



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Presentada por:**

**Stephany Young Yusty**

**Título:**

**Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno  
de serpientes de la familia *Viperidae* mantenidas en cautiverio.**

**Directora de Tesis:**

**Dra. Alexa Prescilla Ledezma**

**Co-asesor:**

**Dr. Celestino Aguilar**

**Fecha:**

**Abril 2025**



## **Dedicatoria**

A la memoria de mi padre, **Woodrow Young Mow**, cuyo sueño era verme completar esta etapa de mi formación académica y profesional. Tu apoyo incondicional, enseñanzas y amor siguen guiándome.

A mis adorados y amados hijos, Aleeah Stephany Chen Young y Michael Ethan Chen Young, fuentes inagotables de motivación, amor y alegría. Que este logro les inspire a perseguir sus propios sueños.

Esta tesis es el fruto de todo su amor y mi esfuerzo...

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradezco a Dios por guiarme y darme la capacidad, fortaleza y resiliencia necesaria para completar esta etapa de mi vida académica.

A mi esposo, Michael Chen Fong, por su amor, comprensión y apoyo incondicional a lo largo de este camino. Siempre juntos, en las buenas, en las malas y en las locuras...

A mi hermana, Belsy Soraya Orozco Yusty, por estar siempre a mi lado. Eres fuente incansable e inagotable de amor, guía y soporte. Te amo por siempre y para siempre.

A mi madre, Luz Marina Yusty de Young, por ser, a lo largo de mi vida, un ejemplo de esfuerzo incansable, tenacidad y resiliencia.

A mi asesora de tesis, Dra. Alexa Prescilla Ledezma, por su constante apoyo, guía y paciencia durante la ejecución de este proyecto. Su dedicación y confianza en mi capacidad y desempeño han sido fundamentales para el desarrollo y éxito de esta investigación.

A mi co-asesor, Dr. Celestino Aguilar, por su amistad, acompañamiento, tiempo, guía y asesoramiento en el desarrollo de este proyecto.

A todos mis profesores de la maestría, por su esmerada dedicación, guía y valiosos conocimientos que marcaron profundamente mi formación académica. Todos han sido fuente de inspiración y un pilar fundamental en este camino.

A la Profesora Hildaura Acosta de Patiño, por facilitarme el acceso a los especímenes conservados en el Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET), y a los señores David Correa y John Cleghorn, por su valioso apoyo en la manipulación de los especímenes para la toma de muestras.

Mi más sincero agradecimiento a las instituciones y personas que hicieron posible la realización de este proyecto de tesis:

- Al Departamento de Microbiología Humana, en especial a la Dra. María Mireya Muñoz, por su apoyo a todas las iniciativas de investigación que se desarrollan en los laboratorios bajo su cargo y supervisión.
- Al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá, por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos, en especial a mis muy estimadas profesoras y jefas, Dra. Nora de Moreno y Profesora Carmen Indira Espino.
- Al Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá, por facilitarme el acceso a sus instalaciones.

Agradecimientos muy especiales a la Dra. Griselda Arteaga y al Mgtr. Orlando Serrano Garrido.

- Al Departamento de Genómica del Instituto Conmemorativo Gorgas, por facilitarme el uso sus instalaciones, equipos y reactivos para completar la fase molecular de este proyecto, especialmente al Dr. Alexander Martínez y la Mgtr. Claudia González.

A la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá, por los fondos otorgados a través de su Convocatoria Universitaria a Fondos de Investigación, que hicieron posible la realización de este estudio.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento por contribuir a la culminación exitosa de esta etapa académica.

## Índice General

Resumen.....	8
Abstract.....	9
1. Introducción .....	10
2. Justificación .....	14
3. Importancia y Pertinencia del proyecto.....	17
4. Objetivos General y Específicos .....	20
4.1 Objetivo General.....	20
4.2 Objetivos Específicos:.....	20
5. CAPÍTULO I: Marco Teórico.....	22
5.1 Serpientes venenosas y su impacto en la salud pública .....	22
5.1.1 Epidemiología global de las mordeduras de serpientes .....	22
5.1.2 Epidemiología regional de mordeduras de serpientes .....	24
5.1.3 Impacto en la salud pública de los accidentes ofídicos en Panamá... ..	26
5.1.4 Impacto socioeconómico de los accidentes ofídicos en Panamá.....	28
5.1.5 <i>Familia Viperidae</i> .....	31
5.2 Venenos de serpientes.....	42
5.2.1 Composición y propiedades bioquímicas .....	43
5.2.2 Efectos fisiopatológicos.....	48
5.2.3 Importancia de la producción de antivenenos .....	49
5.2.4 Panamá y la Producción de antivenenos .....	50
5.3 Microbiota de serpientes .....	51
5.3.1 Concepto general de microbiota .....	51
5.3.2 Microbiota oral y del veneno en serpientes.....	52
5.3.3 Comparación de las comunidades bacterianas orales entre ofidios con y sin veneno.....	53
5.3.4 Factores que influyen en la composición microbiana.....	53
5.3.5. Influencia del cautiverio en la microbiota de serpientes .....	55
5.3.6 Complicaciones infecciosas asociadas al accidente ofídico .....	56
5.3.7 Resistencia a antibióticos de las bacterias presentes en cavidad bucal de serpientes .....	62

5.4	Técnicas de estudio de la diversidad bacteriana.....	63
5.4.1	Métodos dependientes de cultivo.....	64
5.4.2	Métodos independientes de cultivo.....	66
5.5	Manejo y cuidado de serpientes en cautiverio.....	74
5.5.1	Alimentación y Nutrición.....	77
5.5.2	Manejo y Manipulación.....	79
5.5.3	Enfermedades Comunes.....	79
6.	CAPÍTULO II: Metodología.....	81
6.1	Tipo de Estudio.....	81
6.2	Universo y muestras de estudio.....	81
6.3	Criterios de inclusión y exclusión.....	84
6.4	Procedimiento de Toma de Muestras.....	85
6.4.1	Manipulación de las Serpientes.....	85
6.4.2	Toma de Muestras de la Cavidad Oral.....	86
6.4.3	Ordeño y manejo del veneno.....	87
6.4.4	Medio de transporte de muestras.....	90
6.5	Identificación de bacterias mediante Técnicas Dependientes de Cultivo.....	91
6.5.1	Crecimiento y aislamiento de bacterias.....	91
6.5.2	Identificación de aislamientos en VITEK® 2 COMPACT.....	96
6.6	Identificación de bacterias mediante técnicas independientes de Cultivo (Técnicas Moleculares).....	100
6.6.1	Extracción de ADN genómico de las muestras orales colectadas....	100
6.6.2	Preparación de Bibliotecas.....	101
6.6.3	Cuantificación, Normalización y Agrupación de Bibliotecas.....	109
6.6.4	Desnaturalización de las bibliotecas.....	114
6.6.5	Secuenciación Masiva.....	115
6.6.6	Análisis Bioinformáticos.....	116
6.6.7	Análisis Estadísticos.....	118
6.6.8	Aval Bioético.....	118
7.	CAPÍTULO III: Resultados.....	120
7.1	Identificación de bacterias mediante técnicas Dependientes de Cultivo..	120
7.1.1	Especies bacterianas aisladas por tipo de serpiente.....	123
7.1.2	Perfiles de resistencia a antibióticos.....	127

7.2	Identificación de bacterias mediante técnicas independientes de Cultivo	134
7.2.1	Procesamiento de secuencias y control de calidad	134
7.2.2	Diversidad de ASVs	136
7.2.3	Eficiencia del procesamiento bioinformático	137
7.2.4	Composición taxonómica en la Cavidad Oral	138
7.2.5	Composición taxonómica en muestras de veneno	151
8.	CAPÍTULO IV: Discusión	158
9.	Conclusiones	176
10.	Recomendaciones	178
11.	Bibliografía	180
12.	Anexos	213

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Distribución geográfica del número estimado de envenenamientos y muertes por mordedura de serpiente. ....	23
<b>Figura 2:</b> Bothrops asper, serpiente "terciopelo" o "X". ....	25
<b>Figura 3:</b> Distribución de algunas especies de la familia Viperidae. ....	33
<b>Figura 4:</b> Serpientes de la familia Viperidae. ....	38
<b>Figura 5:</b> Niveles de toxinas en el veneno de vipéridos y elápidos. ....	44
<b>Figura 6:</b> Los venenos de serpiente afectan diversos sistemas del cuerpo y sus efectos tóxicos dependen principalmente de su composición específica. ....	46
<b>Figura 7:</b> Dos enfoques para el estudio de la microbiota. ....	63
<b>Figura 8:</b> Los adaptadores de secuenciación discriminan los amplicones y son una secuencia artificial. ....	68
<b>Figura 9:</b> Visión general de los métodos de secuenciación de nueva generación (NGS) del gen 16S rRNA y metagenómica shotgun. ....	70
<b>Figura 10:</b> Estructura del gen 16S rRNA y posibles cebadores. ....	71
<b>Figura 11:</b> Toma de muestra del fondo de saco mucoso y colmillos. ....	87
<b>Figura 12:</b> Procedimiento para la extracción de veneno mediante la técnica de ordeño. ....	89
<b>Figura 13:</b> Cultivo en Agar Sangre, Agar McConkey y Agar Chocolate de cada muestra de hisopado de la cavidad oral y de veneno. ....	92
<b>Figura 14:</b> Sistema de incubación anaeróbica. ....	94
<b>Figura 15:</b> Esquema general de la preparación de suspensiones con las cuales fueron inoculadas las tarjetas de identificación y sensibilidad a antibióticos del VITEK. ....	97
<b>Figura 16:</b> Carrusel de trabajo con las muestras para identificación y sensibilidad por VITEK. ....	98
<b>Figura 17:</b> Tabla de resultados generada por el sistema VITEK 2 COMPACT. .	99
<b>Figura 18:</b> Flujo de trabajo del amplicón 16S del rRNA regiones V3 y V4. ....	102
<b>Figura 19:</b> TruSeq Index Plate Fixture. ....	107
<b>Figura 20:</b> Kit Just-a-Plate™ 96 PCR Normalization and Purification. ....	110
<b>Figura 21:</b> Cuantificación de la concentración de ADN de doble cadena en el fluorómetro Qubit de invitrogen. ....	112
<b>Figura 22:</b> Pool de bibliotecas de ADN. ....	113

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1:</b> Número de especímenes muestreados para cada especie de serpiente estudiada. ....	82
<b>Tabla 2:</b> Especímenes muestreados en el estudio .....	83
<b>Tabla 3</b> Programa de Amplificación de la región V3 y V4 del gen 16S del rRNA. ....	104
<b>Tabla 4</b> Programa de Amplificación utilizado para la indexación utilizando el kit Nextera XT Index. ....	106
<b>Tabla 5</b> Esquema de indexación de muestras. ....	108
<b>Tabla 6</b> Esquema de indexación del cebador 1 y cebador 2 para cada muestra. ....	109
<b>Tabla 7</b> Resultados obtenidos del aislamiento y la identificación de bacterias mediante el sistema bioquímico automatizado VITEK. ....	121
<b>Tabla 8</b> Análisis de la sensibilidad antimicrobiana entre las diferentes especies bacterianas .....	128
<b>Tabla 9</b> Filtrado y Procesamiento de Secuencias Obtenidas Mediante la Secuenciación.....	136
<b>Tabla 10</b> Características Taxonómicas y Fisiológicas de los Géneros Bacterianos Identificados.....	144

## Índice de Gráficas

<b>Gráfica 1:</b> Incidencia de Picadura de Alacrán y Mordedura de Ofidio. República de Panamá. Años: 2000-2021. ....	27
<b>Gráfica 2</b> Porcentaje de identificación bacteriana a través de métodos dependientes de cultivos.....	122
<b>Gráfica 3</b> Diversidad de Especies Bacterianas por espécimen mediante métodos dependientes de cultivo. ....	125
<b>Gráfica 4</b> Perfil de Sensibilidad y Resistencia a Antibióticos de Bacterias Gram Negativas Aisladas.....	131
<b>Gráfica 5</b> Perfiles de sensibilidad y resistencia a antibióticos de especies bacterianas aisladas de cavidades orales de serpientes .....	133
<b>Gráfica 6</b> Composición Bacteriana a Nivel de Filo en las Muestras Analizadas	139
<b>Gráfica 7</b> Composición Bacteriana a Nivel de Familia en las Muestras Analizadas. ....	141
<b>Gráfica 8</b> Composición Bacteriana a Nivel de Género en las Muestras Analizadas. ....	142
<b>Gráfica 9</b> Distribución de bacterias potencialmente patógenas para los seres humanos en la cavidad oral de serpientes.....	144
<b>Gráfica 10</b> Abundancia Relativa de Géneros Bacterianos por Especie de Serpiente obtenida mediante secuenciación masiva. ....	146
<b>Gráfica 11</b> Diversidad Alfa de la Microbiota Oral en Diferentes Especies de Serpientes.....	148
<b>Gráfica 12</b> Gráfico de Dispersión de la Microbiota Oral - Análisis de PCoA por Especie de Serpiente. ....	150
<b>Gráfica 13</b> Abundancia Relativa de Géneros Bacterianos en Cavidad Oral y Veneno de <i>Porthidium lansbergii</i> obtenida mediante secuenciación masiva. ...	152
<b>Gráfica 14</b> Gráfico de dispersión muestra las diferencias en la Composición Bacteriana entre la Microbiota Oral y del Veneno de <i>Porthidium lansbergii</i> (Análisis de PCoA).....	154
<b>Gráfica 15</b> Comparación de la Abundancia de Géneros Bacterianos entre Cavidad Oral y Veneno de <i>Cerrophidion sasai</i> . ....	155
<b>Gráfica 16</b> Diversidad Beta entre las Comunidades Microbianas Orales y del Veneno de <i>Cerrophidion sasai</i> (Análisis de PCoA).....	156

## Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico  
ADNg: ADN genómico  
ARN: Ácido Ribonucleico  
ASV: Variante de Secuencia de Amplicón  
BLEE:  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido  
CEIBA: Comité de Ética de la Investigación y el Bienestar de los Animales  
CIIMET: Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos  
CIM: Concentración Inhibitoria Mínima  
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute  
CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono  
CUFI: Convocatoria Universitaria de Fondos de Investigación  
dNTP: Desoxirribonucleótido Trifosfato  
ESBL:  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido  
ETD: Enfermedades Tropicales Desatendidas  
g: Gramo  
IBD: Inclusión del Cuerpo  
INSPI: Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación  
kg: Kilogramo  
L: Litro  
mL: Mililitro  
 $\mu$ L: Microlitro  
mM: Milímetro  
 $\mu$ M: Micrómetro  
ng: Nanogramo  
NGS: Secuenciación de Nueva Generación  
nM: Nanómetro  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
OPS: Organización Panamericana de la Salud  
OTU: Unidad Taxonómica Operativa  
pb: Pares de Bases  
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa  
PENCYT: Plan Estratégico Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación  
pg: Picogramo  
PLA<sub>2</sub>: Fosfolipasa A<sub>2</sub>  
qPCR: PCR Cuantitativa  
RELAPA: Red de Laboratorios Públicos Productores de Antivenenos de América Latina  
rpm: Revoluciones por minuto  
rRNA: ARN Ribosomal  
s: Segundo  
SFD: Enfermedad Fúngica de las Serpientes  
SVMP: Metaloproteínasa del Veneno de Serpiente  
URTD: Enfermedad del Tracto Respiratorio Superior V: Voltio  
°C: Grados Celsius

## Resumen

Las mordeduras de serpientes venenosas son un problema de salud pública mundial, causando entre 81,000 y 138,000 muertes anuales y 400,000 discapacidades permanentes. Las complicaciones infecciosas son un desafío significativo en el manejo de mordeduras de serpientes, afectando hasta un 33% de los pacientes. Estas infecciones, que incluyen celulitis, abscesos y fascitis necrotizante, se originan por la inoculación de bacterias de la cavidad oral de la serpiente y la alteración de tejidos por el veneno. Este estudio investigó la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia *Viperidae* mantenidas en cautiverio en Panamá. Se analizaron 48 muestras de cuatro especies (*Bothrops asper*, *Bothriechis nigroviridis*, *Cerrophidion sasai* y *Porthidium lansbergii*) utilizando métodos dependientes e independientes de cultivo. Los métodos dependientes de cultivo identificaron 41 cepas bacterianas pertenecientes a 12 géneros, con predominancia de bacterias Gram negativas como *Morganella morganii* y *Providencia rettgeri*. La secuenciación del gen 16S rRNA identificó 2,237 variantes de secuencia de amplicones (ASVs) únicas. Los métodos independientes de cultivo permitieron la identificación de 37 géneros bacterianos, en comparación con los 12 géneros identificados por métodos dependientes de cultivo. Los resultados destacan la complejidad de la microbiota oral de estas serpientes y su potencial implicación en infecciones secundarias tras mordeduras.

**Palabras clave:** Microbiota oral, *Viperidae*, secuenciación 16S rRNA, diversidad bacteriana, accidentes ofídicos.

## **Abstract**

Venomous snake bites are a global public health issue, causing between 81,000 and 138,000 annual deaths and 400,000 permanent disabilities. Infectious complications are a significant challenge in snake bite management, affecting up to 33% of patients. These infections, including cellulitis, abscesses, and necrotizing fasciitis, originate from bacteria inoculation from the snake's oral cavity and tissue alteration by venom. This study investigated the bacterial diversity present in the oral cavity and venom of snakes from the *Viperidae* family kept in captivity in Panama. Forty-eight samples from four species (*Bothrops asper*, *Bothriechis nigroviridis*, *Cerrophidion sasai*, and *Porthidium lansbergii*) were analyzed using culture-dependent and culture-independent methods. Culture-dependent methods identified 41 bacterial strains belonging to 12 genera, with a predominance of Gram-negative bacteria such as *Morganella morganii* and *Providencia rettgeri*. Antimicrobial resistance analysis revealed variable patterns, including multidrug-resistant strains. 16S rRNA gene sequencing identified 2,237 unique amplicon sequence variants (ASVs). Culture-independent methods allowed the identification of 37 bacterial genera, compared to the 12 genera identified by culture-dependent methods. The results highlight the complexity of the oral microbiota of these snakes and its potential implication in secondary infections following snakebites.

**Keywords:** Oral microbiota, *Viperidae*, 16S rRNA sequencing, bacterial diversity, snakebite accidents.

## 1. Introducción

Las mordeduras de serpientes venenosas constituyen un problema significativo de salud pública a nivel mundial, con implicaciones que van desde efectos locales inmediatos hasta complicaciones sistémicas graves. Se estima que anualmente ocurren aproximadamente 5 millones de mordeduras de serpiente, de las cuales entre 94,000 y 125,000 resultan en muertes, y hasta 400,000 en amputaciones y otras secuelas severas (Valencia & Zavaleta, 2017; J. et al., 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido las mordeduras de serpientes en la lista de Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD) de mayor impacto en la salud pública, afectando predominantemente a las poblaciones rurales y pobres en regiones tropicales y subtropicales (PANAFTOSA, 2022). La carga del envenenamiento por mordedura de serpiente es particularmente pronunciada en las zonas rurales, donde el acceso a la atención médica es limitado y la conciencia sobre las medidas preventivas suele ser insuficiente (Lizarazo et al., 2020).

En América Latina, las mordeduras de serpientes representan un problema de salud pública significativo (PANAFTOSA, 2023). La incidencia anual estimada de mordeduras de serpiente en la región es de aproximadamente 57,000 casos, resultando en alrededor de 3,000 muertes y una carga significativa de morbilidad,

incluyendo discapacidades a largo plazo (Valencia & Zavaleta, 2017; J. et al., 2017).

En Panamá, los accidentes ofídicos representan una amenaza significativa para la salud pública, con el país experimentando una de las incidencias más altas de envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica (Gutiérrez, 2014). Se registran en promedio anualmente más de 2 mil casos de mordedura de ofidios, de los cuales el 2-3% resultan en fallecimientos. La serpiente más peligrosa por su veneno y agresividad es la *Bothrops asper*, responsable del 95% de las mordeduras en el país (Ministerio de Salud de Panamá, 2021).

A pesar de la importancia de los accidentes ofídicos en la salud pública, actualmente no existe en Panamá un estudio exhaustivo sobre la biodiversidad de bacterias, presentes en la cavidad oral y veneno de las serpientes pertenecientes a la familia *Viperidae* en cautiverio, utilizando técnicas de Secuenciación Masiva de Nueva Generación (GNS). Esta información es crucial para comprender la composición del veneno utilizado en la inmunización de caballos para la elaboración de sueros antiofídicos, así como para el desarrollo de tratamientos antimicrobianos efectivos para los accidentes ofídicos.

El objetivo general de este estudio fue estudiar la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia *Viperidae* mantenidas en cautiverio en el serpentario del Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET). Los objetivos específicos incluyeron realizar

el cultivo de las bacterias obtenidas del veneno y del hisopado de la cavidad oral, identificar por métodos bioquímicos las bacterias aerobias, analizar mediante técnicas moleculares la diversidad bacteriana presente, y crear una base de datos de las bacterias presentes en el veneno e hisopado de la cavidad oral de las serpientes estudiadas.

Este estudio es relevante e innovador por diversas razones: proporciona datos específicos y relevantes para la región panameña sobre la interacción entre las serpientes autóctonas y las bacterias locales, aborda un vacío en la literatura sobre la microbiota bucal de las serpientes en el contexto panameño, contribuye al conocimiento sobre la variabilidad de la microbiota a lo largo del tracto gastrointestinal en vertebrados, tiene implicaciones directas para la salud y bienestar de los especímenes en cautiverio, y permite diseñar mejores estrategias preventivas y terapéuticas para las personas afectadas por mordeduras de serpientes en Panamá.

La metodología empleada combinó técnicas dependientes e independientes de cultivo, incluyendo el aislamiento e identificación de bacterias mediante sistemas bioquímicos automatizados, extracción de ADN, amplificación del gen 16S rRNA, y secuenciación de nueva generación, seguido de análisis bioinformáticos para la caracterización de la diversidad bacteriana.

Los resultados revelaron una diversidad significativa de bacterias en la cavidad oral y veneno de las serpientes estudiadas, identificando 41 cepas bacterianas

pertenecientes a 12 géneros diferentes mediante las técnicas dependientes de cultivo, con predominancia de bacterias Gram negativas. Las técnicas independientes de cultivo permitieron la identificación de 2,237 variantes de secuencia de amplicones (ASVs) únicas, con la identificación de 37 géneros bacterianos diferentes, proporcionando una visión más completa de la diversidad microbiana. Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para el manejo de accidentes ofídicos y la producción de antivenenos en Panamá.

## 2. Justificación

Panamá, alberga una biodiversidad herpetológica extraordinaria, incluyendo numerosas especies de serpientes venenosas de la familia *Viperidae*. Estas especies son responsables de un significativo número de accidentes ofídicos que representan un problema de salud pública en el país. A pesar de la relevancia clínica y ecológica de estos reptiles, existe actualmente un vacío científico importante en la caracterización microbiana de su cavidad oral y veneno mediante técnicas moleculares avanzadas como la Secuenciación Masiva de Nueva Generación (GNS).

Esta carencia de información constituye una limitación significativa para el desarrollo de protocolos terapéuticos optimizados para las complicaciones infecciosas secundarias a mordeduras de serpientes. Los estudios previos realizados en Panamá sobre microorganismos asociados a accidentes ofídicos se han basado principalmente en métodos tradicionales de caracterización fenotípica, lo cual proporciona una visión parcial de la diversidad microbiana real. La implementación de tecnologías de secuenciación avanzadas permitiría una identificación más precisa y exhaustiva de la microbiota asociada, superando las limitaciones inherentes a los métodos convencionales que frecuentemente subestiman la diversidad microbiana total.

El conocimiento detallado de la microbiota oral y del veneno de serpientes *Viperidae* en cautiverio tiene implicaciones directas para la calidad y eficacia del

veneno utilizado en la producción de sueros antiofídicos. La calidad microbiológica del veneno extraído es un factor determinante tanto para la salud de los animales inmunizados como para la seguridad y potencia del producto final, aspectos que impactan directamente en la efectividad del tratamiento administrado a las víctimas de mordeduras.

Las serpientes representan además un modelo vertebrado excepcional para el estudio de adaptaciones microbiológicas en ambientes biológicamente extremos. La cavidad oral de estos reptiles constituye un nicho ecológico único donde los microorganismos han evolucionado para coexistir con compuestos altamente tóxicos y enzimas proteolíticas presentes en el veneno. Esta interacción biológica singular ofrece oportunidades para la identificación de adaptaciones metabólicas de relevancia biotecnológica, ampliando así el alcance e impacto potencial de esta investigación más allá del ámbito médico inmediato.

El monitoreo del estado microbiológico de serpientes mantenidas en cautiverio para fines científicos o de conservación adquiere particular relevancia considerando que las condiciones ex situ pueden modificar significativamente la composición de su microbiota natural. Este aspecto tiene implicaciones directas tanto para la salud y bienestar de los especímenes como para la validez de las investigaciones realizadas con estos animales.

La especificidad geográfica de este estudio representa otro de sus valores fundamentales. La biodiversidad panameña, resultado de su particular historia

geológica como puente biológico entre continentes, ha generado ecosistemas únicos donde las interacciones entre serpientes y microorganismos pueden presentar características distintivas y hasta ahora inexploradas. Los hallazgos derivados de esta investigación tendrán por tanto una relevancia contextual directa para las estrategias de salud pública nacionales, ofreciendo información crítica para el desarrollo de protocolos de tratamiento antimicrobiano específicamente adaptados a la realidad epidemiológica local de los accidentes ofídicos.

### 3. Importancia y Pertinencia del proyecto

La pertinencia de una propuesta científica no se mide únicamente por su capacidad intrínseca para avanzar en el conocimiento, sino también por su alineación con las directrices y objetivos nacionales e internacionales. En este contexto, el proyecto propuesto no solo es oportuno sino fundamental en múltiples aspectos:

**Estrategia Nacional de Ciencia y Tecnología (PENCIYT):** Acorde con el Plan Estratégico Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, una de las principales limitaciones que enfrenta nuestro país es la escasa investigación generada dentro de nuestras instituciones educativas. Este proyecto no solo aborda esa carencia, sino que crea una base sólida de datos y conocimientos, reposicionando a Panamá en el panorama en conjunto con otros países de Latinoamérica en el estudio y tratamiento de envenenamientos ofídicos y fortaleciendo nuestra capacidad investigativa a largo plazo.

**Compromiso Constitucional con la Salud Pública:** Tal como lo dicta el artículo 105 del capítulo 6º de la Constitución de la República de Panamá, garantizar la salud de la población es una responsabilidad indiscutible del Estado. Esta propuesta está directamente alineada con ese mandato, especialmente al considerar que las mordeduras de serpiente afectan desproporcionadamente a comunidades rurales marginadas. El desarrollo de antídotos más efectivos puede

mejorar considerablemente las condiciones de vida y la salud en estas áreas vulnerables.

**Avance hacia la Igualdad de Género:** Mientras el PENCYT identifica que solo el 35% de los investigadores en Panamá son mujeres, este proyecto desafía esa disparidad. La inclusión de investigadoras y tutoras femeninas en roles principales es un paso significativo hacia la reducción de la brecha de género en la ciencia en nuestro país.

**Alineación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la ONU:** Este proyecto se alinea con al menos tres ODS - promoviendo la salud y el bienestar; reforzando la igualdad de género; y fomentando alianzas estratégicas para alcanzar estos objetivos. Su éxito no solo beneficiará a Panamá, sino que también será una contribución valiosa a una agenda global de desarrollo sostenible.

**Ley 421 del 6 de febrero de 2024:** Que promueve la investigación, desarrollo, producción y comercialización de sueros antiponzoñosos, antivenenos y otros antídotos en la República de Panamá. Al alinearse directamente con las directrices de esta ley, la propuesta no solo es pertinente, sino que se convierte en una herramienta importante para la implementación efectiva. La confluencia de estos factores posiciona este proyecto no solo como relevante, sino como esencial tanto a nivel nacional como internacional. Su ejecución no es solo una

oportunidad, sino una responsabilidad en pro del bienestar de la nación y del avance científico nacional.

## 4. Objetivos General y Específicos

### 4.1 Objetivo General

Estudiar la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia *Viperidae* mantenidas en cautiverio en el serpentario del Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET).

### 4.2 Objetivos Específicos:

1. Cultivar y aislar las bacterias obtenidas del veneno y del hisopado de la cavidad oral de las serpientes de la familia *Viperidae* (*Bothriechis nigroviridis*, *Cerrophidion sasai*, *Porthidium lansbergii* y *Bothrops asper*) mantenidas actualmente en cautiverio en el serpentario del CIIMET.
2. Identificar por métodos bioquímicos las bacterias aerobias obtenidas del veneno e hisopado de la cavidad oral de las serpientes de la familia *Viperidae* (*Bothriechis nigroviridis*, *Cerrophidion sasai*, *Porthidium lansbergii* y *Bothrops asper*) mantenidas actualmente en cautiverio en el serpentario del CIIMET.
3. Analizar mediante técnicas moleculares la diversidad bacteriana presente en el veneno y en el hisopado de la cavidad oral de las serpientes de la familia *Viperidae* (*Bothriechis nigroviridis*, *Cerrophidion sasai*, *Porthidium lansbergii* y *Bothrops asper*) mantenidas actualmente en cautiverio en el serpentario del CIIMET.

4. Crear una base datos de las bacterias identificadas en el veneno e hisopado de la cavidad oral de las serpientes de la familia *Viperidae* (*Bothriechis nigroviridis*, *Cerrophidion sasai*, *Porthidium lansbergii* y *Bothrops asper*) mantenidas actualmente en cautiverio en el serpentario del CIIMET.

## **5. CAPÍTULO I: Marco Teórico**

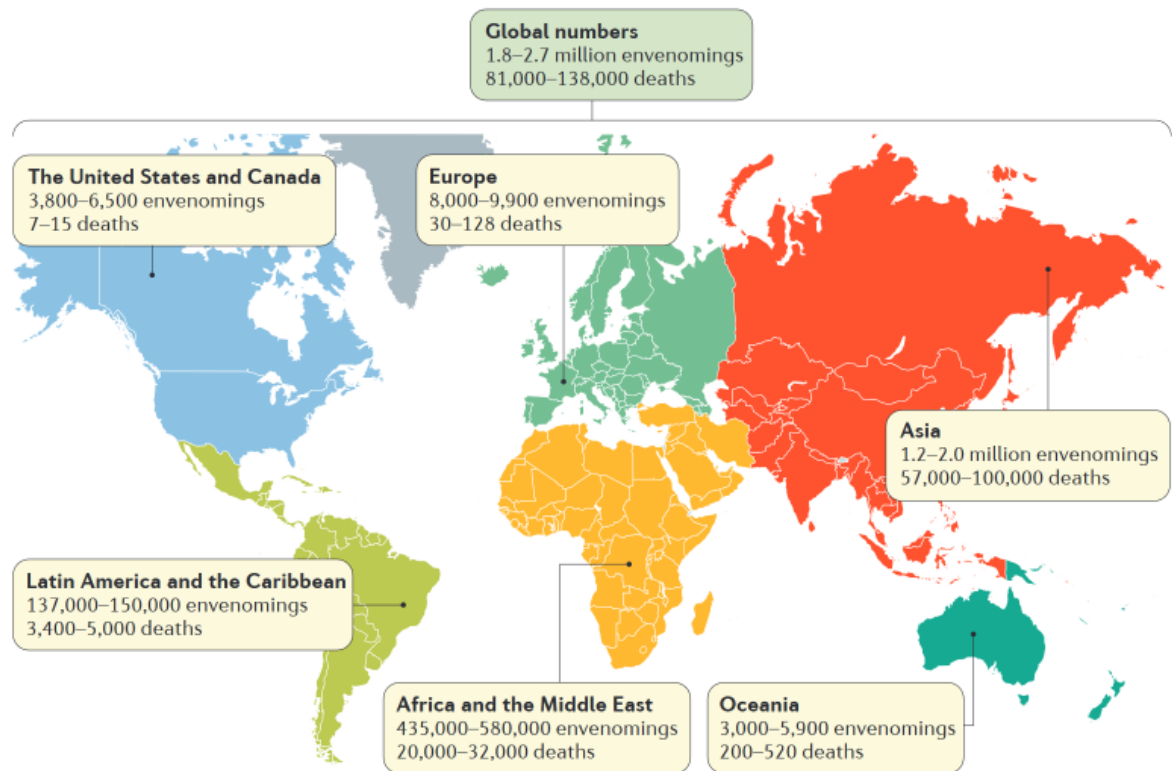
### **5.1 Serpientes venenosas y su impacto en la salud pública**

Las mordeduras de serpientes venenosas representan un problema significativo de salud pública a nivel mundial. Estas mordeduras pueden causar una variedad de efectos adversos, desde dolor local y daño tisular hasta complicaciones sistémicas graves y la muerte. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido las mordeduras de serpientes en la lista de Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD) de mayor impacto en la salud pública, afectando predominantemente a las poblaciones rurales y pobres en regiones tropicales y subtropicales (PANAFTOSA, 2022).

#### **5.1.1 Epidemiología global de las mordeduras de serpientes**

A nivel mundial, se estima que cada año ocurren entre 5.4 y 5.8 millones de mordeduras de serpientes, resultando en aproximadamente 2.7 millones de envenenamientos clínicamente significativos (Figura 1). De estos casos, alrededor de 81,000 a 138,000 personas mueren y otras 400,000 sufren discapacidades permanentes, como amputaciones, úlceras crónicas y limitaciones de la movilidad (Kasturiratne et al., 2008). La carga de las mordeduras de serpientes es desproporcionadamente alta en África subsahariana, Asia y América Latina, donde los sistemas de salud a menudo

carecen de recursos adecuados para el tratamiento y la prevención (Chippaux, 2017).



