fisher = p 0,4828					
<i>M. fulvius</i> / <i>M. fulvius</i>	Use of AV Alone or with N+A 50 µl AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 50 µl AV									
	<i>M. fulvius</i> / <i>M. fulvius</i>		Deaths / Décès		Total / Total					
	N+A / N+A	Yes / Oui	Yes / Oui	No / Non	10					
		No / Non	9	1		10				
Total / Total		18	2	20						
Fisher's exact test = p 1.0 / Test exact de Fisher = p 1,0										

Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micurus* venoms  
Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micurus*

Appendix III: A. Survival of mice challenged with *M. pyrrhocryptus* venom and treated with 50  $\mu$ L of AV alone or with the addition of N+A. Data from the ED<sub>50</sub> studies.

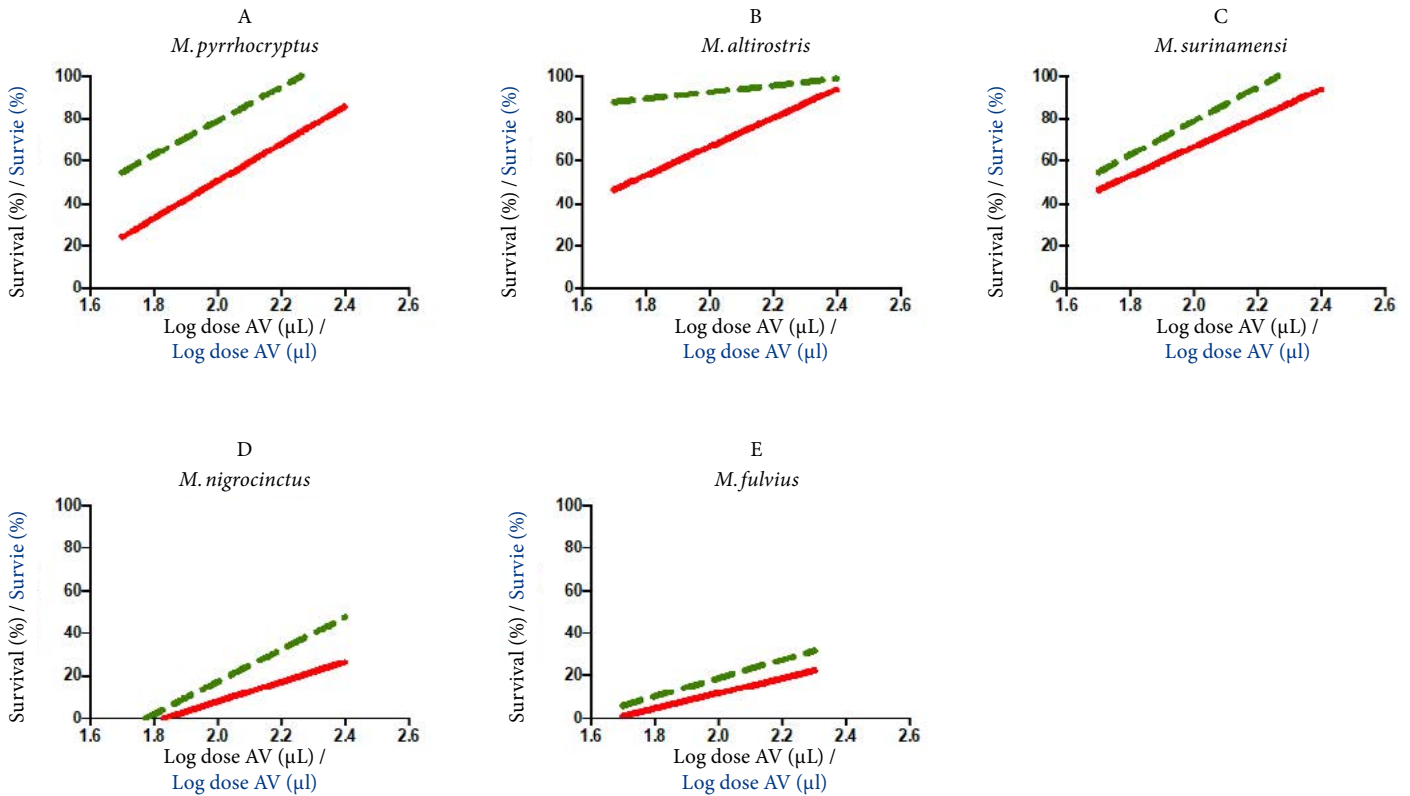
B. Survival of mice challenged with *M. pyrrhocryptus* venom and treated with 50  $\mu$ L of AV alone or with the addition of N+A. Data from the ED<sub>50</sub> (n=30) studies and from the challenge with fixed doses (n= 50)

