

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA EN
LA CAVIDAD BUCAL DE *Bothrops ayerbei* Y *B. rhombeatus* (SERPENTES:
VIPERIDAE) EN CAUTIVERIO Y DE VIDA SILVESTRE
CAUCA, COLOMBIA**

YENIFER YADIRA TOVAR ROSERO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN - CAUCA**

2011

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA EN
LA CAVIDAD BUCAL DE *Bothrops ayerbei* Y *B. rhombeatus* (SERPENTES:
VIPERIDAE) EN CAUTIVERIO Y DE VIDA SILVESTRE
CAUCA, COLOMBIA**

YENIFER YADIRA TOVAR ROSERO

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Bióloga

Msc. GERARDO NAUNDORF SANZ

Director

SANTIAGO AYERBE GONZÁLEZ, MD.

Asesor

Bact. ANGÉLICA ALEJANDRA DOMÍNGUEZ ACOSTA

Asesora

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN - CAUCA
2011**

Nota de aceptación

Msc. Gerardo Naundorf Sanz
Director

Esp. Liliana Caldas Arias
Jurado

MSc. Giselle Zambrano González
Jurado

Lugar y fecha de sustentación: 7 de Junio de 2011

*Dedico este logro a dos grandes mujeres,
María Visitación Recalde y Cruz marina
Rosero, quienes con esfuerzo constante
forjaron un futuro mejor para mi hermano y
para mí. Con su amor, sacrificio, dedicación y
sabiduría cultivaron en mí los mejores valores
y me brindaron las herramientas necesarias
para caminar por los senderos de la vida.*

*A mi abue, quien siempre está junto a mí, le
agradezco por haber compartido conmigo sus
mejores momentos, sus caricias, sus consejos,
sus lagrimas, su alegría; dejó en mí grandes
enseñanzas y la tenacidad para cumplir
cualquier objetivo.*

*A mi amiga y confidente por apoyarme en cada
proyecto que emprendo, por escucharme y
entenderme, por las noches de desvelo, por el
esfuerzo que hace cada día por darnos lo
mejor y por su incalculable amor. Gracias
mami por ser lo mejor para mí.*

AGRADECIMIENTOS

En el transcurso de mi vida he sido rodeada por personas muy valiosas, las cuales me han brindado su amistad, apoyo, conocimiento y amor. Hoy que culmino una etapa para comenzar una nueva quiero agradecer a Dios por acompañarme en cada paso que doy, por brindarme salud y bendecirme con una familia amorosa, unos amigos sinceros, un maravilloso amor y unos maestros con vocación; quienes aman enseñar, pero sobre todo educar.

A la Universidad del Cauca; Departamento de Biología por mi formación académica.

Al Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT), al Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBUC), a los Laboratorios de Microbiología y Parasitología, Inmunología y Biología de la Universidad del Cauca por acogerme, guiarme y colaborar en el desarrollo de mi trabajo.

A mis maestros por enseñarme lo grandioso de mi profesión, en especial a José Beltrán, Silvio Carvajal, Diego Macías Pinto, María del Pilar Rivas, María Isaura Valdivieso y Giselle Zambrano González.

A mi querido profesor Gerardo Naundorf Sanz por haber confiado en mis capacidades, por la paciencia y dirección de este trabajo, a mi querida Alejandra Domínguez quién con sacrificio me encamino, me brindo su amistad y su valioso tiempo. De manera especial quiero agradecer a la bacterióloga Liliana Caldas Arias por enseñarme lo maravilloso del área de la microbiología y por todo lo que aprendí de ella como educadora y como persona. Al doctor Santiago Ayerbe González le doy gracias por apoyarme en todo momento y compartir su gran experiencia.

A mi familia por sus palabras de aliento, por su amor y compañía; a mi hermanito Kike por alegrar mis días con su buen humor, a mi primo Daniel por ser tan especial conmigo y a mi prima Lesly por ser mi amiga, mi hermana; por compartir mis alegrías al igual que mis tristezas, por estar a mi lado siempre que la he necesitado.

A Manuel Alejandro Benachi, quien me enseñó que no hay límites, que lo que me proponga lo puedo lograr; le doy infinitas gracias por apoyarme en este proceso, por brindarme su comprensión, ayuda y valioso amor. Gracias mi amor por enseñarme a amar, por tu sinceridad y por hacerme tan feliz.

A mis amigos Paola Arévalo, Karen Caicedo, Rafael Camayo, David Dávila, Katherine Gómez, Yamileth Gómez, Julian Gutierrez, Frenyi Jara, Leidy Martínez, Ivon Martínez, Anny Meneses, Monica Quiñones, Beatriz Sarmiento, David Semanate, Johana Torres y Andrés Trujillo por su sincera amistad, su compañía y apoyo en los momentos más difíciles.

CONTENIDO

RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
1. JUSTIFICACIÓN.....	14
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES GÉNERO <i>Bothrops</i> , WAGLER	18
2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Bothrops ayerbei</i> Y <i>B. rhombeatus</i>	19
2.3 EPIDEMIOLOGÍA DEL ACCIDENTE OFÍDICO EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA.....	22
2.4 LAS BACTERIAS.....	25
2.5 MICROORGANISMOS: AMBIENTES Y MICROAMBIENTES.....	26
2.6 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.	27
2.7 MÉTODO DE KIRBY-BAUER	28
3 ANTECEDENTES.....	30
3.1 ESTUDIOS QUE REGISTRAN COMPLICACIONES SECUNDARIAS EN PACIENTES CON OFIDIOTOXICOSIS.	30
3.2 ESTUDIOS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN LA BIOTA BUCAL DE SERPIENTES.	31
4 OBJETIVOS	33
4.1 OBJETIVO GENERAL	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5 METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	34
5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.	34
5.2 MATERIAL BIOLÓGICO.	37
5.2.1 Adecuación del animal	37
5.2.2 Clasificación taxonómica del animal.	37
5.2.3 Toma de la muestra.	37
5.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	39
5.3.1 Identificación preliminar de las bacterias.....	39
5.3.2 Tinción de Gram	39

5.3.3	Identificación bacteriana de Bacilos Gram negativos.....	40
5.3.4	Identificación de Cocos Gram positivos.....	42
5.4	PERFIL DE SENSIBILIDAD O RESISTENCIA.....	43
5.4.1	Prueba para detectar <i>Staphylococcus</i> Oxacilino-Resistente	44
5.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	45
6.	RESULTADOS.....	46
6.1	RELACIÓN ESPECIE DE SERPIENTE Y BACTERIA.....	48
6.2	RELACIÓN HÁBITAT DE SERPIENTE Y BACTERIA.....	50
6.3	PRUEBA DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA.	53
7.	DISCUSIÓN	56
7.1	MICROBIOTA DE LA CAVIDAD BUCAL DE <i>Bothrops ayerbeii</i> Y <i>B. rhombeatus</i>	56
8.	CONCLUSIONES	60
9.	RECOMENDACIONES.....	61
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	62

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Esquema general simplificado de las serpientes. Tomado de: Ayerbe 2009.	17
Tabla 2. Clasificación Taxonómica de las serpientes.	18
Tabla 3. Características generales de <i>B. ayerbei</i> y <i>B. rhombeatus</i>	20
Tabla 4. Familias, Géneros, Especies y Subespecies Causales de Ofidismo en el Departamento del Cauca tomada de Tomado de: Ayerbe y Latorre, 2009.	24
Tabla 5. Casos de Accidente Ofídico. Hospital Universitario “San José”: 2000 a 2008. Tomado de: Ayerbe y Latorre, 2009.	25
Tabla 6. Procedencia de <i>B. ayerbei</i> y <i>B. rhombeatus</i> de vida silvestre.	35
Tabla 7. Procedencia de <i>B. ayerbei</i> y <i>B. rhombeatus</i> de cautiverio.	36
Tabla 8. Bacterias aisladas.	46
Tabla 9. Frecuencia de las bacterias aisladas.	47
Tabla 10. Bacteria aislada y especie de serpiente.	48
Tabla 11. Bacterias aisladas y hábitat de <i>B. ayerbei</i> y <i>B. rhombeatus</i>	51
Tabla 12. Antibiogramas para bacterias Gram Negativas y Gram Negativas multi-resistentes.	54
Tabla 13. Antibiogramas para: <i>Pseudomonas</i> y <i>Staphylococcus</i>	55

LISTADO DE FIGURAS.

Figura 1. Vista superior de <i>Bothrops ayerbeii</i>	21
Figura 2. Vista superior de la cabeza de <i>Bothrops ayerbeii</i>	21
Figura 3. Vista superior de <i>Bothrops rhombeatus</i>	22
Figura 4. Vista superior de la cabeza de <i>Bothrops rhombeatus</i>	22
Figura 5. Antibiograma por la técnica de Kirby-Bauer.	29
Figura 6. Hisopado bucal de <i>B. ayerbeii</i>	38
Figura 7. Siembra de la muestra en agar sangre.	38
Figura 8. a. Hidratación. b. Montaje de la cámara de incubación.	40
Figura 9. Cámara de incubación con la muestra bacteriana.	41
Figura 10. Incubación de la muestra bacteriana.	41
Figura 11. Api 20E. <i>Aeromonas hydrophila</i>	41
Figura 12. Antibiograma para: a. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> b. <i>Citrobacter braakii</i>	44
Figura 13. Frecuencia de las bacterias aisladas según la especie de serpiente.	49
Figura 14. Colonias de <i>Providencia rettgeri</i> creciendo en agar sangre.	50
Figura 15. Frecuencia de las bacterias aisladas según el hábitat de la serpiente.	52

RESUMEN

Se realizó un estudio descriptivo con la finalidad de identificar las bacterias presentes en la cavidad bucal de dos especies de serpientes del género *Bothrops* (*Bothrops ayerbei* y *B. rhombeatus*) y la relación de estos microorganismos con las complicaciones infecciosas que se presentan en un accidente ofídico. Las muestras se tomaron a serpientes recién capturadas de su medio natural ubicado en zonas aledañas a los municipios de Popayán, Morales, la Sierra, el Tambo y Timbío (Cauca) y a otro grupo ya mantenido en cautiverio entre 2 y 9 años en el serpentario del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC).

A estos animales se les realizó la toma de la muestra por medio de un hisopado bucal, se transfirió a medios enriquecidos y se llevó a incubar a 37°C durante 24 horas. Al finalizar este período se efectuaron las pruebas de identificación microbiana mediante morfología de la colonia, tinción de Gram, pruebas bioquímicas manuales y el uso de métodos semi automatizados (API 20E). Finalmente a las bacterias identificadas se les realizaron los antibiogramas por difusión empleando la técnica de Kirby-Bauer bajo los lineamientos del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el paquete estadístico PASW 18.0 (SPSS Statistical Package to Social Scientific).

Se obtuvo como resultado un total de diez especies entre bacterias Gram negativas y Gram positivas distribuidas en cuatro familias y ocho géneros, siendo la más abundante la familia Enterobacteriaceae y hallándose con mayor frecuencia la especie *Providencia rettgeri* (antes conocida como *Proteus rettgeri*). Se encontró que todas las bacterias aisladas son potencialmente patógenas para el humano, ya que al permitir su proliferación desencadenan considerables infecciones. Las especies de bacterias aisladas mostraron un patrón de sensibilidad a la mayoría de los antibióticos empleados, encontrándose resistencia a la Ampicilina en todos los microorganismos que fueron evaluados con este antibiótico.

En conclusión las especies *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* pueden estar directamente relacionadas en infecciones de tejidos blandos en un accidente ofídico; el antibiótico Trimetoprim Sulfametoxazole puede ser utilizado como agente antimicrobiano en accidentes ofídicos causados por *B. ayerbeii* y *B. rhombeatus*, puesto que se presentó sensibilidad en todas las bacterias aisladas. La especie de serpiente, el tipo de alimentación y el tipo de hábitat (cautiverio – vida libre) no muestran influencia en la determinación de la microbiota bacteriana en su cavidad bucal.

INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico es considerado como un importante problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en los países tropicales. Aunque en Colombia la mortalidad en el accidente ofídico se redujo notablemente con la introducción del suero antiofídico como tratamiento y el establecimiento de protocolos de manejo bien diseñados (Henaó *et al.* 2005; Ayerbe y Latorre, 2009), la morbilidad no ha disminuido en algunos hospitales, debido a la incidencia de complicaciones secundarias, incluidas las infecciosas (Cuesta *et al.* 2008). Por tal motivo sigue siendo importante conocer los principales agentes causales de infección en el sitio de la mordedura, y correlacionarlos especialmente con las bacterias patógenas que habitan en la cavidad bucal de las serpientes.

En el departamento del Cauca se ha registrado un número considerable de víctimas por mordedura de serpientes agrupadas en las familias Viperidae y Elapidae; siendo los vipéridos responsables del mayor número de accidentes ofídicos, en éstos están implicadas varias especies del género *Bothrops*, las más comunes *B. asper*, *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* (Ayerbe y Latorre, 2009); las cuales habitan bosques desde los 400 m.s.n.m hasta los 2600 m.s.n.m (Folleco 2010).

En un accidente ofídico la víctima no solo se expone a los efectos del envenenamiento, también es vulnerable a presentar complicaciones secundarias, como lo son las infecciones bacterianas causadas por microorganismos presentes en la boca de la serpiente (Nilson *et al.* 2008).

El uso profiláctico de antibióticos de rutina en el manejo de mordeduras de serpiente ha sido defendida y recomendada por algunos autores (Otero *et al.* 2002; Ayerbe y Latorre 2009), criticada y descartada por otros (Pineda 2002, Tagwireyi *et al.* 2001), pues uno de los múltiples factores asociados a la persistencia de secuelas físicas y psicológicas es la controversia que aún existe en temas como la profilaxis antibiótica (Cuesta *et al.* 2008), ya que al no ser manejado adecuadamente se expone al paciente a una intervención quirúrgica

ó a la muerte. Con el fin de ayudar al adecuado manejo de los antibióticos en complicaciones infecciosas, este estudio se centró en identificar las bacterias presentes en la cavidad bucal de serpientes en cautiverio y de vida silvestre, a las bacterias más frecuentemente aisladas se le realizaron los antibiogramas correspondientes dando a conocer los patrones de sensibilidad ó resistencia para contribuir a la orientación del antibiótico a utilizar.

Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta y gracias a su ubicuidad pueden encontrarse en diferentes hábitat y ser parte del ser humano y de los animales, uno de los lugares en donde se encuentran es la boca de las serpientes venenosas, donde múltiples investigaciones prueban la colonización de gran variedad de microorganismos tanto aerobios como anaerobios (Goldstein *et al.* 1981, Henao *et al.* 2005, Jorge *et al.* 1990, Soveri *et al.* 1986).

Las serpientes más importantes desde el punto de vista médico pertenecen a la familia Viperidæ, subfamilia Crotalinæ. Son serpientes con colmillos delanteros móviles (solenoglifas), muy abundantes en la región en donde ocupan prácticamente todas las distintas condiciones ecológicas. Este grupo está muy relacionado con las víboras africanas y con algunas víboras asiáticas y europeas, pero difiere de ellas en la presencia de una foseta termo-receptora, localizada entre el ojo y la nariz. El género *Bothrops* incluye las más abundantes y más importantes serpientes venenosas, responsables de la mayoría de los accidentes y por casi la totalidad de las defunciones. Ellas ocupan una amplia gama de ambientes ecológicos y están distribuidas desde el nivel del mar hasta las más altas montañas, desde bosques secos hasta la selva húmeda tropical (Bolaños 1982).

1. JUSTIFICACIÓN

Colombia es un país privilegiado en cuanto a flora y fauna se refiere, gracias a su ubicación presenta un clima propicio para el desarrollo de diversas especies, las cuales varían en tamaño, morfología, fisiología, color, complejidad y función ecológica. Las serpientes venenosas hacen parte de este magnífico grupo de especies y junto a sus presas han coexistido durante aproximadamente 200 millones de años, y a pesar de que el ser humano no hace parte de su cadena alimenticia, el contacto del hombre con éstas hace que el envenenamiento ofídico todavía sea una causa importante de morbilidad y mortalidad humana a nivel mundial (Estrada *et al.* 2007).

El ofidismo es un problema de salud pública en muchos países del mundo, situación que ha motivado a investigar mucho más sobre la biología, fisiología, taxonomía, etología, acción del veneno entre otros aspectos de estos reptiles, sin embargo, en Colombia se carece de información, capacitación y prevención en cuanto al manejo adecuado que se debe tener en un accidente ofídico; no obstante los estudios y planes de manejo respecto a la ofidiotoxicosis en el departamento del Cauca han aumentado paulatinamente en los últimos años, dando como resultado una cultura diferente con respecto al trato que se le brinda a las serpientes y al comportamiento que debe tener el hombre en caso ser víctima ó de asistir a una víctima por mordedura de serpiente (Ayerbe 2000, 2001).

Aunque las complicaciones secundarias causadas por infecciones bacterianas se presenten en bajas proporciones sigue siendo fuente de morbilidad en Colombia, por lo que resulta de gran importancia conocer las principales bacterias patógenas presentes en la cavidad bucal de serpientes del género *Bothrops*, con el fin de brindar conocimiento al cuerpo médico para la elección adecuada del antibiótico a usar de acuerdo con las bacterias más frecuentemente aisladas.

En Brasil, un país con una población similar a la de Colombia en cuanto a especies de serpientes se refiere, se ha evidenciado en los trabajos realizados por investigadores que existe una asociación entre las bacterias que habitan en la boca de la serpiente y las complicaciones infecciosas que sufre el paciente; en sus estudios muestran que el género *Bothrops* es el responsable del mayor número de accidentes ofídicos y de complicaciones infecciosas (López *et al.* 2008).

En Colombia también se le ha atribuido a este género ser responsable del mayor número de casos de accidentalidad entre 90-95% (Estrada *et al.* 2007), en cuanto al departamento del Cauca las especies *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* representantes del género *Bothrops* han sido catalogadas como responsables de la mayoría de accidentes por envenenamiento Bothrópico aproximadamente el 80% (Pizo 2006) y aunque no hay estudios publicados que muestren complicaciones infecciosas a causa de las bacterias presentes en su microbiota bucal no se descarta que puedan existir, pues este género se caracteriza por tener colmillos más largos, por lo cual ocasionan mayor daño permitiendo así una adecuación más profunda de las bacterias.

La alimentación y el medio donde habitan estas especies cumplen un papel muy importante en la determinación de la flora bucal, además de esto la flora puede ser o no la misma dependiendo de cada especie (Jorge *et al.* 1997) variando así el tipo de infección que pueda desencadenarse en el momento de la mordedura. La mayor proporción de accidentes ofídicos ocurren en la zona rural, por tal motivo es necesario conocer las diferencias que existen en cuanto a las bacterias presentes en la flora bucal de una serpiente en cautiverio y una de vida silvestre, contribuyendo así a un mejor manejo de la complicación infecciosa que se presente.

2. MARCO TEÓRICO

Los ofidios son reptiles que aparecieron hace 100 a 200 millones de años en el periodo cretáceo, en el mundo hay descritas más de 3000 especies de las cuales tan solo 250 son venenosas (Tabla 1), pueden medir desde los 20 cm. hasta los 10 m., habitan a cualquier altura sobre el nivel del mar, disminuyendo a partir de los 2000 m.s.n.m. Habitan en todos los continentes excepto en las regiones polares (Pineda 2002).

Las serpientes tienen una visión mala, escasamente perciben movimientos, su audición es igualmente pobre, solo captan tonalidades agudas (500 ciclos o menos) y las vibraciones del suelo. Por el contrario tiene el órgano de Jacobson, el cual recibe e interpreta sensaciones captadas en receptores ubicados desde sus fosas nasales hasta la lengua (Angel 1987), otras serpientes (subfamilia Crotalinae de las serpientes venenosas) (Tabla 2) han desarrollado un órgano llamado fosa termo-receptora el cual es capaz de identificar variaciones en la temperatura de hasta 0,2 °C a medio metro de distancia inclusive en la oscuridad, dotándolas de una incalculable precisión a la hora de cazar animales de sangre caliente, los cuales contrastan con su sangre fría la cual es óptima entre los 20 y 33°C (Pineda 2002).

Tabla 1. Esquema general simplificado de las serpientes. Tomado de: Ayerbe 2009.

Suborden	Infraorden	N° de Géneros	Familia	
SERPENTES (OPHIDIA)	SCOLECOPHIDIA	200	Typhlopidae (Serpientes ciegas)	
		20	Anomalepididae (Serpientes ciegas primarias)	
		80	Leptotyphlopidae (Serpientes hebra)	
	A L E T I N O P H I D I A	HENOPHIDIA	9	Aniliidae (Serpientes cilíndricas)
			2	Bolyeriidae (Boas de Isla Redonda)
			50	Uropeltidae (Serpiente de cola escudada)
			1	Xenopeltidae (Serpiente rayo de sol)
			1	Loxocemidae (Serpiente subterránea Mexicana)
			67	Boidae (Serpientes gigantes)
			1	Tropidophiidae (Boas pigmeas)
CAENOPHIDIA	2500*	280**	Colubridae (Culebras)	
		220**	Elapidae (Cobras, Kraits, Corales, Serpientes marinas)	
		16**	Viperidae (Víboras y Víboras de fosa termo-receptora)	
			Atractaspididae (Víboras subterráneas)	

* Contiene algunas especies venenosas. ** Todas las especies son venenosas.

Tabla 2. Clasificación Taxonómica de las serpientes.

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Subfilo	Vertebrata
Clase	Reptilia (Laurenti, 1768)
Orden	Squamata (Oppel, 1811)
Suborden	Serpentes (Linnaeus, 1758)
Infraorden	Alethinophidia (Nopcsa, 1923)
Familia	Viperidae (Oppel, 1811)
Subfamilia	Crotalinae (Oppel, 1811)
Género	<i>Bothrops</i> (Wagler, 1824)

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES GÉNERO *Bothrops*, WAGLER

Conformado por 37 especies se distribuye desde el sur de México hasta el norte de Argentina. Antillas menores. Comprende serpientes de tamaño pequeño hasta grande, encontrando el tamaño mínimo de alrededor de 40 centímetros y el máximo de casi 2,50 metros. El cuerpo es siempre grueso con sección transversal triangular o comprimida lateralmente; cola corta y terminada en punta; en algunas especies es prensil. Cabeza de forma triangular o acorazonada muy bien diferenciada del cuello. Algunas especies tienen el hocico levantado. Ojo pequeño o mediano siempre con pupila vertical. Las escamas del cuerpo son siempre quilladas y el número de ellas es muy variable según se cuenten en la parte anterior, media o posterior del cuerpo pero, en general, van desde 18 hasta 29 hileras. La escamación de la parte superior de la cabeza puede estar formada por escamas grandes, lisas o quilladas. Todas las especies poseen foseta termorreceptora en la parte lateral de la cabeza, entre el ojo y la narina y esta foseta puede estar ó no en contacto con las labiales superiores.

Las internasales son variadas así como las pre-post-y suboculares; 7 a 13 labiales superiores; 7 a 13 labiales inferiores; 120 a 260 ventrales; anal entera o dividida y de 20 a 95 subcaudales, enteras o divididas. La coloración es muy variada y, por lo general, consta de dorso color pardo con manchas oscuras triangulares, romboidales o circulares. Algunas especies tienen el dorso color verde oliva con pequeñas manchas oscuras.

2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Bothrops ayerbei* Y *B. rhombeatus*.

Bothrops ayerbei y *B. rhombeatus* actualmente se encuentran descritas como especies heterogéneas debido a las diferencias que presentan morfológicamente y en cuanto a su distribución geográfica (Folleco 2010) (Tabla 3). Estas especies son terrestres, carnívoras se alimentan ante todo de pequeños mamíferos, lagartijas y serpientes. La especie *B. ayerbei* comúnmente conocida como equis patiana (Figuras 1 y 2) habita los bosques pre-montanos a 400 msnm y bosques subtropicales a 1800 msnm desde el borde sur del divorcio de aguas de los ríos Cauca y Patía hasta el Sudeste de El Tambo hacia la cuenca del río Patía incluido el norte de Nariño (Folleco 2010).