**Figura 1:** Distribución geográfica del número estimado de envenenamientos y muertes por mordedura de serpiente.

Los datos presentados constituyen una aproximación general del rango estimado de envenenamientos y muertes por mordedura de serpiente, dado que, en muchos países, la información confiable sobre la morbilidad y mortalidad por mordedura de serpiente es escasa, lo que resulta en datos sub reportados de esta condición tropical desatendida. El mayor impacto de los envenenamientos por mordedura de serpiente se produce en Asia, África subsahariana, América Latina y partes de Oceanía (Kasturiratne, A. et al.2008). Fuente: Gutiérrez et al., 2017.

Las mordeduras de serpientes son más comunes en áreas rurales donde las personas tienen contacto frecuente con serpientes debido a actividades agrícolas y de subsistencia. Los factores socioeconómicos y culturales también juegan un papel crucial en la incidencia y el manejo de las mordeduras de serpientes. En muchas comunidades, la falta de acceso a atención médica adecuada y la dependencia de tratamientos tradicionales contribuyen a la alta morbilidad y mortalidad (Williams et al., 2019).

### **5.1.2 Epidemiología regional de mordeduras de serpientes**

En América Latina, las mordeduras de serpientes representan un problema de salud pública significativo, con una incidencia estimada de 57,000 casos anuales. Las mordeduras de serpientes en esta región resultan en aproximadamente 3,000 muertes y numerosas discapacidades permanentes cada año (PANAFTOSA, 2023). La especie *Bothrops asper*, conocida como la serpiente "terciopelo" o "X" (Figura 2), es responsable de la mayoría de los envenenamientos en países como Panamá, donde se reporta que esta especie causa el 95% de las mordeduras (Ministerio de Salud de Panamá, 2021).



**Figura 2:** *Bothrops asper*, serpiente "terciopelo" o "X".

*Fuente: Instituto Clodomiro Picado.*

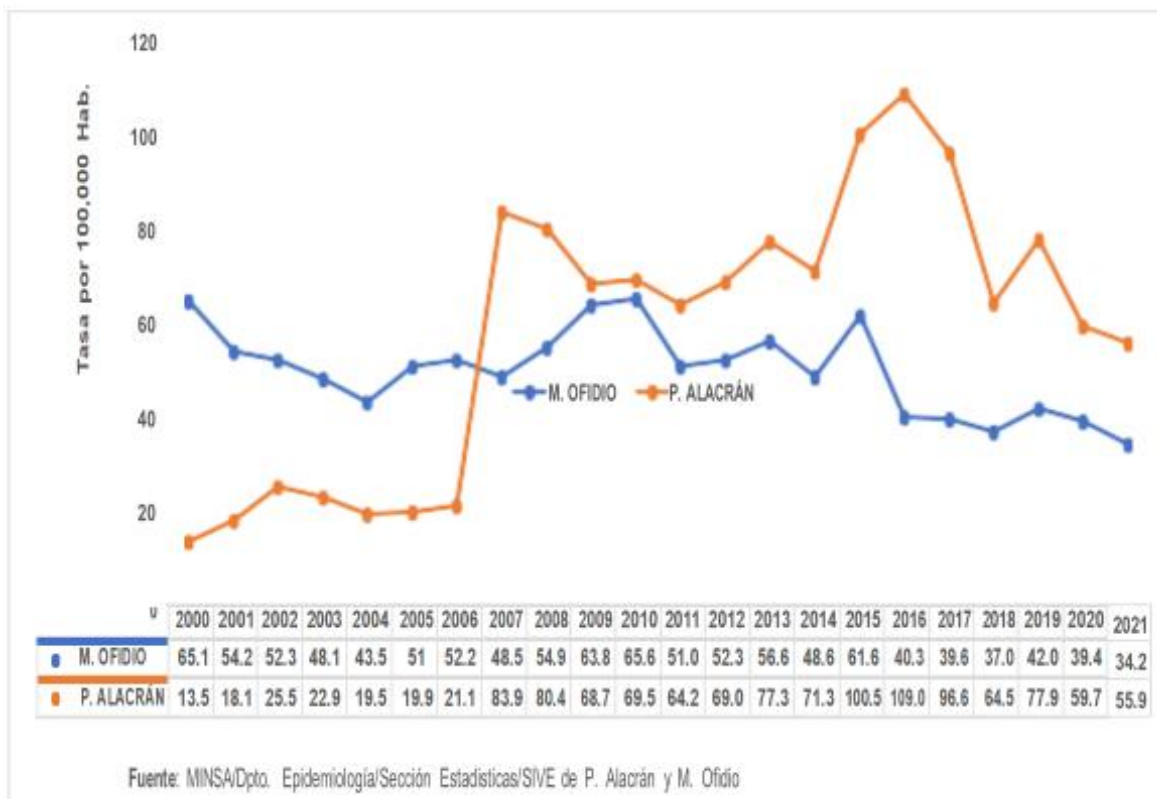
La distribución de las mordeduras de serpientes en América Latina muestra variaciones significativas entre diferentes países y regiones. En áreas rurales de Brasil, Colombia y Venezuela, la incidencia de mordeduras de serpientes es particularmente alta debido a la presencia de diversas especies venenosas y la proximidad de las comunidades humanas a los hábitats naturales de las serpientes (Fan et al., 2018). Además, la falta de antivenenos eficaces y la infraestructura médica limitada agravan el problema, resultando en una alta tasa de mortalidad y morbilidad (Warrell, 2019).

Para abordar este problema, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha implementado varias iniciativas, incluyendo la creación de la Red de Laboratorios Públicos Productores de Antivenenos de América Latina (RELAPA). Esta red tiene como objetivo mejorar la disponibilidad y accesibilidad de antivenenos seguros y eficaces en la región (PANAFTOSA, 2022). Sin embargo,

a pesar de estos esfuerzos, persisten desafíos significativos en términos de financiamiento, distribución y educación comunitaria.

### **5.1.3 Impacto en la salud pública de los accidentes ofídicos en Panamá**

Los accidentes ofídicos constituyen una amenaza considerable para la salud pública panameña. Las serpientes venenosas de Panamá se agrupan en dos familias: *Elapidae* (serpientes de coral y serpiente marina) y *Viperidae* (víboras). Entre las 130 especies, la familia *Viperidae* contiene las serpientes de mayor importancia médica, particularmente las del género *Bothrops*, que incluye especies como *Bothrops asper* y *Bothrops atrox* (Rueda et al., 2013; Rueda & Soares, 2010). Se registran en promedio anualmente más de 2 mil casos de mordedura de ofidios, de los cuales el 2-3% resultan en fallecimientos. La serpiente más peligrosa por su veneno y agresividad es la *Bothrops asper*, y es responsable del 95% de las mordeduras en nuestro país. En el caso de las mordeduras de ofidio, para el período 2007-2021, se registran rangos de 65 casos por cada 100,000 habitantes en el año 2000, y 34 casos por cada 100,000 habitantes en el 2021. (Gráfica 1) (Ministerio de Salud de Panamá, 2021). Esta incidencia ubica a Panamá como uno de los países con mayor riesgo de accidentes ofídicos en el continente americano.



**Gráfica 1:** Incidencia de Picadura de Alacrán y Mordedura de Ofidio. República de Panamá. Años: 2000-2021.

Fuente: Ministerio de Salud de Panamá, 2021.

La fauna ofídica de Panamá incluye tres familias de serpientes venenosas: *Viperidae*, *Elapidae* e *Hydrophiidae*, siendo la primera la responsable de la mayoría de los envenenamientos (Valderrama, 2003). Las especies de la familia *Viperidae*, particularmente *Bothrops asper*, son las principales causantes de accidentes ofídicos en el país. El envenenamiento por serpientes de la familia *Viperidae* produce efectos locales como edema, necrosis y hemorragia, así como manifestaciones sistémicas que incluyen coagulopatías, shock cardiovascular e insuficiencia renal (Valderrama, 2003).

Por su parte, las familias *Elapidae* e *Hydrophiidae* provocan principalmente efectos neurotóxicos. Un aspecto crítico en el manejo de los accidentes ofídicos es el tiempo transcurrido entre la mordedura y la atención médica (Meeran et al., 2016; Raeside, 2011). Un estudio realizado en el Hospital de Santiago, Veraguas, reveló que el 33.9% de los pacientes buscaron asistencia médica entre 3 y 6 horas después del accidente, mientras que el 37.3% lo hicieron en las primeras 2 horas (Haughton, 2019). Este retraso en la atención puede tener consecuencias graves en el pronóstico del paciente, especialmente en áreas rurales con acceso limitado a servicios de salud.

La prevención y el tratamiento adecuado de los accidentes ofídicos son fundamentales para reducir su impacto en la salud pública. El Ministerio de Salud de Panamá ha establecido protocolos de notificación obligatoria para estos casos, aunque se reconoce la existencia de un subregistro significativo (Valderrama, 2003). La disponibilidad y aplicación oportuna de sueros antiofídicos, junto con el manejo adecuado de las complicaciones, son pilares fundamentales en el tratamiento.

#### **5.1.4 Impacto socioeconómico de los accidentes ofídicos en Panamá**

El impacto socioeconómico de los accidentes ofídicos en Panamá es un tema complejo que afecta múltiples aspectos de la sociedad y la economía del país. Los accidentes ofídicos en Panamá, al igual que en otros países de la región, afectan principalmente a poblaciones rurales y trabajadores agrícolas. Según un

estudio realizado por Gutiérrez (2011), en América Central los grupos más vulnerables son los agricultores, trabajadores forestales y habitantes de zonas rurales con acceso limitado a servicios de salud. Esto implica que las personas de bajos recursos económicos son las más propensas a sufrir estos accidentes, lo que puede exacerbar las desigualdades socioeconómicas existentes.

El costo del tratamiento de un accidente ofídico puede ser significativo, especialmente debido al alto precio de los antivenenos. Aunque en Panamá, el sistema de salud pública proporciona atención gratuita para estos casos, el costo para el Estado es considerable. Gutiérrez et al. (2017) señalan que, en América Latina, el costo promedio de tratamiento por paciente puede oscilar entre \$150 y \$2,000.00 dependiendo de la gravedad del caso y el tipo de antiveneno utilizado.

Las víctimas de mordeduras de serpientes a menudo requieren hospitalización y períodos de recuperación prolongados. Esto resulta en una pérdida significativa de días laborables, afectando tanto a los individuos y a sus familias, como a la economía local, especialmente en áreas rurales donde la agricultura es la principal actividad económica (Kipanyula & Kimaro, 2015; Vaiyapuri et al., 2013). Chippaux (2017) estima que, en América Latina, los accidentes ofídicos pueden resultar en una pérdida promedio de 10 a 15 días de trabajo por caso. En el contexto panameño, esto podría traducirse en una disminución de la productividad agrícola y un impacto negativo en los ingresos familiares de las comunidades rurales.

En algunos casos, los accidentes ofídicos pueden resultar en discapacidades permanentes, lo que tiene un impacto a largo plazo en la capacidad productiva de las víctimas y sus familias. Habib et al. (2015) señalan que hasta el 20% de las víctimas de mordeduras de serpientes en regiones tropicales pueden sufrir secuelas permanentes, como amputaciones o disfunciones musculares. Esto no solo afecta la calidad de vida de los individuos, sino que también puede aumentar la carga económica para las familias y para el sistema de seguridad social.

El impacto socioeconómico de los accidentes ofídicos en Panamá también se refleja en los costos indirectos asociados con la prevención y el manejo de estos incidentes. Esto incluye la implementación de programas educativos, la capacitación de personal de salud en áreas rurales y la distribución de antivenenos en zonas de alto riesgo. Gutiérrez et al. (2013) destacan la importancia de estas medidas preventivas, pero también señalan que representan una inversión significativa para los sistemas de salud de países en desarrollo.

Los accidentes ofídicos no solo representan una preocupación para la salud pública, sino que también provocan efectos psicológicos significativos en las comunidades afectadas. Estos efectos pueden incluir un aumento del miedo colectivo hacia las serpientes, lo que a su vez puede alterar las prácticas agrícolas tradicionales. En algunas comunidades, este temor puede llevar a una disminución de la agricultura, ya que los trabajadores se sienten inseguros en el

campo, lo que afecta la seguridad alimentaria y las actividades económicas locales (J. et al., 2017; Várgas et al., 2020).

### **5.1.5 Familia *Viperidae***

La familia *Viperidae* comprende una amplia diversidad de serpientes venenosas distribuidas globalmente. Esta familia incluye géneros como *Bothrops*, *Crotalus*, y *Vipera*, conocidos por su importancia médica debido a las mordeduras venenosas que infligen. La comprensión de su distribución geográfica, características morfológicas, hábitats y ciclo de reproducción es crucial para el manejo de las mordeduras de serpientes y la conservación de estas especies (Gutiérrez, 2014).

#### **5.1.5.1 Distribución Geográfica**

La familia *Viperidae*, que incluye algunas de las serpientes más venenosas del mundo, tiene una distribución global amplia y diversa. Estas serpientes se encuentran en todos los continentes excepto en Australia y la Antártida. En Europa, las víboras del género *Vipera* son comunes y están distribuidas desde la Península Ibérica hasta el Lejano Oriente de Rusia (Krecsák et al., 2003).

En Asia, las víboras de foseta como *Trimeresurus* y *Gloydius* están ampliamente distribuidas en el sudeste asiático, China y Japón (Campbell & Lamar, 2004). África alberga una gran diversidad de víboras, incluyendo las especies del

género *Bitis*, como la víbora del Gabón (*Bitis gabonica*), que se encuentra en las selvas tropicales del África subsahariana (Spawls et al., 2018). En América del Norte, las serpientes de cascabel (*Crotalus*) y las mocasines de agua (*Agkistrodon*) son comunes, mientras que, en América del Sur, las especies del género *Bothrops* son predominantes (Campbell & Lamar, 2004).

En América Latina, la familia *Viperidae* está representada por una amplia variedad de géneros y especies que ocupan diversos hábitats, desde selvas tropicales hasta áreas semiáridas. Las especies del género *Bothrops*, como *Bothrops asper* y *Bothrops atrox*, son las más comunes y se encuentran en toda América Central y del Sur, desde México hasta Argentina (Campbell & Lamar, 2004). Estas serpientes son responsables de la mayoría de los envenenamientos en la región debido a su amplia distribución y alta densidad poblacional.

En los Andes, las especies del género *Bothrocophias* y *Bothriopsis* habitan en las zonas montañosas y bosques nublados. En las regiones áridas y semiáridas de América del Sur, las especies del género *Crotalus*, como *Crotalus durissus*, son comunes y se encuentran en Brasil, Argentina y otros países sudamericanos (Wüster et al., 1997).

Centroamérica alberga una notable variedad de reptiles venenosos, agrupados en 33 especies de *Viperidae*, 19 especies de *Elapidae* y dos especies de *Helodermatidae*. Una de las familias de serpientes más importantes dentro de este grupo, los *Viperidae*, está compuesta por especies de los géneros *Bothrops*,

*Agkistrodon*, *Atropoides*, *Bothriechis*, *Crotalus*, *Cerrophidion*, *Lachesis*, *Metlapilcoatlus* y *Porthidium* (Figura 3). Las especies de *Bothrops* y *Crotalus* son predominantes, mientras que, en el Caribe, la presencia de víboras es limitada, pero incluye especies como *Bothrops lanceolatus* en Martinica y *Bothrops caribbaeus* en Santa Lucía (Campbell & Lamar, 2004). La diversidad y distribución de las serpientes de la familia *Viperidae* en América Latina reflejan una adaptación a una amplia gama de hábitats y condiciones climáticas, lo que contribuye a su éxito evolutivo y a su impacto significativo en la salud pública en la región.



**Figura 3:** Distribución de algunas especies de la familia *Viperidae*.

Estas serpientes son las principales responsables de los accidentes ofídicos en la región centroamericana. En el mapa se indican con colores las áreas de distribución de diferentes géneros: rojo para *Metlapilcoatlus sp.* y *Atropoides sp.*, violeta para *Crotalus simus*, azul para *Bothriechis sp.* y naranja para *Bothrops asper*. Las imágenes de las serpientes representativas de cada género son ilustrativas, ya que las especies pueden presentar numerosas variaciones morfológicas. El mapa fue adaptado de Google Maps y las fotografías fueron tomadas por Andrés Novales y Francisco Obregón. Fuente: Chang Estrada y col., 2024.

#### **5.1.5.2 Características morfológicas**

Las serpientes de la familia *Viperidae* se caracterizan por tener cabezas triangulares y anchas, cuerpos robustos y colmillos solenoglifos que se pliegan contra el paladar cuando no están en uso. Estos colmillos, largos y huecos, permiten inyectar veneno eficazmente en sus presas (Valderrama, 2003). Las escamas de estas serpientes suelen ser quilladas, lo que les proporciona una textura rugosa. Los ojos presentan pupilas verticales, adaptadas para la visión nocturna (Campbell & Lamar, 2004).

#### **5.1.5.3 Hábitats**

Los vipéridos (familia *Viperidae*) habitan una amplia variedad de ecosistemas terrestres, desde desiertos y praderas hasta bosques tropicales y templados. Se

encuentran en todos los continentes excepto Australia y Antártida, con la mayor diversidad en regiones tropicales y subtropicales. Estas serpientes venenosas han desarrollado adaptaciones para prosperar en diversos hábitats, desde el nivel del mar hasta elevaciones montañosas de más de 4000 metros (Campbell & Lamar, 2004).

En cuanto a su comportamiento, la mayoría de las especies de *Viperidae* son principalmente terrestres, aunque algunas tienen hábitos arbóreos o semiacuáticos. Muchas especies son nocturnas o crepusculares, aunque algunas pueden ser activas durante el día, especialmente en climas más fríos o en hábitats de mayor altitud. Los vipéridos suelen ser depredadores de emboscada, utilizando su camuflaje para ocultarse y esperar a sus presas. Algunas especies, sin embargo, pueden adoptar estrategias de búsqueda activa de presas (Shine et al., 2019).

Una característica distintiva del comportamiento de los vipéridos es su sistema de detección de presas altamente desarrollado. Muchas especies poseen órganos sensores de calor llamados fosetas loreales, que les permiten detectar el calor corporal de sus presas endotérmicas. Este sistema, combinado con su visión y sentido del olfato, les permite cazar eficazmente incluso en condiciones de poca luz (Gracheva et al., 2010).

Los vipéridos exhiben una variedad de comportamientos defensivos cuando se sienten amenazados. Estos pueden incluir la adopción de posturas defensivas, la

producción de sonidos de advertencia (como el cascabeleo en las serpientes de cascabel), y en última instancia, el uso de su veneno como mecanismo de defensa. Algunas especies también pueden emplear el mimetismo para evitar la detección por parte de depredadores (Maritz et al., 2016).

#### **5.1.5.4 Ciclo de Reproducción**

El ciclo de reproducción de las serpientes de la familia *Viperidae* es un proceso complejo y varía significativamente entre las diferentes especies. La mayoría de estas serpientes son ovovivíparas, lo que significa que las hembras retienen los huevos dentro de su cuerpo hasta que las crías están completamente desarrolladas y listas para nacer. Este método de reproducción ofrece ventajas como la protección de los huevos contra depredadores y condiciones ambientales adversas (Solórzano, 1997).

En muchas especies de *Viperidae*, la temporada de apareamiento está estrechamente ligada a factores ambientales, como la temperatura y la disponibilidad de recursos. Por ejemplo, en la especie *Atropoides nummifer*, las cópulas ocurren en enero y los partos en junio, con una gestación que dura aproximadamente 186 días. Este patrón estacional asegura que las crías nazcan en un momento del año en que las condiciones ambientales son óptimas para su supervivencia (Vásquez-Cruz, 2018).

Durante la temporada de apareamiento, los machos buscan activamente a las hembras utilizando señales químicas. Los encuentros entre machos pueden resultar en combates ritualizados, donde los machos se enroscan y tratan de dominar al oponente sin causar daño significativo. Este comportamiento es común en muchas especies de vipéridos y sirve para establecer la dominancia y el derecho a aparearse con las hembras disponibles (Campbell & Lamar, 2004).

La gestación en las hembras de *Viperidae* puede durar varios meses, y durante este período, las hembras pueden modificar su comportamiento y su ubicación para optimizar las condiciones térmicas para el desarrollo de los embriones. En algunas especies, las hembras grávidas pueden ser más reacias a moverse y pueden seleccionar microhábitats con temperaturas más estables (Shine, 2003).

El nacimiento de las crías generalmente ocurre en un periodo que maximiza sus posibilidades de supervivencia, coincidiendo con la abundancia de presas y condiciones climáticas favorables. Las crías nacen completamente formadas y son independientes desde el momento del nacimiento. No obstante, algunas especies pueden mostrar un comportamiento de cuidado parental limitado, donde la hembra permanece cerca de las crías durante un corto período después del nacimiento (Maritz et al., 2016).

La fecundidad varía considerablemente entre las especies de *Viperidae*. Algunas especies pueden dar a luz a un pequeño número de crías, mientras que otras pueden tener grandes camadas. Este número puede estar influenciado por factores como la disponibilidad de recursos y la condición física de la hembra.

Además, algunas especies pueden reproducirse anualmente, mientras que otras pueden tener ciclos reproductivos bienales o incluso menos frecuentes (Gracheva et al., 2010).

#### 5.1.5.5 Especies de la Familia *Viperidae* de interés en Panamá

La familia *Viperidae* está representada en Panamá por 6 géneros y 15 especies (Uetz et al., 2018). Las serpientes de esta familia son altamente venenosas y de gran importancia médica debido a los accidentes ofídicos que provocan. Estas especies incluyen *Bothriechis nigroviridis*, *Cerrophidion sasai*, *Porthidium lansbergii* y *Bothrops asper* (Figura 4).



**Figura 4:** Serpientes de la familia *Viperidae* - a) *Bothrops asper*, b) *Cerrophidion sasai*, c) *Porthidium lansbergii*, d) *Bothriechis nigroviridis*.

Fuente: <http://www.reptile-database.org/>

#### **5.1.5.5.1 *Bothriechis nigroviridis***

*Bothriechis nigroviridis* se encuentra en las tierras altas de Panamá y Costa Rica. Habita en bosques montanos y premontanos, donde las condiciones húmedas son prevalentes (Savage, 2020). Esta especie tiene un patrón de coloración verde con manchas negras que la distinguen. Su cuerpo es relativamente delgado y su cabeza triangular, similar a otras víboras de la misma familia (Savage, 2020). Al igual que *Bothriechis lateralis*, *Bothriechis nigroviridis* es ovovivípara.

#### **5.1.5.5.2 *Cerrophidion sasai***

El género *Cerrophidion*, conocido como víboras de montaña, habita en regiones subtropicales a altitudes medias y altas (entre 1200 y 3500 metros) en el sur de México y en las tierras altas de Centroamérica al oeste de Panamá. Estas serpientes son de tamaño mediano, midiendo entre 50 y 55 centímetros, y presentan una coloración amarillo pálido alrededor de la zona mandibular. La especie más representativa de este género es *Cerrophidion godmani*, Aunque en la región también se encuentran otras especies como *Cerrophidion wilsoni* y *Cerrophidion sasai*, no existen estudios sobre el veneno de *C. wilsoni* y solo se han realizado unos pocos estudios sobre el veneno de *C. sasai* (Lomonte B et al., 2011).

*Cerrophidion sasai* es una especie menos conocida que se encuentra en las regiones montañosas del oeste de Panamá. Prefiere áreas con vegetación densa y suelos húmedos. Presenta un color marrón oscuro con patrones más claros que le permiten camuflarse entre las hojas caídas del suelo forestal. Su cabeza es más pequeña en comparación con otras víboras y sus colmillos son moderadamente largos (Savage, 2020). Se cree que *Cerrophidion sasai* es ovovivípara, aunque se necesita más investigación para confirmar sus patrones reproductivos exactos.

#### **5.1.5.5.3 *Porthidium lansbergii***

*Porthidium lansbergii* se encuentra en las regiones bajas y secas de Panamá, especialmente en áreas de bosques secos y matorrales (Gutiérrez, 2019). Esta especie es de tamaño pequeño a mediano y presenta un patrón de coloración marrón con manchas oscuras. Su cuerpo es robusto y su cabeza es ancha y triangular (Gutiérrez, 2019). *Porthidium lansbergii* es vivípara, dando a luz a crías vivas después de un período de gestación que varía entre 4 y 6 meses (Savage, 2020).

#### **5.1.5.5.4 *Bothrops asper***

*Bothrops asper*, comúnmente conocida como "terciopelo", es una especie de serpiente ampliamente distribuida en las tierras bajas de Mesoamérica y el norte de Sudamérica. Su rango geográfico incluye la costa noroeste de Sudamérica

desde Ecuador hasta Venezuela, Trinidad y hacia el norte hasta México. En México y América Central, se encuentra desde el sur de Tamaulipas hasta la península de Yucatán. También habita en las áreas costeras del Atlántico de Nicaragua, Costa Rica y Panamá, así como en las regiones del norte de Guatemala y Honduras (Campbell & Lamar, 2004; Sasa et al., 2009). *Bothrops asper* es una de las especies de vipéridos más importantes en Panamá debido a su responsabilidad en la mayoría de los accidentes ofídicos en el país (Valderrama, 2003).

*Bothrops asper* habita principalmente en selvas tropicales, bosques siempre verdes y en los bordes exteriores de las sabanas. También se ha encontrado en una variedad de otros hábitats, incluyendo regiones bajas y montañosas, áreas secas de algunos bosques tropicales caducifolios y los bosques nublados. Prefiere altos niveles de humedad, aunque los adultos pueden encontrarse en áreas desérticas debido a su menor riesgo de deshidratación en comparación con los juveniles (Campbell & Lamar, 2004).

*Bothrops asper* es conocida por su gran tamaño y su coloración marrón con patrones en forma de diamante. La cabeza es grande y claramente diferenciada del cuello, lo que es característico de los miembros del género *Bothrops*. La longitud de los individuos puede variar entre 1.2 y 1.8 metros, y pueden pesar hasta 6 kg. La coloración de la cabeza varía de marrón medio a oscuro o incluso negra, con manchas o rayas occipitales que pueden ser indistintas o ausentes. El

vientre es generalmente de color amarillo pálido (Campbell & Lamar, 2004; Saldarriaga-Córdoba et al., 2003).

*Bothrops asper* es vivípara, y las hembras pueden dar a luz a grandes camadas de hasta 80 crías después de un período de gestación de aproximadamente 6 meses (Gutiérrez, 2019).

## **5.2 Venenos de serpientes**

Los venenos de serpientes constituyen mezclas complejas de biomoléculas, principalmente proteínas, que han evolucionado a lo largo de miles de años para cumplir funciones específicas en la captura de presas y defensa contra depredadores. Entre sus componentes, destacan las fosfolipasas A2 y las metaloproteinasas, que desempeñan roles fundamentales en la fisiopatología de las mordeduras. Las fosfolipasas A2, por ejemplo, son cruciales en la inducción de hemorragias y necrosis muscular al actuar sobre las membranas celulares, lo que puede resultar en efectos catastróficos en los tejidos objetivo (Quintana-Castillo et al., 2017; Nina-Cueva et al., 2020).

La evolución de estos venenos ha sido influenciada por la necesidad de maximizar la eficacia en la inmovilización y digestión de sus presas, así como la defensa contra amenazas externas. Los venenos de serpientes, especialmente de las familias Viperidae y Elapidae, exhiben una considerable diversidad en su

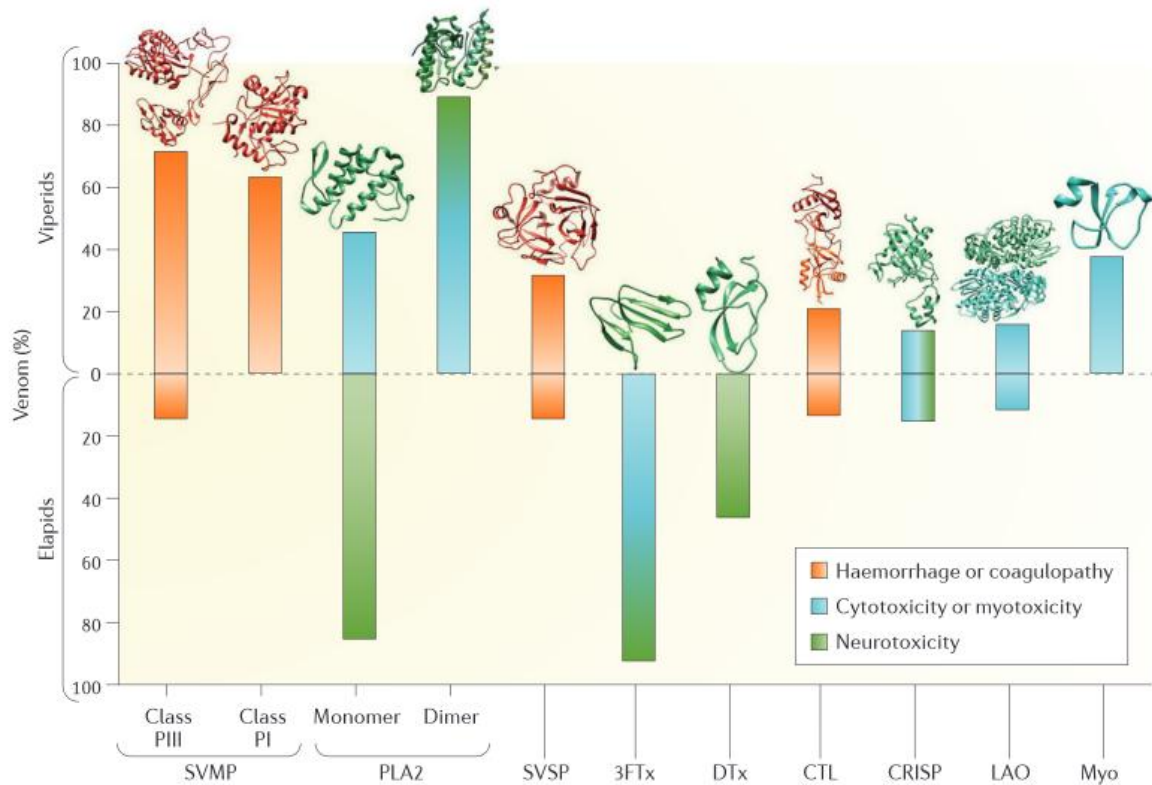
composición, lo que afecta las manifestaciones clínicas de envenenamientos en humanos (Vargas et al., 2020; (Jimenez-Canale et al., 2022).

Los efectos fisiopatológicos del veneno incluyen daño local, como hemorragia e inflamación, y efectos sistémicos, como trastornos en la coagulación y daño renal. En particular, los venenos del género *Bothrops* han sido ampliamente estudiados y se ha documentado su capacidad para inducir desórdenes hemostáticos que pueden llevar a la coagulación intravascular diseminada, shock hipovolémico y fallo renal agudo (Terán & Lomonte, 2016; Panta et al., 2020). Por otro lado, la producción y administración de antivenenos es crucial en el tratamiento de las mordeduras; estos deben ser específicos y eficaces, dado que la respuesta terapéutica puede variar considerablemente dependiendo de la composición variable de los venenos (Terán & Lomonte, 2016; Castro et al., 2020).

### **5.2.1 Composición y propiedades bioquímicas**

Los venenos de serpientes son complejas mezclas de proteínas y péptidos que varían significativamente entre especies. Estas toxinas incluyen enzimas, toxinas no enzimáticas y otros componentes que afectan diversos sistemas fisiológicos en las presas y víctimas humanas (Calvete, 2017). En particular, la combinación de flujos de trabajo de transcriptómica de próxima generación y proteómica ha demostrado capacidades sin precedentes para la caracterización del veneno con un detalle sin igual (Rokyta et al., 2015). La distribución relativa de los principales

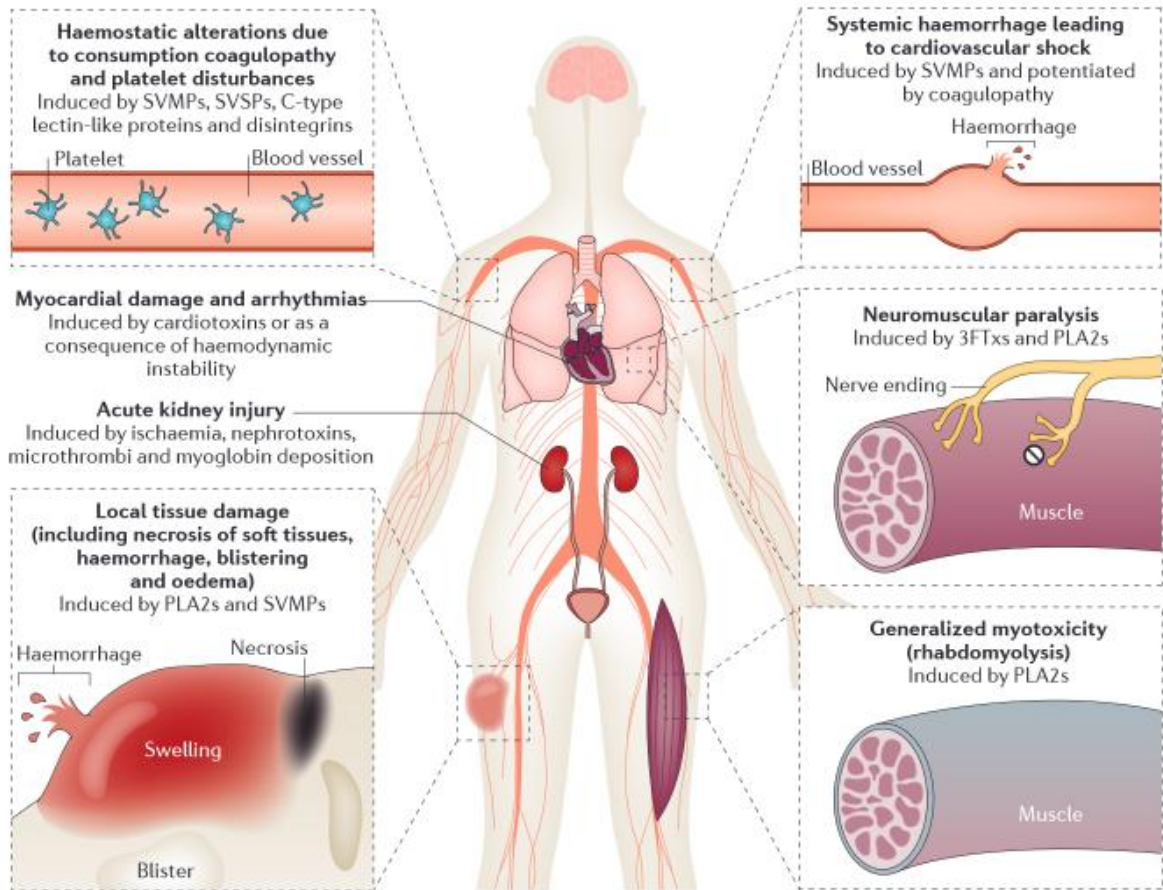
tipos de componentes tóxicos en los venenos de vipéridos y elápidos se resume en la Figura 5.



