

IDENTIFICACIÓN DE LA FLORA BACTERIANA ASOCIADA A LA CAVIDAD ORAL EN EJEMPLARES CAUTIVOS DE CASCABEL SURAMERICANA (*Crotalus durissus*)

Identification of the bacterial flora associated with the oral cavity on captive specimens of southamerican rattlesnake (*Crotalus durissus*)

Fernando Ignacio Ortiz-Suarez^{1*}, Luis Hernando Ortegón-Cardenas², Yuly Lorena Ortega-Bolaños³ y Luis Alejandro Toledo-Brausin⁴

¹Zootecnista, Mg. Ciências Biológicas Instituto Nacional De Pesquisas Da Amazônia, docente de la Universidad de la Amazonia.

²Microbiólogo. Magister en Docencia Universidad de la Salle. (Q.E.P.D).

³Biólogo con énfasis en Biorrecursos. Universidad de la Amazonia.

⁴Biólogo con énfasis en Biorrecursos. Universidad de la Amazonia.



Recibido 15 de enero de 2016.
Aceptado 20 de abril de 2016.

Autor para Correspondencia*:
ferigorsu1961@hotmail.com

Como citar:

ORTIZ-SUAREZ, Fernando, I., et al. Identificación de la flora bacteriana asociada a la cavidad oral en ejemplares cautivos de cascabel suramericana (*Crotalus durissus*). *Revista Facultad Ciencias Agropecuarias – FAGROPEC*, Universidad de la Amazonia, Florencia – Caquetá. 8(1). Pp. 25 – 29. Enero – Junio de 2016.

Resumen

En consideración a la elevada partición de serpientes de la familia Viperidae en accidentes ofídicos, en los que con frecuencia se registran infecciones bacterianas secundarias a la mordedura e inoculación de venenos, el presente estudio tuvo como objetivo central la determinación de la variabilidad de especies de bacterias alojadas en la cavidad bucal de serpientes del género *Crotalus* (Ophidia: Viperidae) mantenidas en cautiverio en el Serpentario de la Universidad de la Amazonia durante el año 2010, mediante el análisis de muestras obtenidas por hisopados bucales. Para el mismo fueron identificadas 13 cepas bacteriológicas, algunas de las cuales han sido reportadas como posibles patógenos para humanos.

Palabras clave: serpiente, viperidae, veneno, bacteria y gram.

Abstract

In consideration of the high partition of snakes of the Viperidae family in snakebites, in which bacterial infections secondary to the bite and inoculation of poisons are often recorded, the present study had, as its central objective, the determination of the variability of species of bacteria housed in the oral cavity snakes of the genus *Crotalus* (Ophidia: Viperidae) held captive in the Serpentarium of the University of the Amazon in 2010, by analyzing samples taken by mouth swabs. For the same bacteriological 13 strains were identified, some of which have been reported as potential human pathogens

Key words: snake, viperidae, poison, bacteria and gram

Introducción

En la actualidad se conocen cerca de 3.000 especies de serpientes a nivel mundial, en Colombia se han identificado cerca de 224 de las cuales 43 son venenosas. Por su forma de vida las serpientes se clasifican en: excavadoras, terrestres, acuáticas y arborícolas; se considera que el 15% de las terrestres son venenosas (Patiño, 2002).

Las serpientes venenosas en Colombia pertenecen a los géneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Micrurus* y *Pelamis*; los accidentes por envenenamiento ofídico son causados principalmente por los géneros *Bothrops* (90%), *Crotalus* y *Micrurus* (Patiño, 2002). Se estima que a nivel mundial se presentan más de 2,6 millones de casos anuales de accidente ofídicos, que conllevan a las víctimas una importante mortalidad y a los sistemas de salud un elevado costo económico (Muñoz y Ovares, 2010).

Se ha demostrado que venenos ofídicos, exhiben actividad citotóxica sobre una amplia gama de bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, etc), por lo que se evidencia que sus componentes son capaces de

afectar no solo células eucariotas sino también procariontas (Bustillo, *et al.* 2005).

Los accidentes por serpientes de cascabel no son muy frecuentes, pero en cambio, son siempre graves; se ha deducido que en Colombia constituyen tan solo el 2,5% de todos los accidentes ofídicos reportados, pero se ha calculado también que su mortalidad es del 70 al 80% sin tratamiento oportuno y adecuado, y del 12 al 15% aún con tratamiento médico, esto debido a las graves complicaciones de difícil manejo que suelen presentarse y a la rapidez con que el veneno puede causar daños irreversibles (Charry, 2006).