B. rhombeatus popularmente llamada equis gata ó equis pelo de gato (Figuras 3 y 4) se halla en el bosque subtropical desde los 1000 msnm hasta el bosque montano a 2600 msnm (Folleco 2010).

Tabla 3. Características generales de *B. ayerbei* y *B. rhombeatus*.

PATRONES	<i>B. ayerbei</i>	<i>B. rhombeatus</i>
Hábitat	Bosque pre-montano a 400 msnm hasta bosque subtropical a 1800 m.s.n.m.	Bosque subtropical a 1000 msnm hasta bosque montano a 2600 m.s.n.m.
Figuras dorsales	Triángulos	Ángulos
Color del Dorso	Amarillo grisáceo ó gris claro	Amarillo ó marrón
Tamaño promedio de Hembra	130 cm	120 cm
Tamaño promedio de Macho	110cm	100 cm
Forma de la Cabeza	Triangular, bien diferenciada del cuello	Triangular, bien diferenciada del cuello
Ornamento supracefálico	Presente	Ausente
Característica del ojo	Mediano con pupila vertical	Mediano con pupila vertical
Número de hileras de escamas dorsales	24-28	23-28
Número de escamas supralabiales	7-9	6-8
Número de escamas infralabiales	7-12	7-10
Número de escamas loreal	1	1
Número de escamas preoculares	3	3
Número de escamas postoculares	4-5	4-5
Característica de escama mental	Más larga que ancha	Más larga que ancha
Forma de escama rostral	Heptagonal	Hexagonal
Número de escamas ventrales en hembras	184-215	174-202
Número de escamas ventrales en machos	180-203	170-194
Número de escamas subcaudales en hembras	56-62	44-70
Número de escamas subcaudales en machos	58-66	58-70
Placa anal	Única	Única



Figura 1. Vista superior de *Bothrops ayerbeii*.
© CIBUC. Cortesía: Biól. Manuel Alejandro Benachi O.



Figura 2. Vista superior de la cabeza de *Bothrops ayerbeii*.
© CIBUC. Cortesía: Biól. Rafael Alejandro Camayo C.



Figura 3. Vista superior de *Bothrops rhombeatus*.
© CIBUC. Cortesía: Biól. Manuel Alejandro Benachi O.



Figura 4. Vista superior de la cabeza de *Bothrops rhombeatus*.
© CIBUC. Cortesía: Biól. Rafael Alejandro Camayo C.

2.3 EPIDEMIOLOGÍA DEL ACCIDENTE OFÍDICO EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA.

En Colombia se registra una tasa considerable de accidente ofídico 30/100.000 habitantes aproximadamente (Pineda *et al* 2002), sin tener cuenta los casos y complicaciones que no son registrados. Los estudios epidemiológicos a nivel departamental son relativamente pocos, sin embargo el médico Santiago Ayerbe González a lo largo de su experiencia en el campo de la medicina y la toxicología ha aportado grandes conocimientos con respecto a

los ofidios, acerca de la incidencia de ofidiotoxicosis en el Departamento del Cauca y sobre el manejo adecuado que se debe prestar a la víctima.

En el año 2006 Rodrigo Navia plasma en su trabajo de grado datos epidemiológicos sobre ofidismo en el Departamento del Cauca entre el año de 1998 y 2003, en el concluye que el género *Bothrops* es responsable del mayor número de accidentes, del mismo modo, encuentra que los miembros inferiores y superiores son los más comprometidos y que la mayor proporción de víctimas corresponde al género masculino (Pizo 2006). A esto complementa Ayerbe González en uno de sus trabajos, que la familia Viperidæ presenta el mayor porcentaje de accidente ofídico en el Cauca (92.8%), ciertamente coincide con diferentes reportes epidemiológicos de ofidismo que se registraron a nivel ibero-americano (Chippaux 1998). Se observa también que en el Departamento del Cauca, el género *Bothrops* encabeza la lista con el (81.2%), siendo *B. ayerbei* la especie más relacionada con estos accidentes (45.6%), continuando con *B. rhombeatus* (26.8%) y *Bothriechis schlegelii* (10.8%). Los accidentes por Colúbridos no son muy frecuentes, la especie *Chironius monticola* (4%), seguida de *Sibon nebulata popayanensis* (2%) y finalizando con *Dendrophidion bivittatus* y *Lampropeltis triangulum andesiana* con el 1%. El menor porcentaje de accidentes ocurre en la familia Elapidae con la especie *Micrurus mipartitus popayanensis* (0.6%) (Tabla 4).

El departamento del Cauca se divide en cinco zonas según la Secretaría Departamental del Cauca (Tabla 5), según esto se tiene que entre año 2000 y 2008 la zona centro ocupó el primer lugar en accidente ofídico con un porcentaje del 56%, seguida de la zona Sur con un 28.1%, continuando con la zona Oriente (8.2%) y finalizando con las zonas Norte y Occidente con un 3.9% (Tabla 5) (Ayerbe y Latorre 2009).

Tabla 4. Familias, Géneros, Especies y Subespecies Causales de Ofidismo en el Departamento del Cauca tomada de Tomado de: Ayerbe y Latorre, 2009.

Familia	Género	Especie	Subespecie	Nombre común	Casos	Lugar
Viperidæ	<i>Bothrops</i>	<i>ayerbei</i>		Equis Patiana, cacica	165	1°
	<i>Bothrops</i>	<i>rhombeatus</i>		Equis pelo de gato, gata	097	2°
	<i>Bothriechis</i>	<i>schlegelii</i>		Cabeza de candado, 24, yaruma	039	3°
	<i>Bothrops</i>	<i>Asper</i>		Equis negra	027	4°
	<i>Bothrops</i>	<i>punctatus</i>		Equis rabo de chucha, orito	005	7°
	<i>Crotalus</i>	<i>durissus</i>	<i>cumanensis</i> *	Cascabel cumanense	003	9°
Colubridæ	<i>Chironius</i>	<i>monticola</i>		Guache, jueteadora	015	5°
	<i>Sibon</i>	<i>nebulata</i>	<i>popayanensis</i>	Culebra babosera	008	6°
	<i>Dendrophidion</i>	<i>bivittatus</i>		Rayuela	004	8°
	<i>Lampropeltis</i>	<i>triangulum</i>	<i>Andesiana</i>	Mataganado	003	9°
Elapidæ	<i>Micrurus</i>	<i>mipartitus</i>	<i>popayanensis</i>	Rabo de ají Payanesa	002	10°
Subtotal	9	11			362**	

* Serpiente exótica en las áreas donde ocasionó las mordeduras pues de los tres especímenes dos mordieron a los “culebreros” que las manipulaban y otra mordió a un pasajero del bus donde era transportada por una pasajera. ** No se incluyen todas las especies con dos ó menos casos excepto *M. m. popayanensis* por su importancia clínica.

Tabla 5. Casos de Accidente Ofídico. Hospital Universitario “San José”: 2000 a 2008. Tomado de: Ayerbe y Latorre, 2009.

Zona	Casos	%
Centro	214 pacientes	56.0
Norte	15 pacientes	3.9
Oriente	31 pacientes	8.2
Sur	107 pacientes	28.0
Occidente	15 pacientes	3.9
Total	382 pacientes	100.0

2.4 LAS BACTERIAS.

Las bacterias son procariotas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, etc.), no tienen núcleo celular ni orgánulos internos. Las eubacterias poseen una pared celular compuesta principalmente de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles.

Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta. Son ubicuas, encontrándose en todo hábitat de la tierra, creciendo en el suelo, en manantiales calientes y ácidos, en desechos radioactivos, en las profundidades del mar, de la corteza terrestre y hasta hacen parte del hombre y los animales. Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior.

Las Gram negativas muestran una gran diversidad metabólica y representan la mayoría de las bacterias con importancia clínica, industrial o agrícola. Las bacterias Gram positivas pueden separarse en dos subgrupos, los de bajo contenido en Guanina – Citosina (GC) y los de alto GC; términos que se refieren al hecho de ser especies que poseen una relación de GC en las bases de sus DNAs, por debajo o por encima del 50% respectivamente. Las bacterias Gram positivas son un gran grupo de bacteria quimioorganotrofas (Madigan *et al.* 2004).

La envoltura celular de las bacterias Gram negativas es una estructura muy compleja de múltiples capas. La membrana citoplasmática ó membrana interna, el espacio periplásmico y la membrana externa. La membrana citoplasmática está rodeada por una capa laminar delgada de peptidoglicano a la cual está anclada la membrana externa. Entre la membrana citoplasmática interna y la membrana externa se localiza el espacio periplásmico relleno de una sustancia denominada periplasma, la cual contiene enzimas importantes para la nutrición de las bacterias. La membrana externa contiene diversas proteínas, siendo una de ellas las porinas o canales proteicos que permiten el paso de ciertas sustancias. También presenta unas estructuras llamadas lipopolisacáridos (LPS) formadas por tres regiones: el antígeno O, una estructura polisacárida central (KDO) y el lípido A (endotoxina). La presencia de LPS es necesaria para la función de muchas de las membranas proteínicas externas.

La envoltura celular de las bacterias Gram positivas es relativamente simple; está constituida por dos capas, la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, que rodea a la anterior. La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico. La capa de peptidoglicano confiere una gran resistencia a las bacterias (Brooks *et al.* 2005, Madigan *et al.* 2004).

2.5 MICROORGANISMOS: AMBIENTES Y MICROAMBIENTES.

Los hábitats naturales de los microorganismos son extremadamente diversos. Cualquier hábitat que sea adecuado para el crecimiento, también lo es para el crecimiento de microorganismos. Pero, además, hay muchos hábitats donde, debido a las condiciones físicas o químicas extremas, no se encuentran organismos superiores; sin embargo, en estos ambientes si pueden existir microorganismos que, en algunos casos, incluso crecen mejor allí. Los microorganismos también habitan las superficies de los organismos superiores y algunos pueden, incluso, vivir en el interior de plantas y animales.

La cavidad bucal de las serpientes es uno de los hábitats microbianos más heterogéneos y complejos del organismo, así como en los humanos. Los microorganismos interactúan con los humanos en una gran variedad de formas, a veces beneficiosas y a veces perjudiciales; muchas de las interacciones son dañinas para el hospedador y causan enfermedad. Un patógeno, por lo general, debe alcanzar los tejidos del hospedador y multiplicarse antes de ocasionar un perjuicio. En la mayoría de los casos, esto requiere que el organismo penetre la piel, membranas mucosas o el epitelio intestinal, superficies que normalmente actúan como barreras microbianas (Madigan *et al.* 2004).

La piel es la primera línea de defensa del cuerpo contra infecciones y lesiones, impide la entrada de microorganismos, evita el contacto directo de los objetos con otros tejidos u órganos internos y previene que los productos químicos accedan a los mismos (Madigan *et al.* 2004); al sufrir ruptura a causa de la incisión de los colmillos de la serpiente se pierde la integridad de la epidermis creando un ambiente apto para la proliferación de las bacterias e ingreso de las mismas al torrente sanguíneo y tejidos del cuerpo (Cuesta *et al.* 2008).

2.6 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.

En un ambiente natural no es frecuente encontrar un solo tipo de microorganismos. Lo que existen son comunidades microbianas. Por tal motivo antes de realizar la identificación de los microorganismos es necesario el aislamiento y crecimiento de la bacteria. Habitualmente, se reconoce la presencia de crecimiento bacteriano por el desarrollo de colonias sobre medio sólido o de turbidez en medio líquido.