**Figura 5:** Niveles de toxinas en el veneno de vipéridos y elápidos.

El gráfico destaca los rangos de niveles de proteínas (expresados como % del proteoma total del veneno) y la distribución distinta de las familias de toxinas más abundantes en diferentes venenos de especies de serpientes de las familias *Viperidae* y *Elapidae*. Las barras están codificadas por colores según las actividades biológicas más relevantes de la familia de toxinas correspondiente. Los gradientes de color indican la dependencia de la concentración del efecto biológico (mismo color) o diferentes efectos (múltiples colores; es decir, algunas toxinas pueden ejercer un efecto a dosis bajas y otro efecto a dosis altas). También se muestran las estructuras cristalográficas o de resonancia magnética

nuclear de algunos miembros de cada familia de proteínas. 3FTx, toxina de tres dedos (ID de acceso del Protein Data Bank (PDB ID): 1IJC); CRISP, proteína secretora rica en cisteína (PDB ID: 3MZ8); CTL, proteína tipo lectina C (PDB ID: 1IXX); DTx, dendrotoxina (PDB ID: 1DTX); LAO, L-aminoácido oxidasa (PDB ID: 2IID); Myo, miotoxina de baja masa molecular (PDB ID: 4GV5); PLA2, fosfolipasa A2 (PDB ID: 1TGM para el monómero y PDB ID: 3R0L para el dímero); SVMP, metaloproteínasa del veneno de serpiente (PDB ID: 3DSL para la clase PIII y PDB ID: 1ND1 para la clase PI); SVSP, serina proteínasa del veneno de serpiente (PDB ID: 1OP0). Las propiedades bioquímicas de los venenos están determinadas por la estructura tridimensional de las toxinas y su capacidad para interactuar con los componentes biológicos del cuerpo de la presa (Figura 6). Estas interacciones son específicas y pueden ser modificadas por variaciones en la composición del veneno entre diferentes especies o incluso entre individuos de la misma especie (Casewell et al., 2020). *Fuente: Gutiérrez et al., 2017.*



**Figura 6:** Los venenos de serpiente afectan diversos sistemas del cuerpo y sus efectos tóxicos dependen principalmente de su composición específica.

Los venenos de elápidos y algunos de vipéridos pueden provocar parálisis neuromuscular. La mayoría de los venenos de vipéridos, y algunos de elápidos, causan un daño significativo en los tejidos locales. Además, los venenos de vipéridos pueden inducir hemorragias sistémicas y aumentar la permeabilidad vascular, lo que podría llevar a un shock cardiovascular. Tanto los venenos de vipéridos como algunos de elápidos y colubroideos sin colmillos frontales actúan en varios niveles de la cascada de coagulación y sobre las plaquetas, afectando así la hemostasis. *Fuente: Gutiérrez et al., 2017.*

**Metaloproteinasas de Veneno de Serpiente (SVMPs):** Las SVMPs son una clase importante de enzimas en los venenos viperinos. Estas enzimas degradan componentes de la matriz extracelular y juegan un papel crucial en la inducción de hemorragias y la disolución de tejidos (Gutiérrez et al., 2021).

**Fosfolipasas A2 (PLA2):** Las PLA2 del veneno de *Viperidae* tienen una amplia gama de actividades biológicas. Estas incluyen efectos miotóxicos, neurotóxicos, anticoagulantes y proinflamatorios. Por ejemplo, la PLA2 Ba SpII RP4 del veneno de *Bothrops alternatus* mostró actividad inhibitoria sobre la agregación plaquetaria y una alta estabilidad estructural bajo condiciones extremas de pH y temperatura (García Denegri et al., 2012).

**Neurotoxinas:** Las neurotoxinas de los vipéridos generalmente actúan a nivel presináptico, inhibiendo la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular. Este mecanismo de acción puede resultar en parálisis flácida, que en casos severos puede afectar la función respiratoria. A diferencia de las neurotoxinas postsinápticas encontradas en algunos elápidos, los efectos de las neurotoxinas presinápticas de vipéridos suelen ser más difíciles de revertir con antivenenos (Del Brutto & Del Brutto, 2012).

Es importante destacar que la presencia de neurotoxinas en los venenos de vipéridos no es universal y puede variar incluso dentro de una misma especie. Factores como la distribución geográfica, la dieta y la ontogenia pueden influir en la composición del veneno. Por ejemplo, algunas poblaciones de *Crotalus*

*horridus* en el sur de los Estados Unidos producen un veneno con componentes neurotóxicos, mientras que otras poblaciones de la misma especie carecen de estos componentes (Rokyta et al., 2013).

### **5.2.2 Efectos fisiopatológicos**

Los efectos fisiopatológicos de los venenos de serpientes dependen de la composición específica del veneno y de la cantidad inyectada. En el caso de las serpientes de la familia *Viperidae*, los efectos locales incluyen dolor intenso, edema, necrosis y hemorragia en el sitio de la mordedura (Valderrama, 2003).

La toxicidad multiorgánica es común en las mordeduras de serpientes venenosas. Las toxinas pueden afectar múltiples sistemas orgánicos simultáneamente, llevando a un colapso generalizado de las funciones corporales y, en ausencia de tratamiento, a la muerte (Williams et al., 2019). Estos efectos son el resultado de la acción combinada de las fosfolipasas A2 y las metaloproteinasas, que destruyen los tejidos y los vasos sanguíneos. A nivel sistémico, los venenos de *Viperidae* pueden causar coagulopatías, insuficiencia renal aguda, y shock cardiovascular (Gutiérrez et al., 2016). Las coagulopatías son inducidas por las serino proteinasas y metaloproteinasas, que interfieren con los factores de coagulación y las plaquetas, mientras que las fosfolipasas A2 pueden contribuir a la miotoxicidad y la nefrotoxicidad (Calvete, 2017).

### **5.2.3 Importancia de la producción de antivenenos**

La producción de antivenenos es crucial para el tratamiento de los envenenamientos por serpientes. Los antivenenos son preparados inmunobiológicos que contienen anticuerpos específicos capaces de neutralizar las toxinas presentes en el veneno de serpiente (Gutiérrez et al., 2016). La administración oportuna de antiveneno puede revertir los efectos tóxicos y reducir significativamente la mortalidad y la morbilidad asociadas con los envenenamientos.

El proceso de producción de antivenenos implica la inmunización de animales (generalmente caballos u ovejas) con veneno de serpiente, seguido de la recolección y purificación de los anticuerpos generados. Estos anticuerpos se procesan para obtener un producto seguro y eficaz que pueda ser administrado a los pacientes (Gutiérrez et al., 2017).

A pesar de su importancia, la producción de antivenenos enfrenta varios desafíos, incluyendo la variabilidad del veneno entre diferentes especies y la necesidad de antivenenos específicos para diferentes regiones geográficas. Avances recientes en la biotecnología y la inmunología han mejorado la especificidad y eficacia de los antivenenos, y la investigación continúa en el desarrollo de antivenenos de amplio espectro y de próxima generación (Williams et al., 2019).

#### **5.2.4 Panamá y la Producción de antivenenos**

La producción y disponibilidad de antivenenos contra mordeduras de serpientes en Panamá ha sido un desafío persistente para el sistema de salud pública del país. Históricamente, Panamá ha dependido en gran medida de la importación de antivenenos de otros países de la región, principalmente Costa Rica, Brasil y México, para satisfacer sus necesidades (Gutiérrez et al., 2011).

Para abordar esta problemática, Panamá ha tomado medidas significativas. Recientemente, se aprobó la Ley N° 421 del 6 de febrero de 2024, "Que promueve la investigación, desarrollo, producción y comercialización de sueros antiponzoñosos, antivenenos y otros antídotos en Panamá" (vLex Panamá, 2023). Esta legislación marca un hito importante en los esfuerzos del país para fortalecer su capacidad de producción de antivenenos. La ley tiene como objetivo fomentar la investigación local, el desarrollo de tecnologías de producción y fabricación de antivenenos específicos para las especies de serpientes venenosas presentes en Panamá.

Además, se ha presentado un proyecto para construir una nueva planta de producción de antivenenos por parte del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI) (OPS, 2019).

Es importante resaltar, que los antivenenos producidos con venenos de serpientes locales tienden a ser más efectivos contra las especies endémicas de

Panamá, como las del género *Bothrops*, que son responsables de la mayoría de los accidentes ofídicos en el país (Gutiérrez et al., 2011). Además, la producción local puede facilitar la distribución oportuna de antivenenos a áreas rurales y de difícil acceso, donde los accidentes ofídicos son más frecuentes.

### **5.3 Microbiota de serpientes**

La microbiota o microbioma, que incluye todas las comunidades microbianas que residen en un organismo, juega un papel esencial en la salud y la enfermedad del mismo. Las serpientes no son una excepción y albergan diversos microbiomas en diferentes partes de su cuerpo, incluyendo la oral y la del veneno.

#### **5.3.1 Concepto general de microbiota**

La microbiota se refiere a la comunidad de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, virus y otros microbios, que habitan en un ambiente particular. Estos microbios pueden tener una relación simbiótica, comensal o patogénica con su hospedador. La microbiota influye en una variedad de funciones biológicas, desde la digestión hasta la inmunidad (Turnbaugh et al., 2007).

La microbiota es fundamental para la salud del hospedador. En los humanos, por ejemplo, la microbiota intestinal es crucial para la digestión y la síntesis de vitaminas. En las serpientes, la microbiota puede influir en la digestión de las

presas, la protección contra patógenos y la cicatrización de heridas (Colston & Jackson, 2016).

### **5.3.2 Microbiota oral y del veneno en serpientes**

La cavidad oral de las serpientes alberga una diversa comunidad microbiana. Sin embargo, se ha observado una predominancia de bacterias Gram negativas en este entorno. Estas bacterias son particularmente preocupantes desde una perspectiva de salud pública debido a su capacidad para desarrollar resistencia a múltiples tipos de antibióticos simultáneamente. Esta característica las convierte en un desafío significativo para la salud a nivel mundial, complicando el tratamiento de infecciones y representando una amenaza creciente en el ámbito médico (Partridge, 2011).

Estudios han revelado la presencia de numerosos géneros y especies bacterianas, incluyendo: *Proteus spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus grupo D*, *Morganella morganii*, *Aeromonas hydrophila* y *A. salmonicida*, *Vibrio sp.*, *Corynebacterium sp.* (Clavijo Vanegas, 2021; Mauridis et al., 1993; García Lima et al., 1987; Ledbetter et al., 1969) Es importante destacar que muchas de estas bacterias son potencialmente patógenas para los humanos y pueden causar infecciones secundarias tras una mordedura de serpiente.

### **5.3.3 Comparación de las comunidades bacterianas orales entre ofidios con y sin veneno**

Las comunidades bacterianas orales de los ofidios representan un aspecto fascinante de la microbiología y la herpetología, especialmente cuando se comparan entre especies venenosas y no venenosas (Krishnankutty et al., 2018). Esta comparación no solo arroja luz sobre la ecología microbiana de estas serpientes, sino que también tiene implicaciones significativas para la comprensión de las infecciones secundarias en mordeduras de serpientes.

Estudios recientes han revelado diferencias notables en la composición y diversidad de las comunidades bacterianas orales entre ofidios venenosos y no venenosos. Goldstein et al. (2013) realizaron un análisis comparativo utilizando técnicas de secuenciación de próxima generación, encontrando que las serpientes venenosas, particularmente las víboras, tienden a albergar una mayor diversidad de especies bacterianas en su cavidad oral en comparación con las serpientes no venenosas. Esta mayor diversidad podría estar relacionada con la presencia de glándulas de veneno y los cambios fisiológicos asociados en la cavidad oral.

### **5.3.4 Factores que influyen en la composición microbiana**

La dieta de las serpientes puede influir significativamente en su microbiota. Las serpientes que se alimentan de presas vivas pueden adquirir bacterias de sus

presas, mientras que las dietas en cautiverio pueden alterar la composición microbiana. El hábitat natural de la serpiente, incluyendo factores como la humedad, temperatura y tipo de suelo, puede afectar la diversidad y composición de su microbiota (Colston & Jackson, 2016).

Las serpientes venenosas, especialmente las de la familia *Viperidae*, han mostrado una prevalencia más alta de bacterias potencialmente patógenas en su microbiota oral. Shek et al. (2009) identificaron una mayor frecuencia de especies como *Morganella morganii*, *Proteus spp.* y *Enterococcus faecalis* en las cavidades orales de serpientes venenosas en comparación con las no venenosas. Estas bacterias son frecuentemente asociadas con infecciones secundarias en mordeduras de serpientes, lo que sugiere una posible coevolución entre el veneno y ciertas especies bacterianas.

Por otro lado, las serpientes no venenosas tienden a presentar comunidades bacterianas orales menos diversas, pero más estables. Estas serpientes albergan principalmente bacterias comensales y ambientales, con una menor proporción de especies potencialmente patógenas. Esta diferencia podría atribuirse a la ausencia de glándulas de veneno y a las distintas estrategias de alimentación y manipulación de presas entre serpientes venenosas y no venenosas (Lam et al., 2011).

### 5.3.5. Influencia del cautiverio en la microbiota de serpientes

Las serpientes en cautiverio suelen experimentar cambios en su microbiota debido a factores como la dieta controlada, la falta de contacto con su hábitat natural y el estrés asociado con el cautiverio. Estos cambios pueden tener consecuencias para su salud y bienestar. Estudios han demostrado que las serpientes en cautiverio pueden tener una microbiota menos diversa en comparación con sus contrapartes salvajes. Esto puede deberse a la dieta artificial y a las condiciones estériles del cautiverio.

La disminución de la diversidad microbiana puede predisponer a las serpientes a infecciones y otras enfermedades. Además, las alteraciones en la microbiota pueden afectar la digestión y la absorción de nutrientes (Colston & Jackson, 2016).

Factores que pueden tener un impacto significativo en la microbiota de las serpientes:

- **Cambio en la dieta:** La alimentación en cautiverio puede ser diferente a la dieta natural, lo que podría alterar la microbiota.
- **Exposición a nuevos microorganismos:** El contacto con humanos y otros animales en cautiverio puede introducir nuevas bacterias.

- **Estrés:** El estrés del cautiverio podría afectar el sistema inmunológico de la serpiente, lo que a su vez podría alterar su microbiota.
- **Tratamientos médicos:** Las serpientes en cautiverio pueden recibir tratamientos antibióticos que alterarían significativamente su microbiota.

### 5.3.6 Complicaciones infecciosas asociadas al accidente ofídico

Las complicaciones infecciosas asociadas al accidente ofídico representan un desafío significativo en el manejo clínico de estos casos, con implicaciones importantes para la morbilidad y la duración de la estancia hospitalaria. Según estudios recientes, la incidencia de estas complicaciones puede ser considerable, con López et al. (2008) reportando que hasta un 33% de los pacientes atendidos por mordeduras de serpientes, particularmente del género *Bothrops*, desarrollan algún tipo de infección secundaria. Estas infecciones pueden manifestarse de diversas formas, siendo las más comunes la celulitis, los abscesos y, en casos más severos, la fascitis necrotizante.

La patogénesis de estas complicaciones infecciosas es multifactorial, involucrando tanto la inoculación directa de bacterias presentes en la cavidad oral de la serpiente como la alteración de los tejidos locales por acción del veneno, lo que crea un ambiente propicio para el crecimiento bacteriano. Factores como la gravedad del envenenamiento, el tiempo transcurrido hasta la atención médica, y el manejo inicial de la herida juegan un papel crucial en el desarrollo de estas infecciones (Feitosa et al., 2015; Magalhães et al., 2022).

### 5.3.6.1 Origen de las Infecciones

Las complicaciones infecciosas asociadas al accidente ofídico tienen un origen multifactorial. Principalmente, se deben a la inoculación de bacterias presentes en la cavidad oral de las serpientes durante la mordedura. Estas bacterias pueden provenir tanto de la flora oral normal del ofidio como del ambiente en el que habita (Mejía-Toro & Hoyos-Pulgarín, 2021). Los géneros bacterianos más comúnmente aislados en estas infecciones incluyen *Morganella morganii*, que se ha identificado como el patógeno más frecuente. Además, se han reportado infecciones por otros bacilos gramnegativos y, ocasionalmente, por bacterias grampositivas (López, Lopera, & Ramírez, 2008). Factores que contribuyen al desarrollo de infecciones incluyen:

- La cantidad y composición del veneno inoculado.
- El tamaño de la serpiente, siendo más riesgosas las mordeduras de especímenes de más de 1 metro de longitud.
- La gravedad del accidente ofídico, con mayor riesgo en casos moderados a graves.
- El tiempo transcurrido hasta la atención médica y la administración del antiveneno.
- Las características del paciente, como comorbilidades o estado inmunológico.
- El manejo inicial de la herida y la atención médica recibida.

Es importante destacar que el tiempo de aplicación del suero antiofídico se ha relacionado indirectamente con un aumento en la frecuencia de complicaciones, especialmente en accidentes ofídicos graves (Mejía-Toro & Hoyos-Pulgarín, 2021).

### **5.3.6.2 Tipos de Infecciones**

Las complicaciones infecciosas asociadas al accidente ofídico pueden manifestarse de diversas formas, variando en gravedad y localización. Los tipos más comunes incluyen:

**Celulitis:** La celulitis es una infección bacteriana del tejido celular subcutáneo que se presenta con frecuencia tras una mordedura de serpiente. Esta condición se caracteriza por enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor en el área afectada. Según Mejía-Toro y Hoyos-Pulgarín (2021), la celulitis es una de las complicaciones infecciosas más comunes en pacientes con accidente ofídico. La infección puede progresar rápidamente y, si no se trata adecuadamente, puede extenderse a los tejidos más profundos.

**Abscesos:** Representan alrededor del 7.5% de las complicaciones infecciosas. Son colecciones localizadas de pus que pueden requerir drenaje quirúrgico (Mejía-Toro & Hoyos-Pulgarín, 2021).

**Fascitis necrotizante:** Una complicación grave que implica la necrosis rápida y progresiva de los tejidos blandos, incluyendo la fascia muscular (López, Lopera, & Ramírez, 2008).

**Mionecrosis:** La mionecrosis es la necrosis del tejido muscular, que puede ser inducida tanto por el veneno de la serpiente como por infecciones bacterianas secundarias. Esta condición es particularmente común en mordeduras de serpientes del género *Bothrops*, cuyo veneno tiene potentes efectos citotóxicos y miotóxicos (Gutiérrez et al., 2016). La mionecrosis puede llevar a la pérdida de función del músculo afectado y, en casos severos, puede requerir amputación.

**Sepsis:** La sepsis es una respuesta inflamatoria sistémica a una infección que puede llevar a fallo multiorgánico y muerte si no se trata de manera oportuna. En el contexto de una mordedura de serpiente, la sepsis puede desarrollarse a partir de infecciones locales no controladas. La sepsis es una complicación grave que puede surgir en pacientes con mordeduras de serpientes, particularmente en aquellos con envenenamiento severo y tratamiento retrasado. (Mejía-Toro & Hoyos-Pulgarín, 2021).

**Osteomielitis:** La osteomielitis es una infección del hueso que puede ocurrir como una complicación tardía de una mordedura de serpiente. Esta condición es menos común, pero puede ser extremadamente difícil de tratar, requiriendo a menudo un tratamiento prolongado con antibióticos y, en algunos casos, intervención quirúrgica para remover el tejido óseo infectado (López et al., 2008).

La prevalencia de estas complicaciones infecciosas varía según los estudios, oscilando entre el 33% y el 90% de los casos de accidente ofídico (Mejía-Toro & Hoyos-Pulgarín, 2021). Esta variabilidad puede deberse a diferencias en los criterios diagnósticos, las poblaciones estudiadas y los métodos de seguimiento empleados.

El manejo adecuado incluye la administración oportuna de antiveneno, el uso prudente de antibióticos y, en algunos casos, intervenciones quirúrgicas (López, Lopera, & Ramírez, 2008). La elección del tratamiento antibiótico empírico debe basarse en el conocimiento de los patógenos más frecuentes. Algunos estudios sugieren que la combinación de ciprofloxacina y clindamicina podría ser adecuada para el manejo inicial de infecciones de tejidos blandos secundarias a mordeduras de serpientes del género *Bothrops* (Mejía-Toro & Hoyos-Pulgarín, 2021).

### **5.3.6.3 Factores de Riesgo**

La severidad de las infecciones depende en gran medida del grado de contaminación del veneno y la boca de la serpiente, así como de las condiciones en las que ocurrió el accidente. Las mordeduras en ambientes sucios y los primeros auxilios inadecuados aumentan el riesgo de infección (Valencia & Zavaleta, 2017; J. et al., 2017).

Los individuos con sistemas inmunológicos comprometidos, como los pacientes con diabetes, VIH/SIDA, o aquellos en tratamiento con inmunosupresores, tienen un mayor riesgo de desarrollar infecciones graves. El retraso en la recepción de tratamiento médico adecuado también incrementa el riesgo de infecciones. Es crucial que las víctimas de mordeduras de serpientes reciban atención médica lo antes posible para minimizar las complicaciones infecciosas (Gutiérrez et al., 2021).

#### **5.3.6.4 Tratamiento de Infecciones**

El tratamiento de infecciones asociadas a mordeduras de serpientes generalmente implica el uso de antibióticos. Es fundamental realizar cultivos bacterianos del sitio de la mordedura para identificar el patógeno específico y seleccionar el antibiótico adecuado. En muchos casos, se inicia el tratamiento con antibióticos de amplio espectro hasta obtener los resultados del cultivo (Warrell, 2019).

El desbridamiento quirúrgico, que consiste en la remoción de tejido muerto o infectado, puede ser necesario en casos de infecciones graves o necrosis extensa. Este procedimiento ayuda a prevenir la propagación de la infección y promueve la cicatrización (Gutiérrez et al., 2016).

Además del tratamiento específico, los pacientes pueden requerir cuidados de soporte, incluyendo fluidos intravenosos, manejo del dolor y monitoreo estrecho

en un entorno hospitalario. En casos severos, el tratamiento en una unidad de cuidados intensivos puede ser necesario (Williams et al., 2019).

### **5.3.7 Resistencia a antibióticos de las bacterias presentes en cavidad bucal de serpientes**

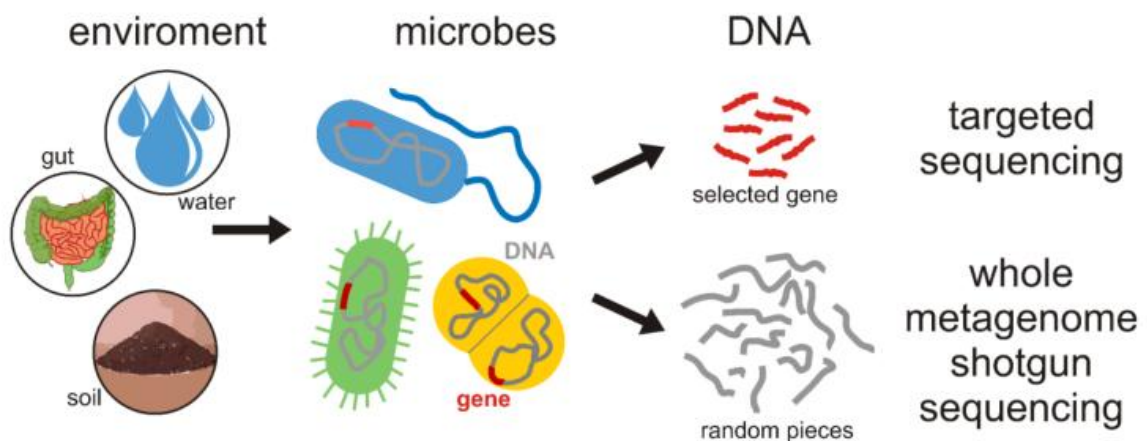
El uso de antibióticos profilácticos es un tema controvertido y, aunque es una práctica común en algunos países, varios estudios sugieren que no es necesario a menos que el paciente presente complicaciones como necrosis, gangrena, celulitis, abscesos y ampollas. Ferreira et al. (2009), Garg et al. (2009), Malani y Keoliya (2016), y Panda, Padhi y Sahoo (2018) enfatizan la importancia de realizar cultivos bacterianos en pacientes con estas complicaciones antes de administrar cualquier tratamiento. Además, Campagner et al. (2012), Babalola y Balogun (2013), y Artavia et al. (2017) coinciden en la baja eficacia de las penicilinas naturales, ampicilina, cefalosporinas de primera generación, macrólidos, cotrimoxazol, ácido nalidíxico y nitrofurantoína contra bacterias Gram negativas.

Por otro lado, Lam et al. (2011) y Shaikh et al. (2017) recomiendan el uso de netilmicina, levofloxacina, imipenem y levofloxacina para combatir estas bacterias. Para las bacterias Gram positivas, Shek et al. (2009), Garg et al. (2009), Lam et al. (2011), y Shaikh et al. (2017) sugieren el uso de ampicilina, vancomicina, ciprofloxacina, amoxicilina, azitromicina y amoxiclavulánico. Campagner et al. (2012) y Dipineto et al. (2014) concluyen que los antibióticos

más efectivos son: amikacina, ciprofloxacina, doxiciclina, gentamicina y tobramicina. Finalmente, autores como Shek et al. (2009) y Résière et al. (2018) proponen considerar tratamientos específicos según la serpiente involucrada en el accidente, como el uso de cefalosporinas de tercera generación en caso de complicaciones tras la mordedura de *Bothrops lanceolatus*.

#### 5.4 Técnicas de estudio de la diversidad bacteriana

El estudio de la diversidad bacteriana es crucial para comprender la estructura, función y dinámica de las comunidades microbianas en diversos entornos, incluidas las serpientes. Las técnicas para estudiar la diversidad bacteriana se dividen en métodos dependientes de cultivo y métodos independientes de cultivo, cada uno con sus propias aplicaciones y enfoques específicos (Figura 7).



**Figura 7:** Dos enfoques para el estudio de la microbiota.

Los métodos independientes de cultivo para la caracterización de comunidades microbianas se basan en la secuenciación directa del ADN aislado para prevenir

la pérdida de diversidad por cultivo. La secuenciación dirigida captura todos los organismos en una muestra, mientras que la secuenciación del meta genoma completo proporciona también información sobre el potencial funcional y metabólico de la comunidad. *Fuente: Sedlar, 2018.*

El cultivo de microorganismos en medios selectivos permite estudiar los genomas completos de diversas especies, pero solo para un número limitado de organismos, ya que la mayoría de los que habitan en un ambiente natural son no cultivables. Para prevenir esta pérdida de diversidad, se aplica la secuenciación directa de muestras ambientales sin cultivo previo in vitro con fines metagenómicos (Karlsson F et al., 2013).

#### **5.4.1 Métodos dependientes de cultivo**

El cultivo microbiano sigue siendo una técnica fundamental en el estudio de la diversidad bacteriana, a pesar del desarrollo de métodos moleculares más avanzados. Los métodos dependientes de cultivo permiten el aislamiento y caracterización de microorganismos cultivables, proporcionando información valiosa sobre su fisiología, metabolismo y potenciales aplicaciones biotecnológicas (Lloyd et al., 2018).

Una de las técnicas más utilizadas es el cultivo en placa, que implica la inoculación de muestras diluidas en medios de agar sólido. Este método permite el aislamiento de colonias individuales, facilitando el conteo y la caracterización

morfológica de las bacterias. Además, las colonias aisladas pueden ser subcultivadas para obtener cultivos puros, esenciales para estudios posteriores. Sin embargo, es importante reconocer que este método solo captura una fracción de la diversidad microbiana total, ya que se estima que solo entre el 0.1% y el 1% de las bacterias ambientales son cultivables en condiciones de laboratorio estándar (Steen et al., 2019).

Los medios de cultivo selectivos y diferenciales juegan un papel crucial en el estudio de la diversidad bacteriana. Estos medios están diseñados para favorecer el crecimiento de grupos bacterianos específicos o para distinguir entre diferentes tipos de bacterias basándose en sus características metabólicas. Por ejemplo, el agar MacConkey se utiliza comúnmente para diferenciar entre bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa, mientras que el agar sangre permite la identificación de bacterias hemolíticas (Rappé & Giovannoni, 2003).

Las técnicas de enriquecimiento son otro enfoque importante en los métodos dependientes de cultivo. Estas técnicas implican la incubación de muestras en medios líquidos que favorecen el crecimiento de grupos bacterianos específicos, a menudo en detrimento de otros. Este método es particularmente útil para detectar bacterias que están presentes en bajas concentraciones en la muestra original (Vartoukian et al., 2010). La caracterización fenotípica de los aislados bacterianos es un componente esencial de los métodos dependientes de cultivo. Esto incluye la observación de características morfológicas, pruebas bioquímicas

y pruebas de susceptibilidad a antibióticos. Los sistemas automatizados, como MALDI-TOF MS, han revolucionado este proceso, permitiendo una identificación más rápida y precisa de las especies bacterianas (Lagier et al., 2012).

A pesar de sus limitaciones, los métodos dependientes de cultivo siguen siendo invaluable para la investigación microbiológica. Proporcionan información crucial sobre las características fisiológicas y metabólicas de las bacterias, permiten la preservación de cepas para estudios futuros, y son esenciales para la validación de métodos moleculares más recientes. Además, el cultivo sigue siendo necesario para cumplir con los postulados de Koch en la identificación de patógenos y para el desarrollo de nuevos antibióticos y probióticos (Alain & Querellou, 2009).

#### **5.4.2 Métodos independientes de cultivo**

Para superar las limitaciones de los métodos dependientes de cultivo, se han desarrollado métodos independientes de cultivo que permiten estudiar la diversidad bacteriana sin la necesidad de cultivar los microorganismos. Estos métodos, basados en técnicas moleculares, han revolucionado la microbiología al permitir la identificación de bacterias no cultivables y proporcionar una visión más completa de la diversidad microbiana.

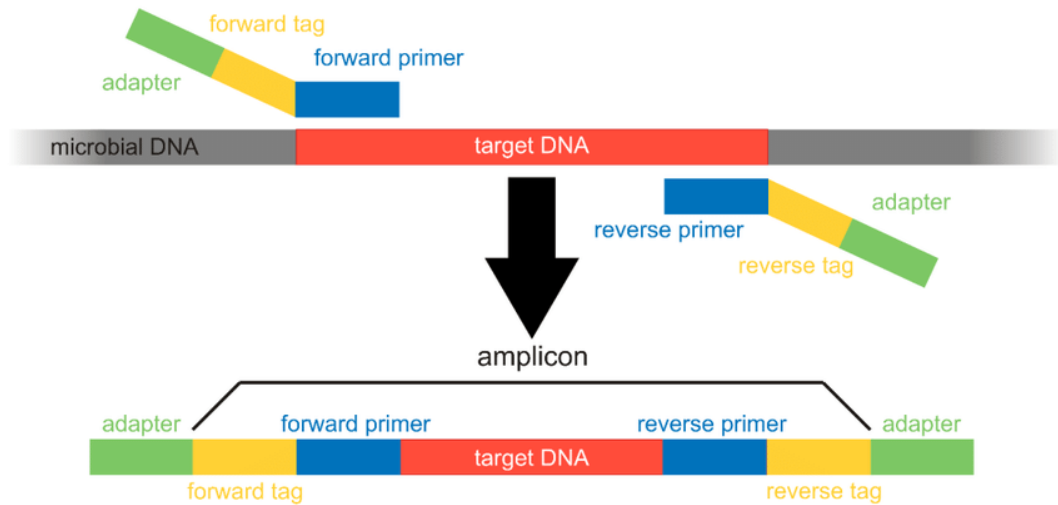
### **5.4.2.1 Técnicas moleculares**

Las técnicas moleculares utilizan el ADN o ARN de las bacterias para su identificación y caracterización. Estas técnicas han permitido avances significativos en el estudio de la microbiota de diversos entornos, incluidos los hospedadores animales (Cheng et al., 2020; Gill et al., 2016).

#### **5.4.2.1.1 PCR**

La PCR es una técnica fundamental en biología molecular que permite la amplificación de secuencias específicas de ADN. La PCR ha sido ampliamente utilizada para detectar y cuantificar bacterias en muestras ambientales y clínicas (Gill et al., 2016).

El proceso de PCR comienza con la extracción de ADN de la muestra de interés. Luego, se añaden primers específicos que se unen a las secuencias diana del ADN bacteriano (Figura 8). La reacción se lleva a cabo en un termociclador, que somete la mezcla de reacción a ciclos repetidos de desnaturalización del ADN, hibridación de los primers y extensión del ADN. Esto resulta en la amplificación exponencial de la secuencia diana, que puede ser detectada y analizada mediante electroforesis en gel o técnicas más avanzadas como la PCR en tiempo real (qPCR) (Ramos & Molina, 2018).



