

CARACTERIZACIÓN DE LA FLORA BACTERIANA PATÓGENA, PRESENTE EN LA CAVIDAD BUCAL DE VÍBORAS EN EL SERPENTARIO DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL DE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA.

Eliana Henao*, **Julie Latorre***, **Clara Muñoz****, **Liliana Caldas*****,
Sonia Delgado****, **Santiago Ayerbe*******

RESUMEN

Se realizó la caracterización de la flora bacteriana bucal en serpientes venenosas de la familia Viperidae, subfamilia Crotalinae, géneros Bothrops, Crotalus y Lachesis, mantenidas en cautiverio en el Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca con el objetivo de identificar las cepas presentes en este sitio anatómico y establecer los patrones de sensibilidad frente a algunos antibióticos de uso frecuente en nuestro medio para las infecciones producidas por estos microorganismos. Todas las bacterias aisladas son consideradas patógenas para el ser humano y los resultados hasta ahora obtenidos permiten sugerir el uso de Amikacina y/o Ciprofloxacina junto a Penicilina Cristalina en los tratamientos profilácticos de las víctimas de Ofidismo.

Palabras clave: Antibiograma, Cauca, flora bacteriana bucal, ofidismo, *Bothrops asper*, *B. punctatus*, *Crotalus durissus cumanensis*, *Lachesis acrochorda*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus sp.*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Peptostreptococcus sp.* Popayán, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*.

Recibido para evaluación: diciembre 17 de 2004. Aprobado para publicación: enero 28 de 2005.

- * Estudiantes de Biología Universidad del Cauca, Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT)
** Estudiante de Biología Unicauca, Grupo de Estudios en Manejo de Vida Silvestre y Conservación (GEMAVIC).
*** Bacterióloga Especialista en Microbiología Médica, Docente Facultad de Ciencias de la Salud, Unicauca
**** Bacterióloga Hospital Universitario Nivel III "San José", Popayán (Colombia), Docente Facultad de Ciencias de la Salud, Unicauca
***** Coordinador GIHT, Profesor de Toxinología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca.

INTRODUCCIÓN

Se conoce que las bacterias gracias a su ubicuidad pueden habitar diferentes medios, uno de ellos -muy importante- es la boca de las serpientes venenosas, donde múltiples investigaciones comprueban la colonización de gran variedad de microorganismos tanto aerobios como anaerobios (1,2,3,4,5,6,7), que en el momento de una mordedura de serpiente u ofidismo, pueden desencadenar en el paciente serias complicaciones secundarias a infecciones bacterianas (8). Las serpientes que viven en cautiverio son responsables de un significativo número de mordeduras y entre sus víctimas se encuentran herpetólogos, personal auxiliar de serpentarios, veterinarios, biólogos, estudiantes, guardas de zoológico (9), coleccionistas, encantadores de serpientes, culebreros, etcétera. Por lo anterior, son muy importantes las investigaciones que permitan no solo conocer las bacterias potencialmente responsables de estas infecciones sino sus patrones de sensibilidad y así sugerir la profilaxis antibiótica más apropiada a seguir.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron las cepas bacterianas presentes en la cavidad bucal de cuatro especies de serpientes de la subfamilia *Crotalinae* (Tabla 1).

Muestreo. Se realizó un muestreo en septiembre de 2004, a cuatro serpientes determinadas como *Bothrops asper* (Garman, 1883)(10,11), *B. punctatus* (García, 1896) (10), *Crotalus durissus cumanensis* Humboldt, 1833 (11) y *Lachesis acrochorda* (García, 1896)(10). Al espécimen de *B. punctatus* le había sido practicado un muestreo cuatro meses antes (mayo de 2004). Las muestras fueron tomadas empleando un inmovilizador de extracción (figura 1), pinzas e hisopos estériles (figura 2) e inmediatamente se sembraron en medios de cultivo sólidos como agar sangre, agar Mc-Conkey y agar Fenil Etil Alcohol (FEA), también se emplearon medios de cultivo líquidos como el caldo de infusión cerebro-corazón. Adicionalmente, a las muestras obtenidas se les practicó un extendido para la aplicación de la tinción de Gram.