La identidad inicial de un organismo bacteriano puede ser sugerida por la procedencia de la muestra de cultivo, su aspecto microscópico y la tinción de Gram; su patrón de crecimiento en medios selectivos, diferenciales, enriquecidos o característicos; sus propiedades hemolíticas, metabólicas y de fermentación en los diversos medios de cultivo. Después de examinar las características microscópicas y de crecimiento de un cultivo bacteriano puro, se pueden realizar pruebas bioquímicas específicas. Para identificar bacterias en las muestras se utilizan claves dicotómicas clásicas con las pruebas bioquímicas. En general

son necesarias al menos 20 pruebas para identificar hasta el nivel de especie las bacterias aisladas. La microbiología se ha beneficiado mucho de los procesos tecnológicos en equipos, en programas informáticos y bases de datos, en biología molecular e inmunoquímicos. En lo que respecta a los métodos de detección de microorganismos en muestras biológicas, existen métodos de identificación rápida que se pueden dividir en tres categorías: 1) sistemas bioquímicos manuales, 2) sistemas mecanizados/automatizados, 3) sistemas inmunológicos. La batería de pruebas API20E es un sistema manual de identificación rápida para bacterias de la familia Enterobacteriaceae y otras bacterias Gram negativas. Básicamente consta de 21 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada API 20E es una galería que contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímica distinta. La prueba número 21, la oxidasa, se hace de forma independiente a la tira (Prescott *et al.* 2004).

2.7 MÉTODO DE KIRBY-BAUER

Es una técnica recomendada de difusión de agar (Figura 5), llamada así en honor a sus descubridores. Se realiza siguiendo los lineamientos del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS); este método determina la sensibilidad de las bacterias y consiste en inocular una placa con un medio de cultivo adecuado distribuyendo una muestra de cultivo uniformemente por toda la superficie de agar. Después, se coloca sobre la placa discos de papel de filtro con una concentración conocida de distintos antimicrobianos (sensidiscos). Cada disco tiene especificada la concentración de antimicrobiano y, tras la incubación, se anotan la presencia y el tamaño de las zonas de inhibición alrededor de los discos. Las zonas que se ven sobre las placas se miden y se comparan con los datos estándar para establecer si el aislado es sensible a los antibióticos ensayados (Madigan *et al.* 2004).



Figura 5. Antibiograma por la técnica de Kirby-Bauer.

3 ANTECEDENTES

3.1 ESTUDIOS QUE REGISTRAN COMPLICACIONES SECUNDARIAS EN PACIENTES CON OFIDIOTOXICOSIS.

En Brasil Jorge y colaboradores (1994) evaluaron 40 pacientes con abscesos en el sitio de la mordedura de serpientes del género *Bothrops*, recogieron las muestras y realizaron el respectivo cultivo; las bacterias más frecuentemente aisladas fueron *Morganella morganii* (23 pacientes), *Providencia rettgeri* (7) *Enterobacter sp.* (4), *Escherichia coli* (3), *Streptococcus* del grupo D (11) y *Bacteroides sp.* (6); además encontraron que todas las enterobacterias fueron sensibles al Cloramfenicol, aminoglucósidos y Cefotaxima. Los estreptococos del grupo D fueron sensibles al Cloramfenicol, la Ampicilina y la Penicilina G, mientras que las bacterias anaerobias fueron sensibles al Cloramfenicol y a la Tetraciclina (Jorge *et al.* 1994).

Otero y colaboradores (2002) presentan los resultados del estudio clínico- epidemiológico realizado a 39 pacientes víctimas de mordedura de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Porthidium* y *Bothriechis*. Las víctimas inicialmente fueron atendidas en diferentes hospitales de Antioquia y Chocó, sin embargo al sufrir complicaciones fueron trasladadas al Hospital Universitario San Vicente de Paúl en Medellín con el fin de mejorar su condición física. Entre las complicaciones se encontraron infección de tejidos blandos (30.8%), insuficiencia renal aguda (IRA) (38,5%), hemorragia (74,4%), formación de ampollas (38,5%), hematomas de tejidos blandos (15,4%), entre otros. Con este estudio dieron a conocer que las bacterias presentes en la flora bucal de serpientes pueden ser en cierto porcentaje causantes de las complicaciones infecciosas que se presentan en un accidente ofídico (Otero *et al.* 2002).

En Colombia, Pineda y colaboradores (2002) en uno de los apartes de su trabajo registran complicaciones infecciosas entre un 16% y 30% de los casos ocurridos durante el periodo comprendido entre septiembre 1996 y junio de 1997 en los hospitales de Leticia y Yopal en pacientes que sufrieron mordedura de serpientes del género *Bothrops* (Pineda *et al.* 2002)

López y colaboradores (2008) encontraron que un 33% de los pacientes atendidos por mordedura de serpientes en el Hospital Pablo Tobón Uribe (Medellín) entre los años 2000 y 2006 presentaron complicaciones infecciosas. Las más frecuentes fasciitis y abscesos, encontraron que el germen más comúnmente aislado fue *M. morganii* y ocasionalmente bacterias Gram positivas. Los resultados sugieren una alta frecuencia de complicaciones infecciosas derivadas de la mordedura de serpientes del género *Bothrops* y que los gérmenes habituales son los Gram negativos (López *et al.* 2008).

3.2 ESTUDIOS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN LA BIOTA BUCAL DE SERPIENTES.

Jorge y colaboradores (1990) en Brasil analizan la flora bacteriana de la cavidad oral de 15 ejemplares recién capturados de *Bothrops jararaca* como posible fuente de infección en el sitio de mordedura. Como resultado obtienen que las bacterias más frecuentemente aisladas fueron *Streptococcus* del grupo D (12 serpientes), *Enterobacter spp.* (6), *P. rettgeri* (6), *Providencia sp.* (4), *E. coli* (4), *M. morganii* (3) y *Clostridium sp.* (5). El valioso aporte de su estudio es que a medida que esas bacterias son similares a las de los abscesos en pacientes mordidos por serpientes del género *Bothrops*, se acerca más a la posibilidad de que las bacterias de la boca de serpiente puede ser inoculadas durante la mordedura, encontrando condiciones favorables para multiplicarse y causando así la infección (Jorge *et al.* 1990).

Shek y colaboradores (2009) determinaron las bacterias presentes en la flora bucal de dos especies de serpientes de Hong Kong conocidas como *Naja atra* y *Trimeresurus albolabris*, como resultado encontraron que la cavidad oral de *N. atra* posee un alto rango de bacterias patógenas incluyendo bacterias Gram negativas, especies como *M. morganii*, *Aeromonas hydrophila* y *Proteus*, seguidas de bacterias Gram positivas. En la cavidad bucal de *T. albolabris* el rango de bacterias fué menor, tres especies fueron aerobias Gram positivas, nueve especies fueron aerobias Gram negativas y tres especies fueron anaerobias (Shek *et al.* 2009).

En la ciudad de Popayán, departamento del Cauca Henao y colaboradores (2005) realizaron la caracterización de la flora bacteriana bucal a cuatro serpientes venenosas determinadas como *Bothrops asper*, *B. punctatus*, *Crotalus durissus cumanensis* y *Lachesis acrochorda* que eran cautivas en el serpentario del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca, como resultado encontraron diversos microorganismos con predominio de bacilos Gram negativos seguido por cocos Gram positivos, potencialmente patógenos para el ser humano; además el estudio reveló que las floras bacterianas aerobia y anaerobia facultativa encontradas en las serpientes, fueron diferentes para cada especie y la mayoría de estas bacterias pertenecían a la familia Enterobacteriaceæ (Henao *et al.* 2005).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

- ✓ Identificar las bacterias presentes en la cavidad bucal de *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* mantenidas en cautiverio por dos a nueve años y recién colectadas (24 a 48 horas) en zonas suburbanas o rurales de los municipios de Popayán, Timbío, La Sierra, El Tambo y Morales en el Dpto. del Cauca.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ✓ Aislar e identificar bacterias presentes en la microbiota bucal de *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* mantenidas en cautiverio de dos a nueve años y recién colectadas (24 a 48 horas).
- ✓ Establecer las diferencias en la biota bacteriana de la cavidad bucal de especies de serpientes mantenidas en cautiverio de dos a nueve años y recién colectadas (24 a 48 horas).
- ✓ Determinar y proponer los antibióticos apropiados a usar según las bacterias más frecuentemente aisladas de la microbiota bucal de *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* mantenidas en cautiverio de dos a nueve años y recién colectadas (24 a 48 horas).

5 METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Se emplearon diez ejemplares por especie de vida silvestre en estado adulto provenientes de veredas aledañas a los municipios de Popayán, Morales, la Sierra, el Tambo y Timbío (Cauca) las serpientes fueron colectadas por habitantes de dichos municipios (Tabla 6), al ser ingresados al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC) se les realizó la clasificación taxonómica, valoración física por un veterinario experto e inmediatamente la toma de la muestra bucal, posteriormente se esterilizaron y trasladaron a un cuarto aislado donde fueron mantenidos en periodo de cuarentena; al finalizar este periodo se ubicaron en los respectivos terrarios.

Igualmente se emplearon diez ejemplares por especie de cautiverio en estado adulto provenientes de veredas aledañas a los municipios de Morales, Popayán, la Sierra y el Tambo en el Departamento del Cauca. Se escogieron aquellos ejemplares que tuvieran como mínimo dos años de permanencia en el serpentario del CIBUC (Tabla 7) y se encontraran en perfecto estado físico.

Tabla 4. Procedencia de *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* de vida silvestre.

N° de Individuos	Código	Especie de serpiente	Procedencia	Altitud msnm
1	VSA01	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Frontino Bajo, La Sierra-Cauca	1400
2	VSA02	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Versailles, Tambo-Cauca	1350
3	VSA03	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Versailles, Tambo-Cauca	1350
4	VSA04	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Versailles, Tambo-Cauca	1350
5	VSA05	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Bellavista, Timbío-Cauca	1700
6	VSA06A	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Bellavista, Timbío	1700
	VSA06B	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Bellavista, Timbío	1700
7	VSA07	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Versailles, Tambo-Cauca	1350
8	VSA08	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Versailles, Tambo-Cauca	1350
9	VSA09	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Versailles, Tambo-Cauca	1300
10	VSA10	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Pomorroso, San Joaquín, Tambo-Cauca	1400
11	VSR01	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. Punta Larga, Popayán-Cauca	1880
12	VSR02	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán-Cauca	1600
13	VSR03A	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. San Antonio de Chuza, Popayán-Cauca	1700
	VSR03B	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. San Antonio de Chuza, Popayán-Cauca	1700
14	VSR04	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán-Cauca	1600
15	VSR05	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán-Cauca	1600
16	VSR06	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán-Cauca	1600
17	VSR07	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. Versailles, Tambo-Cauca	1350
18	VSR08	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. El Charco, Popayán-Cauca	1700
19	VSR09	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. Los Cerritos, Popayán-Cauca	1500
20	VSR10	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. Los Cerritos, Popayán-Cauca	1500

Tabla 5. Procedencia de *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* de cautiverio.

N° de Individuos	Código	Especie de serpiente	Procedencia	Altitud msnm
1	CA01	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Versalles, San Joaquín, Tambo-Cauca	1300
2	CA02	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Pomorrosos, San Joaquín, Tambo-Cauca	1400
3	CA03	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Versalles, Tambo-Cauca	1350
4	CA04A	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Pomorrosos, San Joaquín, Tambo-Cauca	1400
	CA04B	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Pomorrosos, San Joaquín, Tambo-Cauca	1400
5	CA05	<i>B. ayerbei</i>	Cto. San Joaquín, Tambo-Cauca	1500
6	CA06	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Pomorrosos, San Joaquín, Tambo-Cauca	1400
7	CA07A	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Pomorrosos, San Joaquín, Tambo-Cauca	1400
	CA07B	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Pomorrosos, San Joaquín, Tambo-Cauca	1400
8	CA08	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Pomorrosos, San Joaquín, Tambo-Cauca	1400
9	CA09	<i>B. ayerbei</i>	Vda. Frontino Bajo, La Sierra-Cauca	1400
10	CA10	<i>B. ayerbei</i>	Nace en cautiverio	1700
11	CR01	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. El Rosal, Morales-Cauca	1635
12	CR02	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán-Cauca	1600
13	CR03A	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán	1600
	CR03B	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán	1600
14	CR04	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán	1600
15	CR05	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán	1600
16	CR06	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. Los Cerritos, Popayán-Cauca	1500
17	CR07	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán	1600
18	CR08A	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán	1600
	CR08B	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán	1600
19	CR09	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán	1600
20	CR10	<i>B. rhombeatus</i>	Vda. La Yunga, Popayán	1600

5.2 MATERIAL BIOLÓGICO.

5.2.1 Adecuación del animal.

Los ejemplares de *B. ayerbei* y *B. rhombeatus*, tanto de vida silvestre como de cautiverio fueron adecuados en terrarios individuales con suministro de agua diaria, alimentación semanal y condiciones ambientales controladas de temperatura 24°C y humedad relativa 70%, en el serpentario del CIBUC bajo la responsabilidad y cuidado del personal encargado.