La infección bacteriana primaria es un hallazgo común, dado que la cavidad oral de las serpientes son altamente colonizadas con una gran cantidad de bacterias, además de que el extenso daño tisular favorece la entrada de microorganismos propios de la piel y agentes de adquisición intrahospitalaria (Avila, 1999). Se conoce que las bacterias gracias a su ubicuidad pueden habitar diferentes ambientes incluido la boca de las serpientes venenosas, donde múltiples investigaciones comprueban la

colonización de gran variedad de microorganismos tanto aerobios como anaerobios (Henaó, *et al.* 2005) que en el momento de una mordedura de serpiente, pueden desencadenar en el paciente serias complicaciones secundarias a infecciones bacterianas (Ayerbe, 2001 citado por Henaó, *et al.* 2005), ante lo que resulta indispensable su identificación.

Estudios previos realizados arrojaron hipótesis que planteaban que así como los microorganismos presentes en la cavidad bucal de las serpientes, difieren significativamente de acuerdo a la región geográfica donde se encuentre estas, otros factores determinantes son el clima y el sexo en donde se han encontrado diferencias aun entre individuos de la misma especie.

Las serpientes que viven en cautiverio son las responsables de un significativo número de mordeduras y entre sus víctimas se encuentran herpetólogos, personal auxiliar de serpentarios, veterinarios, biólogos, estudiantes etc (Henaó, *et al.* 2005), por lo que podría contarse también como factores determinantes, los terrarios que albergan las serpientes, su alimentación, el tiempo de cautiverio y el contacto de su lengua con el medio externo (Blaylock 2001 citado por Henaó, 2005). Según Goldstein, *et al.* 1981, la flora bucal de las serpientes refleja la flora fecal de su presa.

Además de lo anterior, otro de los factores que determina significativamente el crecimiento bacteriano son los cuidados que se deben tener para no llegar a contaminar las muestras y los métodos utilizados para la conservación y el cultivo de las mismas (Jorge, *et al.* 1990).

Por lo anterior, el propósito de la investigación fue el de determinar la variabilidad de especies de bacterias que se encuentran en la cavidad bucal de serpientes del género *Crotalus* (Ophidia: Viperidae) mantenidas en cautiverio en el Serpentario Uniamazonia durante el año 2010.

Materiales y métodos

Localización

La investigación se desarrolló en el municipio de Florencia que se encuentra localizado en el departamento del Caquetá, a los 01°37'03" de latitud norte y 75°37'03" de longitud oeste; a una altura de 242 metros sobre el nivel del mar. Su extensión es de 2.200 Km² equivalente a 229.200 has, y con relación al resto del país ocupa el 0,2% del territorio aproximadamente. Sus límites son: al Norte con el departamento del Huila, al Sur con los municipios de Milán y Morelia, al Este con el municipio de La Montañita y al oeste con el municipio de Belén de los Andaquíes y departamento del Huila (Municipio de Florencia, 2010).

El punto fijo de muestreo para la toma de cada una de las

muestras se encuentra ubicado en los predios de la sede centro de la Universidad de la Amazonia, antiguo IDEMA, área urbana del municipio de Florencia.

Manejo de los especímenes

En el desarrollo del trabajo se tomaron muestras de serpientes de la especie *Crotalus durissus* de la Familia Viperidae, en cinco individuos mantenidas en cautiverio y pertenecientes al Serpentario de la Universidad de la Amazonia. Sobre cada individuo se practicaron dos muestreos, uno para los análisis de bacterias anaerobias y el otro para el de bacterias aerobias.

Muestreos

Las muestras fueron tomadas de manera que coincidiera con el protocolo de extracción de veneno utilizado por laboratorios PROBIOL, es decir, diez días después de ser alimentadas e inmediatamente antes del proceso de extracción de veneno.

Una vez expuesta la cavidad oral de la serpiente, se tomaron dos hisopados, uno para condición anaerobia y otro para aerobiosis; para ambos casos se emplearon hisopos estériles en medio de transporte Stuart. Posteriormente las muestras fueron transportadas en un lapso no superior a 24 horas, al laboratorio de Microbiología en la Universidad de la Amazonia.

Siembra e incubación de la muestra

Las muestras obtenidas fueron sembradas en medios de cultivos, Agar sangre, Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI®) y Agar MacConkey® en condiciones aerobias. Se utilizaron sobres productores de atmósfera anaeróbica mediante el sistema GasPak®. Cada siembra se incubó (35°C) durante 24-48 horas; el tiempo fue determinado por la velocidad de crecimiento bacteriano.