Factores de crecimiento. Los medios de cultivo se prepararon siguiendo las indicaciones de los fabricantes. El tiempo de incubación para aislar bacterias aerobias fue entre 24 y 48 horas. Para anaerobios fue de 72 horas y se utilizaron sobres productores de atmósfera anaeróbica.

Identificación final y perfil de sensibilidad. Para continuar con el proceso de identificación bacteriana se utilizaron dos tipos de sistemas: manual y semiautomatizado, los cuales contienen sustratos que permiten detectar las reacciones bioquímicas de cada microorganismo de acuerdo a su fisiología.

Tabla 1. Características de las Serpientes en estudio.

Nombre Científico	<i>Bothrops asper</i> (Garman, 1883)	<i>B. punctatus</i> (García, 1896)	<i>Crotalus durissus cumanensis</i> Humboldt, 1833	<i>Lachesis acrochorda</i> (García, 1896)
Nombre Vulgar	Equis Negra ó Terciopelo	Equis Orito ó Rabo de Chucha	Cascabel	Verrugoso, Montuno ó Pudrídora
Distribución Geográfica	Chocó	Chocó	Valle del río Magdalena, norte de la Costa Atlántica y Llanos Orientales.	Chocó Biogeográfico, Valles bajos de los ríos Cauca y Magdalena
Distribución Altitudinal	0 – 1700 msnm	0 – 1500 msnm	0 – 2500 msnm	0 – 1000 msnm
Ingreso al MHNUC	Julio de 2002	Febrero de 2002	Octubre de 1999	Septiembre de 2004
Procedencia	Huisitó, El Tambo (Cauca) 1200 msnm.	Huisitó, El Tambo (Cauca) 1200 msnm.	Decomiso de la CRC en Popayán	Honduras, El Tambo (Cauca) 250 msnm.