Annexe III: A. Taux de survie des souris exposées au venin de *M. pyrrhocryptus* et traitées avec 50  $\mu$ l d'AV seul ou en association avec N+A. Données issues des tests de DE<sub>50</sub>.

B. Survie des souris exposées au venin de *M. pyrrhocryptus* et traitées avec 50  $\mu$ l d'AV seul ou avec l'ajout de N+A. Données issues des tests de DE<sub>50</sub> (n = 30) et de l'exposition à des doses fixes (n = 50)

A		Use of AV Alone or with N+A 50 $\mu$ l AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 50 $\mu$ l AV			
		<i>M. pyrrhocryptus</i> / <i>M. pyrrhocryptus</i>		Deaths / Décès	
M. pyrrhocryptus data from ED <sub>50</sub> using 50 $\mu$ l of AV / Données relatives à M. pyrrhocryptus issues de l'ED <sub>50</sub> obtenues à partir de 50 $\mu$ l d'AV	N+A / N+A	Yes / Oui	Yes / Oui	No / Non	15
		No / Non	14	1	
	Total / Total	22	8	30	
Fisher's exact test = p 0.0352 / Test exact de Fisher = p 0,0352					
B		Use of AV Alone or with N+A 50 $\mu$ l AV / Utilisation de l'AV seul ou avec N+A 50 $\mu$ l AV			
		<i>M. pyrrhocryptus</i> / <i>M. pyrrhocryptus</i>		Deaths / Décès	
M. pyrrhocryptus all data using 50 $\mu$ l of AV / Toutes les données relatives à M. pyrrhocryptus obtenues à partir de 50 $\mu$ l d'AV	N+A / N+A	Yes / Oui	Yes / Oui	No / Non	45
		No / Non	27	8	
	Total / Total	47	33	80	
Fisher's exact test = p 0.0032 / Test exact de Fisher = p 0,0032					

Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micurus* venoms  
 Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micurus*



Appendix IVa: Linear regression of the relationship between log transformed AV doses (in µL) and median survival (%) of mice challenged. Solid lines represent the response to AV alone, while the dashed lines represent the response to AV plus N+A. In all cases, the combination of AV with N+A, required lower AV doses than using the AV alone to produce the same effect.