5.2.2 Clasificación taxonómica del animal.

La clasificación taxonómica se realizó siguiendo algunos parámetros que establecen las claves taxonómicas de serpientes (Cambell y Lamar 2004) y la asesoría y supervisión del Doctor Santiago Ayerbe.

5.2.3 Toma de la muestra.

Las muestras se obtuvieron inicialmente inmovilizando al animal, con la ayuda de unas pinzas se abrió la boca; las pinzas fueron esterilizadas con etanol al 70% y flameadas, posteriormente se realizó un frotis con un hisopo estéril en la parte ventral y alrededor del interior de la boca (Figura 6) e inmediatamente fueron sembradas por agotamiento en cultivos sólidos de agar base sangre y agar MacConkey (Figura 7) e incubadas a 37°C por 18-24 horas; las cajas de agar sangre se colocaron en una atmosfera de CO₂ y Oxígeno (Jarra con vela). Las tomas de las muestras se llevaron a cabo en el laboratorio del CIBUC y cumpliendo las normas de bioseguridad (Bata de laboratorio, guantes, tapabocas y gorro estériles).



Figura 6. Hisopado bucal de *B. ayerbeii*.



Figura 7. Siembra de la muestra en agar sangre.

5.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

Las pruebas de identificación bacteriana se realizaron en los laboratorios de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca.

5.3.1 Identificación preliminar de las bacterias

Inicialmente a toda colonia se le observó el tamaño, forma, bordes y color; posteriormente se realizó el proceso de purificación el cual consistió en separar colonias diferentes y cultivarlas en agar base sangre y MacConkey respectivamente. La purificación se realizó mediante mínimo tres transferencias y crecimiento en el medio de cultivo.

5.3.2 Tinción de Gram

Con la ayuda de un asa bacteriológica previamente flameada se tomó un poco de la muestra del cultivo respectivo y en una gota de solución salina fisiológica (0.85%) se hizo un extendido sobre el portaobjetos mediante movimientos giratorios, se secó la muestra con la ayuda del calor de un mechero teniendo cuidado de no exceder la temperatura, posteriormente se adicionó suficiente cantidad de colorante cristal violeta y se dejó actuar durante un minuto. Al terminar el minuto se enjuagó con agua la lámina en posición inclinada hacia abajo y ayudado de un frasco lavador, a continuación se aplicó lugol como mordiente durante un minuto. Transcurrido el minuto el frotis se lavó con abundante agua y se decoloró añadiendo suficiente cantidad de alcohol acetona hasta lograr que saliera totalmente transparente, en seguida se realizó el tercer lavado y se agregó safranina, se dejó actuar por un minuto; pasado el minuto se efectuó el cuarto lavado y se llevó a secar. Finalmente se observó en el microscopio óptico bajo 100X y se determinó tinción y forma de las bacterias.

5.3.3 Identificación bacteriana de Bacilos Gram negativos.

Se utilizó el sistema bioquímico manual API 20E™ Bio-Mérieux como componente de identificación bacteriana para bacterias Gram negativas.

Inicialmente se preparó la cámara de incubación y en él se adecuó la galería que contiene 20 pequeños pozos con sustancias químicas deshidratadas las cuales pueden detectar ciertas características bioquímicas propias de cada cepa bacteriana (Figuras 8a y 8b), posteriormente se tomó una cantidad suficiente de colonias puras con la ayuda de una asa bacteriológica previamente flameada y se disolvió en 5 ml de solución fisiológica salina estéril (NaCl 0.85%) hasta que se logró homogenizar la muestra; a continuación con una pipeta se tomó un poco de la suspensión bacteriana y se inoculó en cada uno de los 20 microtubos (Figura 9) siguiendo las indicaciones de la ficha técnica, al finalizar se cubrió la cámara de incubación con su respectiva tapa y se llevó a incubar a 37°C durante 24 horas (Figura 10). Al transcurrir las 24 horas la batería se retiró de la incubadora y se le realizó la respectiva lectura siguiendo la tabla de lectura presente en la ficha técnica (Figura 11).

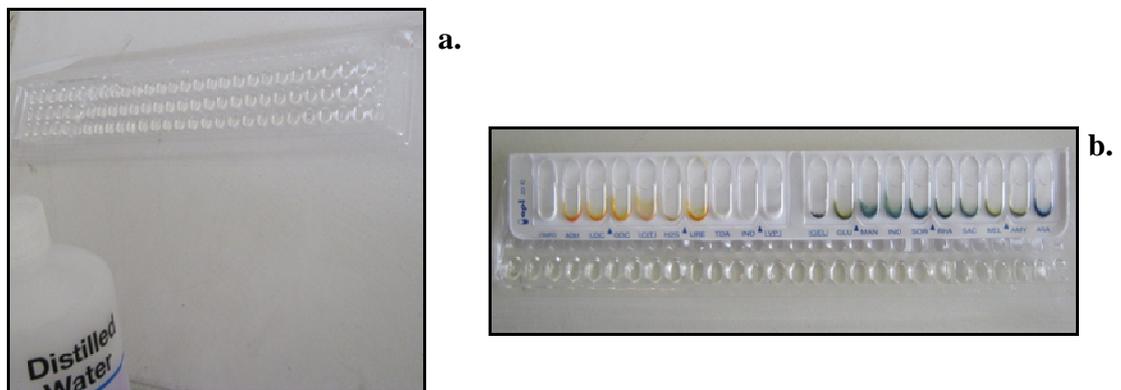


Figura 8. **a.** Hidratación. **b.** Montaje de la cámara de incubación.



Figura 9. Cámara de incubación con la muestra bacteriana.



Figura 10. Incubación de la muestra bacteriana.

La lectura arroja un perfil numérico el cual se ingresa en el software de identificación *Apiweb™ Stand alone V 1.2.1* que permite identificar la especie bacteriana de dicha muestra.

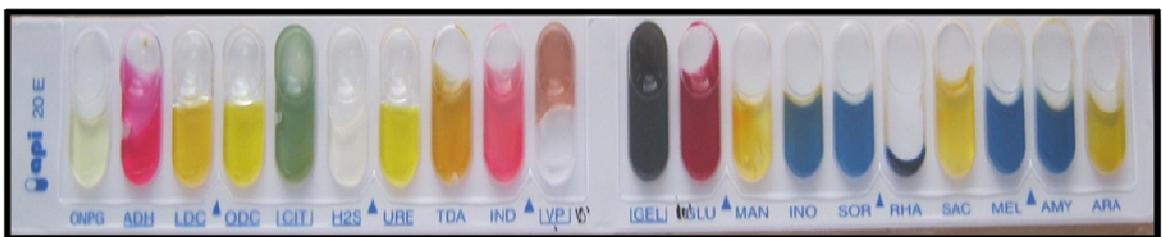


Figura 11. Api 20E. *Aeromonas hydrophila*.

5.3.4 Identificación de Cocos Gram positivos

Después de realizar la identificación preliminar de las bacterias mediante Tinción de Gram y determinar la presencia de cocos Gram positivos se procedió a realizar la prueba de la catalasa con el fin de comprobar la presencia de la enzima catalasa en dichas bacterias y así clasificarlas entre los géneros *Staphylococcus* ó *Streptococcus*. La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y aerobias facultativas con excepción al género *Streptococcus*.

Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomó una colonia y se llevó al portaobjetos al cual se le añadió una gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂); la presencia de burbujas se considera como catalasa positiva, al no observar dichas burbujas o muy pocas se toma como catalasa negativa.

Posteriormente, para la bacteria con catalasa positiva, se tomó una colonia y se inoculó en agar salino manitol e incubó a 37°C durante 24 horas; al mismo tiempo con un asa bacteriológica previamente flameada se tomó una colonia de la misma muestra, se mezcló en 3 ml de plasma y se llevó a incubar durante 4 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la respectiva interpretación. La prueba de manitol sirve para detectar si los gérmenes son capaces de fermentar el manitol, las bacterias liberan productos ácidos que se ven reflejados gracias al indicador rojo de fenol que cambia a color amarillo, esta prueba es de gran utilidad para diferenciar *S. aureus* de otros *Staphylococcus*.

La prueba de coagulasa se empleó con el fin de separar *S. aureus* que posee la enzima coagulasa de las otras especies de *Staphylococcus* que genéricamente se denominan coagulasa negativos; la coagulasa es una enzima capaz de desnaturalizar la fibrina del plasma provocando la formación de coágulos o grumos cuando se mezcla la suspensión bacteriana con el plasma.

5.4 PERFIL DE SENSIBILIDAD O RESISTENCIA.

Finalmente a cada especie identificada se le realizó el antibiograma con la técnica de Kirby-Bauer siguiendo los lineamientos de la NCCLS con el fin de establecer la sensibilidad o resistencia a determinados antibióticos.

Inicialmente se seleccionó los antibióticos a usar según el blanco molecular y el espectro bacteriano.

Para Enterobacterias se utilizaron los sensidiscos de Amikacin, Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Aztreonam, Cefepime, Cefotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxona, Cefuroxima, Cefalotin, Ciprofloxacina, Gentamicina, Piperacillin/Tazobactam y Trimetoprim Sulfametoxazole (Figura 12b); para bacilos Gram negativos multi-resistentes se utilizó adicional Imipenem y Tobramicina.

Para Pseudomonas se empleó Amikacin, Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Aztreonam, Cefepime, Ceftazidime, Ceftazidime/Clavulanic Acid, Cefuroxima, Cefalotin, Ciprofloxacina, Imipenem, Meropenem, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Tobramicina y Trimetoprim Sulfametoxazole (Figura 12a).

Finalmente para Staphylococcus se ensayó sensidiscos de Ciprofloxacina, Clindamicina, Eritromicina, Linezolid, Gentamicina, Oxacilina, Rifampicina, Tigeciclina, Trimetoprim Sulfametoxazole y Vancomicina.

Con la ayuda de un hisopo estéril se tomó una colonia de la bacteria ya identificada y se llevó a un tubo de ensayo con 3ml de solución fisiológica salina estéril (NaCl 0.85%), se mezcló hasta obtener una suspensión homogénea y ajustada al patrón de 0.5 a la escala de MacFarland, concentración en la cual el crecimiento de bacterias es óptimo para la realización de antibiogramas; en seguida se humedeció un hisopo estéril con la suspensión bacteriana y se retiró el exceso de la muestra ejerciendo presión sobre las paredes del tubo en forma circular, a continuación sobre el agar Muller Hinton se sembró en forma masiva y

en tres direcciones de manera uniforme la muestra. Al terminar la siembra, con la ayuda de una pinza estéril y realizando una ligera presión se colocaron entre 5-6 sensidiscos por caja separados entre sí y se llevaron a incubar durante 24 horas a 37°C.

Finalmente se efectuó la medición del diámetro de la zona de inhibición completa en mm y de acuerdo a los tamaños obtenidos se informaron como sensibles, intermedios o resistentes según la tabla de interpretación de resultados.