*Corporación Autónoma Regional del Cauca

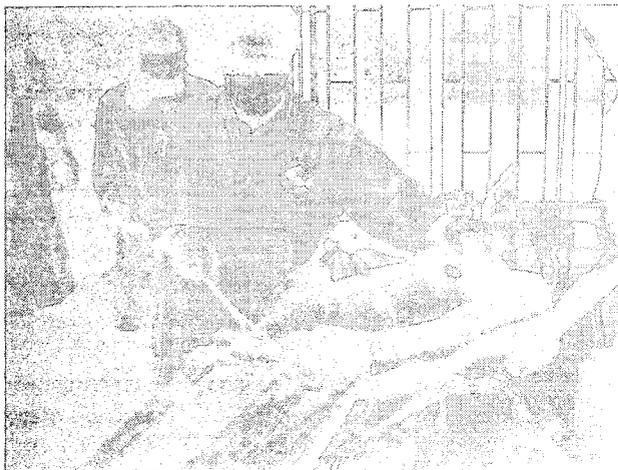


Figura 1. Inmovilización de *L. acrochorda*

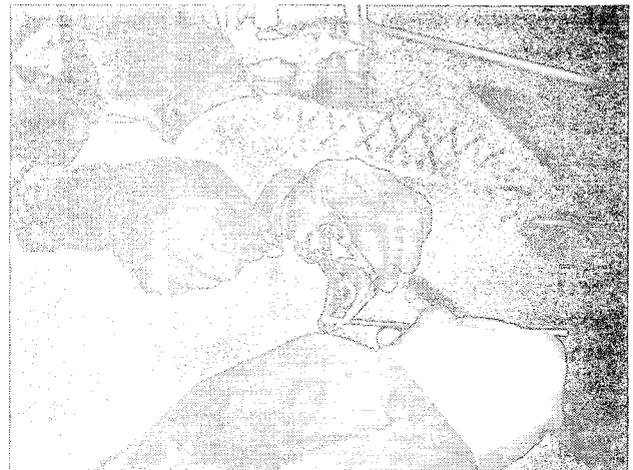


Figura 2. Toma de frotis a *C. d. cumanensis*

Finalmente a cada especie identificada se le realizó el Antibiograma con la técnica de Kirby Bauer para establecer la sensibilidad o resistencia a determinados antibióticos. Tanto la aplicación de la técnica como la selección de los sensidiscos se realizó según los lineamientos del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)

RESULTADOS

Para *B. asper* en la tinción de Gram se observaron bacilos Gram negativos escasos y en el cultivo se aisló *Morganella morganii*. Se determinó su perfil de sensibilidad antibiótica. (Tabla 2) No se aislaron bacterias anaerobias.

En el frotis de la boca de *B. punctatus* la tinción de Gram mostró cocobacilos Gram negativos y cocos Gram positivos. En el cultivo se aislaron inicialmente *Aeromonas*

hydrophila + *Staphylococcus saprophyticus* y en un segundo inuestreo creció *Pseudomonas aeruginosa* para la cual se determinó su perfil de sensibilidad antibiótica (Tabla 3) Como bacteria anaerobia se aisló *Peptostreptococcus sp.*

En la muestra bucal de *C. d. cumanensis* la tinción de Gram permitió ver bacilos Gram negativos escasos y en el cultivo se aislaron *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter koseri* para los cuales se determinaron los respectivos perfiles de sensibilidad antibiótica (Tablas 4 y 5). Se aisló *Peptostreptococcus sp.* como única flora anaerobia.

En la tinción de Gram practicada al frotis bucal de *Lachesis acrochorda* se observaron cocobacilos Gram negativos escasos y en el cultivo se aisló *Staphylococcus aureus* cuyo sensibilidad antibiótica fue determinada (Tabla 6) También se aisló *Bacillus sp.* pero no se aislaron bacterias anaerobias.

Tabla 2. Antibiograma para *M. morganii*

Serpiente	Agente aislado	Sensibilidad Antibiótica	Sensibilidad Antianerobio	Resistencia
<i>B. asper</i>	<i>M. morganii</i>	Amikacina	Asitronam	Ampicilina
		Ceftiazona		Ampicilina/sulbactam
		Ciprofloxacina		Cefalotina
		Imipenem		
		TMP-S		

* Trimetoprim-sulfamethoxazole

Tabla 4. Antibiograma para *K. pneumoniae*

Serpiente	Agente aislado	Sensibilidad Antibiótica	Resistencia
		Amikacina	Ampicilina
		Ampicilina/sulbactam	
		Aztreonam	
<i>C. d. cumanensis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Cefalotina	
		Ceftriaxona	
		Ciprofloxacina	
		Imipenem	
		TMP-S	

Tabla 5. Antibiograma para *C. koseri*

Serpiente	Agente aislado	Sensibilidad Antibiótica	Resistencia
		Amikacina	Ampicilina
		Ampicilina/sulbactam	
		Aztreonam	
<i>C. d. cumanensis</i>	<i>C. koseri</i>	Cefalotina	
		Ceftriaxona	
		Ciprofloxacina	
		Imipenem	
		TMP-S	

Tabla 6. Antibiograma para *S. aureus*

Serpiente	Agente aislado	Sensibilidad Antibiótica	Sensibilidad Intermedia	Resistencia
		Amikacina	Clindamicina	Ninguna
		Ampicilina/sulbactam	Penicilina	
		Ciprofloxacina		
		Eritromicina		
<i>L. acrochorda</i>	<i>S. aureus</i>	Gentamicina		
		Oxacilina		
		Rifampicina		
		TMP-S		
		Vancomicina		