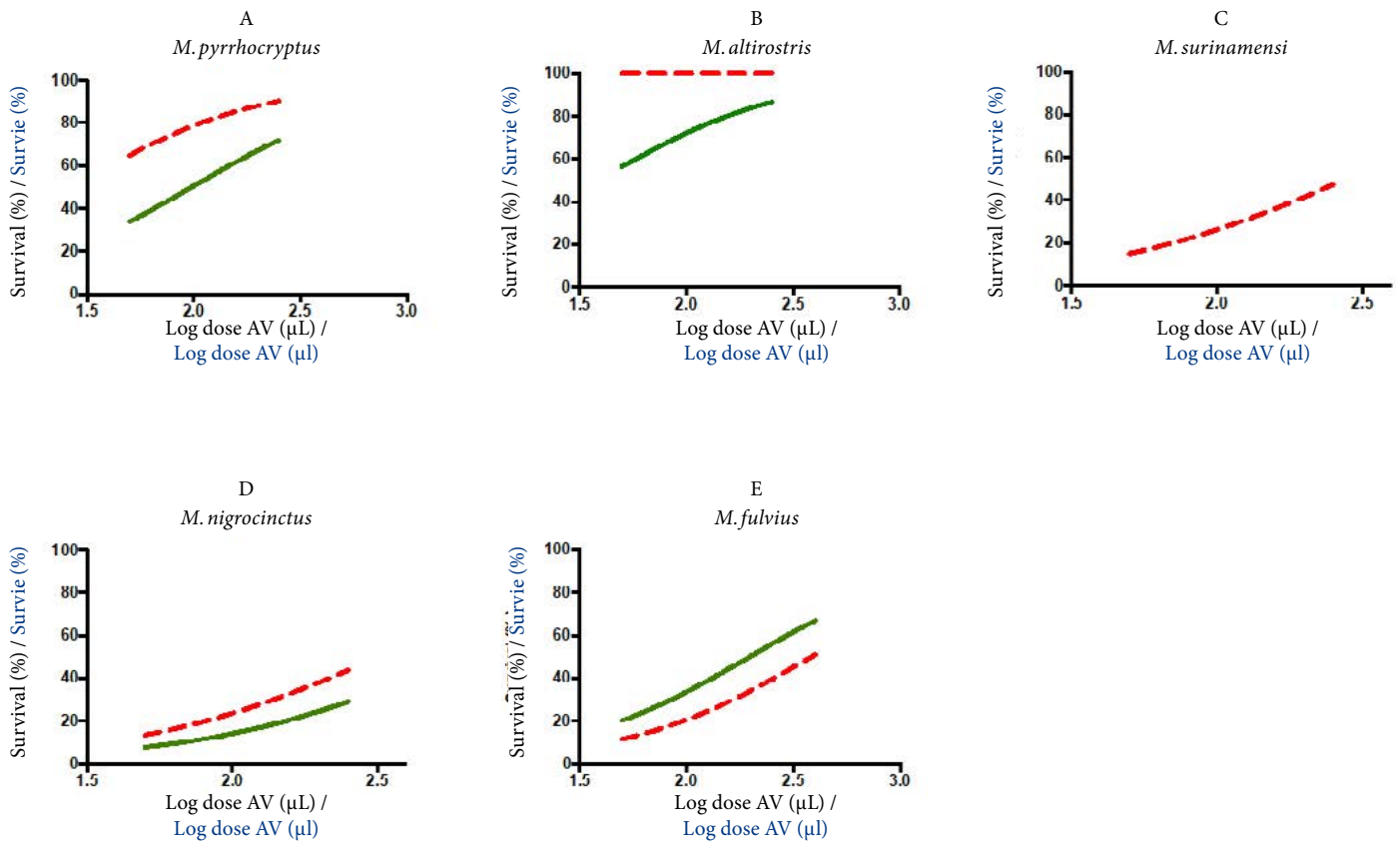
Annexe IVa: Régression linéaire de la relation entre les doses d'AV transformées en logarithmes (en µL) et la survie médiane (%) des souris exposées. Les lignes pleines représentent la réponse à l'AV seul, tandis que les lignes pointillées représentent la réponse à l'AV associé à N+A. Dans tous les cas, l'association de l'AV et de N+A a nécessité des doses d'AV plus faibles que celles requises par l'AV seul pour produire le même effet.

Appendix IVb: Regression values and p-values for the results presented in 4.a. In the case of *M. altirostris* and *M. surinamensis* venoms, the low R<sup>2</sup> and p-values are attributable to the high (for *M. altirostris*) or low (for *M. surinamensis*) response observed at the AV doses used.

Annexe IVb: Valeurs de régression et valeurs p pour les résultats présentés au point 4.a. Dans le cas des venins de *M. altirostris* et de *M. surinamensis*, les faibles valeurs de R<sup>2</sup> et p s'expliquent par la réponse élevée (pour *M. altirostris*) ou faible (pour *M. surinamensis*) observée aux doses d'AV utilisées.