**Figura 8:** Los adaptadores de secuenciación discriminan los amplicones y son una secuencia artificial.

La imagen ilustra el proceso de amplificación de ADN objetivo (target DNA) mediante el uso de cebadores (primers) específicos, etiquetados con adaptadores y etiquetas (tags) para la identificación. Los cebadores forward y reverse se unen a las regiones flanqueantes del ADN microbiano, y el resultado es un amplicón que incluye el ADN objetivo junto con las regiones adaptadoras y etiquetas necesarias para análisis posteriores, como la secuenciación.

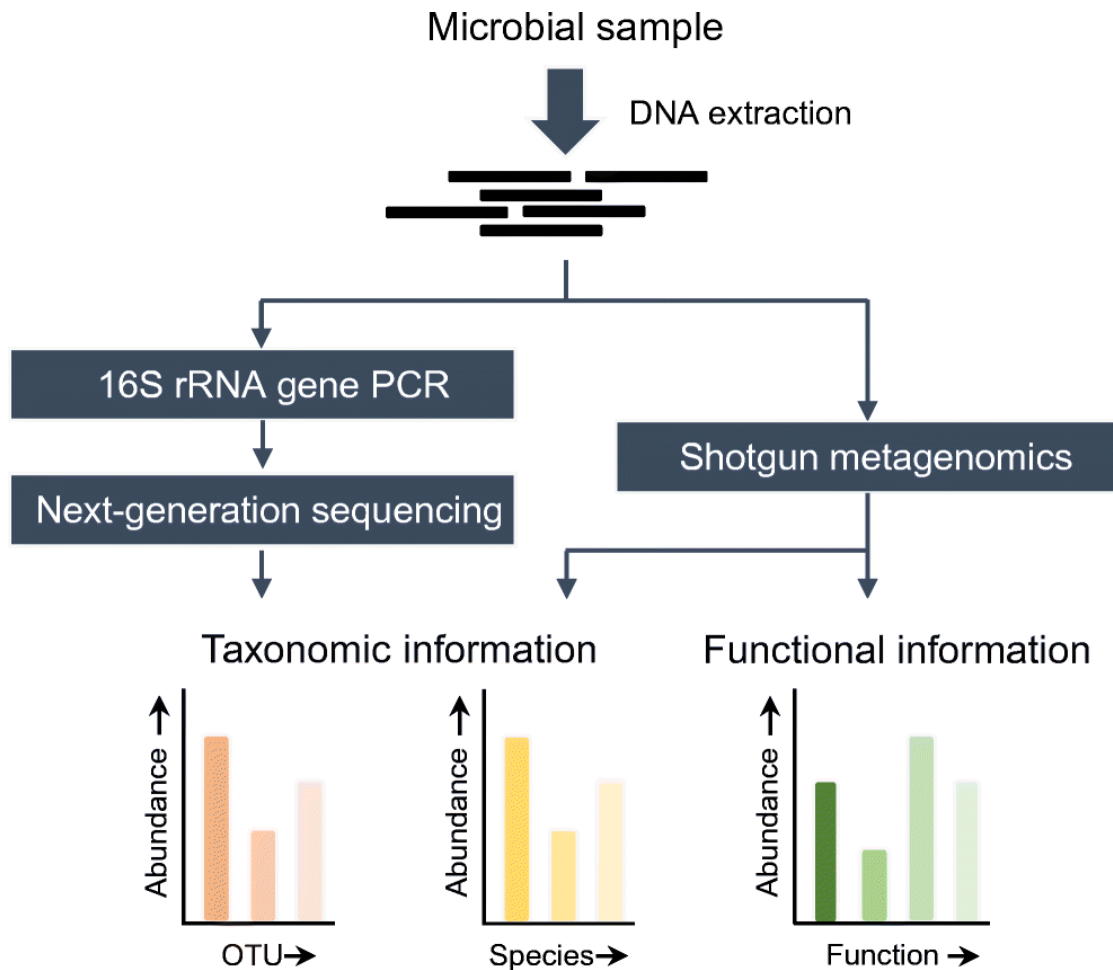
*Fuente: Nossa et al 2010.*

La PCR permite la detección de bacterias específicas incluso en muestras complejas y con bajas concentraciones de microorganismos. Esto es particularmente útil en estudios de microbiota, donde es necesario identificar y cuantificar bacterias en entornos altamente diversos y dinámicos. Además, la PCR en tiempo real permite la cuantificación precisa de las bacterias presentes,

proporcionando información sobre la abundancia relativa de diferentes especies (Yang et al., 2016).

#### **5.4.2.1.2 Secuenciación del gen 16S rRNA**

La secuenciación del gen 16S rRNA es una técnica crucial en microbiología para la identificación y caracterización de la diversidad bacteriana en diversos entornos. Este método se basa en la amplificación y secuenciación de una región altamente conservada del gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal bacteriano (Figura 9). Las regiones conservadas del gen 16S rRNA proporcionan un objetivo estable para el diseño de cebadores, facilitando la amplificación del gen en diversas especies procariotas. Los cebadores universales, como los que se dirigen a las regiones hipervariables V3 y V4, permiten la amplificación de los genes 16S rRNA de una amplia gama de taxones bacterianos y arqueales, lo que hace posible realizar estudios exhaustivos de comunidades microbianas (Abuabara-Franco et al., 2022; Osorio et al., 2023).

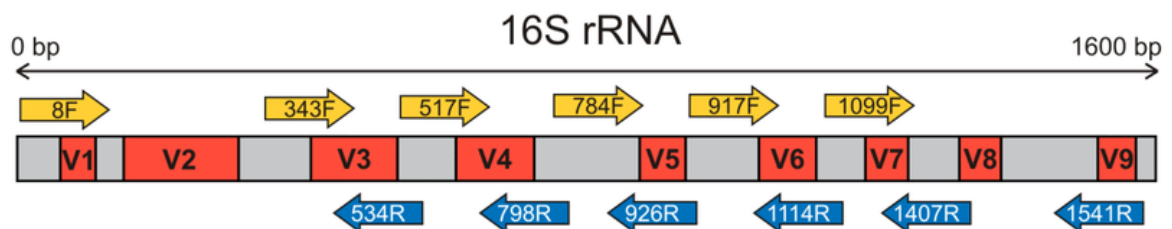


**Figura 9:** Visión general de los métodos de secuenciación de nueva generación (NGS) del gen 16S rRNA y metagenómica shotgun.

Ambos métodos comienzan con la extracción de ácidos nucleicos de una muestra microbiana. A continuación, el ADN extraído se somete a amplificación por PCR del gen 16S rRNA (NGS del gen 16S rRNA) o se fragmenta en pequeños fragmentos de ADN (metagenómica shotgun). Los amplicones resultantes del gen 16S rRNA, o los fragmentos de ADN fragmentados, se secuencian utilizando técnicas de NGS. Finalmente, todos los datos de secuencia se procesan utilizando una amplia gama de algoritmos bioinformáticos

que permiten al investigador explorar la composición taxonómica y/o la capacidad funcional de la muestra analizada. Fuente: Boers SA et al., 2019.

Las regiones hipervariables del gen 16S rRNA, como V1-V2, V3-V4, y V4-V5, son comúnmente seleccionadas para la secuenciación debido a su capacidad para discriminar entre diferentes especies bacterianas (Figura 10). Estas regiones contienen variaciones en la secuencia que son útiles para la identificación taxonómica (Kozich et al., 2013). Por ejemplo, la región V4 es frecuentemente utilizada en estudios de microbiomas debido a su equilibrio entre longitud y capacidad de resolución, permitiendo una identificación precisa de una amplia gama de bacterias (Caporaso et al., 2012).



**Figura 10:** Estructura del gen 16S rRNA y posibles cebadores.

Una figura esquemática del gen 16S rRNA con nueve regiones variables marcadas como V1 – V9. Las flechas muestran cebadores que cubren al menos dos regiones variables propuestos por Nossa et al 2010. El número dentro de las flechas determina la posición de mapeo en el gen 16S rRNA de *E. coli*.

En 2023, por primera vez se realizó la secuenciación completa del gen 16S rRNA para la identificación de bacterias en la cavidad oral de serpientes, marcando un hito significativo en la microbiología y la ecología microbiana de estos reptiles

(Lin & Tsai, 2023). Este estudio utilizó la secuenciación de alto rendimiento del gen 16S rRNA completo para investigar la diversidad bacteriana en la cavidad oral de siete especies de serpientes venenosas en Taiwán. La técnica empleada permitió la amplificación y secuenciación de las regiones hipervariables V1-V9 del gen 16S rRNA, proporcionando una resolución sin precedentes en la identificación taxonómica de las comunidades bacterianas presentes en las muestras orales de las serpientes.

La secuenciación del 16S rRNA ha revolucionado nuestra comprensión de la diversidad microbiana y la estructura de las comunidades. Sin embargo, la gran cantidad de datos generados requiere enfoques bioinformáticos robustos para una interpretación efectiva. El proceso generalmente involucra varios pasos críticos: procesamiento de secuencias, agrupación en OTUs o ASVs, y asignación taxonómica (Valencia & Zavaleta, 2017; J. et al., 2017). Estos análisis permiten la caracterización de la diversidad alfa (dentro de las muestras) y beta (entre muestras), así como la identificación de taxones microbianos claves asociados con condiciones específicas o tipos de muestras (Callahan et al., 2017).

A pesar de sus numerosas ventajas, es importante reconocer las limitaciones de la secuenciación del 16S rRNA, como la posible subestimación de la diversidad debido a sesgos en la amplificación por PCR y la limitada resolución taxonómica a nivel de especie en algunos grupos bacterianos (Johnson et al., 2019).

### **5.4.2.1.3 Secuenciación de nueva generación (NGS) y su aplicación en estudios de microbioma**

La secuenciación de nueva generación (NGS) ha revolucionado el estudio del microbioma al permitir el análisis masivo y en paralelo de múltiples secuencias de ADN microbiano. Esta tecnología ha posibilitado caracterizar de manera más completa y precisa las comunidades microbianas presentes en diferentes nichos ecológicos, incluido el cuerpo humano (Goodwin et al., 2016). Las principales aplicaciones de NGS en estudios de microbioma incluyen:

1. Análisis taxonómico: Permite identificar y cuantificar los microorganismos presentes en una muestra mediante la secuenciación de genes marcadores como el 16S rRNA para bacterias (Caporaso et al., 2012).
2. Metagenómica: Posibilita estudiar el contenido genético total de una comunidad microbiana, revelando su potencial funcional (Quince et al., 2017).
3. Meta transcriptómica: Analiza los genes que se están expresando activamente en una comunidad microbiana (Franzosa et al., 2014).
4. Estudios longitudinales: Facilita el seguimiento de cambios en la composición y función del microbioma a lo largo del tiempo (Lloyd-Price et al., 2017).
5. Asociación con enfermedades: Permite identificar alteraciones del microbioma vinculadas a diferentes patologías (Gilbert et al., 2016).

El proceso de NGS comienza con la extracción de ADN de la muestra y la preparación de bibliotecas de ADN mediante fragmentación y adición de adaptadores. Luego, las bibliotecas se secuencian utilizando plataformas de NGS, que generan millones de lecturas de secuencias cortas. Estas secuencias se ensamblan y se comparan con bases de datos de secuencias para identificar las bacterias presentes en la muestra (Knight et al., 2018).

NGS permite el análisis profundo de la diversidad microbiana, identificando no solo las bacterias presentes, sino también su abundancia relativa y su función potencial en el ecosistema. Esta técnica ha sido fundamental en el estudio de la microbiota intestinal, la microbiota de la piel y otros microbiomas humanos y animales, proporcionando información valiosa sobre las interacciones microbianas y su impacto en la salud y la enfermedad (Franzosa et al., 2014).

La integración de datos de NGS con información clínica y otras tecnologías ómicas está abriendo nuevas perspectivas para comprender el papel del microbioma en la salud y la enfermedad, así como para desarrollar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas basadas en el microbioma (Wang & Jia, 2016).

## **5.5 Manejo y cuidado de serpientes en cautiverio**

El manejo y cuidado de serpientes en cautiverio es una práctica que requiere conocimientos especializados en biología, anatomía, fisiología y comportamiento

de estos reptiles. Comprender la biología y fisiología de las serpientes es fundamental para su manejo efectivo en cautiverio. Los ambientes en cautiverio deben imitar los hábitats naturales para satisfacer las necesidades fisiológicas y comportamentales de las serpientes. Por ejemplo, estudios han demostrado que el enriquecimiento ambiental puede mejorar significativamente la diversidad comportamental y el bienestar general de las serpientes en cautiverio (Azevedo et al., 2021; Spain et al., 2020). Los ambientes inadecuados pueden generar comportamientos relacionados con el estrés, lo que puede aumentar la probabilidad de problemas de salud e incluso incidentes de mordeduras de serpiente cuando se requiere manipulación (Waeyenberge et al., 2018).

Para un manejo adecuado, es esencial comprender la biología y ecología de las serpientes. Al ser ectotérmicas, dependen de fuentes externas de calor para regular su temperatura corporal, y sus comportamientos y fisiologías están adaptados a hábitats que van desde selvas tropicales hasta desiertos áridos (Feva, 2022). Este entendimiento es fundamental para replicar las condiciones ambientales adecuadas en un entorno controlado.

El diseño del terrario es un aspecto clave en este proceso, ya que debe imitar las condiciones naturales del hábitat de la serpiente. Esto incluye la temperatura, humedad, sustrato y elementos de enriquecimiento ambiental como ramas y escondites. La temperatura debe ser regulada con lámparas de calor y mantas térmicas, creando un gradiente térmico dentro del terrario para permitir la termorregulación (Feva, 2022).

Un estudio de Lillywhite et al. (2011) subraya la importancia del gradiente térmico en los terrarios, ya que permite a las serpientes regular su temperatura moviéndose entre áreas cálidas y frías. Este control ambiental previene enfermedades metabólicas y asegura una digestión eficiente.

Uno de los mayores retos en el manejo de serpientes en cautiverio es la prevención de enfermedades infecciosas. La prevención de estas infecciones depende de un control estricto de bioseguridad y la implementación de cuarentenas para nuevos ejemplares. Las infecciones bacterianas son comunes. Harr et al. (2001) documentan la importancia de mantener una higiene adecuada en los recintos y proporcionar un sustrato que no favorezca el crecimiento de bacterias patógenas. Mantener las instalaciones limpias es fundamental para la salud de las serpientes.

El manejo del estrés es otro factor vital en el bienestar de las serpientes en cautiverio. El estrés crónico puede afectar negativamente su sistema inmunológico y comportamiento. Un estudio de Morgan y Tromborg (2006) revela que el estrés puede reducir la respuesta inmune, aumentando la susceptibilidad a infecciones. El manejo inadecuado, cambios bruscos en el entorno y la falta de refugios adecuados contribuyen a este problema. Minimizar la interacción humana y proporcionar espacios de refugio que simulen su hábitat natural son medidas necesarias para reducir el estrés.

El enriquecimiento ambiental también juega un papel crucial en el bienestar de las serpientes. Warwick et al. (2019) sugieren que ofrecer estructuras que permitan comportamientos naturales, como escalar y esconderse, mejora tanto la salud física como el bienestar psicológico de las serpientes. Un entorno enriquecido no solo reduce el estrés, sino que también favorece una mejor adaptación al cautiverio y promueve la longevidad.

El control ambiental, la vigilancia de enfermedades infecciosas y parasitarias, y el enriquecimiento del entorno son componentes esenciales para garantizar la salud de las serpientes en cautiverio, contribuyendo a la conservación de especies en peligro.

### **5.5.1 Alimentación y Nutrición**

Las serpientes de la familia *Viperidae*, que incluyen víboras y crótalos, presentan una dieta bastante generalizada y variada, adaptada a su entorno y disponibilidad de presas. Estas serpientes son principalmente carnívoras y se alimentan de una amplia gama de vertebrados. Los roedores constituyen una parte significativa de su dieta, pero también consumen otros mamíferos pequeños, aves, anfibios y reptiles (Serpientes Argentinas, 2020).

En este contexto, en el caso de la especie *Vipera seoanei*, se ha observado que su dieta incluye principalmente pequeños mamíferos como los géneros *Apodemus* y *Microtus*. Sin embargo, la dieta puede variar según la edad y el

tamaño de la serpiente. Los juveniles tienden a consumir presas más pequeñas y accesibles, mientras que los adultos pueden capturar presas más grandes (Braña et al., 1984).

Las técnicas de caza de los vipéridos son variadas y adaptadas a su entorno. Muchas especies son depredadores de emboscada, utilizando su camuflaje para acechar a sus presas y atacarlas con rapidez. Otras especies pueden ser más activas en la búsqueda de alimento, especialmente en hábitats donde las presas son menos abundantes (Serpientes Argentinas, 2020).

La nutrición de las serpientes de la familia *Viperidae* se basa en la digestión y asimilación de los nutrientes obtenidos de sus presas. Los vipéridos poseen un sistema digestivo altamente especializado que les permite digerir y absorber eficientemente los nutrientes de sus presas. El proceso digestivo comienza con la inyección de veneno, que no solo inmoviliza a la presa, sino que también inicia la digestión al descomponer los tejidos (Gutiérrez et al., 2017).

El veneno de los vipéridos contiene una variedad de enzimas y toxinas que facilitan la digestión. Las fosfolipasas A2 y las metaloproteinasas son particularmente importantes en este proceso, ya que degradan las membranas celulares y los componentes de la matriz extracelular, facilitando la absorción de nutrientes (Gutiérrez et al., 2016).

### **5.5.2 Manejo y Manipulación**

Las técnicas adecuadas de manipulación incluyen el uso de ganchos y pinzas para sujetar y mover a las serpientes de manera segura. Al levantar una serpiente, es importante apoyar su cuerpo en varios puntos para evitar estrés o daño. Las serpientes venenosas deben ser manejadas exclusivamente por personal capacitado y con el uso de equipos de seguridad adecuados (Girling & Raiti, 2004).

El personal encargado del manejo de serpientes debe estar debidamente capacitado y conocer el comportamiento y la biología de las especies que manejan. La capacitación debe incluir el reconocimiento de signos de estrés y enfermedad, técnicas de manipulación seguras y el uso de equipos de protección personal (Warwick et al., 2013).

### **5.5.3 Enfermedades Comunes**

Las serpientes mantenidas en cautiverio son susceptibles a diversas enfermedades infecciosas y no infecciosas. Entre las más comunes se encuentran:

1. Enfermedad del tracto respiratorio superior (URTD): Causada principalmente por bacterias como *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.* Y

*Mycoplasma spp.* Se caracteriza por secreciones nasales, estomatitis y neumonía (Schumacher, 2006).

2. Estomatitis infecciosa (enfermedad de la boca podrida): Infección bacteriana de la cavidad oral, comúnmente por *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.* Y *Proteus spp.* Puede progresar a septicemia si no se trata (Tetzlaff et al., 2015).
3. Enfermedad fúngica de las serpientes (SFD): Causada por el hongo *Ophidiomyces ophiodiicola*. Produce lesiones cutáneas y puede ser fatal en casos severos (Lorch et al., 2016).
4. Parasitosis: Infestaciones por nematodos, cestodos y protozoos son comunes. Los géneros más frecuentes incluyen *Cryptosporidium*, *Entamoeba* y *Ophidascaris* (Paré, 2008).
5. Enfermedad de los cuerpos de Inclusión (IBD): Enfermedad viral crónica y progresiva que afecta principalmente a boas y pitones. Causa trastornos neurológicos y digestivos (Stenglein et al., 2017).

Es importante destacar que muchas de estas condiciones están interrelacionadas y pueden presentarse de forma concomitante. El manejo adecuado del ambiente, la nutrición y la higiene son fundamentales para prevenir estas enfermedades en serpientes cautivas. Estrategias clave incluyen la cuarentena de nuevos ejemplares y el manejo apropiado para prevenir la introducción y propagación de enfermedades (Tully et al., 2018).

## 6. CAPÍTULO II: Metodología

### 6.1 Tipo de Estudio

Este estudio se clasifica como descriptivo-exploratorio de corte transversal. Es descriptivo porque caracteriza detalladamente la microbiota oral de diferentes especies de serpientes venenosas, identificando y cuantificando las especies bacterianas presentes. Tiene elementos exploratorios al utilizar técnicas de secuenciación de nueva generación para investigar la diversidad microbiana total, incluyendo bacterias no cultivables, en un área relativamente poco estudiada. Se considera de corte transversal ya que las muestras se recolectaron en un único momento temporal, proporcionando una “instantánea” de la composición microbiana en un punto específico del tiempo, sin seguimiento longitudinal de las serpientes o de las comunidades bacterianas.

### 6.2 Universo y muestras de estudio

Se recolectaron, un total de 48 muestras provenientes de ejemplares adultos de serpientes de la familia *Viperidae*, específicamente de las especies *Bothrops asper*, *Bothriechis nigroviridis*, *Cerrophidion sasai*, y *Porthidium lansbergii*. Estos especímenes se mantenían en cautiverio en el serpentario del Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET), sede de Panamá, Campus Octavio Méndez Pereira, y sede de Santiago de Veraguas. La distribución específica de las muestras fue la siguiente (Tablas 1 y 2):

<b>Individuo</b>	<b>Especímenes muestreados</b>
<i>Porthidium lansbergii</i>	21
<i>Bothriechis nigroviridis</i>	8
<i>Cerrophidion sasai</i>	15
<i>Bothrops asper</i>	4
<b>Total de especímenes</b>	<b>48</b>

**Tabla 1:** Número de especímenes muestreados para cada especie de serpiente estudiada. Se incluyeron un total de 48 especímenes.

<b>Código del Individuo</b>	<b>Tipo de Especímen</b>	<b>Fecha de toma de muestra</b>	<b>Ubicación del espécimen</b>	<b>Observaciones</b>
2023-Ba05	<i>Bothrops asper</i>	04/02/2023	Santiago	Adulto
2023-Ba06	<i>Bothrops asper</i>	06/07/2023	Santiago	Adulto
2023-Ba07	<i>Bothrops asper</i>	06/07/2023	Santiago	Adulto
2023-Ba08	<i>Bothrops asper</i>	14/04/2023	Santiago	Adulto
2023-Bn05	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	23/02/2023	Panamá	Adulto
2023-Bn07	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	23/02/2023	Panamá	Adulto
2023-Bn08	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	23/02/2023	Panamá	Adulto
2023-Bn10	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	23/02/2023	Panamá	Adulto
2023-Bn11	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	23/02/2023	Panamá	Adulto
2023-Bn12	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	23/02/2023	Panamá	Adulto
2023-Bn13	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	23/02/2023	Panamá	Adulto
2023-Bn14	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	23/02/2023	Panamá	Adulto
2023-Cr14	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/08/2023	Panamá	Adulto
2023-Cr16	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/08/2023	Panamá	Adulto
2023-Cr18	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/08/2023	Panamá	Adulto
2023-Cr20	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/08/2023	Panamá	Adulto
2023-Cr21	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/08/2023	Panamá	Adulto
2023-Cr22	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/08/2023	Panamá	Adulto
2023-Cr23	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/08/2023	Panamá	Adulto
2023-Cr24	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/08/2023	Panamá	Adulto
2023-Cr26	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/09/2023	Panamá	Adulto
2023-Cr27	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/09/2023	Panamá	Adulto

2023-Cr28	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/08/2023	Panamá	Adulto
2023-Cr29	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/09/2023	Panamá	Adulto
2023-Cr30	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/08/2023	Panamá	Adulto
2023-PI06	<i>Porthidium lansbergii</i>	14/04/2023	Santiago	Adulto
2023-PI07	<i>Porthidium lansbergii</i>	04/02/2023	Santiago	Adulto
2023-PI11	<i>Porthidium lansbergii</i>	04/02/2023	Santiago	Adulto
2023-PI13	<i>Porthidium lansbergii</i>	04/02/2023	Santiago	Adulto
2023-PI17	<i>Porthidium lansbergii</i>	14/04/2023	Santiago	Adulto
2023-PI18	<i>Porthidium lansbergii</i>	04/02/2023	Santiago	Adulto
2023-PI18	<i>Porthidium lansbergii</i>	14/04/2023	Santiago	Adulto
2023-PI19	<i>Porthidium lansbergii</i>	14/04/2023	Santiago	Adulto
2023-PI25	<i>Porthidium lansbergii</i>	14/04/2023	Santiago	Adulto
2023-PI27	<i>Porthidium lansbergii</i>	14/04/2023	Santiago	Adulto
2023-PI28	<i>Porthidium lansbergii</i>	14/04/2023	Santiago	Adulto
2023-PI29	<i>Porthidium lansbergii</i>	06/10/2023	Santiago	Adulto
2023-PI30	<i>Porthidium lansbergii</i>	14/04/2023	Santiago	Adulto
2023-PI43	<i>Porthidium lansbergii</i>	23/02/2023	Panamá	Adulto
2023-PI44	<i>Porthidium lansbergii</i>	23/02/2023	Panamá	Adulto
2023-PI46	<i>Porthidium lansbergii</i>	23/02/2023	Panamá	Adulto
2023-PI09	<i>Porthidium lansbergii</i>	04/02/2023	Santiago	Adulto
Pool Veneno PLVA1	<i>Porthidium lansbergii</i>	06/10/2023	Santiago	Adulto
Pool Veneno PLVJ2	<i>Porthidium lansbergii</i>	06/10/2023	Santiago	Juvenil
Pool Veneno PLVA3	<i>Porthidium lansbergii</i>	07/10/2023	Santiago	Adulto
Pool Veneno PLVJ4	<i>Porthidium lansbergii</i>	07/10/2023	Santiago	Juvenil
Pool Veneno CSVA	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/08/2023	Panamá	Adulto
Pool Veneno CSVJ	<i>Cerrophidion sasai</i>	03/09/2023	Panamá	Juvenil

**Tabla 2:** Especímenes muestreados en el estudio, organizados por código de identificación, especie, fecha, ubicación y observaciones.

Esta selección de especies y número de individuos se basó en la disponibilidad en los serpentarios, y en la importancia médica de estas especies en la región.

### **6.3 Criterios de inclusión y exclusión**

Los criterios de inclusión y exclusión de los especímenes fueron los siguientes:

#### **Criterios de inclusión:**

- Serpientes que mostraban un buen estado físico y de salud general.
- Especímenes libres de infecciones bacterianas y fúngicas visibles.
- Serpientes alimentadas en un periodo mínimo de 72 horas previas a su manipulación para evitar regurgitaciones.
- Tamaño adecuado para ser manipuladas e hisopadas de forma segura.
- Sin signos de muda inminente.
- Hidratación adecuada.

#### **Criterios de exclusión:**

- Serpientes gestantes o en periodo de reproducción.
- Especímenes con lesiones, heridas o cicatrices visibles.
- Individuos que mostraran signos de estrés o comportamiento defensivo excesivo.
- Ejemplares recién adquiridos o cumpliendo un periodo de cuarentena.
- Serpientes en tratamientos médicos o con alguna condición especial.

Estos criterios se establecieron para garantizar el bienestar de los animales y la calidad de las muestras obtenidas, siguiendo las recomendaciones de manejo de reptiles en cautiverio.

## 6.4 Procedimiento de Toma de Muestras

### 6.4.1 Manipulación de las Serpientes

La manipulación de las serpientes fue realizada exclusivamente por el personal del CIIMET, quienes están altamente capacitados en el manejo de serpientes venenosas y técnicas herpetológicas. Las serpientes fueron sujetadas detrás de la cabeza para permitir un control seguro de la boca y los colmillos, mientras que el resto del cuerpo fue soportado adecuadamente. Esta sujeción precisa permitió un acceso seguro a la cavidad oral, mientras se proporcionaba un soporte adecuado al resto del cuerpo del animal, garantizando así la integridad física y segura reduciendo el estrés potencial.

Para la colecta de muestras en adultos de las serpientes *P. lansbergii*, *B. Nigroviridis* y *C. sasai* se excluyó el uso de agentes sedantes. Esta decisión se basó en la consideración de los tamaños reducidos de dichas especies, lo que permitió un manejo más directo, seguro y menos invasivo. El uso de agentes sedantes, como el CO<sub>2</sub>, puede inducir estrés adicional en las serpientes, lo cual es contraproducente para su bienestar. Además, la sedación puede llevar a complicaciones respiratorias y cardiovasculares, especialmente en especies pequeñas que son más sensibles a los cambios fisiológicos.

La sujeción manual permitió un procedimiento más rápido y eficiente, reduciendo el tiempo que las serpientes estuvieron fuera de sus recintos y expuestas a

manipulación. Esto no solo mejoró la seguridad del personal y de las serpientes, sino que también optimizó el proceso de toma de muestras, asegurando que se realice de manera efectiva y con el menor impacto posible en los animales.

Para la toma de muestras de *B. asper*, se implementó un protocolo de sedación utilizando CO<sub>2</sub> debido al gran tamaño de los especímenes. Este procedimiento se llevó a cabo en un recipiente de contención diseñado específicamente para serpientes de tamaño específicos, equipado con un sistema de suministro de CO<sub>2</sub>. Los ejemplares fueron introducidos de manera individual en las cámaras de contención previamente cargadas con CO<sub>2</sub>, por un tiempo aproximado de 10-15 minutos, el cual actuó como un agente aletargador. Esta técnica se empleó con el propósito de reducir la capacidad de reacción del animal, minimizando así el riesgo de lesiones tanto para el espécimen como para el personal encargado de la manipulación. Adicionalmente, este método permitió disminuir significativamente el nivel de estrés que los ejemplares podrían experimentar durante el proceso de toma de muestras, garantizando de esta manera el bienestar animal y la seguridad del equipo de investigación.

#### **6.4.2 Toma de Muestras de la Cavidad Oral**

Una vez que la serpiente estuvo inmovilizada de manera segura por el personal del CIIMET, se procedió a tomar las muestras de la cavidad oral utilizando hisopos estériles. Los hisopos de nylon fueron introducidos y frotados suavemente en el fondo de saco del colmillo y la cavidad oral de la serpiente

para recolectar la muestra del fondo de saco mucoso y colmillos de los especímenes (Figura 11).



**Figura 11:** Toma de muestra del fondo de saco mucoso y colmillos.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

Los hisopos con las muestras recolectadas fueron depositados inmediatamente en medios de transporte Amies líquido Eswab® debidamente rotulados.

#### **6.4.3 Ordeño y manejo del veneno**

Este procedimiento es el más delicado, donde se puede comprometer la salud e integridad física del personal que lo realiza y de las serpientes destinadas para dicho proceso.

Este procedimiento se inició desde dos días antes. En horas de la mañana del primer día, se redujo de 1°C a 2°C la temperatura general de la sala que alberga los especímenes a los que se les extrajo el veneno. El segundo día se repitió este proceso, con el fin de aletargar a los animales, para reducirles el estrés de los procesos y preparativos que ocurrían dentro del serpentario. En la mesa principal de extracción de veneno, se dispusieron los siguientes elementos:

- Vasos químicos estériles ya rotulados e identificados para el propósito que se les asignó (contener veneno y yodo al 2%)
- Vasos químicos recubiertos de Parafilm previamente esterilizado para simular una membrana.
- Hisopos estériles
- Gasas estériles
- Papel toalla estériles
- Nevera con hielo
- Pinzas estériles
- Soportes de vasos químicos universal
- Povidona (yodo) al 0.2%

#### **6.4.3.1 Extracción de veneno**

El operario principal se destinó a sacar los individuos de sus contenedores individuales y procedió a inmovilizar al animal sujetándolo por la cabeza, controlando su movimiento. El segundo operario inmovilizó al animal

sujetándolo firmemente por el centro de su cuerpo, impidiendo así cualquier movimiento brusco. A continuación, procedió a abrir cuidadosamente la boca del ejemplar. Con una pinza previamente esterilizada, se retiró con precisión la membrana protectora que cubría los colmillos. Los colmillos se introdujeron dentro del recipiente de contención del veneno (previamente colocado en hielo para garantizar la cadena de frío), que contenía una membrana de origen plástico (Parafilm) que estimuló la salida del veneno (Figura 12).



**Figura 12:** Procedimiento para la extracción de veneno mediante la técnica de ordeño.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

Al retirar los colmillos del recipiente, se reacomodó la membrana y se utilizó una solución antiséptica, (yodo diluido al 0.2%), para evitar que alguna lesión se

infectara y comprometiera la salud posterior de los individuos. Al ingresar nuevamente los ejemplares a su recinto, se aseguró que ingresaran en óptimas condiciones y fue indispensable revisar que los colmillos de la serpiente volvieran a estar en la posición habitual. Un colmillo fuera de su posición podría provocar infecciones o laceraciones dentro de la boca de los animales.

#### **6.4.3.2 Manejo del veneno**

El veneno colectado fue introducido, al igual que las muestras de hisopado, en medios de transporte, conservando la cadena de frío y fue trasladado de inmediato al laboratorio para su debido procesamiento.

#### **6.4.4 Medio de transporte de muestras**

Para la recolección y transporte de las muestras, se utilizó el medio de transporte Amies líquido Eswab® debido a su cumplimiento con la norma CLSI M40-A2 y su capacidad para mantener la viabilidad de bacterias aeróbicas, anaeróbicas y fastidiosas. Este sistema de recolección y preservación fue seleccionado debido a sus múltiples ventajas, como lo es la preservación y transporte de muestras a temperatura ambiente o refrigeradas por un período de hasta 48 horas, manteniendo la viabilidad de los microorganismos. Esta característica facilitó el manejo y procesamiento de las muestras, especialmente cuando se requería el traslado desde sitios de recolección distantes hasta el laboratorio.

Para el almacenamiento a largo plazo, después del período inicial de transporte, las muestras pudieron ser preservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por tiempos prolongados, lo que posibilitó la realización de estudios moleculares posteriores sin comprometer la integridad de las mismas.

El volumen del medio de transporte de aproximadamente 1 mL, permitió la suspensión correcta de la muestra y posterior siembra en diversos medios de cultivo para análisis microbiológicos, y la conservación  $-80^{\circ}\text{C}$  de una alícuota para los ensayos moleculares subsiguientes. Esta característica optimizó el uso de la muestra, permitiendo realizar múltiples análisis a partir de una única recolección.