DISCUSIÓN

Los terrarios que albergan las serpientes, su alimentación, el tiempo de cautiverio y el contacto de su lengua con el medio externo influyen en el tipo de flora bacteriana bucal(1). También se especula que la flora bucal de las serpientes refleja la flora fecal de su presa (2); por ello en un caso se tomó una muestra aislada de heces de un ratón (*Mus musculus*) del utilizado como alimento de las serpientes y se aisló *K. pneumoniae*, cepa que también se aisló de la cavidad bucal de *C. d. cumanensis*, lo que hace pensar que esta hipótesis sea cierta; sin embargo debe hacerse un estudio con muestreo estadísticamente más significativo.

Entre el muestreo inicial realizado a *B. punctatus* y el final, no se encuentra similitud alguna, debido a que la flora bacteriana bucal puede variar por causa del ambiente (3).

Tradicionalmente se ha recomendado el uso de Penicilina Cristalina como profiláctico para anaerobios del género *Clostridium* en ofidismo procedente del medio natural (6,7,8) y parece continuar teniendo vigencia pues casi no se reportan sobreinfecciones por *Clostridium sp.* en pacientes que han recibido este antibiótico (8); sin embargo vemos que las cepas de Gram negativos y algunos Gram positivos presentes en la boca de las serpientes aparecen en el 20% de los abscesos que complican a los pacientes, indicando que no fueron sensibles a la Penicilina (8).

En vista de lo anterior se propone el uso combinado de Penicilina Cristalina y Amikacina y/o Ciprofloxacina para Ofidismo procedente tanto de los sitios de confinamiento artificial como aquellos del medio natural, por ausencia de resistencia de los Clostridios y los otros gérmenes a Penicilina y/o Amikacina/Ciprofloxacina respectivamente. La sensibilidad observada en medios de confinamiento artificial frente a algunos antimicrobianos tiene validez temporal debido a la capacidad de las bacterias para desarrollar mecanismos de resistencia.

Las especies encontradas para *B. punctatus* como *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* y *Peptostreptococcus*, pueden ser agentes etiológicos de infección primaria y secundaria para el hombre (4). *A. hydrophila* causa bacteriemias, mionecrosis y celulitis y *P. aeruginosa* produce infecciones de heridas o puede penetrar a través de soluciones de continuidad insignificantes en la piel. Si la cantidad presente en el torrente circulatorio es suficientemente grande, puede ocasionar bacteriemias. Esta bacteria se adhiere al epitelio intacto normal y no lo vulnera (12), pero es un

germen oportunista en presencia de heridas o laceraciones y ha sido aislado de la boca de diferentes serpientes(1).

M. morgani fue aislada de cavidades bucales de serpientes (1,5) y venenos de *B. asper* y *C. durissus* (6), además, este microorganismo es un agente etiológico de infección secundaria (4)

K. pneumoniae es causa común de neumonía lobar, también se asocia con cuadros respiratorios menos severos como bronquitis y se aísla con frecuencia en infecciones nosocomiales tales como infección urinaria y bacteriemia (13). Fue aislado de la orofaringe de serpientes² y de su flora bacteriana buca (11). Esta bacteria puede producir choque séptico y coagulación intravascular diseminada (CID)(16). En casos de aislamiento de *Klebsiella sp.* y *P. aeruginosa*, es recomendable realizar la prueba para Betalactamasas de espectro extendido, el cual no se aplicó por limitaciones de orden técnico

Las especies de bacterias del género *Citrobacter* causan infecciones respiratorias y urinarias, principalmente en ambientes hospitalarios (13) y *S. aureus* produce mastitis e infecciones de heridas y quemaduras además de piodermatitis (14); este microorganismo fue aislado de la flora bacteriana bucal de serpientes (5), de abscesos post-ofidismo (8) y en ocasiones es un agente etiológico de infección secundaria (4).