Venom / Venin	Treatment / Traitement	R <sup>2</sup> / R <sup>2</sup>	p / p
<i>M. pyrrhocryptus</i>	AV plus N+A / AV plus N+A	0.6155	0.0005
	AV alone / AV seul	0.5108	0.0135
<i>M. altirostri</i>	AV plus N+A / AV plus N+A	0.0676	0.4399
	AV alone / AV seul	0.3608	0.0507
<i>M. surinamensis</i>	AV plus N+A / AV plus N+A	0.3651	0.0374
	AV alone / AV seul	0.1980	0.3297
<i>M. nigrocinctus</i>	AV plus N+A / AV plus N+A	0.7265	0.0072
	AV alone / AV seul	0.6100	0.0221
<i>M. fulvius</i>	AV plus N+A / AV plus N+A	0.7542	0.0112
	AV alone / AV seul	0.6213	0.0352

Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micurus* venoms  
 Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micurus*



Appendix V: Non-Linear regression of the relationship between log transformed AV doses (in  $\mu\text{L}$ ) and median survival (%) of mice challenged. Solid lines represent the response to AV alone, while the dashed lines represent the response to AV plus N+A. In all cases, lower AV doses were required to produce the same effect (Table III).

Annexe V: Régression non linéaire de la relation entre les doses d'AV transformées en logarithmes (en  $\mu\text{l}$ ) et la survie médiane (%) des souris exposées. Les lignes pleines représentent la réponse à l'AV seule, tandis que les lignes pointillées représentent la réponse à l'AV associée à N+A. Dans tous les cas, des doses d'AV plus faibles ont été nécessaires pour obtenir le même effet (Tableau III).

Usefulness of the combination of a single dose of neostigmine-atropine plus antivenom on the experimental treatment of the envenomation caused by *Micrurus* venoms  
Utilité de l'association d'une seule dose de néostigmine-atropine et d'un antisérum dans le traitement expérimental de l'envenimation causée par les venins du genre *Micrurus*

Appendix VI: ED<sub>50</sub> and T-MED of the AV with or without N+A. In all cases, both the actual values and the theoretical values obtained from the rescue experiments fell within the range of the 95% confidence intervals. ND = not determined

Annexe VI: DE<sub>50</sub> et T-MED de l'AV, avec ou sans N+A. Dans tous les cas, tant les valeurs réelles que les valeurs théoriques obtenues à partir des expériences de sauvetage se situaient dans l'intervalle de confiance à 95 %. ND = non déterminé

Venom / Venin	Neutralization / Neutralisation			
	ED <sub>50</sub> / ED <sub>50</sub>		T-MED / T-MED	
	AV plus N+A (µl) / AV plus N+A (µl)	AV alone (µl) / AV seul (µl)	AV plus N+A (µl) / AV plus N+A (µl)	AV alone (µl) / AV seul (µl)
<i>M. pyrrhocryptus</i>	59 (47 - 74)	94 (81 - 108)	40 (25 - 65)	106 (61 - 184)
<i>M. altirostri</i>	16 (9 - 28)	55 (46 - 67)	ND / ND	44 (very wide) / (très large)

Appendix VII: Percentage of α-neurotoxins (3-FTx) and phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) of the venoms from *Micrurus* species used in this study, and their relation. Data of percentage were obtained from proteomic studies (see Discussion).

Annexe VII: Pourcentage d'α-neurotoxines (3-FTx) et de phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) dans les venins des espèces du genre *Micrurus* utilisées dans cette étude, et leur relation. Les données relatives aux pourcentages ont été obtenues à partir d'études protéomiques (voir Discussion)

Venom / Venin	Percentage in the venom / Pourcentage dans le venin		Ratio / Ratio	
	3-FTx / 3-FTx	PLA <sub>2</sub> / PLA <sub>2</sub>	3-FTx/PLA <sub>2</sub> / 3-FTx	PLA <sub>2</sub> /3-FTx / PLA <sub>2</sub> /3-FTx
<i>M. nigrocinctus</i>	38	48	0.79	1.26
<i>M. fulvius</i>	24.9	58.3	0.43	2.34
<i>M. surinamensis</i>	95.4	4.2	22.7	0.04
<i>M. pyrrhocryptus</i>	27	17	1.59	0.63
<i>M. altirostris</i>	79.5	13.7	5.8	0.17