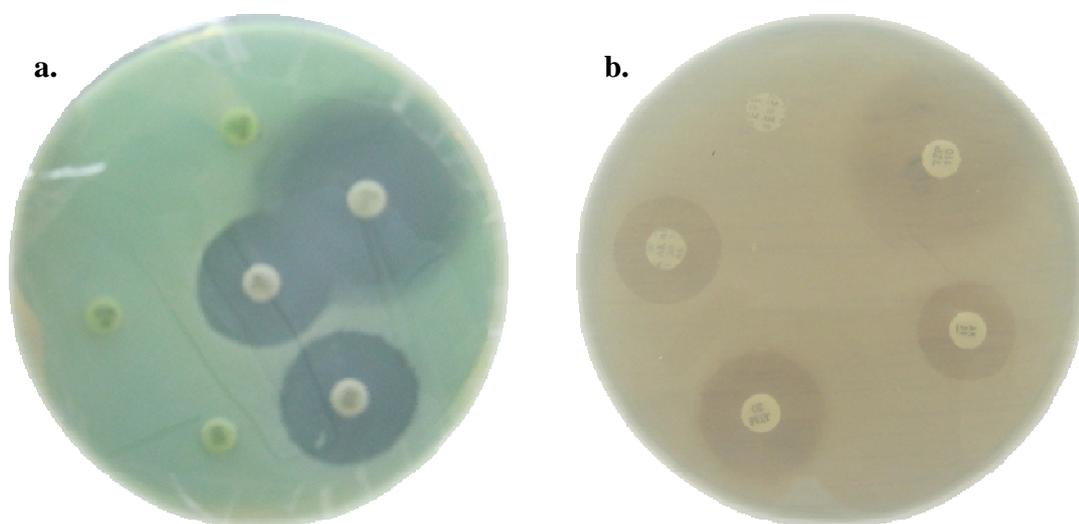


Figura 12. Antibiograma para: **a.** *Pseudomonas aeruginosa* **b.** *Citrobacter braakii*.

5.4.1 Prueba para detectar *Staphylococcus* Oxacilino-Resistente

A las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa se les realizó la prueba para la detección de resistencia a la Oxacilina, que consistió en sembrar la colonia en agar Muller Hinton salado con la técnica de siembra anteriormente mencionada y a la cual se le adicionó con la ayuda de una pinza estéril un sensidisco de Oxacilina de 5 µg y se llevó a incubar a 35°C durante 24 horas exactamente. Al finalizar el tiempo de incubación se realizó la respectiva lectura e interpretación. La Oxacilina fue desarrollada específicamente para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus* productores de Beta-lactamasa.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis de los datos obtenidos en este estudio se empleó estadística descriptiva con el fin de evaluar la frecuencia con la que se encontraban las bacterias aisladas en la cavidad bucal de *B. ayerbeii* y *B. rhombeatus* y para determinar si existía relación alguna entre la microbiota bacteriana de la cavidad bucal de dichas serpientes con el hábitat. Para el análisis de los cultivos de identificación no se tuvieron en cuenta el número de las unidades formadoras de colonias (ufc) sino, la presencia o ausencia de ellas, ya que se realizaron cultivos bacterianos cualitativos.

6. RESULTADOS

Se identificó un total de diez especies de bacterias distribuidas en cuatro familias y ocho géneros; la familia más abundante fué Enterobacteriaceæ, entretanto Vibrionaceæ y Pseudomonadaceæ se presentaron con menor frecuencia. Se observó bacilos Gram negativos de crecimiento aerobio como también de crecimiento aerobio facultativo (Tabla 8).

Tabla 6. Bacterias aisladas.

Familia	Especie	Morfología	GRAM	Crecimiento
Enterobacteriaceæ	<i>Citrobacter braakii</i>	Bacilo	Negativo	Aerobio
	<i>Citrobacter koseri</i>	Bacilo	Negativo	Aerobio
	<i>Escherichia coli</i>	Bacilo	Negativo	Aerobio facultativo
	<i>Morganella morganii</i>	Bacilo	Negativo	Aerobio
	<i>Proteus mirabilis</i>	Bacilo	Negativo	Aerobio facultativo
	<i>Providencia rettgeri</i>	Bacilo	Negativo	Aerobio facultativo
Vibrionaceæ	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Bacilo	Negativo	Aerobio facultativo
Pseudomonadaceæ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilo	Negativo	Aerobio
Staphylococcaceæ	<i>Staphylococcus aureus</i>	Coco	Positivo	Aerobio facultativo
	<i>Staphylococcus coagulasa (-)</i>	Coco	Positivo	Aerobio facultativo

Como se observa en la tabla 9 las bacterias *P. rettgeri*, *A. hydrophila*, *M. morganii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* fueron las más abundantes, siendo *P. rettgeri* la más frecuente; entretanto las bacterias menos abundantes fueron *C. braakii*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *S. coagulasa* negativa y *C. koseri*, hallándose ésta última como la menos frecuente.

Tabla 7. Frecuencia de las bacterias aisladas.

BACTERIA AISLADA	n (%)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	8 (17,4)
<i>Citrobacter braakii</i>	2 (4,3)
<i>Citrobacter koseri</i>	1 (2,2)
<i>Escherichia coli</i>	5 (10,9)
<i>Morganella morganii</i>	6 (13,0)
<i>Proteus mirabilis</i>	2 (4,3)
<i>Providencia rettgeri</i>	12 (26,1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 (13,0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (4,3)
<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	2 (4,3)
TOTAL	100,0

6.1 RELACIÓN ESPECIE DE SERPIENTE Y BACTERIA.

La tabla 10 presenta la relación de las especies bacterianas detectadas en la cavidad bucal de cada una las especies de serpientes estudiadas.

Tabla 8. Bacteria aislada y especie de serpiente.

Especie de Serpiente		<i>B .ayerbei</i>	<i>B. rhombeatus</i>	Total
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Frecuencia	4	4	8
	% Total	8,7%	8,7%	17,4%
<i>Citrobacter braakii</i>	Frecuencia	2	0	2
	% Total	4,3%	0%	4,3%
<i>Citrobacter koseri</i>	Frecuencia	1	0	1
	% Total	2,2%	0%	2,2%
<i>Escherichia coli</i>	Frecuencia	2	3	5
	% Total	4,3%	6,5%	10,9%
<i>Morganella morganii</i>	Frecuencia	2	4	6
	% Total	4,3%	8,7%	13,0%
<i>Proteus mirabilis</i>	Frecuencia	1	1	2
	% Total	2,2%	2,2%	4,3%
<i>Providencia rettgeri</i>	Frecuencia	8	4	12
	% Total	17,4%	8,7%	26,1%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Frecuencia	2	4	6
	% Total	4,3%	8,7%	13,0%
<i>Staphylococcus aureus</i>	Frecuencia	1	1	2
	% Total	2,2%	2,2%	4,3%
<i>Staphylococcus coagulasa (-)</i>	Frecuencia	0	2	2
	% Total	0%	4,3%	4,3%
Total	Frecuencia	23	23	46
	% Total	50,0%	50,0%	100,0%

Al realizar el cruce entre las bacterias aisladas y las dos especies de serpientes se encontró que prácticamente la microbiota bacteriana de la cavidad bucal de *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* son similares en un 70%.

Las bacterias *E. coli* (6.5%), *M. morgani* (8.7%) y *P. aeruginosa* (8.7%) se encontraron en mayor proporción en *B. rhombeatus*, mientras que *P. rettgeri* fué más frecuentemente aislada en *B. Ayerbei* (Figura 13).

Las bacterias *A. hydrophila*, *P. mirabilis* y *S. aureus* se hallaron tanto en *B. ayerbei* como en *B. rhombeatus* en la misma frecuencia. Los microorganismos *C. braakii* y *C. koseri* se presentaron únicamente en *B. ayerbei*, mientras que *Staphylococcus coagulasa* negativa se observó exclusivamente en *B. rhombeatus* (Figura 13).

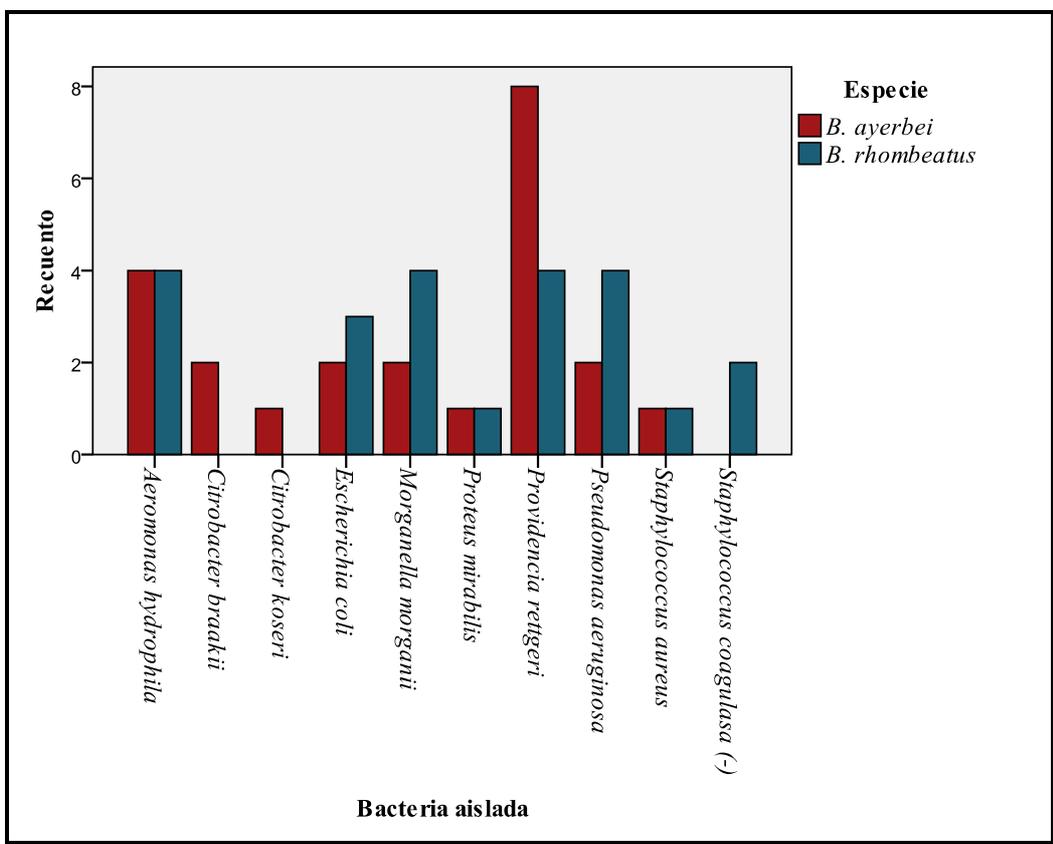


Figura 13. Frecuencia de las bacterias aisladas según la especie de serpiente.



Figura 14. Colonias de *Providencia rettgeri* creciendo en agar sangre.

6.2 RELACIÓN HÁBITAT DE SERPIENTE Y BACTERIA.

La tabla 11 indica la relación entre las especies bacterianas encontradas en la cavidad bucal de las serpientes y el hábitat en el que se encuentra cada una de dichas especies.

Tabla 9. Bacterias aisladas y hábitat de *B. ayerbei* y *B. rhombeatus*.

Hábitat		Cautiverio	Vida Silvestre	Total
Bacteria Aislada				
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Frecuencia	5	3	8
	% Total	10,9%	6,5%	17,4%
<i>Citrobacter braakii</i>	Frecuencia	2	0	2
	% Total	4,3%	0%	4,3%
<i>Citrobacter koseri</i>	Frecuencia	1	0	1
	% Total	2,2%	0%	2,2%
<i>Escherichia coli</i>	Frecuencia	2	3	5
	% Total	4,3%	6,5%	10,9%
<i>Morganella morganii</i>	Frecuencia	2	4	6
	% Total	4,3%	8,7%	13,0%
<i>Proteus mirabilis</i>	Frecuencia	1	1	2
	% Total	2,2%	2,2%	4,3%
<i>Providencia rettgeri</i>	Frecuencia	6	6	12
	% Total	13,0%	13,0%	26,1%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Frecuencia	3	3	6
	% Total	6,5%	6,5%	13,0%
<i>Staphylococcus aureus</i>	Frecuencia	0	2	2
	% Total	0%	4,3%	4,3%
<i>Staphylococcus coagulasa (-)</i>	Frecuencia	2	0	2
	% Total	4,3%	0%	4,3%
Total	Frecuencia	24	22	46
	% Total	52,2%	47,8%	100,0%

Como se indica en la tabla anterior, la bacteria *A. hydrophila* se encontró en mayor proporción en serpientes cautivas, entretanto *E. coli* y *M. morganii* fueron más frecuentes en serpientes de vida silvestre.