## **6.5 Identificación de bacterias mediante Técnicas Dependientes de Cultivo**

### **6.5.1 Crecimiento y aislamiento de bacterias**

Para el procesamiento de los hisopados de la cavidad oral y de las muestras de veneno con el fin de identificar bacterias cultivables, se implementó el siguiente protocolo:

**Cultivos bacterianos:** Cada muestra (hisopado oral y veneno), se cultivó en Agar Sangre, Agar McConkey y Agar Chocolate como medio para bacterias fastidiosas (Figura 13). Utilizando técnicas asépticas y en el interior de una

cámara de flujo laminar, se procedió a inocular cada muestra de la siguiente manera:



**Figura 13:** Cultivo en Agar Sangre, Agar McConkey y Agar Chocolate de cada muestra de hisopado de la cavidad oral y de veneno.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

1. Se tomó con un hisopo parte de la muestra del medio líquido de transporte.
2. Se inocularon las muestras mediante técnica de estriado en 3 cuadrantes en cada uno de los platos utilizando un asa esterilizada.
3. Se etiquetó cada placa con el código de la muestra y la fecha del cultivo.

### 6.5.1.1 Incubación de las muestras

Los cultivos se dividieron en dos grupos para su incubación:

**Incubación aeróbica:** Los medios de cultivos aeróbicos fueron incubados a una temperatura de 35-37°C por un periodo de tiempo de 18-24 horas. Cabe resaltar que bajo condiciones de aerobiosis fueron incubados solamente los platos de Agar Sangre y Agar McConkey.

**Grupo de incubación anaeróbica:** Para la incubación de los cultivos en condiciones anaeróbicas, se utilizaron las cámaras AnaeroPack 2.5L Rectangular Jar de Mitsubishi™. Para generar y mantener las condiciones anaeróbicas dentro de las cámaras, se emplearon los sobres GENBAG ANAER de *bioMérieux* y los *indicadores de anaerobiosis*, los cuales nos permitieron evidenciar las condiciones de anaerobiosis. El sistema de incubación anaeróbica permitió el crecimiento de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos en el contexto de esta investigación (Figura 14). La incubación de estos cultivos se realizó por un periodo de 72 horas hasta 5 días, a 35- 37°C. Bajo estas condiciones fueron incubados los medios de agar sangre sembrados con las muestras.



**Figura 14:** Sistema de incubación anaeróbica.

Sistema compuesto por las cámaras AnaeroPack 2.5L, los sobres GENBAG ANAER, las tiras indicadoras de anaerobiosis y los platos de medio de cultivo estriados con las muestras.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

#### **6.5.1.2 Características macroscópicas y microscópicas**

Para la caracterización morfológica de las colonias bacterianas obtenidas, se implementó un protocolo sistemático de observación y registro, tanto a nivel macroscópico como microscópico.

Transcurrido el tiempo de incubación establecido, se procedió a la observación detallada de los cultivos. Se registró meticulosamente el crecimiento bacteriano en cada plato, documentando las características macroscópicas de las colonias observadas. Este registro incluyó:

- Presencia o ausencia de crecimiento
- Tipos de colonias observadas (forma, elevación, borde, tamaño, color, textura)
- Diferencias entre los medios de cultivo utilizados
- Variaciones entre condiciones aeróbicas y anaeróbicas

Para lograr el aislamiento de las colonias bacterianas y obtener cultivos puros, se realizaron pases sucesivos de las colonias con características morfológicas distintas a nuevos medios de cultivo. Este proceso se repitió hasta obtener colonias aisladas y puras.

Además de la caracterización macroscópica, a cada colonia morfológicamente diferente se le realizó una tinción de Gram para observar sus características morfológicas y clasificación según Gram. Importante destacar que este paso solo se llevó a cabo con las bacterias que crecieron en condiciones de aerobiosis, ya que fueron las que se identificaron mediante métodos bioquímicos automatizados.

### **6.5.2 Identificación de aislamientos en VITEK® 2 COMPACT**

Para la identificación bacteriana se utilizó el sistema automatizado VITEK 2 COMPACT de bioMérieux. El protocolo de preparación de las muestras y el proceso de identificación se llevó a cabo de la siguiente manera:

**Preparación de la suspensión bacteriana:** A partir de los cultivos puros obtenidos previamente, se seleccionó una colonia aislada. Utilizando un hisopo estéril, se tomó una cantidad suficiente de la colonia y se suspendió en solución salina estéril (NaCl 0.45%). La turbidez de la suspensión se ajustó hasta alcanzar un índice de McFarland de 0.5, utilizando el equipo DensiCHEK Plus (bioMérieux) para su verificación. El estándar 0.5 de McFarland corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de  $1.5 \times 10^8$  células bacterianas por mL. Este paso es crucial para asegurar una concentración bacteriana estandarizada, lo que garantiza la precisión y reproducibilidad de los resultados. Se realizó un control de esterilidad de la solución salina, inoculando 1mL en un medio agar sangre incubándolo a 35-37°C por 24hrs.

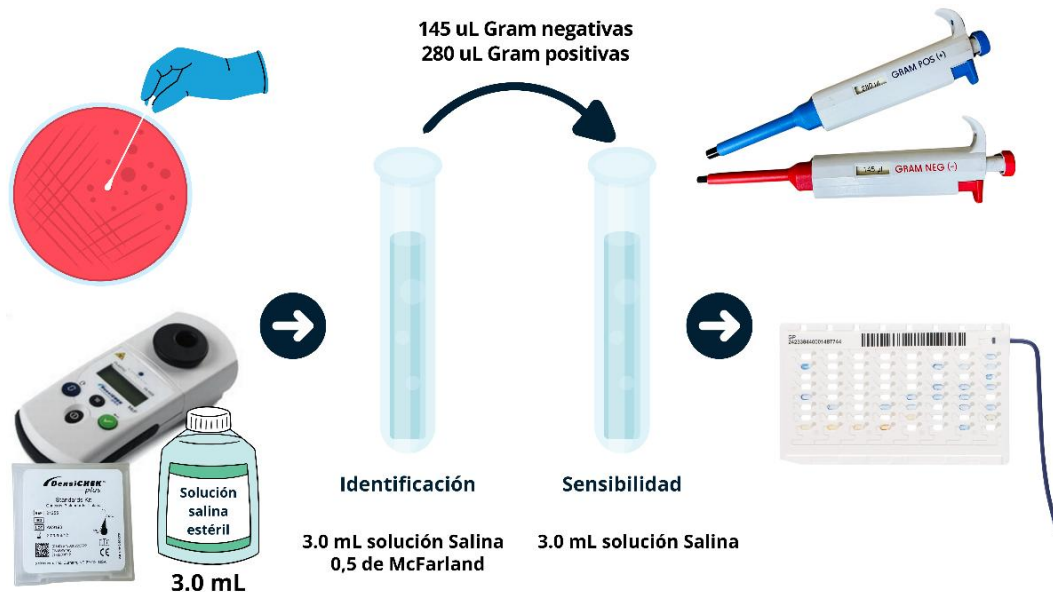
**Identificación y antibiograma:** Para la identificación de los aislados bacterianos y la determinación de su perfil de sensibilidad antimicrobiana, se utilizaron las siguientes tarjetas del sistema VITEK 2:

1. Tarjeta VITEK 2 GN: para la identificación de bacterias Gram-negativas.
2. Tarjeta VITEK 2 GP: para la identificación de bacterias Gram-positivas.

3. Tarjeta VITEK 2 AST-P663: para el antibiograma de bacterias Grampositivas.
4. Tarjeta VITEK 2 AST-N401: para el antibiograma de bacterias Gramnegativas.

Estas tarjetas contienen sustratos bioquímicos para la identificación bacteriana y diluciones de antibióticos para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada antimicrobiano probado.

Para la determinación de la sensibilidad a antibióticos, se utilizaron diferentes volúmenes de la suspensión bacteriana ajustada al 0.5 de McFarland, dependiendo del tipo de bacteria (Figura 15):



**Figura 15:** Esquema general de la preparación de suspensiones con las cuales fueron inoculadas las tarjetas de identificación y sensibilidad a antibióticos del VITEK. Fuente: Imagen elaborada en Biorender.

### **Bacterias Gram negativas**

- Se tomaron 280  $\mu\text{L}$  de la suspensión ajustada al 0.5 de McFarland.
- Estos 280  $\mu\text{L}$  se inocularon en 3 mL de solución salina.

### **Bacterias Gram positivas**

- Se tomaron 145  $\mu\text{L}$  de la suspensión ajustada al 0.5 de McFarland.
- Estos 145  $\mu\text{L}$  se inocularon en 3 mL de solución salina.



**Figura 16:** Carrusel de trabajo con las muestras para identificación y sensibilidad por VITEK.

Tarjetas para identificación (carrizo azul), seguidas de tarjetas para sensibilidad a antibióticos (carrizo gris) con las diferentes suspensiones bacterianas ajustadas al 0.5 en el índice de McFarland, listas para ser montadas en el equipo.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

La suspensión bacteriana preparada se inoculó en las tarjetas correspondientes según la tinción de Gram previamente realizada (Figura 16). Las tarjetas inoculadas se introdujeron en el equipo VITEK 2 COMPACT, donde se incubaron por un espacio de aproximadamente 18 horas y se realizaron las lecturas automáticas. El sistema VITEK 2 COMPACT utiliza métodos automatizados de alta sensibilidad y especificidad para la identificación de microorganismos y la determinación de su perfil de sensibilidad antimicrobiana. Los resultados de identificación se basan en una serie de pruebas bioquímicas y enzimáticas (Figura 17), mientras que los antibiogramas se realizan siguiendo las normas del CLSI.

<b>Información de identificación</b>		<b>Tiempo de análisis:</b> 4,73 horas		<b>Estado:</b> Final	
<b>Organismo seleccionado</b>		95% Probabilidad		<b>Serratia fonticola</b>	
<b>Mensajes de análisis de ID</b>		<b>Bionúmero:</b>		2107110301542011	

<b>Detalles bioquímicos</b>																	
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	+	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	+	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

**Figura 17:** Tabla de resultados generada por el sistema VITEK 2 COMPACT.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

El software del equipo presenta la identificación bioquímica de bacterias en base a diferentes pruebas bioquímicas que son reportadas con resultados positivos y negativos.

## **6.6 Identificación de bacterias mediante técnicas independientes de Cultivo (Técnicas Moleculares)**

### **6.6.1 Extracción de ADN genómico de las muestras orales colectadas**

Para la extracción del ADN genómico (ADNg) se utilizó el kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit de la casa comercial Zymo Research, diseñado específicamente para la purificación de ADN microbiano a partir de diversos tipos de muestras. Las muestras de hisopados orales y de veneno, previamente recolectadas en medio de transporte Amies líquido ESwab® y almacenadas a -80°C, fueron descongeladas y homogeneizadas antes de iniciar el proceso de extracción.

El protocolo de extracción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema de lisis ZymoBIOMICS empleado en este kit eliminó el sesgo asociado con las diferentes eficiencias de lisis de distintos organismos, como bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, hongos, protozoos y algas.

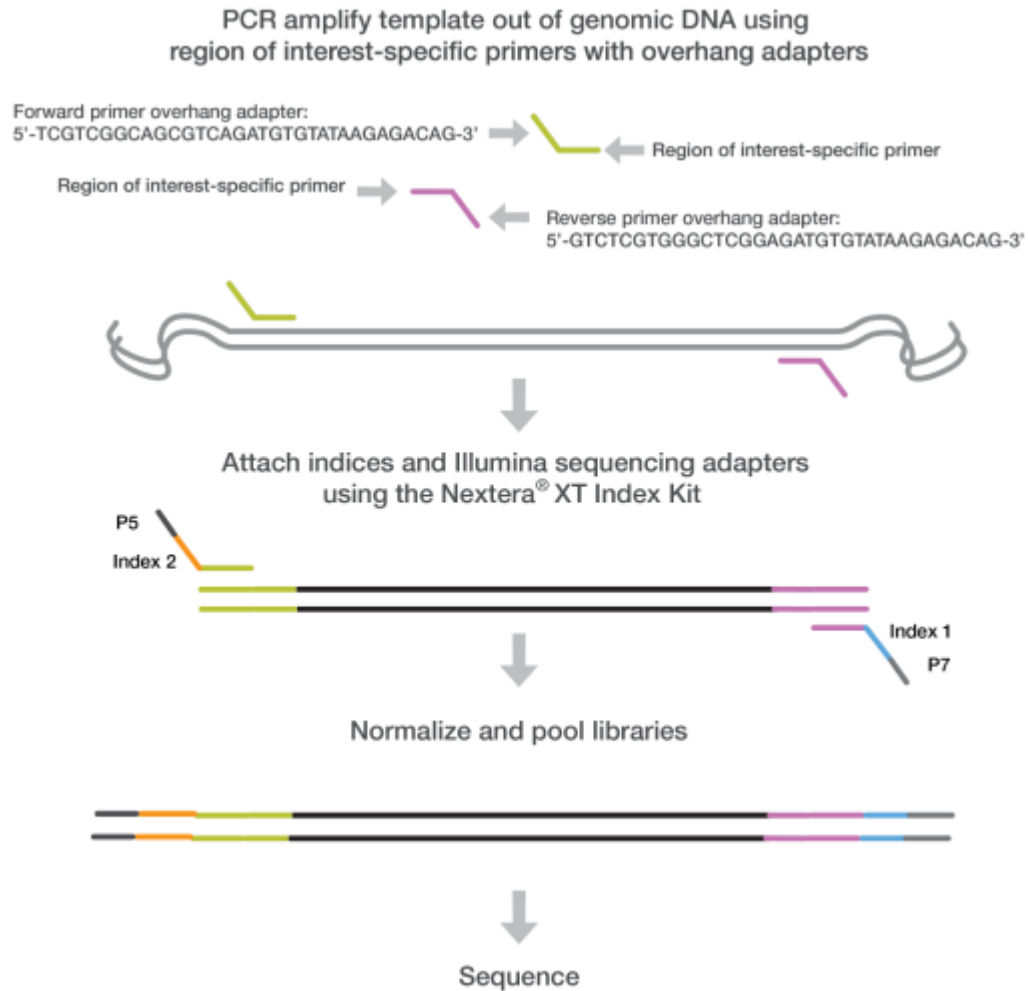
La lisis mecánica uniforme de todos los microorganismos se logró mediante agitación con perlas (bead beating) utilizando las Bashing Beads de ultra alta densidad. El kit también incorporó la tecnología OneStep de eliminación de inhibidores de PCR, lo que permitió la amplificación por PCR del ADN derivado de muestras ambientales ricas en inhibidores.

La calidad y concentración del ADN genómico extraído se verificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (espectrofotómetro UV Visible BioSpec Nano SHIMADZU). Este equipo permitió estimar la pureza del ADN mediante la medición de las absorbancias a 260 y 280 nm, así como determinar su concentración.

## **6.6.2 Preparación de Bibliotecas**

### **6.6.2.1 Amplificación del gen 16S V3-V4 rRNA**

Para la amplificación del gen 16S rRNA, se siguió el protocolo de preparación de biblioteca de amplicones de Illumina desglosada en el protocolo "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation" (Figura 18). Se seleccionaron específicamente para fines de este trabajo de investigación las regiones V3 y V4 del gen, las cuales generan un amplicón de aproximadamente 460 pb. Los cebadores fueron sintetizados por la empresa Integrated DNA Technologies (IDT). Estas regiones fueron elegidas por su capacidad para la clasificación taxonómica de microorganismos y por contar con una extensa base de datos de referencia que facilita la identificación precisa de taxones bacterianos.



**Figura 18:** Flujo de trabajo del amplicón 16S del rRNA regiones V3 y V4.

Los cebadores forward y reverse definidos por el usuario, que son complementarios a las regiones upstream y downstream de la región de interés, se diseñan con adaptadores de sobresaliente y se utilizan para amplificar moldes a partir del ADN genómico. Posteriormente, se realizó un paso de amplificación de ciclo limitado para añadir índices de multiplexación y adaptadores de secuenciación de Illumina. Las bibliotecas se normalizaron y se agruparon, y luego se secuenciaron en el sistema MiSeq.

*Fuente: Illumina, 2013.*

Se emplearon los siguientes cebadores con secuencias adaptadoras de Illumina:

**Cebador Forward (16S):**

5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN  
GGC WGC AG-3'

**Cebador Reverse (16S):**

5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV  
GGG TAT CTA ATC C-3'

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L, utilizando el termociclador Veriti Dx de Applied Biosystems. La mezcla de reacción contenía:

- 17.5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O
- 2.5  $\mu$ L de 10X tampón de PCR
- 0.9  $\mu$ L de MgSO<sub>4</sub> 50 mM
- 0.5  $\mu$ L de dNTPs 10 mM
- 0.5  $\mu$ L de cada cebador (Forward y Reverse)
- 0.1  $\mu$ L de Platinum Taq HiFi (5U/ $\mu$ L)
- 2.5  $\mu$ L de cDNA

El programa de amplificación se muestra en la siguiente tabla 3:

PROGRAMA: PCR 16s V3-V4		
	94°C	2 minutos
25	94°C	20 segundos
	55°C	30 segundos
	72°C	1 minutos 30 segundos
	72°C	6 minutos
	4°C	HOLD

**Tabla 3** Programa de Amplificación de la región V3 y V4 del gen 16S del rRNA.

Los productos de la PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando buffer TBE 1X, sometidos a un voltaje de 75 V. Para confirmar el tamaño del fragmento amplificado, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega) cargado al inicio del gel. Las muestras fueron mezcladas con Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega) y la visualización de las bandas se realizó mediante tinción con GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10000X (Biotium), seguido de su observación en el transiluminador BioRad.

#### 6.6.2.2 Limpieza de Productos de la PCR

Como parte de nuestro protocolo, se realizó un paso de limpieza de PCR para purificar los amplicones, y eliminar componentes no deseados de la reacción. El propósito de este paso fue el de eliminar cebadores no incorporados y dNTPs sobrantes de la reacción de PCR, eliminar enzimas y componentes del tampón que podrían interferir en pasos posteriores.

Para la purificación de los amplicones de las regiones V3 y V4 del gen 16S rRNA se utilizaron perlas magnéticas AMPure XP. Se centrifugó la placa de PCR resultante de la amplificación a 1,000 × g durante 1 minuto para coleccionar la condensación. Se agregaron 20 µL de perlas AMPure XP a cada pocillo de la placa de PCR, mezclando suavemente mediante pipeteo. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos sin agitación.

Posteriormente, se colocó la placa en un soporte magnético durante 2 minutos hasta que el sobrenadante se aclaró. Se removió y descartó el sobrenadante manteniendo la placa en el soporte magnético. Se realizaron dos lavados con etanol al 80% recién preparado, agregando 200 µL a cada pocillo e incubando durante 30 segundos en el soporte magnético antes de remover el sobrenadante. Después del segundo lavado, se eliminó el exceso de etanol con puntas finas. Las perlas se secaron al aire durante 10 minutos en el soporte magnético. Se re suspendieron en 52.5 µL de Tris 10 mM pH 8.5 mediante pipeteo suave. Después de una incubación de 2 minutos a temperatura ambiente, la placa se colocó nuevamente en el soporte magnético durante 2 minutos. Finalmente, se transfirieron cuidadosamente 50 µL del sobrenadante a una nueva placa de PCR, evitando la contaminación cruzada entre muestras.

### **6.6.2.3 PCR de Indexación**

Para la preparación de la biblioteca de secuenciación, se realizó una PCR de indexación utilizando el kit Nextera XT Index. Se transfirieron 2.5 µL del producto

de PCR purificado a una nueva placa de 96 pocillos. Los índices se organizaron utilizando el TruSeq Index Plate Fixture, colocando los primers Index 2 (tapas blancas) verticalmente en las filas A-H, y los primers Index 1 (tapas naranjas) horizontalmente en las columnas 1-12 (Figura 19). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L, utilizando el termociclador Veriti Dx de Applied Biosystems.

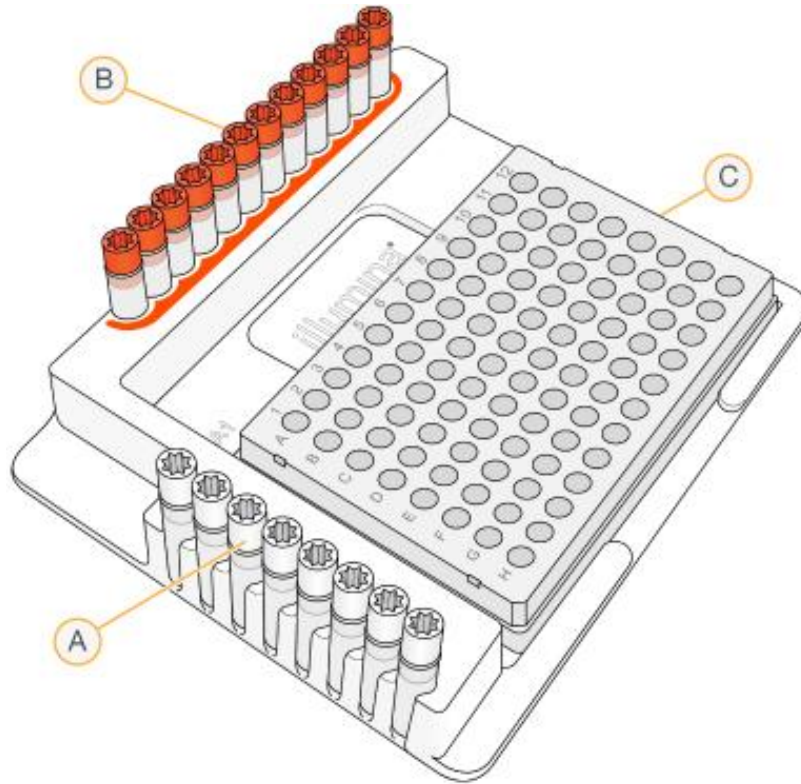
La reacción de PCR se preparó en un volumen final de 50  $\mu$ L conteniendo:

- 12.5  $\mu$ L de ADN purificado
- 2.5  $\mu$ L de Cebador Índice 1 (N7xx)
- 2.5  $\mu$ L de Cebador Índice 2 (S5xx)
- 7.5  $\mu$ L de Nextera PCR Mix (NPM)

La amplificación se realizó utilizando el siguiente programa:

PROGRAMA: Nextera XT Index		
	72°C	3 minutos
12	95°C	30 segundos
	95°C	10 segundos
	55°C	30 segundos
	72°C	30 segundos
	72°C	5 minutos
	4°C	HOLD

**Tabla 4** Programa de Amplificación utilizado para la indexación utilizando el kit Nextera XT Index.



**Figura 19:** TruSeq Index Plate Fixture.

A) Cebadores índex 2 (tapas blancos - S5xx), B) Cebadores índex 1 (tapas naranjas - N7xx) y C) Placa de 96 pocillos.

Los cebadores índex fueron anexados a cada muestra para generar códigos de identificación únicos para cada una de las muestras como se muestra en las siguientes tablas 5 y 6:

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
<b>1</b>	N707 S502	N710 S502	N711 S502	N712 S502	N714 S502	N715 S502
<b>2</b>	N707 S503	N710 S503	N711 S503	N712 S503	N714 S503	N715 S503
<b>3</b>	N707 S505	N710 S505	N711 S505	N712 S505	N714 S505	N715 S505
<b>4</b>	N707 S506	N710 S506	N711 S506	N712 S506	N714 S506	N715 S506

5	N707 S507	N710 S507	N711 S507	N712 S507	N714 S507	N715 S507
6	N707 S508	N710 S508	N711 S508	N712 S508	N714 S508	N715 S508
7	N707 S510	N710 S510	N711 S510	N712 S510	N714 S510	N715 S510
8	N707 S511	N710 S511	N711 S511	N712 S511	N714 S511	N715 S511

**Tabla 5** Esquema de indexación de muestras.

<b>Muestra</b>	<b>Cebador índice 1</b>	<b>Cebador índice 2</b>
PI06	N707	S502
PI07	N707	S503
PI09	N707	S505
PI11	N707	S506
PI13	N707	S507
PI15	N707	S508
PI17	N707	S510
PI18	N707	S511
PI19	N710	S502
PI25	N710	S503
PI27	N710	S505
PI28	N710	S506
PI29	N710	S507
PI30	N710	S508
PI43	N710	S510
PI44	N710	S511
PI46	N711	S502
Bn05	N711	S503
Bn07	N711	S505
Bn08	N711	S506
Bn10	N711	S507
Bn11	N711	S508
Bn12	N711	S510
Bn13	N711	S511
Bn14	N712	S502
PLVA1	N712	S503
PLVJ2	N712	S505

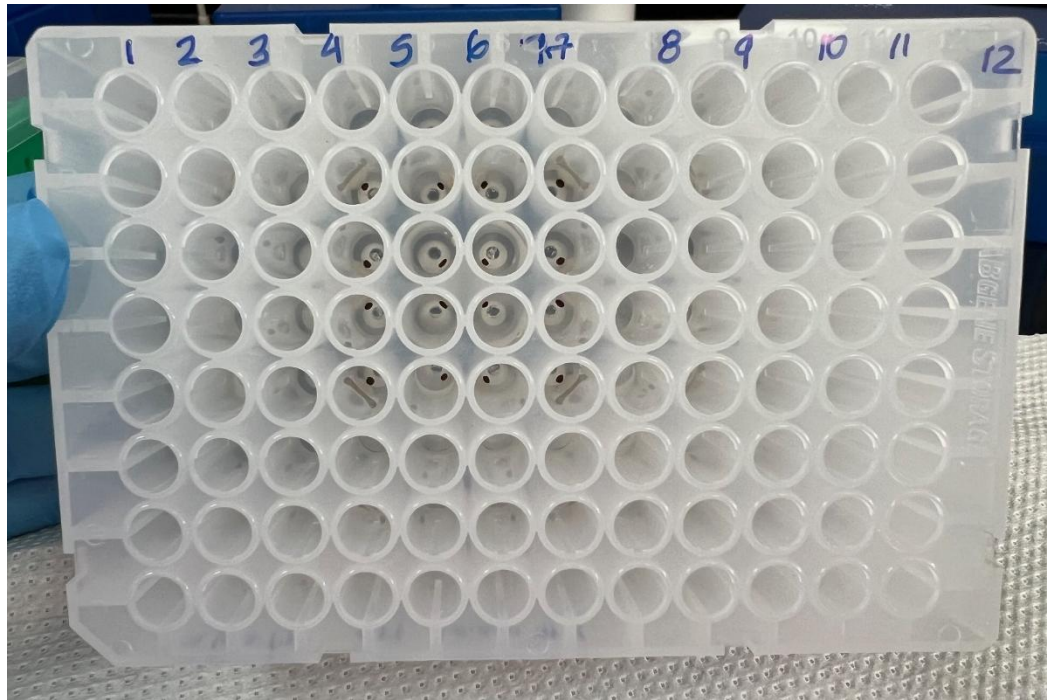
PLVA3	N712	S506
PLVJ4	N712	S507
Cs14	N712	S508
Cs16	N712	S510
Cs18	N712	S511
Cs20	N714	S502
Cs21	N714	S503
Cs22	N714	S505
Cs23	N714	S506
Cs24	N714	S507
Cs26	N714	S508
Cs27	N714	S510
Cs28	N714	S511
Cs29	N715	S502
Cs30	N715	S503
CSVA	N715	S505
CSVJ	N715	S506
Ba05	N715	S507
Ba06	N715	S508
Ba07	N715	S510
Ba08	N715	S511

**Tabla 6** Esquema de indexación del cebador 1 y cebador 2 para cada muestra.

### 6.6.3 Cuantificación, Normalización y Agrupación de Bibliotecas

#### 6.6.3.1 Normalización y Purificación

Para la normalización y purificación de los productos de PCR utilizamos el kit Just-a-Plate™ 96 PCR Normalization and Purification, basado en la tecnología de unión reversible a superficie sólida (SSRB). Este sistema emplea placas de 96 pocillos cuya superficie está recubierta con turbo-binders que actúan como captadores selectivos de ácidos nucleicos (Figura 20).



**Figura 20:** Kit Just-a-Plate™ 96 PCR Normalization and Purification con los productos de la PCR de Indexación durante el proceso de lavado y normalización.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

Los productos de PCR se unieron específicamente a los turbo-binders en el buffer de extracción, mientras que los primers, nucleótidos y otros contaminantes permanecieron en solución. Después de lavar la placa con buffer de lavado para eliminar el material no unido, se realizó la elusión los productos de PCR purificados con tampón Tris 10 mM. Este proceso permitió obtener productos normalizados con una cantidad aproximada de 25ng por pocillo, eliminando la necesidad de pasos manuales de normalización como la determinación de concentración de ADN y dilución de muestras.

El sistema proporcionó un rendimiento consistente entre pocillos y una alta calidad de ADN sin contaminación, generando productos listos para su uso en las reacciones de secuenciación subsiguientes que requerían normalización de amplicones.

Para la cuantificación de las bibliotecas de ADN se utilizó el fluorómetro Qubit de Life Technologies. Este método fluorométrico emplea colorantes selectivos que se unen específicamente al ADN de doble cadena, lo que permite una cuantificación precisa incluso en presencia de contaminantes comunes.

Las muestras fueron preparadas siguiendo el protocolo del fabricante, utilizando 2  $\mu\text{L}$  de cada biblioteca y 198  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) en tubos estériles específicos para Qubit. La solución de trabajo se preparó diluyendo el reactivo Qubit dsDNA HS en el tampón de dilución en una proporción 1:200.

Después de la preparación, los tubos se agitaron en vórtex durante 2-3 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos. La concentración de ADN se midió en el fluorómetro Qubit, previamente calibrado con los estándares proporcionados en el kit (Figura 21). Los resultados se obtuvieron en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y posteriormente se utilizaron para los cálculos de dilución necesarios para la preparación de la biblioteca de secuenciación.



**Figura 21:** Cuantificación de la concentración de ADN de doble cadena en el fluorómetro Qubit de invitrogen.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

### 6.6.3.2 Agrupación de Bibliotecas y Limpieza para Secuenciación

Se unificaron las 48 muestras ya normalizadas en un único pool en un tubo Eppendorf de 1.5mL. Se tomaron 5  $\mu$ L de ADN de cada biblioteca y se mezclaron para agrupar las bibliotecas con sus índices únicos (Figura 22).



**Figura 22:** Pool de bibliotecas de ADN.

El contenido del tubo representa la mezcla de 5  $\mu$ L de ADN proveniente de cada una de las 48 bibliotecas individuales, cada una con su índice único. Este pool combina todas las bibliotecas en una sola muestra, preparada para los siguientes pasos del proceso de secuenciación.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

Se realizó un paso de limpieza final para purificar el pool de amplicones y eliminar componentes no deseados de la reacción. Este proceso fue crucial para eliminar cebadores no incorporados, dNTPs sobrantes, enzimas y otros componentes del tampón que podrían interferir en los pasos posteriores de secuenciación.

Al pool, se agregaron perlas AMPure XP en una proporción 1.12X (56  $\mu$ L de perlas por cada 50  $\mu$ L de muestra), mezclando suavemente mediante pipeteo. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos sin agitación. El tubo se colocó en un soporte magnético durante 2 minutos hasta que el sobrenadante se aclaró. Se removió y descartó el sobrenadante manteniendo el tubo en el soporte magnético. Se realizaron dos lavados con 200  $\mu$ L de etanol al 80% recién preparado, incubando durante 30 segundos antes de remover el sobrenadante.

Después del segundo lavado, se eliminó cuidadosamente el exceso de etanol con puntas finas. Las perlas se secaron al aire durante 10 minutos en el soporte magnético. Posteriormente, se re suspendieron en 50 $\mu$ L tampón de Re suspensión RSB mediante pipeteo suave, se volvió a colocar el tubo en el soporte magnético y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio para la cuantificación y dilución final.

Se diluyó la biblioteca final concentrada utilizando tampón de Re suspensión (RSB) hasta alcanzar una concentración de 4 nM.

#### **6.6.4 Desnaturalización de las bibliotecas**

La desnaturalización del ADN se realizó mezclando 5  $\mu$ L de la librería agrupada a 4 nM con 5  $\mu$ L de NaOH 0,2 N recién diluido en un tubo de microcentrífuga. Esta mezcla se agitó brevemente en vórtex, se centrifugó a 280  $\times$  g a 20°C durante 1

minuto y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos para separar las hebras de ADN. Posteriormente, se añadieron 990  $\mu\text{L}$  de HT1 pre-enfriado, resultando en una librería desnaturalizada de 20 pM en NaOH 1 mM, que se mantuvo en hielo hasta su dilución final.

#### **6.6.5 Secuenciación Masiva**

Para la secuenciación se utilizó la plataforma **MiSeq de *Illumina***, en donde se procedió a la carga de la biblioteca siguiendo un protocolo riguroso. La biblioteca desnaturalizada se diluyó adicionalmente a la concentración de carga deseada, típicamente entre 2 pM y 10 pM, utilizando HT1 pre-enfriado. Paralelamente, se preparó el control PhiX, que se desnaturalizó y diluyó de manera similar a la biblioteca principal. La biblioteca de amplicones y el control PhiX desnaturalizados se combinaron, con un mínimo recomendado de 5% de PhiX para bibliotecas de baja diversidad. PhiX es una biblioteca de control derivada del genoma del bacteriófago  $\Phi\text{X174}$ , utilizada en secuenciación *Illumina*. Sirve como control de calidad para la generación de clusters, secuenciación y alineación, y como control de calibración para la generación de matrices de interferencia (Galanti et al., 2021).

Esta mezcla se incubó a  $96^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos, seguido de una incubación inmediata en un baño de hielo-agua durante 5 minutos. Este paso de desnaturalización por calor se realizó justo antes de cargar la biblioteca en el

cartucho de reactivos MiSeq v3 para garantizar una carga eficiente de la plantilla en la celda de flujo del MiSeq.