Montaje de Tinción de Gram

Una vez realizado el cultivo, se emplearon las mismas muestras para realizar frotis en lámina portaobjetos y tinción de Gram, que permitió realizar una identificación preliminar de las bacterias de acuerdo a los morfotipos visualizados y la afinidad de éstas frente al colorante aplicado. El número de morfotipos bacterianos identificados en la tinción de Gram deben corresponder con los aislados en los cultivos.

Aislamiento selectivo

Teniendo en cuenta el tamaño y morfología de las colonias que crecen en la fase de aislamiento primario se seleccionaron medios de cultivo selectivos, agar Mac

Conkey®, agar Fenil-Etil-Alcohol®, agar Cetrimide® para el caso de aerobios y anaerobios; y agar TSN (Tryptone Sulfite Neomycin) para anaerobios. Los cultivos fueron llevados a incubación por un tiempo no superior de 48 horas.

Para la prueba de identificación y diferenciación se utilizó un TAMIZ de LIA (Agar Hierro Lisina) y KIA (Agar Hierro de Kligler), los cuales permitieron diferenciar bacterias cocos de bacilos para posteriormente realizar contenido completo de pruebas bioquímicas que permitieran identificar el tipo específico de coco y bacilo.

Identificación de bacterias

Para el proceso de identificación bacteriana en pruebas bioquímicas se utilizaron tubos de 5ml tapa rosca, con muestras suspensión del microorganismo en estudio y sobre los que se realizaron un total de siete pruebas: TSI (Triple azúcar hierro), SIN (Sin indol manitol), LIA (Agar hierro lisina), urea, citrato, MNM (Nitrato movilidad), MR-VP (Rojo metilo- Voges Proskauer). Los resultados fueron leídos tras 24 horas de incubación a 37°C.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se organizaron debidamente sistematizados y analizados mediante un estudio univariado, de estadística descriptiva.

Implicaciones éticas y bioéticas

Para el desarrollo específico de la investigación no se utilizaron directamente los animales vivos, sino un hisopado de su boca obtenido durante el proceso de ordeño (extracción de veneno), realizado en el marco del protocolo establecido para tal fin, ejecutado por el manejador habitual; por lo que no se consideraron avales adicionales a la autorización del coordinador del Serpentario.

Resultados y discusión

Sobre las muestras colectadas fueron identificadas un total de trece especies de bacterias pertenecientes a nueve familias; en donde se evidenció claramente el dominio de bacilos gram negativos, de crecimiento aerobio (Tabla 1). La familia más abundante fue Enterobacteriaceae, seguida de Vibrionaceae; mientras que las menos abundantes fueron Pseudomonadaceae, Staphylococcaceae, Corynebacteriaceae, Streptococcaceae, Micrococcaceae, Lactobacillaceae y Moraxellaceae.

66% de las estructuras identificadas correspondieron a bacilos y el 34% restantes a cocos. A la coración de Gram, el 58% correspondió a Gram- y el 42% a Gram+, lo cual resulta preocupante pues la Gram- son mucho mas propensas a la propagación de enfermedades como bacteriemias, mionecrosis y celulitis. 75% de los microorganismos fueron Anerobios y 25% Aerobios.

La identificación de microorganismos correspondió en un 62% de los casos, a muestras obtenidas de especímenes juveniles (Tabla 2) y en un 38% de especímenes adultos (Tabla 3), de los microorganismos identificados en las muestras es especímenes juveniles, el 25% perteneció a la familia Vibrionacea, y 12,5% a cada una de las familias Enterobacteriacea, Pseudomonacea, Staphylococcacea, Corynebacteriacea, Streptococcacea y Lactoballacea; para las muestras de especímenes adultos, el 60% correspondió a especies de la familia Enterobacteriacea, el 20% Micrococcacea y un porcentaje igual a la familia Moraxellacea.