Las bacterias *P. mirabilis*, *P. rettgeri* y *P. aeruginosa* se observaron en la microbiota bucal de serpientes tanto de vida silvestre como de cautiverio en igual proporción. *C. braakii*, *C. koseri* y *Staphylococcus coagulasa* negativa se hallaron exclusivamente en serpientes cautivas, mientras que *S. aureus* se aisló solo en serpientes de vida silvestre (Figura 15).

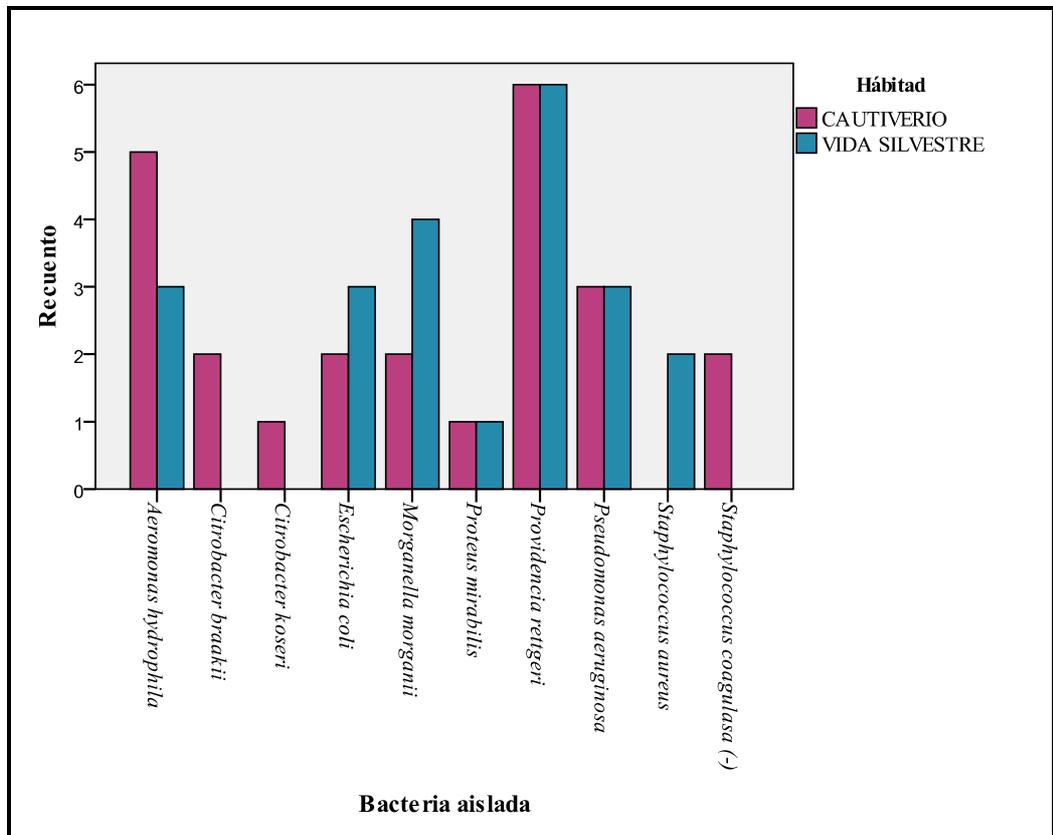


Figura 15. Frecuencia de las bacterias aisladas según el hábitat de la serpiente.

6.3 PRUEBA DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA.

Aquellas bacterias que se les realizó el antibiograma con Ampicilina mostraron resistencia a él, mientras tanto, los microorganismos *A. hydrophila* y *P. aeruginosa* presentaron resistencia a Ampicilina Sulbactam y a Aztreonam, a la vez las bacterias *C. braakii* y *M. morgani* también fueron resistentes a Aztreonam (Tablas 12 y 13).

Las especies *A. hydrophila*, *C. braakii*, *E. coli*, *M. morgani*, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa* fueron resistentes a Cefalotin, entretanto, *P. rettgeri* presentó sensibilidad intermedia a este fármaco. La bacteria *P. aeruginosa* también fué resistente a Ciprofloxacina. *Staphylococcus coagulasa* negativa se mostró como resistente a Clindamicina y Eritromicina, del mismo modo *S. aureus* fué resistente a este último. El Trimetoprim Sulfametoxazole fue efectivo en todos los agentes bacterianos aislados en este estudio (Tablas 12 y 13).

Se indican a continuación los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad – resistencia para cada una de las especies de bacterias aisladas (Tablas 12 y 13).

Tabla 12. Antibiogramas para bacterias Gram Negativas y Gram Negativas multi-resistentes.

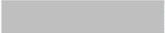
Antibiótico	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
Amikacin	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.
Ampicilina	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.
Ampicilina/Sulbactam	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.
Aztreonam	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.
Cefepime	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.
Cefotaxime	Resistente.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.
Ceftazidime	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Resistente.	Resistente.
Ceftriaxona	Resistente.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.
Cefuroxima	Resistente.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Resistente.	Resistente.	Resistente.
Cefalotin	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Sensibilidad Intermedia.
Ciprofloxacina	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.
Imipenem	Resistente.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Resistente.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.
Gentamicina	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Resistente.	Resistente.
Piperacillin/Tazobactam	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.
Tobramicina	Resistente.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.	Resistente.	Antibiótico no utilizado.	Antibiótico no utilizado.
Trimetoprim/ Sulfamethoxazole	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.	Resistente.

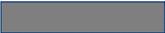
Resistente.
Sensible.

Sensibilidad Intermedia.
Antibiótico no utilizado.

Tabla 13. Antibiogramas para *Pseudomonas* y *Staphylococcus*.

Antibiótico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)
Amikacin			
Ampicilina			
Ampicilina /Sulbactam			
Aztreonam			
Cefepime			
Ceftazidime			
Ceftazidime/Clavulonic Acid			
Cefuroxima			
Cefalotin			
Ciprofloxacina			
Clindamicina			
Eritromicina			
Imipenem			
Meropenem			
Linezolid			
Gentamicina			
Oxacilina			
Piperacillin			
Piperacillin / Tazobactam			
Rifampicina			
Tigeciclina			
Tobramicina			
Trimetoprim / Sulfamethoxazole			
Vancomicina			

 Resistente.

 Sensible.

 Antibiótico no utilizado.

7. DISCUSIÓN

7.1 MICROBIOTA DE LA CAVIDAD BUCAL DE *Bothrops ayerbei* Y *B. rhombeatus*.

Con los métodos convencionales de identificación bacteriana se obtuvo un registro de bacterias Gram negativas seguida por bacterias Gram positivas y muchas de estas especies de bacterias se encuentran en diferentes estudios sobre complicaciones infecciosas que se presentan en un accidente ofídico y sobre bacterias que habitan en la cavidad bucal de serpientes del género *Bothrops* (Henaó *et al.* 2005, Jorge *et al.* 1990, López *et al.* 2008, Shek *et al.* 2009).

Las bacterias más frecuentemente aisladas como *P. rettgeri*, *A. hydrophila*, *M. morganii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* también han sido aisladas de la cavidad bucal de serpientes del género *Bothrops* (Henaó *et al.* 2005, Jorge *et al.* 1990).

Las bacterias *A. hydrophila*, *C. braakii*, *C. koseri*, *E. coli*, *M. morganii*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. coagulasa* negativa hacen parte de la microbiota normal del intestino en humanos y animales, en una especie de relación mutuales, ya que estos microorganismos ayudan a mantener la salud y función normal del organismo. La microbiota normal está relacionada con la estimulación del sistema inmune, la síntesis de vitamina K, la absorción de nutrientes y desdoblamiento de productos. Sin embargo así como juega un papel importante en la salud también lo hace en la enfermedad puesto que si se llega a alterar la microbiota residente, los microorganismos transitorios pueden colonizar, proliferar y producir enfermedad (Montiel 1997).

La cavidad bucal de las serpientes del género *Bothrops* es frecuentemente colonizada por bacterias Gram positivas como Gram negativas, tanto de crecimiento aerobio como de crecimiento anaerobio (Jorge *et al.* 1997) y todas pueden en algún momento comportarse como invasoras y patógenas para el ser humano si encuentran un ambiente adecuado para su proliferación; en un accidente ofídico se crea el escenario indicado para la colonización de bacterias, ya que al ocasionar la disrupción de la piel con los colmillos de la serpiente provoca un grave cuadro de alteraciones en la zona afectada.

La especie *A. hydrophila* al ingresar al torrente sanguíneo puede causar una bacteriemia, igualmente al adherirse a una herida puede desencadenar infecciones de las partes blandas que va desde celulitis hasta mionecrosis, esto se evidencia en el estudio realizado por Otero

y colaboradores en el 2002 donde encontraron infecciones de tejidos blandos en un 30.8% en víctimas de accidente ofídico.

Las especies de bacterias del género *Citrobacter* están asociadas a infecciones urinarias y respiratorias, generalmente adquiridas en ambientes hospitalarios, sin embargo estos microorganismos pueden producir infecciones importantes, especialmente en huéspedes inmuno-deprimidos, como la septicemia (Brooks *et al.* 2005).

La especie *E. coli* es reconocida como un importante patógeno para el humano, ya que es causante de una gran variedad de infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis y septicemia (Brooks *et al.* 2005).

M. morganii ha sido asociada con casos de sepsis y se conoce como causante de infecciones en el tracto urinario. Rara vez causa infección invasora en personas inmuno-competentes, pero si podría causar probablemente infecciones nosocomiales en huéspedes inmuno-deprimidos (Brooks *et al.* 2005). La especie *P. mirabilis* y *P. rettgeri* causan infecciones urinarias y en ocasiones otras infecciones (Brooks *et al.* 2005).

La bacteria *P. aeruginosa* únicamente es patógena cuando ingresa en regiones desprovistas de defensas normales, por ejemplo, las mucosas y piel lesionadas por daño tisular directo. Este agente es infeccioso en heridas y quemaduras, formando pus color azul verdoso; además se relaciona con sepsis, el tracto pulmonar y urinario. Es un patógeno oportunista, puesto que se observa con mayor frecuencia en individuos inmuno-deprimidos (Brooks *et al.* 2005). *S. aureus* puede causar neumonía, meningitis, empiema, endocarditis o septicemia con supuración en cualquier órgano. La infección por *S. aureus* también se manifiesta en forúnculos y abscesos causados por la contaminación directa de una herida (Brooks *et al.* 2005).

Las especies de bacterias de *Staphylococcus* coagulasa negativa no son invasores ni patógenos y tienden a ser no hemolíticos; estos microorganismos pocas veces producen supuración, pero pueden causar enfermedad a personas inmuno-deprimidas (Brooks *et al.* 2005).

En el momento que la serpiente muerde a la víctima con sus largos colmillos ocasiona la disrupción de la integridad de la epidermis retirando de cierto modo la barrera natural (piel) que se tiene contra los agentes infecciosos, permitiendo la penetración, adhesión y proliferación de las bacterias presentes en el ambiente, en la piel de la víctima y especialmente las que se encuentran en la cavidad bucal de la serpiente llevando al paciente a sufrir complicaciones secundarias. Entre las complicaciones secundarias que se presenta en la ofidiotoxicosis está la septicemia la cual no se relaciona directamente a bacterias

presentes en la boca de la serpiente, sino aquellas bacterias hospitalarias las cuales son resistentes a antibióticos habituales; por otro lado las infecciones de tejidos blandos si se registran como resultado de la incisión y colonización de bacterias provenientes de la cavidad bucal de las serpientes.

Además de lo anterior, factores como la edad extrema de la víctima, la eficacia que tenga el sistema inmune para actuar, la acción del veneno y la atención adecuada y a tiempo que se le preste al paciente pueden crear un escenario vulnerable al desarrollo de infecciones bacterianas (Tagwireyi *et al.* 2001).