Es importante destacar que la corrida alcanzó un puntaje de calidad mínima Q30. El puntaje Q30 indica que la probabilidad de que una base sea llamada incorrectamente es de 1 en 1,000, lo que corresponde a una precisión de lectura del 99.9%. Este alto puntaje de calidad es crucial para garantizar la fiabilidad de los datos de secuenciación generados, permitiendo análisis posteriores más precisos y confiables.

#### **6.6.6 Análisis Bioinformáticos**

El análisis bioinformático de los datos de secuenciación del gen 16S rRNA se realizó utilizando el pipeline DADA2 en R. El pipeline es un flujo de trabajo automatizado que consiste en una serie de pasos secuenciales para procesar y analizar datos biológicos, especialmente datos genómicos o de secuenciación. El proceso comenzó con la inspección de la calidad de las lecturas mediante la función `plotQualityProfile`.

Posteriormente, se procedió a la remoción de los cebadores y el filtrado de calidad utilizando Cutadapt una herramienta para eliminar secuencias adaptadoras de los datos de secuenciación de ADN. Cutadapt permite la eliminación de múltiples adaptadores tanto de los extremos 3' como 5'. Se eliminaron los primers forward (CCTACGGGNGGCWGCAG) y reverse

(GACTACHVGGGTATCTAATCC), estableciendo una longitud mínima de 1 pb después del recorte. Un filtrado adicional se realizó con la función `filterAndTrim` de DADA2, truncando las lecturas a 230 pb (forward) y 220 pb (reverse), estableciendo `maxN=0` (sin bases ambiguas permitidas), `maxEE=2` (máximo de 2 errores esperados), `truncQ=2` (truncamiento en  $Q < 2$ ) y eliminando las secuencias de PhiX.

La inferencia de variantes de secuencia de amplicones (ASVs) se llevó a cabo mediante una serie de pasos. Primero, se aprendió el modelo de error para las lecturas forward y reverse utilizando la función `learnErrors`. Luego, se procedió a la dereplicación de secuencias con `derepFastq`. La inferencia de ASVs se realizó con el algoritmo DADA2 (función `dada`) de forma independiente para las lecturas R1 y R2. Las lecturas paired-end se fusionaron utilizando `mergePairs` y se construyó la tabla de ASVs con `makeSequenceTable`. Finalmente, se removieron las quimeras utilizando `removeBimeraDenovo` con el método "consensus".

Los resultados clave del análisis incluyeron la obtención inicial de 51,141 ASVs, de los cuales 2,237 (4.4% del total) permanecieron después de la remoción de quimeras. Es importante destacar que el 86.8% de las lecturas se retuvieron después de este proceso. Se realizó un seguimiento detallado del número de lecturas en cada paso del análisis, lo que permitió evaluar la pérdida de datos en cada etapa del procesamiento. Por ejemplo, para la muestra Ba05\_R1.fastq.gz, se partió de 165,184 lecturas iniciales, se filtraron a 145,836, se denoised a

145,586 (forward) y 145,574 (reverse), se fusionaron 144,804 y finalmente quedaron 110,817 después de la remoción de quimeras.

### **6.6.7 Análisis Estadísticos**

Para el análisis estadístico de la diversidad alfa, se empleó un enfoque integral utilizando la función "richness" para calcular diversos índices de diversidad en los datos de la comunidad microbiana. Estos índices incluyeron Observed, Chao1, ACE, Richness, Fisher, Simpson, Shannon, Evenness e InvSimpson, proporcionando una visión completa de la diversidad dentro de cada muestra o ecosistema. Para comparar la diversidad entre grupos, se utilizó la función "plotalpha", que realiza pruebas de Wilcoxon. El umbral de significancia se estableció en  $p < 0.05$ . Los resultados se visualizaron mediante gráficos generados con ggplot2. Esta metodología permitió una evaluación robusta de las diferencias en la diversidad alfa entre los grupos de muestras, proporcionando una base sólida para la interpretación de los patrones de diversidad microbiana en el contexto de la investigación.

### **6.6.8 Aval Bioético**

El presente proyecto de tesis fue sometido a evaluación y revisión por el Comité de Ética de la Investigación y el Bienestar de los Animales de la Universidad de Panamá (CEIBA). Tras un minucioso análisis, el comité otorgó su aprobación,

concediendo el aval bioético necesario para la ejecución del proyecto (CEIBA-UP-032-2024).

## 7. CAPÍTULO III: Resultados

### 7.1 Identificación de bacterias mediante técnicas Dependientes de Cultivo

El análisis microbiológico de las muestras orales y de veneno de las serpientes estudiadas reveló una diversidad de bacterias cultivables, aunque es importante destacar que no se obtuvo crecimiento bacteriano en todas las muestras recolectadas.

En las muestras que sí presentaron crecimiento, se logró aislar e identificar un total de **41** cepas bacterianas pertenecientes a **12** géneros diferentes (Tabla 7). Sin embargo, es crucial señalar que no fue posible realizar la identificación bioquímica de todas las colonias observadas y estas aparecen como "No identificado". Algunas colonias, a pesar de ser visibles en los medios de cultivo, no mostraron características metabólicas adecuadas para su identificación mediante los sistemas bioquímicos automatizados como el VITEK.

Código del Individuo	Tipo de Espécimen	Ubicación	Resultado
2023-Ba05	<i>Bothrops asper</i>	Santiago	<i>Morganella morganii</i>
2023-Ba05	<i>Bothrops asper</i>	Santiago	<i>Proteus vulgaris</i>
2023-Ba08	<i>Bothrops asper</i>	Santiago	<i>Enterobacter cloacae</i>
2023-Ba06	<i>Bothrops asper</i>	Santiago	<i>Burkholderia mallei</i>
2023-Ba07	<i>Bothrops asper</i>	Santiago	<i>Morganella morganii</i>
2023-Bn05	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	Panamá	<i>Morganella morganii</i>
2023-Bn10	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	Panamá	<i>Serratia fonticola</i>
2023-Bn11	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	Panamá	No identificado
2023-Bn12	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	Panamá	<i>Serratia fonticola</i>
2023-Bn08	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	Panamá	<i>Morganella morganii</i>
2023-Bn14	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	Panamá	<i>Providencia rettgeri</i>

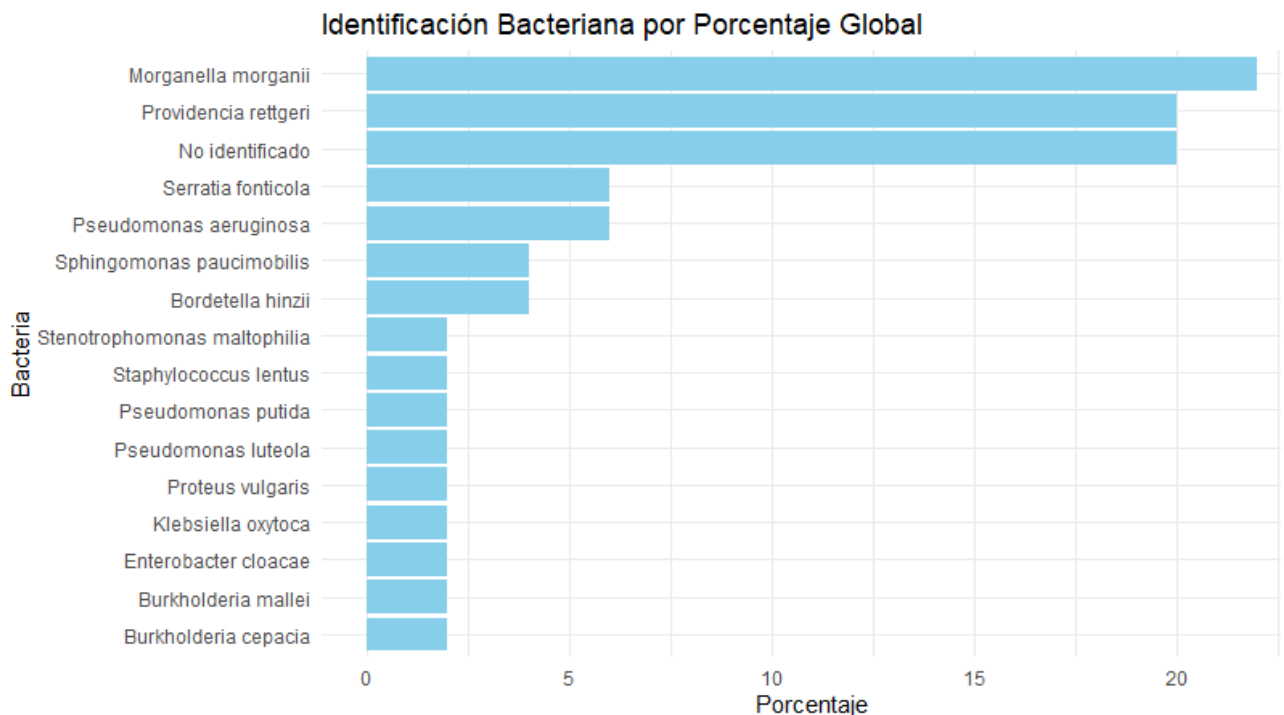
2023-Bn13	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	Panamá	<i>Providencia rettgeri</i>
2023-Bn07	<i>Bothriechis nigroviridis</i>	Panamá	<i>Morganella morganii</i>
2023-Cr14	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	<i>Morganella morganii</i>
2023-Cr16	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
2023-Cr18	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	No identificado
2023-Cr20	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	No identificado
2023-Cr21	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	<i>Morganella morganii</i>
2023-Cr22	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	<i>Pseudomonas luteola</i>
2023-Cr23	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	<i>Burkholderia cepacia</i>
2023-Cr24	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
2023-Cr26	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	<i>Providencia rettgeri</i>
2023-Cr28	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	<i>Providencia rettgeri</i>
2023-Cr29	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	<i>Providencia rettgeri</i>
2023-Cr30	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	No identificado
2023-CSVA	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	<i>Morganella morganii</i>
2023-CSVJ	<i>Cerrophidion sasai</i>	Panamá	No identificado
2023-PI11	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Providencia rettgeri</i>
2023-PI13	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Morganella morganii</i>
2023-PI25	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2023-PI17	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Bordetella hinzii</i>
	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Pseudomonas putida</i>
2023-PI18	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2023-PI28	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	No identificado
2023-PI19	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Bordetella hinzii</i>
	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2023-PI27	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Morganella morganii</i>
2023-PI06	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Providencia rettgeri</i>
2023-PI07	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Providencia rettgeri</i>
2023-PI09	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Serratia fonticola</i>
2023-PI43	<i>Porthidium lansbergii</i>	Panamá	<i>Providencia rettgeri</i>
2023-PI44	<i>Porthidium lansbergii</i>	Panamá	<i>Staphylococcus lentus</i>
2023-PI46	<i>Porthidium lansbergii</i>	Panamá	<i>Providencia rettgeri</i>
2023-PI30	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
2023-PI29	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	<i>Morganella morganii</i>
2023-PLVA1	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	No identificado
2023-PLVJ2	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	No identificado
2023-PLVA3	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	No identificado
2023-PLVJ4	<i>Porthidium lansbergii</i>	Santiago	No identificado

**Tabla 7** Resultados obtenidos del aislamiento y la identificación de bacterias mediante el sistema bioquímico automatizado VITEK.

Las especies bacterianas más frecuentemente aisladas e identificadas fueron:

- *Morganella morganii* (Identificada en 11 aislamientos).
- *Providencia rettgeri* (Identificada en 10 aislamientos).
- *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia fonticola* (Identificadas en 3 aislamientos cada una).

Otras especies identificadas incluyeron *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Burkholderia mallei*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas luteola*, *Burkholderia cepacia*, *Bordetella hinzii*, *Klebsiella oxytoca* y *Pseudomonas putida* (Gráfica 2).



**Gráfica 2** Porcentaje de identificación bacteriana a través de métodos dependientes de cultivos, mediante sistema automatizado de identificación

bacteriana (VITEK 2 COMPACT de bioMérieux). Porcentajes basados en una N de 41 aislamientos realizados. Especies bacterianas aisladas mediante cultivo e identificadas por método bioquímico automatizado.

Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad *oral* y el veneno de serpientes de la familia *Viperidae* en cautiverio.

Los resultados del estudio muestran un claro predominio de bacterias Gram negativas en la cavidad oral de las serpientes analizadas.

### **7.1.1 Especies bacterianas aisladas por tipo de serpiente**

La comparación de los resultados entre las diferentes especies de serpientes revela patrones interesantes en la microbiota oral y del veneno:

#### ***Bothrops asper:***

Especies bacterianas identificadas: *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Burkholderia mallei*.

Predominancia: *Morganella morganii* (2 de 5 muestras).

Diversidad: 4 especies diferentes identificadas en 5 muestras.

Ubicación: Todas las muestras provenientes de Santiago.

#### ***Bothriechis nigroviridis:***

Especies bacterianas identificadas: *Morganella morganii*, *Serratia fonticola*, *Providencia rettgeri*.

Predominancia: *Morganella morganii* (3 de 8 muestras).

Diversidad: 3 especies diferentes identificadas en 8 muestras.

Ubicación: Todas las muestras provenientes de Ciudad de Panamá.

***Cerrohidion sasai:***

Especies bacterianas identificadas: *Morganella morganii*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas luteola*, *Burkholderia cepacia*, *Providencia rettgeri*.

Predominancia: *Morganella morganii* y *Providencia rettgeri* (3 muestras cada una).

Diversidad: 5 especies diferentes identificadas.

Ubicación: Todas las muestras provenientes de Ciudad de Panamá.

***Porthidium lansbergii:***

Especies bacterianas identificadas: *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella hinzii*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas putida*, *Serratia fonticola*, *Staphylococcus lentus*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

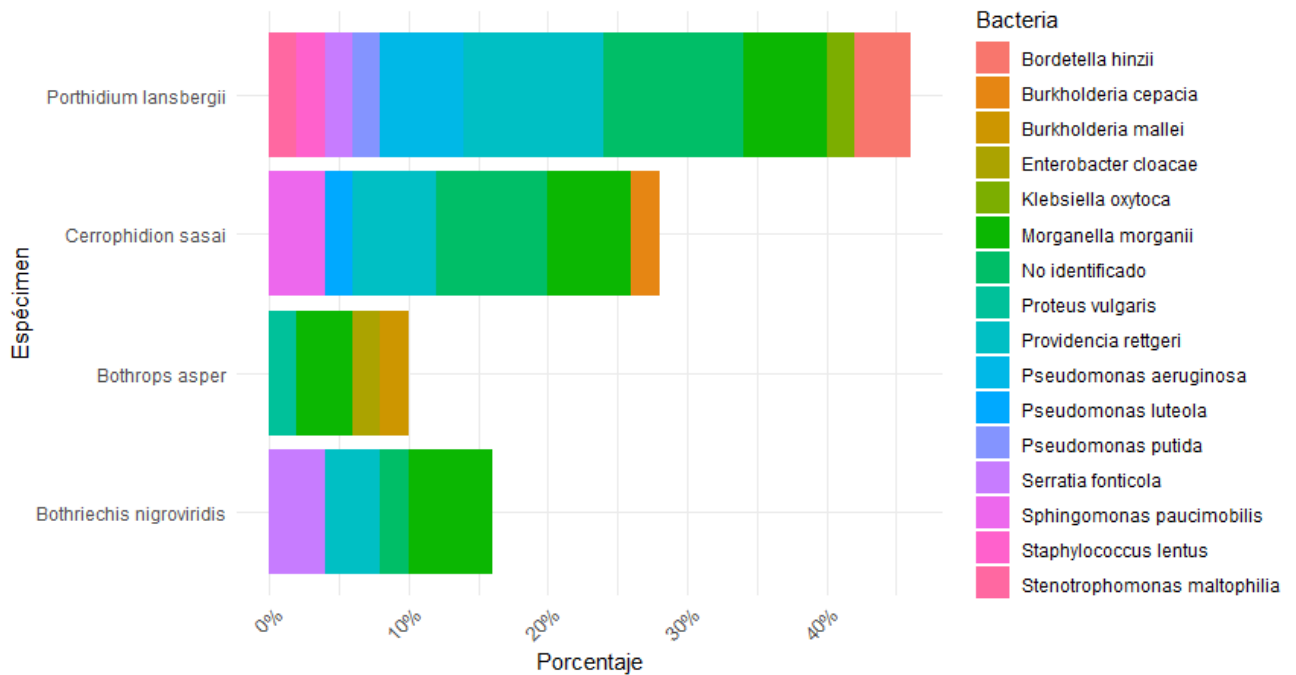
Predominancia: *Providencia rettgeri* (5 muestras).

Diversidad: Muy alta, con 9 especies diferentes identificadas.

Ubicación: Mayoría de muestras provenientes de Santiago, algunas de Ciudad de Panamá.

### 7.1.1.1 Comparación entre especies

- *P. lansbergii* muestra la mayor diversidad de las especies estudiadas. (Gráfica 3), mientras que *C. sasai* muestra una diversidad intermedia.
- *B. nigroviridis* y *B. asper* exhiben una menor diversidad.



**Gráfica 3** Diversidad de Especies Bacterianas por espécimen mediante métodos dependientes de cultivo.

Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.

#### Especies bacterianas comunes:

- *Morganella morganii* se encuentra en todas las especies de serpientes.
- *Providencia rettgeri* es común en *B. nigroviridis*, *C. sasai* y *P. lansbergii*.

### **Especies únicas:**

- *B. asper*: *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*.
- *C. sasai*: *Pseudomonas luteola*.
- *P. lansbergii*: *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus lentus*,  
*Stenotrophomonas maltophilia*.

#### **7.1.1.2 Tasa de identificación de cepas bacterianas**

Con respecto a la cantidad de aislados bacterianos identificados por especie de serpiente, se obtuvieron los siguientes porcentajes:

- *B. asper* y *B. nigroviridis*: 100% de muestras identificadas.
- *C. sasai*: 71% de muestras identificadas.
- *P. lansbergii*: 82% de muestras identificadas

## 7.1.2 Perfiles de resistencia a antibióticos

El análisis de sensibilidad antimicrobiana reveló patrones de resistencia variables entre las diferentes especies bacterianas (Tabla 8):

Código del Individuo	Resultado	Ampicilina/ Subbactam	Cefalotina	Cefazolina	Ceftazidima	Ceftriaxona	Cefepima	Ertapenem	Meropenem	Amicacina	Gentamicina	Ciprofloxacino	Norfloxacino	Fosfomicina	Nitrofurantoina	Trimetoprima/ Sulfametoxazol
2023-Ba05	<i>Proteus vulgaris</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-Ba05	<i>Morganella morganii</i>	I	R	R	S	S		S	S	S	S	S	S	R	R	S
2023-Ba06	<i>Burkholderia mallei</i>															
2023-Ba07	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	S	R		R	S	S	S	S	S	R	R	R
2023-Ba08	<i>Enterobacter cloacae</i>		R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	I	S
2023-Bn05	<i>Morganella morganii</i>	S	R	R	S	S		S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-Bn08	<i>Morganella morganii</i>	S	R	R	S	S		S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-Bn10	<i>Serratia fonticola</i>		S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S
2023-Bn12	<i>Serratia fonticola</i>		S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S
2023-Bn13	<i>Providencia rettgeri</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-Bn14	<i>Providencia rettgeri</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-Cr14	<i>Morganella morganii</i>	S	R	R	S	S		S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-Cr16	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>			R	R	R	S		I	R	R	S	S			S
2023-Cr21	<i>Morganella morganii</i>	I	R	R	S	S		S	S	S	S	S	S	S	R	
2023-Cr22	<i>Pseudomonas luteola</i>			R	S	R	S		S	S	S	S	S			S
2023-Cr23	<i>Burkholderia cepacia</i>															
2023-Cr24	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>			S	S	S	S		S	S	S	S	S			S
2023-Cr26	<i>Providencia rettgeri</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-Cr28	<i>Providencia rettgeri</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-Cr29	<i>Providencia rettgeri</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-PI06	<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-PI07	<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-PI11	<i>Providencia rettgeri</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-PI13	<i>Morganella morganii</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-PI17	<i>Bordetella hinzii</i>															
2023-PI17	<i>Klebsiella oxytoca</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2023-PI17	<i>Pseudomonas putida</i>			R	S	S	S		S	S	S	S	S			R
2023-PI18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			R	S		S		R	S	S	S	S			
2023-PI19	<i>Bordetella hinzii</i>															
2023-PI19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			R	S		S		S	S	S	S	S			

2023-PI25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			R	S		S		S	S	S	S	S			
2023-PI27	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	I	I		S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-PI29	<i>Morganella morganii</i>															
2023-PI43	<i>Providencia rettgeri</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
2023-CSVA	<i>Morganella morganii</i>	I	R	R	S	S		S	S	S	S	S	S	S	R	S

**Tabla 8** Análisis de la sensibilidad antimicrobiana entre las diferentes especies bacterianas. R=resistente, S=sensible, I=indeterminado. Resaltadas en celeste los aislados para los cuales no fue posible obtener un perfil de resistencia con las tarjetas utilizadas.

Los resultados obtenidos en el análisis de las cepas bacterianas aisladas de diferentes especies de serpientes revelan una diversidad de microorganismos con patrones de resistencia antimicrobiana variados.

### 7.1.2.1 Bacterias Gram negativas

#### 7.1.2.1.1 *Enterobacteriaceae*

##### ***Morganella morganii*:**

- Alta resistencia a cefalotina y cefazolina (100% de las cepas)
- Resistencia variable a ampicilina/sulbactam (37.5% resistentes, 25% intermedias)
- Sensibilidad a la mayoría de los otros antibióticos probados, incluyendo ceftazidima, ceftriaxona, ertapenem, meropenem, ampicacina y gentamicina.

Algunas cepas mostraron resistencia a múltiples antibióticos, sugiriendo la presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL) o carbapenemasas de bajo nivel.

***Providencia rettgeri:***

- Resistencia universal a cefalotina, cefazolina y nitrofurantoína
- Alta sensibilidad a ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, ertapenem, meropenem, ampicacina, gentamicina, ciprofloxacino y norfloxacino

***Serratia fonticola:***

- Resistencia a cefazolina, ceftazidima y ceftriaxona
- Sensibilidad a cefepima, meropenem, ampicacina, gentamicina, ciprofloxacino y norfloxacino

**7.1.2.1.2 *Pseudomonadaceae***

***Pseudomonas aeruginosa:***

- Resistencia intrínseca a cefazolina en todas las cepas
- Sensibilidad variable a meropenem (66.7% de las cepas sensibles)
- Alta sensibilidad a ceftazidima, cefepima, ampicacina, gentamicina, ciprofloxacino y norfloxacino

### 7.1.2.1.3 Otras bacterias de interés

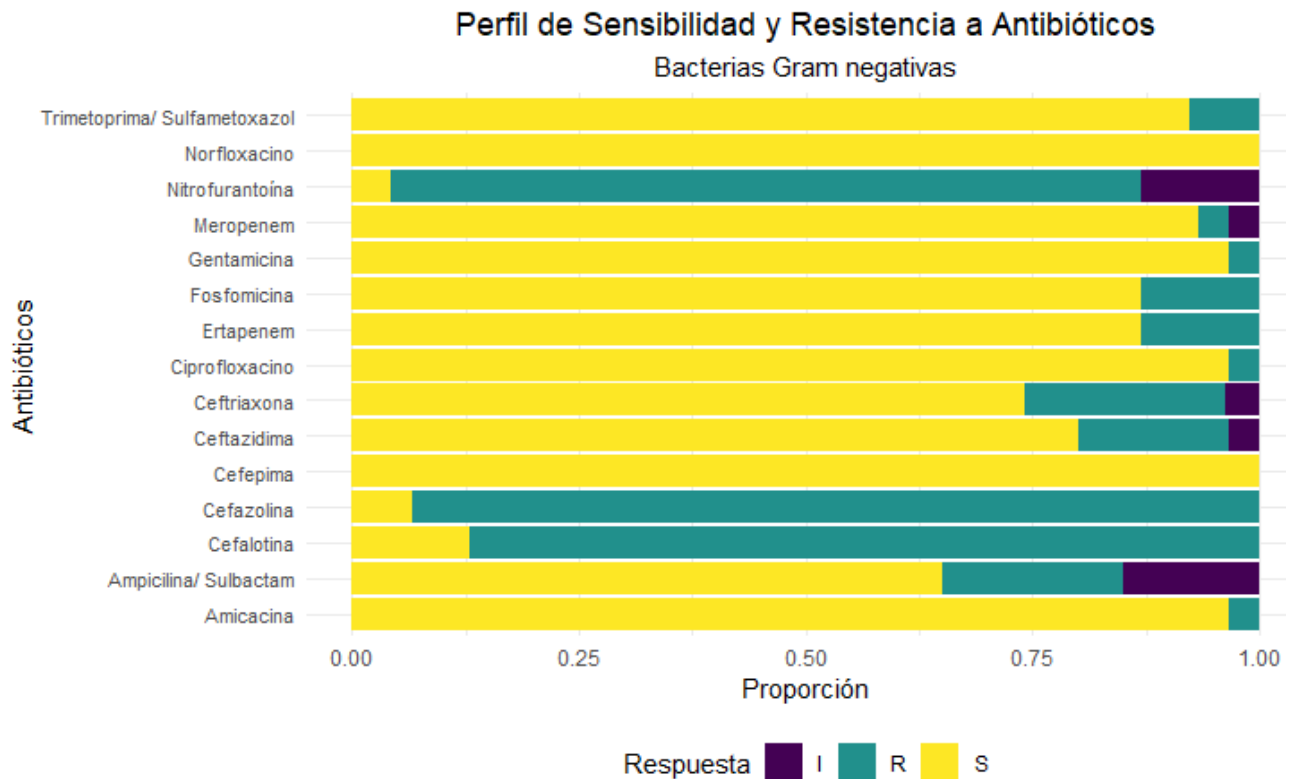
#### ***Enterobacter cloacae*:**

- Se detectó una cepa con un perfil de resistencia sugestivo de producción de ESBL.
- Resistencia a cefalosporinas de tercera generación, pero sensibilidad a cefepima.

***Burkholderia cepacia*** y ***Burkholderia mallei*** fueron aisladas en algunas muestras, aunque no se proporcionaron datos de susceptibilidad antimicrobiana para estas especies.

#### 7.1.2.1.4 Patrones de resistencia

Se observaron patrones de multirresistencia a antibióticos en algunas cepas aisladas (Gráfica 4):



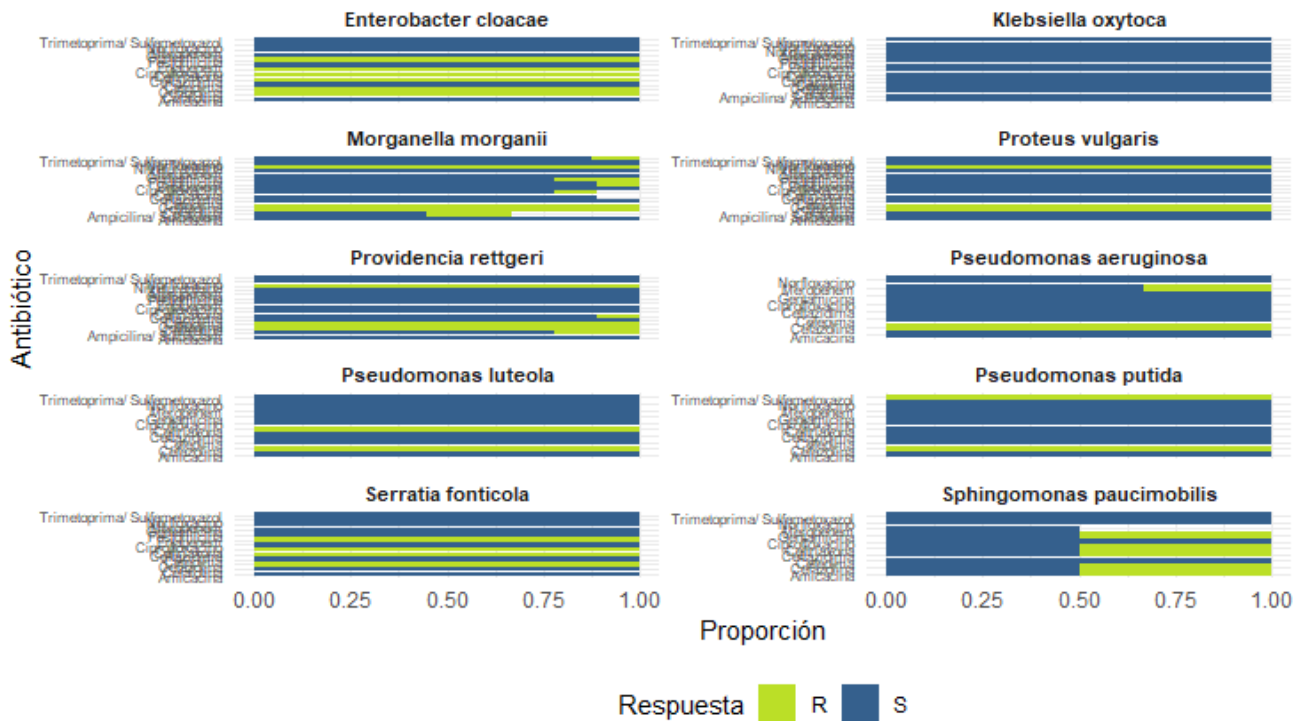
**Gráfica 4** Perfil de Sensibilidad y Resistencia a Antibióticos de Bacterias Gram Negativas Aisladas.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

- Una cepa de ***Sphingomonas paucimobilis*** mostró resistencia a múltiples antibióticos, incluyendo cefazolina, ceftazidima y ceftriaxona, con sensibilidad intermedia a meropenem, lo que podría sugerir la presencia de ESBL o carbapenemasas nativa (Gráfica 5).

- Una cepa de ***Morganella morganii*** presentó un perfil de resistencia compatible con la producción de ESBL y carbapenemasas de bajo nivel, mostrando resistencia a 7 de los 15 antibióticos probados, incluyendo ceftriaxona y ertapenem (Gráfica 5).
- Se detectó una cepa de ***Enterobacter cloacae*** productora de ESBL, con resistencia a 5 antibióticos: cefalotina, cefazolina, ceftazidima, ceftriaxona y ciprofloxacino (Gráfica 5).
- Una cepa de ***Serratia marcescens*** mostró un patrón de resistencia inusual, siendo resistente a ceftriaxona, pero sensible a ceftazidima y cefepima, lo que requiere una revisión adicional (Gráfica 5).

### Perfil de sensibilidad y resistencia a antibióticos por bacteria



**Gráfica 5** Perfiles de sensibilidad y resistencia a antibióticos de especies bacterianas aisladas de cavidades orales de serpientes, mostrando patrones de susceptibilidad variables.

Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.

#### 7.1.2.2 Bacterias Gram positivas

Los resultados revelaron la identificación de *Staphylococcus lentus* en una muestra (2023-PI44). No se determinó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana para esta cepa, por lo que no se dispone de datos adicionales sobre su respuesta a agentes antimicrobianos.

## **7.2 Identificación de bacterias mediante técnicas independientes de Cultivo**

La identificación de bacterias mediante técnicas independientes de cultivo se realizó a través de la extracción y análisis del ADN genómico de las muestras recolectadas, utilizando metodologías basadas en la secuenciación de nueva generación (NGS). El ADN fue extraído empleando un protocolo estandarizado que garantizó la lisis uniforme de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, así como la eliminación de inhibidores de PCR. Posteriormente, se amplificaron las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S rRNA, seleccionadas por su capacidad para discriminar taxonómicamente entre géneros bacterianos.

Las bibliotecas generadas fueron secuenciadas en un sistema Illumina MiSeq, obteniendo datos que fueron procesados mediante herramientas bioinformáticas para identificar y clasificar las bacterias presentes en las muestras. Este enfoque permitió una caracterización precisa de la microbiota, incluyendo microorganismos no cultivables, proporcionando una visión integral de la diversidad bacteriana asociada a las serpientes estudiadas.

### **7.2.1 Procesamiento de secuencias y control de calidad**

Se procesaron un total de 7,174,851 lecturas crudas provenientes de 48 muestras. Tras el filtrado por calidad y longitud, se retuvieron 6,169,075 lecturas (86.0% de las lecturas iniciales). El proceso de denoising identificó 7,169,410 secuencias de alta calidad, que luego se fusionaron en 6,739,414 secuencias

pareadas (94.0% de las lecturas filtradas). La detección y eliminación de quimeras resultó en 5,844,780 secuencias no quiméricas, representando el 86.7% de las secuencias fusionadas (Tabla 9).