La presencia de este particular grupo de bacterias, probablemente corresponda a las características del hábitat y la alimentación, pues según Blaylock (2001) los terrarios que albergan las serpientes, la alimentación, el tiempo de cautiverio, la edad y el contacto de la lengua con el medio externo influyen en el tipo de la flora bacteria presente en la cavidad bucal. Según Goldstein, *et al.* 1981, la flora bucal

Tabla 1. Bacterias identificadas en la investigación.

| Familia | Especie | Morfología microscópica | Condición de aislamiento |
|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Enterobacteriaceae | <i>Morganella morganii</i> | Bacilo Gram (-) | Aerobiosis |
| | <i>Klebsella rhinoscleromatis</i> | Bacilo Gram (-) | Anaerobiosis |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | Bacilo Gram (-) | Anaerobiosis |
| | <i>Escherichia coli</i> | Bacilo Gram (-) | Anaerobiosis |
| | <i>Aeromonas hydrophila</i> | Bacilo Gram (-) | Aerobiosis |
| Vibrionaceae (Aeromonadaceae) | <i>A. Shigeloides</i> | Bacilo Gram (-) | Aerobiosis |
| Pseudomonadaceae | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | Bacilo Gram (-) | Aerobiosis |
| Staphylococcaceae | <i>Staphylococcus</i> sp. | Coco Gram (+) | Anaerobiosis |
| Corynebacteriaceae | <i>Corynebacterium</i> sp. | Bacilos Gram (+) | Anaerobiosis |
| Streptococcaceae | <i>Streptococcus</i> sp. | Cocos Gram (+) | Anaerobiosis |
| Micrococcaceae | <i>Micrococcus</i> sp. | Cocos Gram (+) | Anaerobiosis |
| Lactobacillaceae | <i>Lactobacilos</i> sp. | Bacilos Gram (+) | Anaerobiosis |
| Moraxellaceae | <i>Moraxella</i> sp. | Cocos Gram (-) | Anaerobiosis |

Tabla 2. Bacterias identificadas en especímenes Juveniles.

| Familia | Especie |
|-------------------------------|--|
| Enterobacteriaceae | <i>Escherichia coli</i> |
| Vibrionaceae (Aeromonadaceae) | <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>A. Shigeloides</i> |
| Pseudomonadaceae | <i>Pseudomona aeruginosa</i> |
| Staphylococcaceae | <i>Staphylococcus</i> sp. |
| Corynebacteriaceae | <i>Corynebacterium</i> sp. |
| Streptococcaceae | <i>Streptococcus</i> sp. |
| Lactobacillaceae | <i>Lactobacilos</i> sp. |

Tabla 3. Bacterias identificadas en especímenes adultos.

| Familia | Especie |
|--------------------|---|
| Enterobacteriaceae | <i>Morganella morganii</i> <i>Klebsella oscleromatis</i> <i>Proteus mirabilis</i> |
| Micrococcaceae | <i>Micrococcus</i> sp. |
| Moraxellaceae | <i>Moraxella</i> sp. |

de las serpientes refleja la flora fecal de su presa, por lo cual es importante tomar muestras de estas.

Lo anterior se ratifica en evidencias presentadas por Henao, *et al.* (2005), quienes en estudios realizados en el Serpentario del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca, aislaron *K. pneumonice*, tanto de las heces de un ratón (*Mus musculus*) del utilizado como alimento de las serpientes y como de la cavidad bucal de *Crotalus durissus*.

El género *Enterobacterias* ha sido reportada por diversos autores como el más abundante en estudios relacionados con bacterias en cavidad oral, colmillos y venenos de serpientes; dentro de estos estudios se pueden destacar los de Blandon (2009), con serpientes de la familia Viperidae en laboratorios probiol y Henao, *et al.* (2005) con serpientes venenosas en el serpentario del museo de historia natural de la Universidad del Cauca Colombia.

Investigaciones realizadas en Costa Rica con especies de *C. durissus*, *B. asper*, y *L. muta*, la familia Clostridiaceae fue reportada como la más abundante (Arroyo, *et al.* 1980), contrario a lo hallado en el estudio; tal discrepancia podía justificarse en factores tales como: condiciones ambientales, condiciones de higiene, tipo de alimentación suministrada a las serpientes, tipo de estado (cautiverio o silvestre), edad, etc. que influyen sobre el crecimiento y propagación de bacterias.

Especies bacterianas como *A. hydrophila*, *P. aeruginosa*, aisladas en el estudio, pueden ser consideradas agentes etiológicos de infección primaria y secundaria para el hombre (Avila, *et al.* 2001). *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 bacterias se adhiere al epitelio intacto normal y no lo vulnera (Toder 1994; citado por Blandon, 2009), pero son un patógeno oportunista.

Las bacterias identificadas en la investigación, han sido ampliamente documentadas y aisladas de la herida post-mordedura de serpientes venenosas en víctimas humanas de acuerdo a los resultados, autores como Andrade, *et al.* (1989) y Jorge, *et al.* (1990), quienes además concluyen que las bacterias aisladas en las heridas concuerdan en su mayoría con las encontradas en la boca de las serpientes.