En el género *Bacillus*, la especie *B. anthracis* causa carbunco ó ántrax, la puerta de entrada de la infección es cutánea dando lugar a una lesión característica, desde donde puede producir sepsis (15); sin embargo en el presente estudio no se logró caracterizar la especie aislada.

Peptostreptococcus se aísla a partir de la placa subgingival, y es causante de piorrea e infecciones de canales radiculares (15). Es difícil correlacionar esta especie de bacteria con procesos infecciosos post-mordedura salvo quizá en la muy rara excepción de mordedura en la boca como ocurrió hace varios años en una paciente mordida por una *B. schlegelii* en la lengua (17) y que falleció antes de 6 horas, obviamente sin que hubiera alcanzado a hacer una infección por bacterias.

Hasta el momento en el presente estudio no se han encontrado bacterias anaeróbicas como *Clostridium*, sin embargo, sí se han aislado de la boca de *Bothrops jararaca* en Brasil (5), del veneno de cuatro especies de *Bothrops* *Cos-tarricenses* (7) y de la boca y el veneno de otras serpientes de Costa Rica (6).

CONCLUSIONES

En la cavidad bucal de las serpientes estudiadas, mantenidas en cautiverio, se encuentran diversos microorganismos con predominio de bacilos Gram negativos seguido por cocos Gram positivos, potencialmente patógenos para el ser humano.

En este estudio las floras bacterianas aerobia y anaerobia facultativa encontradas en las serpientes, fueron diferentes para cada especie y la mayoría de estas bacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son microorganismos que hacen parte de la flora normal del intestino grueso de animales y del hombre.

La flora bacteriana bucal de las serpientes depende de factores como; condiciones de cautiverio, el alimento y el medio ambiente en general.

En la manipulación de las serpientes y los procedimientos microbiológicos es importante la antisepsia para evitar la proliferación de microorganismos saprofitos y potencialmente patógenos.

Es importante conocer las bacterias presentes en la cavidad bucal de las serpientes así como el antibiograma para establecer el antibiótico de elección en el manejo profiláctico aumentando así la eficacia en el tratamiento del ofidismo.

Los microorganismos inoculados en la mordedura representan complicaciones en el cuadro clínico del paciente, pudiendo causar las peores secuelas incluso la muerte, independiente del mismo veneno inoculado.

RECOMENDACIONES

Realizar un estudio estadísticamente significativo de las heces de los ratones con los que se alimentan las serpientes.

Se debe continuar con la caracterización de la flora bacteriana bucal de otras serpientes que se hallan en cautiverio para establecer los cambios operados en las colonias durante su vida útil en el serpentario comparadas con las cepas aisladas a su ingreso.

Realizar estudios bacteriológicos a partir del sitio de la mordedura a todos los pacientes con ofidismo previamente a la iniciación del tratamiento antibiótico profiláctico.