<b>Muestra</b>	<b>Lecturas iniciales</b>	<b>Filtradas</b>	<b>Denosed F</b>	<b>Denosed R</b>	<b>Fusionadas</b>	<b>No quiméricas</b>
Ba05	165184	145836	145586	145574	144804	110817
Ba06	221252	182526	181761	181900	177956	145051
Ba07	287350	241650	241299	241271	240090	164541
Ba08	170311	141438	141129	141122	140465	96871
Bn05	214944	182941	181973	182046	176339	150317
Bn07	197450	168007	167214	167333	162548	144756
Bn08	189701	149503	147595	147949	138621	115690
Bn10	148622	129192	128528	128649	125652	110354
Bn11	205231	165440	163922	164363	156972	121911
Bn12	247741	214310	213359	213514	206701	169743
Bn13	198911	162966	161118	161249	148479	100240
Bn14	182473	152836	151640	151706	143719	109140
Cs14	1182	300	241	244	185	166
Cs16	881	303	271	247	206	192
Cs18	640	118	90	85	67	66
Cs20	204133	162021	161075	161061	157114	144475
Cs21	209875	171423	170551	170703	167225	153908
Cs22	223082	174353	173253	173350	168175	152309
Cs23	175736	145158	144533	144676	142079	122562
Cs24	76329	62061	61691	61808	60684	57651
Cs26	197879	156754	155749	156058	151543	136871
Cs27	265699	219791	219380	219314	217271	208258
Cs28	198329	142949	142357	142364	139956	130758
Cs29	221207	173685	172663	172673	166776	148188
Cs30	258594	196842	195472	195760	187852	155231
CSVA	243752	200497	199521	199913	195096	178398
CSVJ	179991	141149	140181	140459	136397	126633
PI06	182653	153880	153385	153337	151744	138220
PI07	147180	119671	119298	119330	118026	112642
PI09	66568	54164	53942	53967	53311	52502
PI11	127327	108794	108488	108482	107493	106056
PI13	750	297	243	244	221	198
PI15	229980	196479	195777	195895	191701	154610
PI17	220055	186834	185975	186102	182295	168680

PI18	253891	206240	205407	205415	199890	179011
PI19	186121	155528	154838	154989	151423	137299
PI25	237250	203161	202421	202567	199297	173601
PI27	199489	167824	167263	167378	164404	148756
PI28	209148	169060	168683	168747	167565	163103
PI29	160536	131054	130418	130526	127774	117445
PI30	304783	219751	218748	218624	212398	194189
PI43	233495	200059	199276	199337	194081	164090
PI44	1298	286	235	228	198	187
PI46	199062	172360	171511	171718	166763	138140
PLVA1	199069	151654	150828	150996	146965	126789
PLVA3	213212	167807	167328	167403	165387	154840
PLVJ2	295313	242311	241538	241605	237463	206460
PLVJ4	308	81	62	66	57	31

**Tabla 9** Filtrado y Procesamiento de Secuencias Obtenidas Mediante la Secuenciación.

Se procesaron un total de 7,174,851 lecturas crudas provenientes de 48 muestras. Tras el filtrado por calidad y longitud, se retuvieron 6,169,075 lecturas (86.0% de las lecturas iniciales). El proceso de denoising identificó 7,169,410 secuencias de alta calidad, que luego se fusionaron en 6,739,414 secuencias pareadas (94.0% de las lecturas filtradas). La detección y eliminación de quimeras resultó en 5,844,780 secuencias no quiméricas, representando el 86.7% de las secuencias fusionadas.

### 7.2.2 Diversidad de ASVs

Se identificaron 2,237 variantes de secuencia de amplicones (ASVs) únicas entre todas las muestras analizadas. La longitud de las secuencias ASV osciló principalmente entre 402-429 pares de bases, consistente con la región V3-V4 del gen 16S rRNA amplificada.

Las ASVs más abundantes y ampliamente distribuidas entre las muestras correspondieron a secuencias con longitudes de 426-427 pares de bases. Específicamente, se detectaron 35,765 secuencias de 426 pb y 2,622 secuencias de 427 pb a lo largo del conjunto de datos.

### **7.2.3 Eficiencia del procesamiento bioinformático**

El seguimiento de lecturas a través del flujo de trabajo demostró una alta eficiencia en el procesamiento, con la mayoría de las muestras reteniendo entre el 60-80% de sus lecturas iniciales después de todos los pasos de filtrado y limpieza. Notablemente, algunas muestras (ej. Cs27, PI28) mantuvieron más del 80% de sus lecturas originales. La alta calidad y cantidad de secuencias retenidas permiten una caracterización robusta de las comunidades bacterianas presentes en estas muestras.

Se identificaron 4 muestras que presentaron un número de lecturas extremadamente bajo en comparación con el promedio, lo que llevó a su exclusión de los análisis estadísticos y bioinformáticos posteriores:

Muestras con bajo número de lecturas:

**Cs14: 300 lecturas después del filtrado**

**Cs16: 303 lecturas después del filtrado**

**Cs18: 118 lecturas después del filtrado**

**PI13: 297 lecturas después del filtrado**

El número medio de lecturas para las demás muestras después del filtrado fue de aproximadamente 120,000. Esto significa que estas 4 muestras tenían menos del 0.2% de las lecturas en comparación con una muestra típica del conjunto de datos. Con tan pocas lecturas, estas muestras no proporcionan una representación adecuada de la diversidad microbiana real en las muestras originales.

## **7.2.4 Composición taxonómica en la Cavidad Oral**

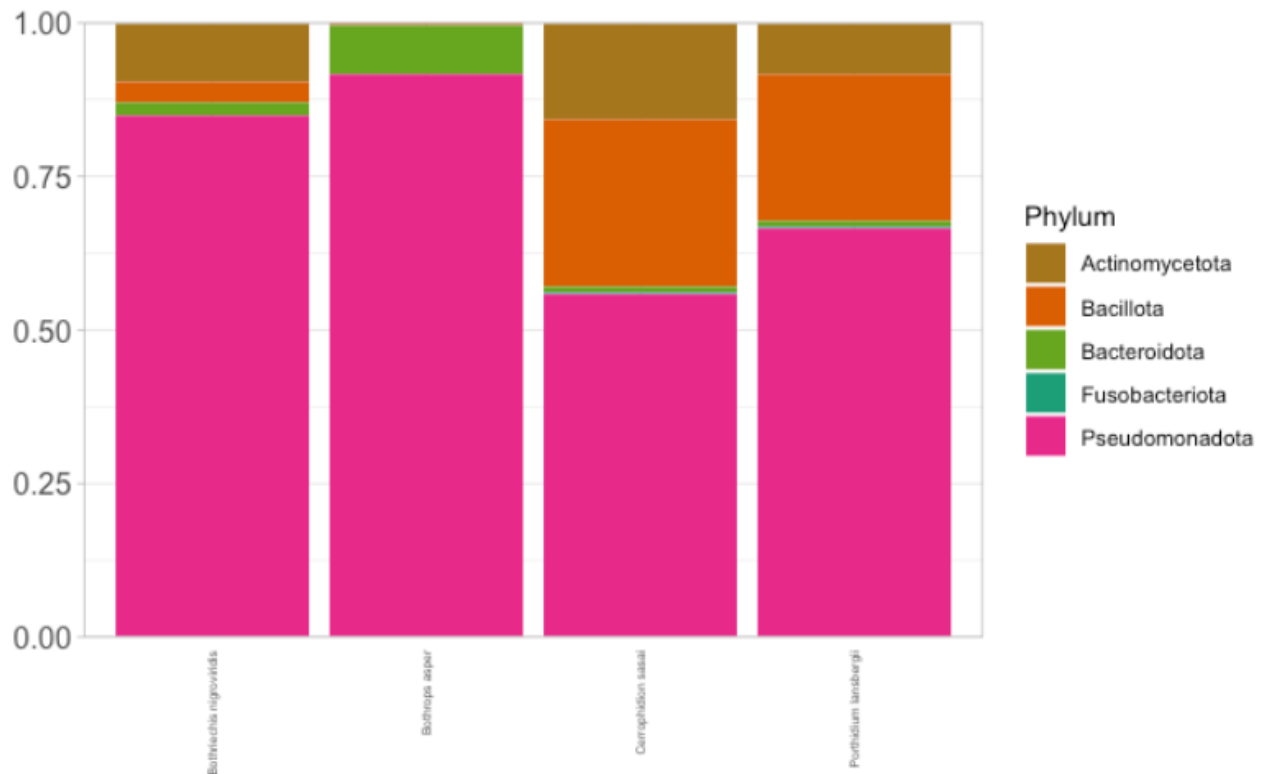
### **7.2.4.1 Composición bacteriana a nivel de filo**

El análisis de la composición bacteriana a nivel de filo reveló una clara dominancia de cinco filos principales (Gráfica 6): *Pseudomonadota* (representado en rosa) fue el filo más abundante, mostrando una presencia dominante en todas las muestras con una abundancia relativa que oscila entre 50-90% del total de secuencias.

*Bacillota* (mostrado en color naranja) fue el segundo filo más abundante, presentando una abundancia relativa notable particularmente en algunas muestras, donde alcanzó aproximadamente el 25-30% de las secuencias.

*Actinomycetota* (en marrón) mostró una presencia consistente, pero en menor proporción, generalmente representando menos del 10% de las secuencias en las muestras donde se detectó.

*Bacteroidota* (en verde) y *Fusobacteriota* (en verde oscuro) se detectaron en proporciones menores, representando cada uno menos del 5% de la abundancia relativa total.



**Gráfica 6** Composición Bacteriana a Nivel de Filo en las Muestras Analizadas

Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.

#### 7.2.4.2 Composición bacteriana a nivel de familia

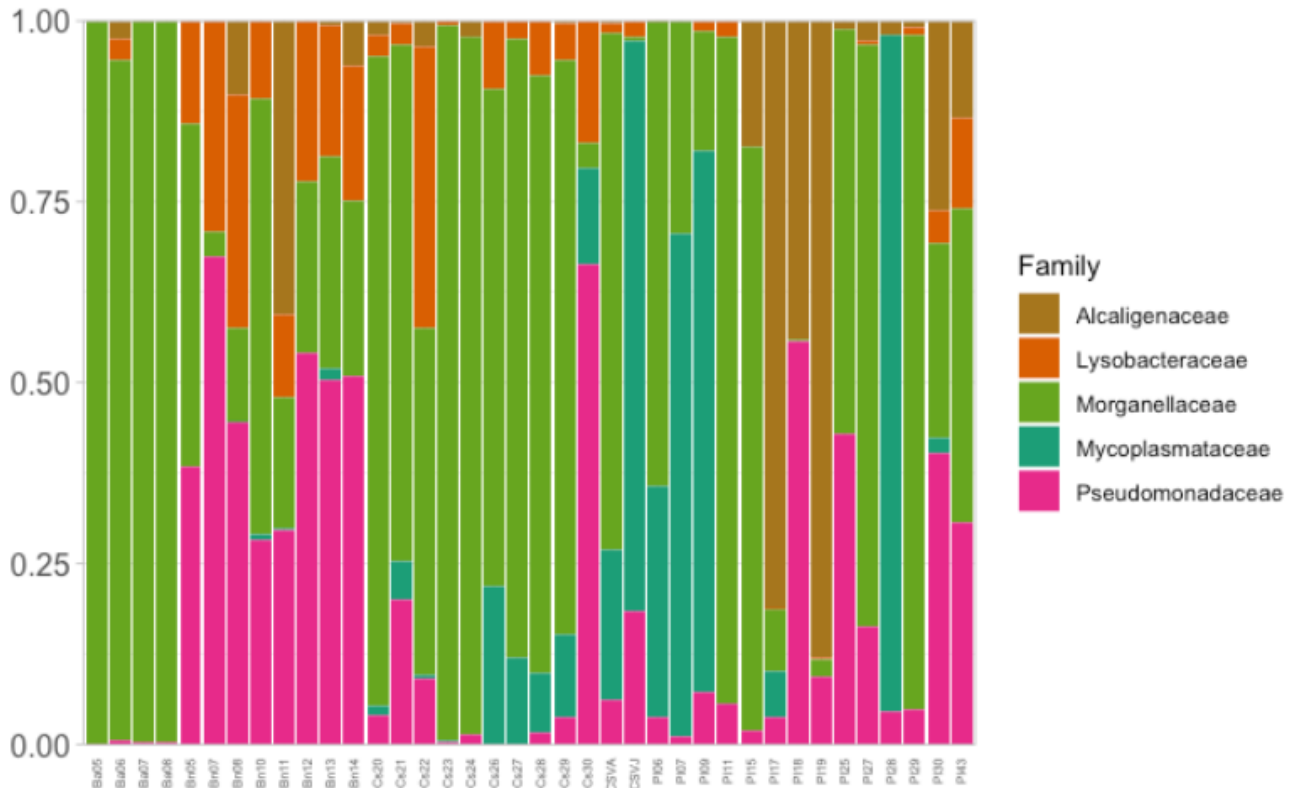
El análisis de la composición bacteriana a nivel de familia reveló cinco familias principales, con diferentes patrones de abundancia relativa en las muestras (Gráfica 7): La familia *Morganellaceae* (representada en verde) fue claramente

dominante, mostrando la mayor abundancia relativa en la mayoría de las muestras, frecuentemente alcanzando proporciones superiores al 75% en muchos especímenes.

La familia *Pseudomonadaceae* (mostrada en rosa) presentó una abundancia variable, siendo particularmente notable en algunas muestras donde alcanzó hasta el 50% de la abundancia relativa.

*Lysobacteraceae* (en naranja) mostró una presencia consistente pero generalmente en menor proporción que *Morganellaceae*, apareciendo en varias muestras con abundancias moderadas.

*Mycoplasmataceae* (en azul) y *Alcaligenaceae* (en marrón) se detectaron en menor frecuencia y abundancia en comparación con las otras familias, apareciendo de manera esporádica en algunas muestras específicas. La distribución de estas familias mostró variabilidad considerable entre las diferentes muestras, sugiriendo una composición bacteriana heterogénea en la población estudiada.



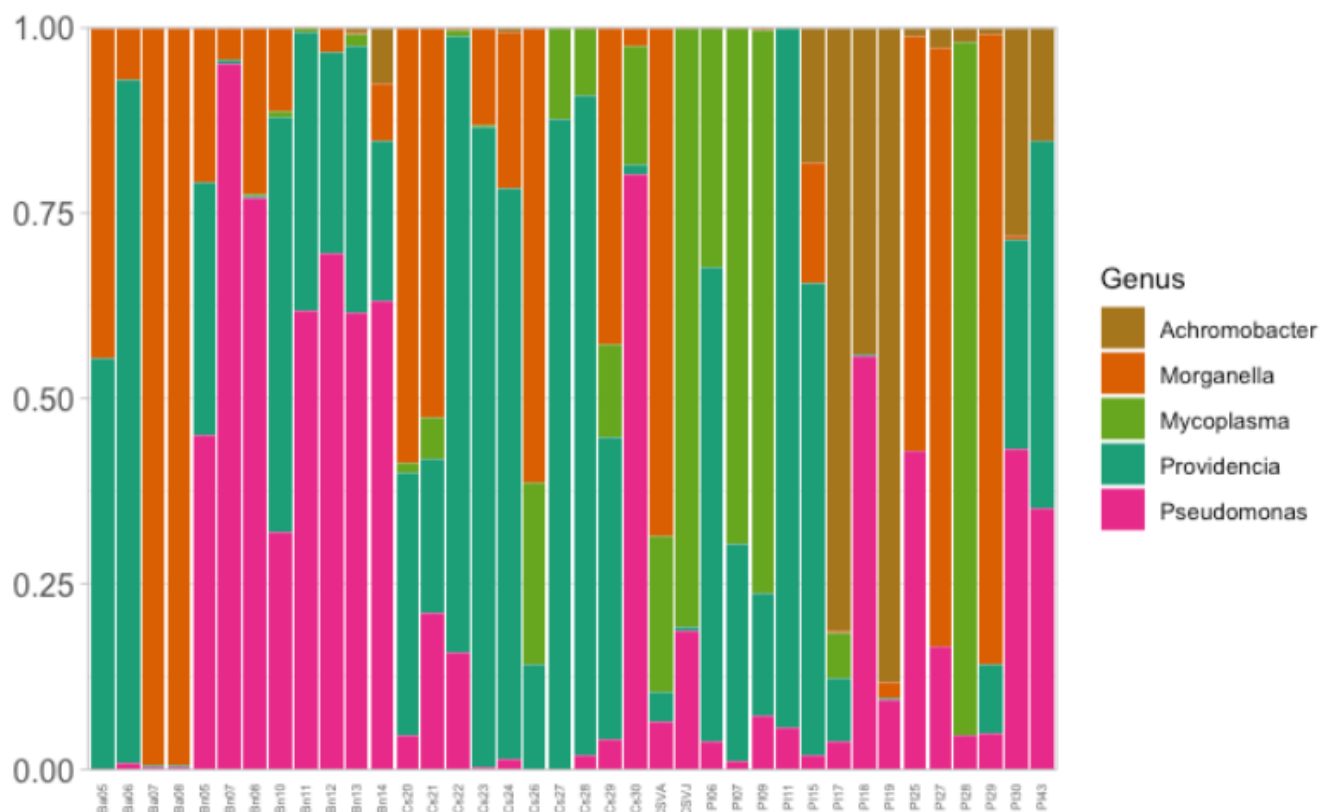
**Gráfica 7** Composición Bacteriana a Nivel de Familia en las Muestras Analizadas.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

### 7.2.4.3 Composición bacteriana a nivel de género bacteriano

La secuenciación genómica reveló una diversidad taxonómica significativa, identificando 37 géneros bacterianos distintos (Gráfica 9). Es importante destacar que la secuenciación proporcionó únicamente información a nivel de género, y las características adicionales se infirieron a partir de la literatura científica existente. La composición bacteriana mostró una ligera predominancia de géneros Gram-negativos (20) sobre los Gram-positivos (16). Morfológicamente,

se observó una prevalencia de bacilos (26 géneros), seguidos por cocos (5 géneros), formas pleomórficas (3 géneros), cocobacilos (2 géneros) y bastones (1 género) como se puede observar en la tabla 10. Los requerimientos de oxígeno variaron considerablemente, incluyendo 15 géneros aerobios, 11 anaerobios facultativos, 2 anaerobios estrictos, 1 microaerófilo y 1 aerotolerante. En cuanto al potencial patogénico, 26 géneros se asociaron con patogenicidad en humanos y/o animales, mientras que 9 no presentaron capacidad patogénica conocida (Gráfica 8).



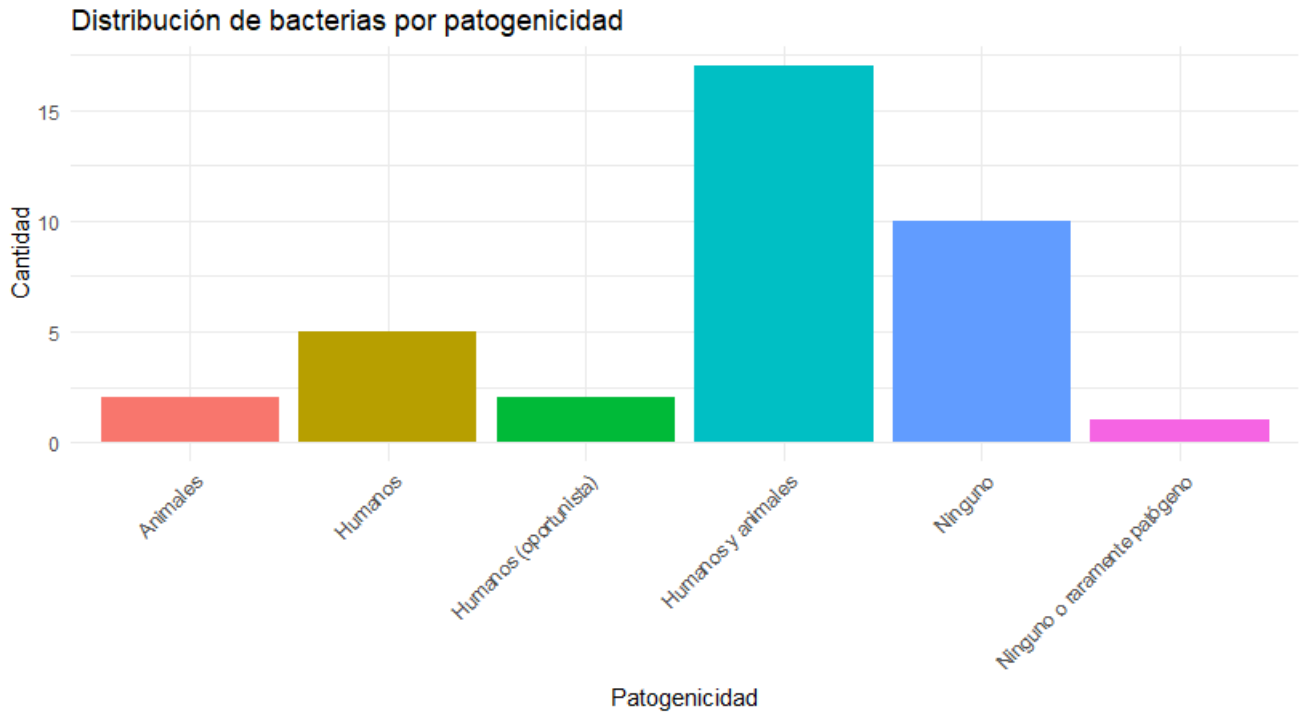
**Gráfica 8** Composición Bacteriana a Nivel de Género en las Muestras Analizadas.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

Género	Reacción al Gram	Morfología	Clasificación por requerimientos de oxígeno
<i>Achromobacter</i>	Gram negativa	Bacilos	Aerobia
<i>Acinetobacter</i>	Gram negativa	Cocobacilos	Aerobia
<i>Alcaligenes</i>	Gram negativa	Bacilos	Aerobia
<i>Anoxybacillus</i>	Gram positiva	Bacilos	Anaerobia facultativa
<i>Aquamicrobium</i>	Gram negativa	Bacilos	Aerobia
<i>Arthrobacter</i>	Gram positiva	Pleomórfica	Aerobia
<i>Bacteroides</i>	Gram negativa	Bacilos	Anaerobia
<i>Brevibacterium</i>	Gram positiva	Bacilos	Aerobia
<i>Carnobacterium</i>	Gram positiva	Bacilos	Anaerobia facultativa
<i>Corynebacterium</i>	Gram positiva	Bacilos	Facultativa
<i>Cutibacterium</i>	Gram positiva	Bacilos	Aerotolerante
<i>Enterobacter</i>	Gram negativa	Bacilos	Anaerobia facultativa
<i>Enterococcus</i>	Gram positiva	Cocos	Anaerobia facultativa
<i>Erwinia</i>	Gram negativa	Bacilos	Anaerobia facultativa
<i>Hymenobacter</i>	Gram negativa	Bastón	Aerobia
<i>Hyphomicrobium</i>	Gram negativa	Bacilos	Aerobia
<i>Janthinobacterium</i>	Gram negativa	Bacilos	Aerobia
<i>Kocuria</i>	Gram positiva	Cocos	Aerobia
<i>Mammaliococcus</i>	Gram positiva	Cocos	Anaerobia facultativa
<i>Micrococcus</i>	Gram positiva	Cocos	Aerobia
<i>Morganella</i>	Gram negativa	Bacilos	Anaerobia facultativa
<i>Mycoplasma</i>	Indeterminado	Pleomórfica	Anaerobio facultativa
<i>Niallia</i>	Gram positiva	Bacilos	Anaerobia facultativa
<i>Pantoea</i>	Gram negativa	Bacilos	Anaerobia facultativa
<i>Paracoccus</i>	Gram negativa	Cocobacilos	Aerobia
<i>Peribacillus</i>	Gram positiva	Bacilos	Aerobia
<i>Providencia</i>	Gram negativa	Bacilos	Anaerobia facultativa
<i>Pseudomonas</i>	Gram negativa	Bacilos	Aerobia
<i>Rahnella</i>	Gram negativa	Bacilos	Anaerobia facultativa
<i>Rhodococcus</i>	Gram positiva	Pleomórfica	Aerobia
<i>Rubrobacter</i>	Gram positiva	Bacilos	Aerobia
<i>Sphingobacterium</i>	Gram negativa	Bacilos	Aerobia estricta
<i>Sphingomonas</i>	Gram negativa	Bacilos	Aerobia
<i>Staphylococcus</i>	Gram positiva	Cocos	Anaerobio facultativo

<i>Stenotrophomonas</i>	Gram negativa	Bacilos	Aerobia
<i>Stenoxymbacter</i>	Gram negativa	Bacilos	Microaerófila
<i>Clostridium</i>	Gram positiva	Bacilos	Anaerobia

**Tabla 10** Características Taxonómicas y Fisiológicas de los Géneros Bacterianos Identificados.



**Gráfica 9** Distribución de bacterias potencialmente patógenas para los seres humanos en la cavidad oral de serpientes.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

Los géneros bacterianos predominantes en los diferentes especímenes muestreados fueron (Gráfica 10):

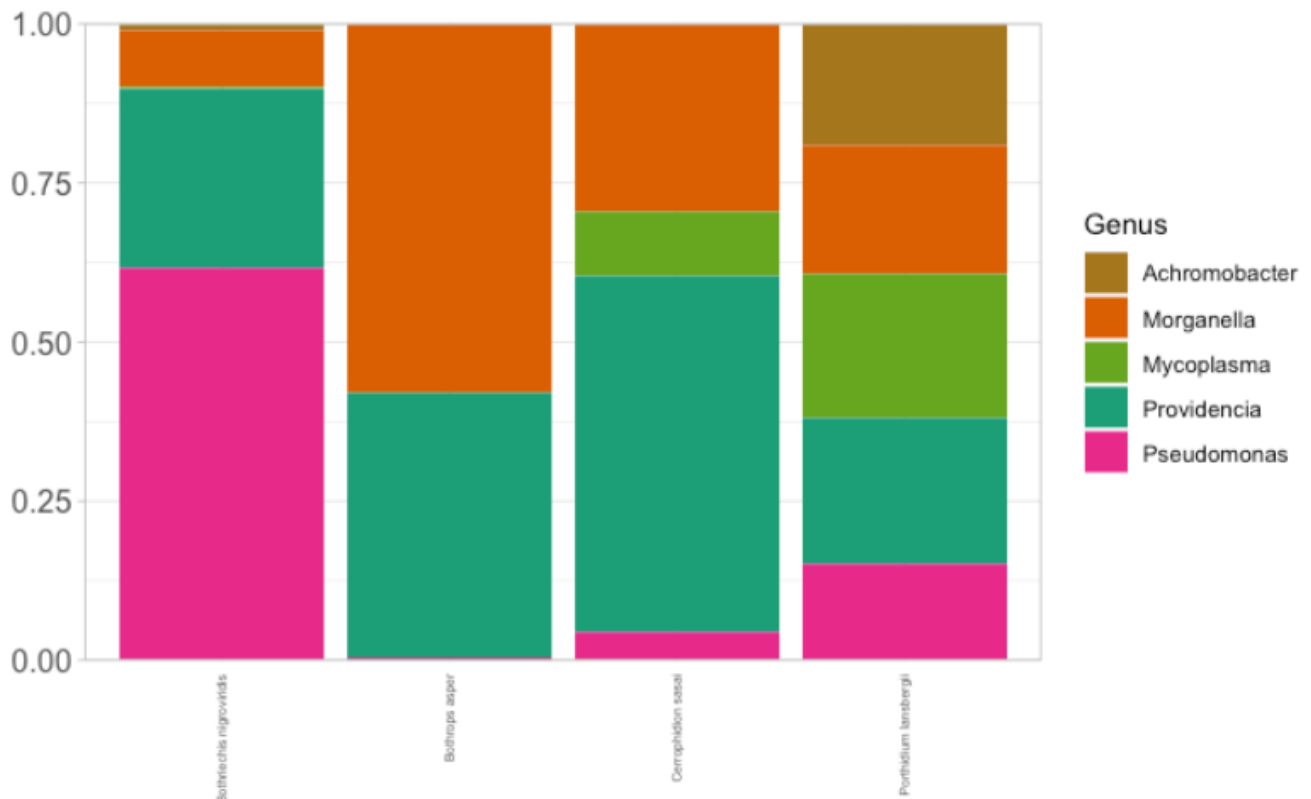
- *Providencia*: Mostró una abundancia relativa significativa, particularmente dominante en varias muestras.
- *Morganella*: Presentó una presencia consistente y abundante en múltiples muestras.
- *Pseudomonas*: Exhibió una abundancia variable, siendo dominante en algunas muestras solamente.
- *Achromobacter*: Se detectó en menor proporción, pero con presencia constante.
- *Mycoplasma*: Mostró una abundancia variable, con mayor presencia en ciertas muestras.

***Bothriechis nigroviridis***: Dominancia clara de *Pseudomonas*, seguido por *Providencia*, con menor presencia de *Morganella*.

***Bothrops asper***: Predominio de *Morganella*, seguido de *Providencia* como segundo género más abundante, y con presencia muy reducida del género *Pseudomonas*.

***Cerrophidion sasai***: Mayor proporción de *Providencia*, con presencia también significativa de *Morganella*, y en menor abundancia de *Mycoplasma* y *Pseudomonas*.

***Porthidium lansbergii***: Presencia y distribución pareja de géneros *Providencia*, *Morganella*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas* y *Achromobacter*. Fue notable la presencia de *Achromobacter* con respecto a las demás especies de serpientes.



**Gráfica 10** Abundancia Relativa de Géneros Bacterianos por Especie de Serpiente obtenida mediante secuenciación masiva.

Se observa una dominancia de *Pseudomonas* en *Bothriechis nigroviridis*, mientras que *Morganella* predomina en *Bothrops asper*. *Cerrophidion sasai* muestra una mayor proporción de *Providencia*, y *Porthidium lansbergii* presenta una distribución más equitativa entre los géneros identificados.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

#### 7.2.4.4 Análisis Estadísticos

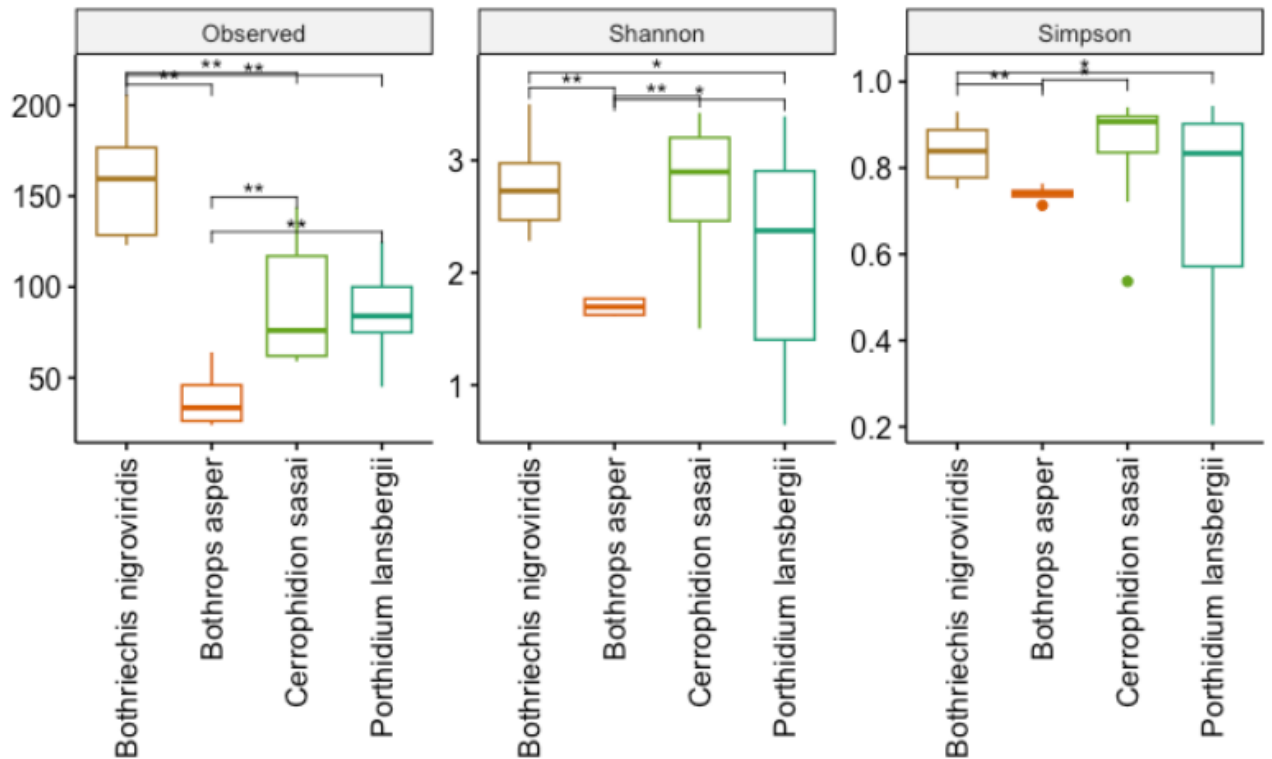
El análisis de diversidad alfa entre las cuatro especies de serpientes (*Bothriechis nigroviridis*, *Bothrops asper*, *Cerrophidion sasai* y *Porthidium lansbergii*) reveló diferencias significativas utilizando tres índices de diversidad principales (Gráfica 11).

La riqueza observada muestra que *Bothriechis nigroviridis* presenta la mayor diversidad con una mediana de aproximadamente 150 OTUs, significativamente superior ( $p < 0.01$ ) a las demás especies. En contraste, *Bothrops asper* exhibe la menor riqueza con una mediana de aproximadamente 35 OTUs. El índice de Shannon, que considera tanto la riqueza como la equitatividad, muestra un patrón similar, con *B. nigroviridis* y *C. sasai* presentando los valores más altos, mientras que *B. asper* muestra el valor más bajo.

El índice de Simpson, que enfatiza la dominancia y equitatividad, muestra valores generalmente altos ( $>0.6$ ) para todas las especies, aunque con menor variabilidad entre especies en comparación con los otros índices.

Las diferencias observadas son estadísticamente significativas según las pruebas de Wilcoxon por pares ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ ), particularmente entre *B. nigroviridis* y las demás especies. La variabilidad dentro de cada especie, representada por los rangos intercuartílicos en los diagramas de caja, es

notablemente mayor en *P. lansbergii* para todos los índices de diversidad, sugiriendo una mayor heterogeneidad en la composición de su microbiota.