López, Lopera y Ramírez (2008) aislaron bacterias como *M. morganii*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *E. cloacae* y *Staphylococcus* sp. en llagas post-mordedura de accidente ofídico de pacientes del hospital Pablo Tobón Uribe de la ciudad de Medellín.

Por otro lado, resulta posible afirmar que el tiempo en cautiverio influye sobre la abundancia bacteriana bucal, pues en aquellos los individuos muestreados, con más de dos años de cuativerio, el porcentaje fue menor en comparación con los que presentan menos tiempo en cautiverio; lo anterior podría justificarse principalmente en el tipo de alimentación, pues los especímenes acuáticos son alimentados exclusivamente por ratones (*Mus musculus*) criados bajo condiciones controladas; mientras que en condiciones naturales registran una gran variedad de dieta alimenticia no controlada.

Conclusiones

Para la investigación realizada sobre los muestreos bucales de cinco especímenes de la especie *Crotalus durissus*, se encontró un total de 13 cepas bacteriológicas, ocho Gram negativas y cinco Gram positivas; algunas de las reportadas como posibles patógenos para humanos, como *A. hydrophila*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp. y *P. vulgaris*.

La abundancia de la flora bacteriana encontrada en la cavidad oral de las serpientes de la Especie *Crotalus durissus* varía según el estadio de desarrollo del animal (adulto o juvenil) y su tiempo en cautiverio.

Literatura citada

- ANDRADE, J. et al. Estudio bacteriológico de abscesos causados por picada de serpientes do género Bothrops. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 1989. Pp. 363-367.
- ARROYO, O; BOLAÑOS, R y MUÑOZ, G. The Bacterial Flora of Venoms and Mouth Cavities of Costa Rican Snakes. Bull PanAm Health Organ. 14(3):280-285. 1980.
- AVILA A. 1999. Nuevos conceptos en el manejo de los pacientes pediátricos mordidos por serpientes venenosas. Acta pediátrica Costa Rica. ISSN 1409-0090. 13 (3)

- Pp.107- 109. 1990.
- AVILA, A. et al. Venomous Snakebites in Children and Adolescents: a 12 Years Retrospective Review. J Venom Anim Toxins. 7(1). Pp. 69-84. 2001.
- BLANDÓN, G. Flora bacteriana asociada a la cavidad bucal en serpientes de la familia Viperidae. Trabajo de grado. Universidad de Caldas, Manizales. 2009.
- BLAYLOCK, R. Normal Oral Bacterial Flora from Some Southern African Snakes. The Onderstepoort J of Vet Res. 68(3). Pp.175-182. 2001.
- BUSTILLO, S. et al. Actividad Bactericida del Veneno de Bothrops Alternatus del Nordeste de Argentina. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: M-099. 2005.
- CHARRY H. “Accidentes por serpientes de cascabel en Colombia”. En: Memorias del primer simposio de Toxinología Clínica “César Gómez Villegas”. Laboratorios Probiol Ltda. Bogotá: Fundación Universitaria San Martín. Bogotá, 2006.
- CHARRY H. Manual Básico para el tratamiento del accidenté ofídico. COODESCA. Manizales, Colombia. 2007.
- GOLDSTEIN J. et al. Aerobic Bacterial Oral Flora of Garter Snakes: Development of Normal Flora and Pathogenic Potential for snakes and Humans. J Clin Microbiol. 13(5). 1981. 954-956.
- HENAO, E. et al. 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. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. 7(1). Marzo de 2005.
- JORGE, M.T. et al. Flora Bacteriana da Cavidade Oral, Presas e Veneno de Bothrops jararaca: Possível Fonte da Infecção no Local da Picada. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 32(1). Pp. 6-10. 1990.
- LOPEZ N, LOPERA C y RAMIREZ A. Characteristics of patients with ophidic accidents (snakebites) and infectious complications at the Pablo Tobon Uribe Hospital between the years 2000 and 2006. Acta Med Colomb. 2008.
- MUÑOZ, Alexander y OVARES, Carlos. Antibioticoterapia profiláctica en el accidente ofídico: evidencia actual. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXVII(593) 251-254. 2010.
- MUNICIPIO DE FLORENCIA. Alcaldía de Florencia – Caquetá. [En línea] 2010. Disponible desde Internet en: <http://www.florencia-caqueta.gov.co/index.shtml#3>
- PATIÑO C, S. Serpientes venenosas. Estudiante de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia. Grupo de Estudio de Animales Silvestres (Boletín GEAS). 3 (1). 2002.