AGRADECIMIENTOS

Al Taxidermista Jaime Ramírez Mosquera, al Biólogo Jimmy Alexander Guerrero Vargas, Mgr. Mariana Valencia a los estudiantes Francia Arrieta, Andrea Coronel, Andrés Chantre, Armando Folleco estudiantes de Biología y Agrozootecnia de la Universidad del Cauca, quienes colaboraron eficazmente en los muestreos. Al Laboratorio de Herpetología e Ictiología del MHNUC, al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud y al Laboratorio de Biología de Universidad del Cauca.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blaylock R S M. Normal Oral Bacterial Flora From Some Southern African Snakes. *The Onderstepoort J of Vet Res* 2001; 68(3):175-182.
2. Goldstein E J C, Agyare E O, Vagvolgyi A E and Halpern M. Aerobic Bacterial Oral Flora of Garter Snakes: Development of Normal Flora and Pathogenic Potential for Snakes and Humans. *J Clin Microbiol* 1981; 13(5):954-956.
3. Soveri T and Seuna E R. Aerobic Oral Bacteria in Healthy Captive Snakes. *Acta Vet Scand* 1986; 27:172-181.
4. Avila-Agüero M L, Valverde K, Gutierrez J, Paris M M and Faingezicht, I. Venomous Snakebites in Children and Adolescents: a 12 Years Retrospective Review. *J Venom Anim Toxins* 2001; 7(1):69-84.
5. Jorge M T, Mendonça J S, Ribeiro LA, Da Silva MLR, Kusano E J U e Cordeiro C L. Flora Bacteriana da Cavidade Oral, Presas e Veneno de *Bothrops jararaca*: Possível Fonte de Infecção no Local da Picada. *Rev Inst Med Trop* 1990; 32(1):6-10.
6. Arroyo O, Bolaños R and Muñoz G. The Bacterial Flora of Venoms and Mouth Cavities of Costa Rican Snakes. *Bull Pan Am Health Organ* 1980; 14(3):280-285.
7. Bruncker T y Fernández B. Clostridios Aislados de Venenos de Culebras Costarricenses. *Acta Médica Cost.* 1974;17(2):147-152.
8. Ayerbe S. Tratamiento del Ofidismo en el Departamento del Cauca, Colombia. *Rev Fac Cienc Salud Univ Cauca*.3(1): 20-26.2001.
9. Fanti-Echegoyen E. Manual de Trabajo y Seguridad en un Herpetario. Herpetario del Zoológico de Guadalajara, Lab. de Herpetología CUCBA, Univ. Guadalajara, México. Memorias Curso – Taller: Diseño, Manejo de Herpetarios y Tratamiento del Accidente Ofídico: Barranquilla. 2001; 60 pp.

10. **Campbell J A** And **Lamar W W**. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. 2nd ed. Ithaca – London: Comstock Publ. Co./Cornell Univ. Press; 2004. pp. 406-407; 436-439; 442-444.
11. **Peters J A** and **Donoso-Barros R**. Catalogue of the Neotropical Squamata. Part I. Snakes. 2nded. Washington, D.C.: Smithsonian Institution; 1986. pp. 43; 75-76.
12. **Toder D S**. *Pseudomonas aeruginosa*: Patógeno Ubicuo. En Schaechter M, Medoff G, Eifentein B L y Guerra H 2^a ed.. Microbiología Mecanismos de las Enfermedades Infecciosas. Enfoque Mediante la Resolución de Problemas. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1994; 218-309.
13. **Restrepo M A**, **Robledo R J**, **Bedoya E V I**, **Restrepo I M**, **Botero R D**, **Leiderman W E**, *et al*. Fundamentos de Medicina. Enfermedades Infecciosas. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 1996. pp. 44, 97, 117, 133-134, 192-193, 199, 202, 423, 425, 437-438.
14. **Tally F P**. Estafilococos: Abscesos y Otras Enfermedades. En Schaechter M, Medoff G, Eifentein B L y Guerra H 2^a ed.. Microbiología Mecanismos de las Enfermedades Infecciosas. Enfoque Mediante la Resolución de Problemas. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1994; 207-217.
15. **Ureña J L**. Microbiología Oral. 2^a ed. México: Interamericana Mc-Graw-Hill; 1997. pp. 202-210.
16. **Ayerbe S**. Ofidismo en Colombia. Enfoque, Diagnóstico y Tratamiento. En: Ordóñez C A, Ferrada R y Buitrago R. 1^a ed. Cuidado Intensivo y Trauma. Bogotá, D.C. Ed. Distribuna Ltda.. 2002; 766.
17. **Ayerbe S**, **Paredes A** y **Gálvez D**. Estudio Retrospectivo Sobre Ofidiotoxicosis en el Departamento del Cauca. 2^a Parte. Aspectos Clínicos, Epidemiológicos y Complicaciones *Cuad Med Popayán (Col.)*1979; 4(1-2):33-43.