La microbiota bacteriana de la cavidad bucal de *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* son muy semejantes entre sí, pues, las bacterias *A. hydrophila*, *E. coli*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* se encuentran presentes en la cavidad bucal tanto de *B. ayerbei* como de *B. rhombeatus*. Sin embargo la bacteria *S. coagulans* negativa se observó únicamente en *B. rhombeatus*, entretanto *C. braakii* y *C. koseri* se hallaron exclusivamente en *B. ayerbei* estas diferencias están relacionadas con su distribución geográfica, ya que presentan ambientes diferentes (Henao *et al.* 2005).

Al realizar el cruce entre las bacterias aisladas y la especie de serpiente se observó que no difieren en mucho con respecto a su microbiota bacteriana; las bacterias más frecuentemente aisladas en este trabajo se encuentran registradas en numerosos estudios relacionados con la composición bacteriana de la cavidad bucal de diversas especies pertenecientes a la familia Viperidae (Costa *et al.* 2002, Goldstein *et al.* 1978, Henao *et al.* 2005, Jorge *et al.* 1990), lo cual indica que múltiples especies de serpientes comparten similitud con respecto a la composición de biota bacteriana bucal.

La microbiota bacteriana de la cavidad bucal de serpientes tanto de vida silvestre como de cautiverio presentan similitud (60%); esta similitud es muy importante, pues la mayor proporción de accidentes ofídicos se presentan en zonas rurales, lo cual permite crear un manejo adecuado para la profilaxis antibiótica en accidentes por mordeduras de *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* tanto cautivas como de vida silvestre.

Según Henao y colaboradores (2005), la biota bacteriana de la cavidad bucal de las serpientes depende de factores tales como, las condiciones de cautiverio, el tipo de alimento y el medio en general; esto se refuerza en ciertos estudios donde se manifiesta que la microbiota bacteriana está determinada por el medio donde el individuo se desarrolla (Blaylock 2001, Jorge y Ribeiro 1997) sin embargo, este trabajo no arrojó grandes diferencias relacionadas a la composición de la biota bacteriana en la cavidad bucal entre serpientes de vida silvestre y cautivas; posiblemente esto se deba al contacto frecuente que tienen las serpientes en estado de cautiverio con el medio natural en la actividad que

realizan de pastoreo, ya que dichas serpientes no estarían totalmente desligadas de su hábitat natural.

La composición de la microbiota bacteriana de la cavidad bucal de serpientes está dada además del ambiente por el tipo de alimentación que esta tenga, sin embargo en este estudio se observa que la mayoría de las bacterias aisladas están presentes tanto en serpientes que se alimentan de ratón de laboratorio (*Mus musculus*) como de aquellas que se alimentan de cualquier otro animal (pequeños mamíferos, lagartijas y serpientes).

Esta similitud podría ser dada por la hipótesis donde se menciona que la microbiota bacteriana bucal de las serpientes refleja la microbiota bacteriana fecal de su presa, por lo cual sería de gran importancia desarrollar estudios sólidos donde se demuestre la veracidad de dicha proposición (Goldstein *et al* 1981, Henao *et al* 2005). En general, las bacterias aisladas fueron sensibles al grupo de antibióticos seleccionados, estos fármacos en su mayoría actúan como bactericidas inhibiendo la síntesis de proteínas, la síntesis de la pared celular, la síntesis y/o el metabolismo de los ácidos nucleicos además de actuar como antagonistas metabólicos; induciendo así la muerte bacteriana. La Eritromicina, Rifampicina y Tigeciclina se comportan como agentes bacteriostáticos, sin embargo frente a organismos susceptibles son bactericidas.

8. CONCLUSIONES

- En la cavidad bucal de las serpientes de *B. ayerbeii* y *B. rhombeatus* tanto de vida silvestre como de cautiverio predominan bacterias Gram negativas sobre Gram positivas, las cuales actúan como agentes perniciosos para el humano en accidentes ofídicos.
- Las especies *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* pueden estar directamente relacionadas en complicaciones infecciones en un accidente ofídico, puesto que estos microorganismos, al adherirse a una herida desencadenan infecciones en los tejidos blandos que van desde una celulitis hasta una mionecrosis.
- Las especies *B. ayerbeii* y *B. rhombeatus* comparten similitud con relación a la composición bacteriana que presenta su cavidad bucal. Este resultado se asemeja y refleja en diversos estudios realizados sobre caracterización bacteriana de la microbiota bucal de serpientes del género *Bothrops*.
- Dado que el género *Bothrops* se caracteriza por tener los colmillos más largos que el de otras serpientes, podría ocasionarse un mayor daño tisular permitiendo así una adecuación más profunda de las bacterias.
- Este estudio concluye que el contacto frecuente que tienen las serpientes de cautiverio con el medio natural en la actividad que realizan de pastoreo influye en el porcentaje de semejanza que se encuentra entre la microbiota bacteriana de la cavidad bucal de serpientes cautivas y de vida silvestre.
- El Trimetoprim Sulfamethoxazole puede ser utilizado como agente antimicrobiano único en accidentes ofídicos causados por *B. ayerbeii* y *B. rhombeatus*, puesto que tanto en bacterias Gram negativas como en bacterias Gram positivas se observó sensibilidad al fármaco.

9. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios epidemiológicos a nivel departamental donde se evidencie la prevalencia de infecciones en accidentes ofídicos que respalden el uso de la profilaxis antibiótica.
- Se recomienda continuar con la caracterización de la microbiota bacteriana de la cavidad bucal de diversas especies de serpientes con sus respectivos estudios sensibilidad-resistencia a diversos antibióticos, con el fin de aportar al adecuado uso de los antibióticos en un accidente ofídico.
- Aumentar el tamaño de muestra de ejemplares en futuros estudios relacionados a la identificación de la composición bacteriana de la cavidad bucal de serpientes.
- Considerar ubicar el serpentario en un espacio diferente al actual, con el fin de aclarar las pequeñas diferencias que se observan en la microbiota de la cavidad bucal de serpientes cautivas de las de vida silvestre.

10. BIBLIOGRAFÍA

Angel, M. R. 1987. Serpientes de Colombia. Su relación con el hombre. Academia de Medicina de Medellín. Ediciones Especiales del Fondo Rotatorio de Publicaciones. Imprenta Dptal. de Antioquia; pp.: 149-177.

Ayerbe, S. 2000. Ofidismo en el Departamento del Cauca, Colombia. Epidemiología, Etiología, Clínica y Complicaciones. Revista Facultad de Ciencias Universidad del Cauca 2: 21-27.

Ayerbe, S. 2001. Tratamiento del Ofidismo en el Departamento del Cauca, Colombia. Revista Facultad de Ciencias Universidad del Cauca 3: 20-26.

Ayerbe, S., Latorre, J. P. 2009. Manual para la Prevención y Mejoramiento en la atención del Paciente con Accidente Ofídico. Gobernación del Departamento del Cauca, Secretaría Departamental de Salud. ISBN. 978-958-44-5272-6. Editorial López, Popayán. 60 p.

Blaylock, R. S. M. 2001. Normal Oral Bacterial Flora From Some Southern African Snakes. *The Onderstepoort J of Vet Res.* 68(3):175-182.

Bolaños, R. 1982. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. Revista Costarricense de Ciencias Médicas 3: 165-184.

Brooks, G. F., Butel, J. S., Morse, S. A. 2005. Bacteriology En: Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 23 ed. Tr. Francisco Sánchez Frago. 18ed. México: Manual Moderno 2005. p. 145-243.

Costa, J. L., De Siqueiera, F. 2002. Animais Peconhentos No Brasil. Biología, Clínica y Terapéutica del Accidente. Ed. Sarvier FASPEP. Sao Paulo. 468 pp.

Cuesta, J., Peña, L., Zuluaga, A., F. 2008. Is antibiotic prophylaxis necessary in ophidism? *Infect* 12: 54-63.

Chippaux, J. P. 1998. Snake bites: Appraisal of the Global Situation. *Bulletin of the World Health Organization*, 76(5):515-524.

Estrada, D., Vélez, J., Ruiz, E., Palacio, L. 2007. Envenenamiento Ofídico. *Salud Uninorte* 23: 96-111.

- Folleco, F. A. J. 2010. Taxonomía del complejo *Bothrops asper* (SERPENTES: VIPERIDAE) en el Sudoeste de Colombia. Revalidación de la Especie *Bothrops rhombeatus* (garcía 1896) y Descripción de una Nueva Especie. Revista Novedades Colombianas On Line 10: 1-34.
- Goldstein, E., Citron, D., Wield, B., Blachman, U., Sutter, V., Miller, T., Finegold, S. 1978. Bacteriology of human and animal bite wounds. Journal of Clinical Microbiology 8: 667.
- Goldstein, E. J., Agyare, E. O., Vagvolgyi, A. E., Halpern, M. 1981. Aerobic bacterial oral flora of garter snakes: development of normal flora and pathogenic potential for snakes and humans. Journal of Clinical Microbiology 13: 954.
- Henao, E., Latorre, J., Muñoz, C., Caldas, L., Delgado, S., Ayerbe, S. 2005. 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 - Universidad del Cauca. 7(1):23-29.
- Jorge, M., Mendonça, J., Ribeiro, L., Silva, M., Kusano, E., Cordeiro, C. 1990. Bacterial flora of the oral cavity, fangs and venom of *Bothrops jararaca*: possible source of infection at the local bite. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 32: 6-10.
- Jorge, M., Ribeiro, L. 1997. Infections in the bite site after envenoming by snakes of the *Bothrops* genus. Journal of Venomous Animals and Toxins 3: 264-272.
- Jorge, M., Ribeiro, L., Da Silva, M., Kusano, E., de Mendonça, J. 1994. Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: a prospective study. Toxicon 32: 743-748.
- Lopez, N., Lopera, C., Ramirez, A. 2008. 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. 0120-2448.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson Educación, S.A. Madrid.
- Montiel, A. F. 1997. Flora Bacteriana Habitual. Boletín de la Escuela de Medicina - Universidad Católica de Chile. 26:3.
- Nilson, L., Clara, L., Alex, R. 2008. Características de los pacientes con accidente ofídico y complicaciones infecciosas atendidos en el Hospital Pablo Tobón Uribe entre los años 2000 y 2006. Acta Med Colomb 33.
- Otero, R., Gutiérrez, J., Beatriz Mesa, M., Duque, E., Rodríguez, O., Luis Arango, J., Gómez, F., Toro, A., Cano, F., María Rodríguez, L. 2002. Complications of *Bothrops*,

Porthidium, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* 40: 1107-1114.

Pineda, D. 2002. Accidentes por Animales Venenosos. Div. de Bibliotecas y Publicaciones. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, D.C. Pág. 45.

Pineda, D., Ghotme, K., Aldeco, M., Montoya, P. 2002. Accidentes ofídicos en Yopal y Leticia, Colombia, 1996-1997. *Biomédica* 22: 14-21.

Pizo, R. E. N. 2006. Determinación de la Dosis Letal 50 del Veneno de tres Poblaciones de *Bothrops asper* (SERPENTES: VIPERIDAE) y su Incidencia Epidemiológica en el Departamento del Cauca, Colombia. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación.

Prescott, L., Harley, J., Klein, D. 2004. *Microbiología: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.*

Shek, K., Tsui, K., Lam, K., Crow, P., Ng, K., Ades, G., Yip, K., Grioni, A., Tan, K., Lung, D. 2009. Oral bacterial flora of the Chinese cobra (*Naja atra*) and bamboo pit viper (*Trimeresurus albolabris*) in Hong Kong SAR, China. *Hong Kong Med J* 15: 183-190.

Soveri, T., Seuna, E. R. 1986. Aerobic oral bacteria in healthy captive snakes. *Acta Veterinaria Scandinavica* 27: 172-181.

Tagwireyi, D., Ball, D., Nhachi, C. 2001. Routine prophylactic antibiotic use in the management of snakebite. *BMC Clinical Pharmacology* 1: 4.

Theakston, R. D. G., Phillips, R. E., Looareesuwan, S., Echeverria P., Makin, T., Warrell, D. A. 1990. Bacteriological studies of the venom and mouth cavities of wild Malayan pit vipers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 84:875-879.