**Gráfica 11** Diversidad Alfa de la Microbiota Oral en Diferentes Especies de Serpientes.

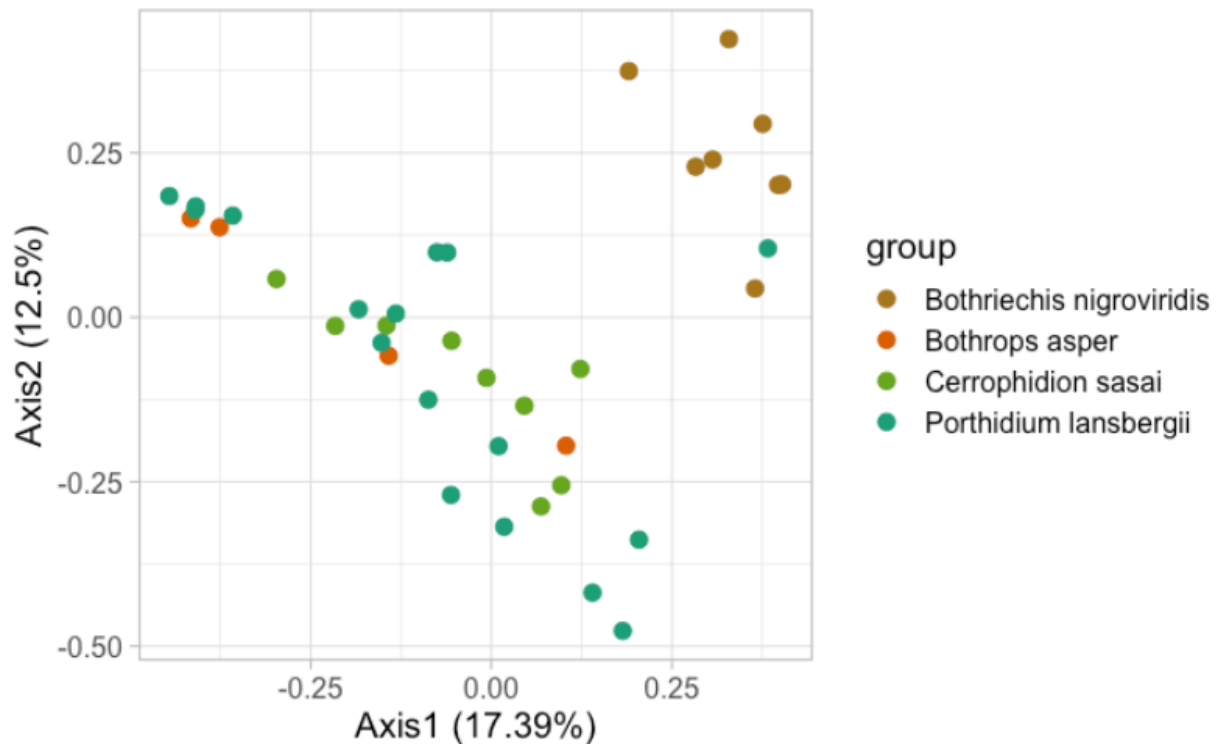
Se muestran los índices de riqueza observada, Shannon y Simpson para cada especie. Se observan diferencias significativas en la riqueza entre *Bothriechis nigroviridis* y las demás especies.

Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.

El análisis de diversidad beta mediante PCoA (Análisis de Coordenadas Principales) revela patrones distintivos de agrupamiento entre las comunidades microbianas de las cuatro especies de serpientes estudiadas. Los dos ejes

principales explican un total de 29.89% de la variación (Axis 1: 17.39%, Axis 2: 12.5%), indicando una estructura compleja en la composición microbiana (Gráfica 12).

*Bothriechis nigroviridis* muestra un agrupamiento bien definido en el cuadrante superior derecho, sugiriendo una composición microbiana única y consistente. *Cerrophidion sasai* y *Porthidium lansbergii* exhiben un patrón de distribución más disperso, con *C. sasai* ocupando principalmente la región central-superior izquierda y *P. lansbergii* mostrando una mayor dispersión hacia el cuadrante inferior. *Bothrops asper* mantiene una posición distintiva en el espacio de ordenación. Es notable la existencia de cierto solapamiento entre algunas especies, particularmente entre *C. sasai* y *P. lansbergii*, lo que podría indicar similitudes.



**Gráfica 12** Gráfico de Dispersión de la Microbiota Oral - Análisis de PCoA por Especie de Serpiente.

El gráfico de dispersión muestra el agrupamiento de las comunidades microbianas según la especie de serpiente. *Bothriechis nigroviridis* presenta un agrupamiento bien definido, mientras que *Cerrophidion sasai* y *Porthidium lansbergii* exhiben una mayor dispersión.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

## 7.2.5 Composición taxonómica en muestras de veneno

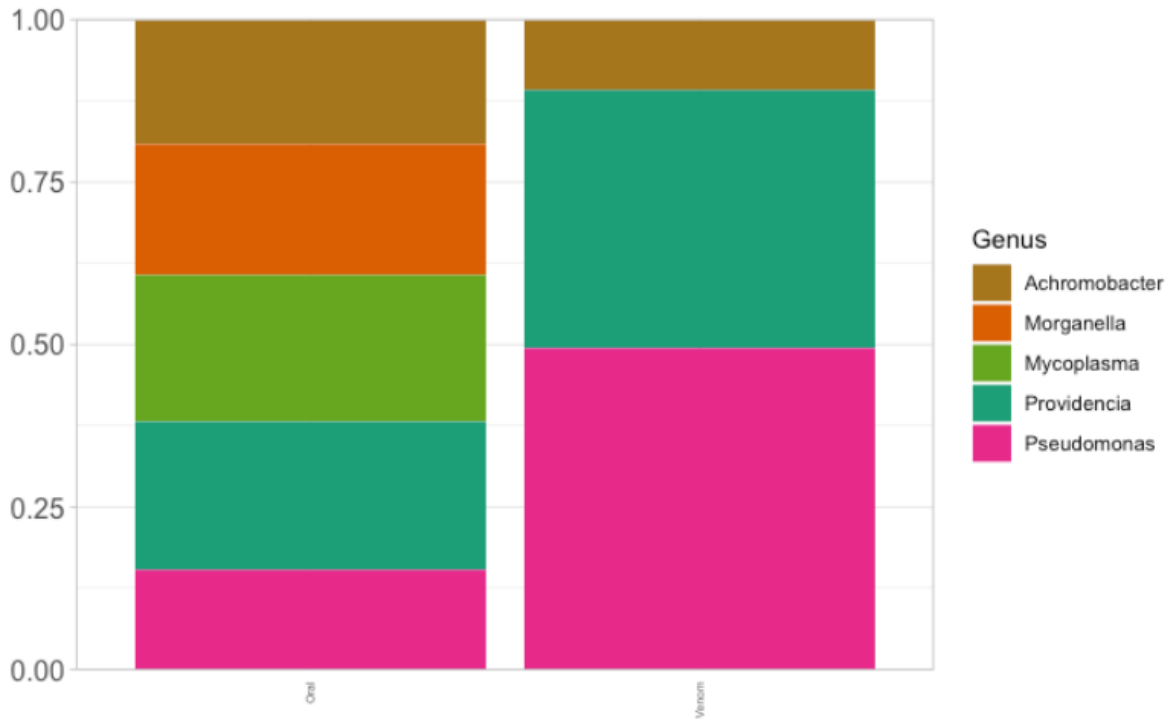
El análisis de la diversidad de géneros bacterianos entre la cavidad oral y el veneno de *Porthidium lansbergii* reveló diferencias en la composición y abundancia relativa (Gráfica 13):

### Cavidad Oral

- *Pseudomonas*: ~15% de abundancia relativa
- *Providencia*: ~25% de abundancia relativa
- *Mycoplasma*: ~25% de abundancia relativa
- *Morganella*: ~20% de abundancia relativa
- *Achromobacter*: ~15% de abundancia relativa

### Veneno

- *Pseudomonas*: ~50% de abundancia relativa
- *Providencia*: ~40% de abundancia relativa
- *Achromobacter*: ~10% de abundancia relativa



**Gráfica 13** Abundancia Relativa de Géneros Bacterianos en Cavidad Oral y Veneno de *Porthidium lansbergii* obtenida mediante secuenciación masiva.

Se observa una mayor diversidad de géneros en la cavidad oral en comparación con el veneno, donde *Pseudomonas* y *Providencia* son los géneros predominantes.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

La distribución de géneros muestra una menor diversidad en el veneno, donde predominan principalmente *Pseudomonas* y *Providencia*, mientras que la cavidad oral presenta una distribución más equilibrada entre los cinco géneros identificados. *Mycoplasma* y *Morganella* están presentes en la cavidad oral pero ausentes en las muestras de veneno.

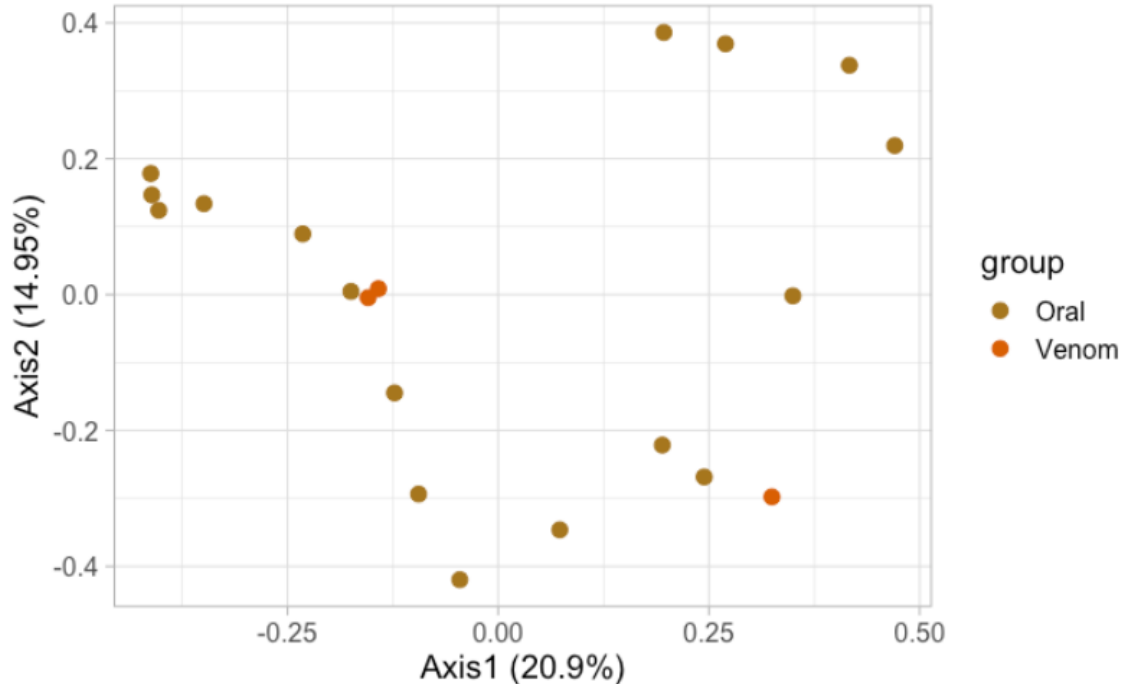
Con respecto al análisis de diversidad beta mediante PCoA (Análisis de Coordenadas Principales) entre muestras orales y de veneno de *Porthidium Lansbergii* muestra la siguiente distribución:

### **Distribución en Ejes**

- Axis 1: Explica el 20.9% de la variación total
- Axis 2: Explica el 14.95% de la variación total

### **Patrones de Agrupamiento**

Las muestras orales (puntos marrones) muestran una amplia dispersión en el espacio de ordenación, ocupando diferentes posiciones a lo largo de ambos ejes. Las muestras de veneno (puntos naranjas) están representadas por pocos puntos y muestran una distribución más restringida, agrupándose principalmente en una región específica del gráfico (Gráfica 14).

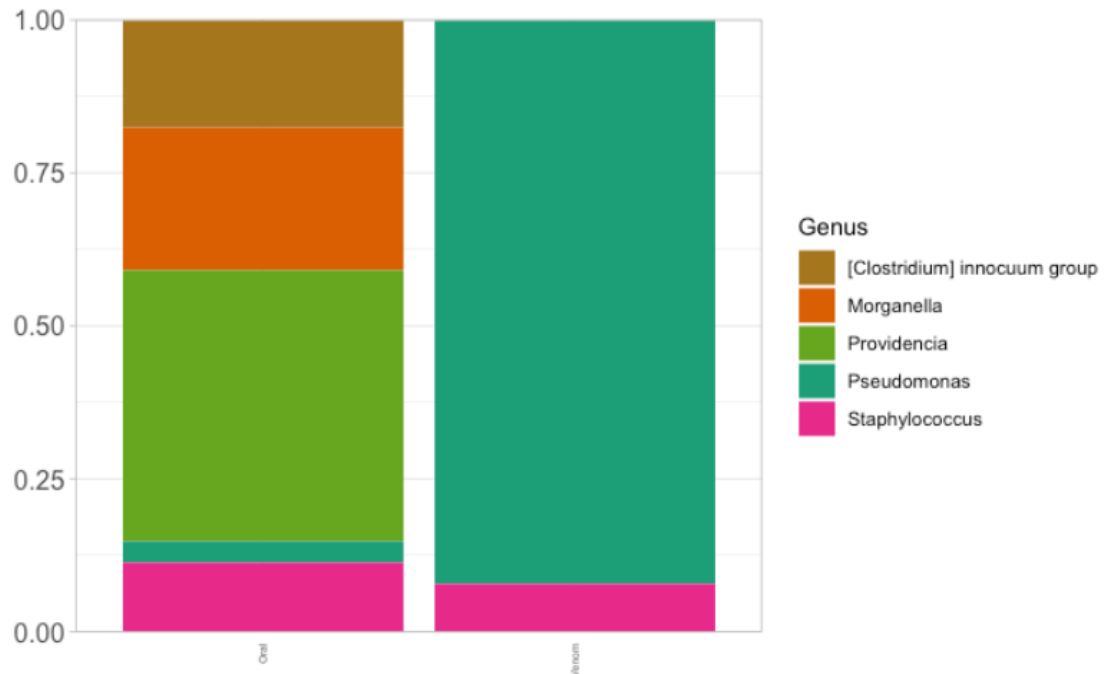


**Gráfica 14** Gráfico de dispersión muestra las diferencias en la Composición Bacteriana entre la Microbiota Oral y del Veneno de *Porthidium lansbergii* (Análisis de PCoA).

El gráfico muestra una clara separación entre las muestras orales (puntos marrones) y las muestras de veneno (puntos naranjas), indicando diferencias significativas en la composición bacteriana. Las muestras orales exhiben una mayor dispersión, mientras que las muestras de veneno tienden a agruparse, lo que sugiere una menor diversidad.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

Por otro lado, con respecto al análisis de la diversidad de géneros bacterianos entre la cavidad oral y el veneno de *Cerrophidion sasai* se obtuvieron los siguientes resultados (Gráfica 15):



**Gráfica 15** Comparación de la Abundancia de Géneros Bacterianos entre Cavidad Oral y Veneno de *Cerrophidion sasai*.

Se observa una predominancia de *Pseudomonas* en el veneno, mientras que en la cavidad oral se presenta una mayor diversidad de géneros, incluyendo *Staphylococcus*, *Providencia*, *Morganella* y el grupo *Clostridium*.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

### Cavidad Oral

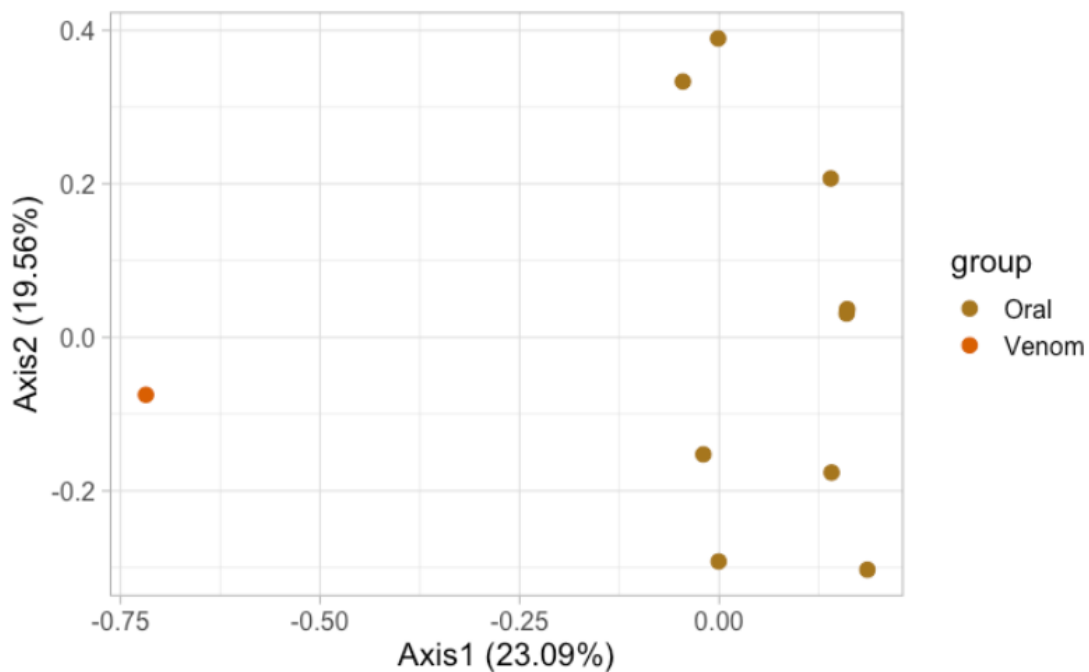
- *Staphylococcus*: ~10% de abundancia relativa
- *Providencia*: ~40% de abundancia relativa
- *Morganella*: ~20% de abundancia relativa
- *[Clostridium] innocuum group*: ~15% de abundancia relativa

## Veneno

- *Staphylococcus*: ~8% de abundancia relativa
- *Pseudomonas*: ~90% de abundancia relativa

El análisis de diversidad beta mediante PCoA muestra (Gráfica 16):

- Axis 1: Explica el 23.09% de la variación
- Axis 2: Explica el 19.56% de la variación



**Gráfica 16** Diversidad Beta entre las Comunidades Microbianas Orales y del Veneno de *Cerrophidion sasai* (Análisis de PCoA).

El gráfico de dispersión muestra una clara separación entre las muestras orales y las muestras de veneno a lo largo del Eje 1, lo que indica diferencias significativas en la composición de sus comunidades microbianas.

*Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio.*

Las muestras orales (puntos marrones) muestran una mayor dispersión en el espacio de ordenación, mientras que la muestra de veneno (punto naranja) se ubica en una posición distinta y aislada en el cuadrante inferior izquierdo del gráfico.

## 8. CAPÍTULO IV: Discusión

El presente estudio tenía como propósito caracterizar la microbiota oral de serpientes venenosas pertenecientes a la familia *Viperidae*, mantenidas en cautiverio en el serpentario del Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET), sede de Panamá, Campus Octavio Méndez Pereira, y sede de Santiago de Veraguas. Este proyecto se desarrolló en dos fases complementarias: una fase dependiente de cultivo y una fase independiente de cultivo (molecular). La relevancia de este campo de investigación se destaca en estudios como el de Fonseca et al. (2009), quienes señalan que tanto las mordeduras de serpientes no venenosas como venenosas pueden generar complicaciones debido a la presencia de bacterias en su cavidad oral.

Los resultados de la primera fase del estudio, basados en el análisis microbiológico de las muestras recolectadas de la cavidad oral y el veneno de serpientes venenosas, revelaron una notable diversidad de bacterias cultivables. Sin embargo, no todas las muestras lograron generar crecimiento bacteriano en los medios utilizados. De las 48 muestras recolectadas, solo un grupo mostró crecimiento visible, lo que permitió aislar e identificar 41 cepas bacterianas pertenecientes a 12 géneros diferentes. Sin embargo, algunas colonias no pudieron ser identificadas bioquímicamente. Este hallazgo subraya las limitaciones inherentes a los métodos dependientes de cultivo, ya que no todas las bacterias presentes en un ecosistema complejo como la cavidad oral son

cultivables o identificables mediante estas técnicas (Li et al., 2014; Kapinusova et al., 2023; Anand et al., 2010).

El predominio de bacterias Gram negativas en nuestros resultados, particularmente *Morganella morganii* y *Providencia rettgeri*, coincide con los hallazgos de otros investigadores. Ferreira et al. (2009) y Fonseca et al. (2009) también reportaron una alta prevalencia de bacterias Gram negativas en la microbiota oral de serpientes brasileñas. Esta consistencia sugiere que las bacterias Gram negativas podrían ser componentes fundamentales de la microbiota oral de las serpientes, independientemente de la región geográfica.

Las diferencias observadas en la composición bacteriana entre las cuatro especies de serpientes estudiadas son particularmente interesantes. *Porthidium lansbergii* mostró la mayor diversidad bacteriana, mientras que *Bothrops asper* y *Bothriechis nigroviridis* exhibieron una diversidad más limitada. Estas variaciones podrían atribuirse a diversos factores, incluyendo diferencias en adaptaciones específicas con respecto al hábitat y la fisiología de cada especie, como lo sugieren Jho et al. (2011) en su estudio sobre serpientes vietnamitas. Además, podrían reflejar variaciones en los mecanismos de defensa inmunológica intrínsecas de cada especie de serpiente. Por ejemplo, especies de Bacteroides, que son prevalentes en la microbiota intestinal de las serpientes, se sabe que interactúan con el sistema inmunológico del huésped, potencialmente ayudando en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica (Zhang et al., 2019; Tang et al., 2019). Esta interacción subraya la importancia del microbioma oral en la

modulación de las respuestas inmunitarias, ya que puede influir tanto en la inmunidad local como en la sistémica (Schachtschneider et al., 2013; DeVine et al., 2015).

La presencia de *Morganella morganii* en todas las especies de serpientes estudiadas es notable y concuerda con su frecuente aislamiento en estudios previos. Esta bacteria ha sido asociada con infecciones graves en humanos tras mordeduras de serpiente (Valsan et al., 2007). El género *Morganella* comprende bacilos Gram negativos que se encuentran comúnmente en el ambiente, y se distinguen por su capacidad de producir una variedad de factores de virulencia. Entre estos factores se incluyen la ureasa, hemolisinas, lipopolisacárido (LPS), adhesinas y enzimas con la capacidad de hidrolizar y modificar antibióticos (Zalas et al., 2012). En humanos, las bacterias del género *Morganella* pueden ocasionar infecciones en diversos sistemas, incluyendo el torrente sanguíneo, el tracto urinario y el sistema respiratorio (Manos y Belas, 2006).

Además, se identificaron otras bacterias potencialmente patógenas como *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia fonticola* y *Staphylococcus lentus* en la microbiota oral de estas serpientes. Las bacterias del género *Providencia* son consideradas patógenos oportunistas (Rajni et al., 2022; Hadavand et al., 2024). Estas bacterias pueden encontrarse en diversos ambientes y organismos; algunas especies forman parte de la microbiota intestinal humana. Entre las especies más frecuentemente aisladas en contextos

clínicos y responsables de infecciones urinarias y nosocomiales en humanos se encuentran *P. alcalifaciens*, *P. rettgeri* y *P. stuartii* (Yuan et al., 2020).

*P. aeruginosa* y *S. fonticola* fueron aisladas e identificadas en 3 muestras cada una. Ambas bacterias exhiben una morfología de bacilos Gram negativos y habitan en diversos nichos, como el suelo, el agua y en asociaciones con plantas y animales (Özen y Ussery, 2011). *P. aeruginosa* produce enzimas como proteasas y elastasas, capaces de degradar proteínas inmunoreguladoras, incluyendo surfactantes A y D, inmunoglobulinas y péptidos antibacterianos (Paz et al., 2019). Por su parte, *S. fonticola* tiene la capacidad de formar biopelículas, invadir células epiteliales corneales humanas, causar queratitis y producir gelatinasa, elastasa y proteasa alcalina (Samonis, et al., 2011).

En relación con los resultados obtenidos en este estudio sobre el perfil de resistencia a antibióticos. *Morganella morganii* exhibió alta resistencia a cefalotina y cefazolina (100% de las cepas), lo cual es consistente con su capacidad conocida para producir  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL) o carbapenemasas de bajo nivel (Egwuatu, et al., 2023). Sin embargo, esta especie demostró sensibilidad a antibióticos como ceftazidima, ceftriaxona, ertapenem y meropenem, lo que sugiere que estos agentes podrían ser efectivos en el tratamiento de infecciones causadas por *M. morganii*. Estudios previos han documentado la asociación de esta bacteria con infecciones nosocomiales y su capacidad para desarrollar resistencia a múltiples clases de antibióticos, lo que subraya su importancia clínica (Novelli, et al., 2024).

Por otro lado, *Providencia rettgeri* presentó resistencia universal a cefalotina, cefazolina y nitrofurantoína, pero alta sensibilidad a ceftazidima, ceftriaxona, cefepima y carbapenémicos. Esto coincide con resultados previos que destacan su papel como patógeno oportunista en infecciones urinarias y nosocomiales (Kovačević, et al., 2024). La resistencia a nitrofurantoína es un patrón comúnmente observado en *P. rettgeri*, lo que limita su uso terapéutico (Dettori, et al., 2023).

En el caso de *Serratia fonticola*, se observó resistencia a cefazolina, ceftazidima y ceftriaxona, pero sensibilidad a cefepima, meropenem y fluoroquinolonas. Esto es coherente con investigaciones previas que han reportado variaciones en los perfiles de susceptibilidad entre diferentes especies del género *Serratia* (Seni, et al., 2021).

*Pseudomonas aeruginosa* mostró resistencia a cefazolina en todas las cepas, lo cual es un rasgo característico ampliamente documentado debido a la impermeabilidad natural de su membrana externa (Longhi, et al., 2023). Sin embargo, se observó sensibilidad variable a meropenem (66.7% sensible) y alta sensibilidad a ceftazidima, cefepima y aminoglucósidos. Este perfil es consistente con estudios que destacan la eficacia relativa de los carbapenémicos y aminoglucósidos contra *P. aeruginosa* (Franco-Gonzalez, et al., 2022; Sheraba et al., 2015).

El aislamiento de *Enterobacter cloacae*, con un perfil compatible con la producción de ESBL, resalta su relevancia como patógeno emergente en infecciones nosocomiales (Algammal, et al., 2023). La resistencia observada a cefalosporinas de tercera generación subraya la necesidad de vigilancia continua para mitigar el impacto clínico de estas cepas resistentes.

La detección de cepas productoras de ESBL o carbapenemasas en especies como *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae* y *Sphingomonas paucimobilis* refuerza la preocupación global sobre la diseminación de genes de resistencia entre bacterias Gram negativas (Egwuatu, et al., 2023; Mohammadzadeh, et al., 2017).

Los resultados obtenidos subrayan la importancia de realizar pruebas posteriores específicas para identificar mecanismos moleculares subyacentes, como genes codificadores de ESBL o carbapenemasas (por. ej., blaCTX-M o blaKPC), para guiar decisiones terapéuticas más precisas (Rahimzadeh et al., 2023). Además, el monitoreo continuo del perfil antimicrobiano es crucial para prevenir brotes asociados con bacterias multirresistentes. Por ejemplo, se ha demostrado que los sistemas de vigilancia integrados que monitorean tanto la resistencia antimicrobiana como el uso de antimicrobianos son efectivos para comprender la dinámica de la resistencia (Otto et al., 2022; Rudnick et al., 2022).

Con respecto a las bacterias Gram positivas, el hallazgo de *S. lentus* representa un aporte relevante al conocimiento sobre la microbiota asociada. Un estudio

realizado por Yuan et al. (2020) reportó la capacidad de algunas cepas de *S. lentus* para causar bacteriemia en animales pequeños, lo que sugiere un potencial patogénico subestimado. La ausencia de un perfil de susceptibilidad antimicrobiana para esta cepa limita nuestra comprensión sobre su resistencia o sensibilidad a agentes antimicrobianos específicos. Sin embargo, investigaciones previas han mostrado que *S. lentus* puede ser sensible a una amplia gama de antibióticos, aunque también se han reportado casos de resistencia a ciertos antimicrobianos como fluoroquinolonas y sulfametoxazol-trimetoprima (Wen-Yu, 2010).

Cabe destacar que, en este estudio, la identificación bacteriana y el perfil de resistencia y sensibilidad a antibióticos se realizó exclusivamente para aquellas bacterias que crecieron en condiciones de aerobiosis. Aunque se observaron crecimientos de bacterias anaerobias en los métodos dependientes de cultivo, no se llevó a cabo su identificación ni su perfil de resistencia debido a que los sistemas automatizados como VITEK no están completamente estandarizados para estas bacterias, lo que limita su precisión y aplicabilidad clínica en este contexto (Garner et al., 2013; Ozcan et al., 2020).

Además, en la segunda etapa del estudio, se implementaron técnicas independientes de cultivo basadas en la secuenciación del gen 16S rRNA, las cuales permitieron identificar de manera más robusta y confiable las bacterias aerobias y anaerobias presentes. Esta técnica tiene un gran potencial para el diagnóstico clínico y la identificación de nuevas bacterias (Li et al., 2024).

La identificación de 11 géneros bacterianos de bacterias Gram negativas diferentes y solo 1 género de bacterias Gram positivas en las muestras analizadas refleja una diversidad microbiana considerable, aunque notablemente limitada y subestimada, en la cavidad oral y el veneno de las serpientes estudiadas. El uso de solo tres tipos de medios de cultivo también puede haber restringido la detección de bacterias con requerimientos nutricionales más específicos. Esta limitación en la cultivabilidad y posterior identificación de bacterias es un fenómeno bien documentado en microbiología, conocido como "la gran anomalía del conteo en placa" (Tanaka et al., 2014; Lagier et al., 2015).

La discrepancia entre las bacterias observables microscópicamente y las que pueden ser cultivadas en el laboratorio se debe a varios factores, incluyendo los requerimientos nutricionales específicos no satisfechos por los medios de cultivo estándar. Este fenómeno ha sido un desafío persistente en la microbiología desde su descubrimiento a principios del siglo XX (Peters et al., 2016). Por otra parte, "Comfort Timing", sugiere que muchos microorganismos solo salen de la dormancia (mecanismo adaptativo para sobrevivir a las bajas temperaturas) en respuesta a un conjunto de condiciones ambientales cercanas a las óptimas para su crecimiento (Laugier et al., 2023).

Factores como condiciones de crecimiento subóptimas (temperatura, pH, atmósfera, entre otros), el estado viable pero no cultivable (VBNC) de algunas bacterias y las dependencias simbióticas con otros microorganismos que no pueden reproducirse in vitro, probablemente contribuyeron a esta limitación

(Fakruddin, et al., 2013). Estas restricciones son consistentes con estudios previos que resaltan cómo las técnicas convencionales basadas en cultivo solo permiten identificar una fracción del microbioma presente en muestras complejas, dejando fuera bacterias que no se adaptan a las condiciones artificiales del laboratorio (Rivas y Pose, 2024).

Nuestros resultados en esta primera fase del estudio, son consistentes con la literatura existente, la cual reporta un amplio predominio de bacterias Gram negativas, las cuales destacan por su capacidad de desarrollar resistencia simultánea a múltiples clases de antibióticos, representando así un desafío significativo para la salud global (Partridge, 2011).

Con respecto a la segunda fase de este estudio, la implementación de técnicas independientes de cultivo en este estudio permitió superar las limitaciones inherentes a los métodos dependientes de cultivo, proporcionando una visión más integral y precisa de la microbiota bacteriana asociada a las serpientes estudiadas. Este enfoque, basado en la secuenciación del gen 16S rRNA mediante tecnologías de nueva generación (NGS), ha demostrado ser una herramienta robusta para explorar comunidades microbianas complejas, especialmente aquellas que incluyen microorganismos no cultivables o en estado viable pero no cultivable (VBNC) (Lin & Tsai, 2023).

La selección de las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S rRNA como objetivo para la amplificación fue clave para lograr una discriminación taxonómica

confiable hasta el nivel de género (Azaroual et al., 2022). La región hipervariable V3-V4 del gen 16S rRNA ha captado la atención en estudios de comunidades microbianas debido a diversas ventajas frente a otras regiones, como la V1-V2 o la V4. Una ventaja significativa es el equilibrio que ofrece entre resolución taxonómica y eficiencia de secuenciación. Investigaciones indican que la región V3-V4 captura adecuadamente la diversidad taxonómica de diversas comunidades microbianas, convirtiéndola en una elección práctica para plataformas de secuenciación masiva como Illumina MiSeq, comúnmente utilizadas en investigaciones del microbioma (Abellan-Schneyder et al., 2021; Jurburg et al., 2020).

El uso de la plataforma Illumina MiSeq y el procesamiento bioinformático de los datos obtenidos proporcionaron una visión integral de la diversidad microbiana, permitiendo clasificar las bacterias presentes hasta el nivel de género con alta resolución. Este enfoque ha demostrado ser altamente efectivo en estudios microbiológicos complejos, como el análisis de microbiotas ambientales y clínicas, donde la diversidad taxonómica es alta (Kozich et al., 2013).

El procesamiento bioinformático efectuado a partir de la corrida de secuenciación fue altamente eficiente, reteniendo un promedio del 86.7% de las lecturas iniciales tras los pasos de filtrado y eliminación de quimeras. Este nivel de retención es consistente con estándares reportados en estudios similares que utilizan herramientas bioinformáticas avanzadas para el análisis del microbioma. Sin embargo, cuatro muestras fueron excluidas debido a un número

extremadamente bajo de lecturas (<0.20% del promedio general), lo que subraya la importancia de garantizar una calidad adecuada en la extracción y preparación inicial del ADN para evitar pérdidas significativas durante el procesamiento. La exclusión de estas muestras, aunque necesaria desde el punto de vista metodológico, implica una pérdida de información potencialmente valiosa.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio revelaron una clara dominancia de cinco filos bacterianos principales en las muestras analizadas, con *Pseudomonadota* emergiendo como el filo más abundante, este resultado es consistente con hallazgos previos en la literatura científica que destacan la importancia de este filo en diversos nichos microbianos (Rooney et al., 2023; Leão et al., 2022). Investigaciones previas han demostrado que géneros pertenecientes a este filo, como *Pseudomonas*, son comúnmente aislados de la cavidad oral de serpientes (Clavijo Vanegas, 2021).

*Bacillota*, fue el segundo filo más abundante en nuestro estudio, y se identificó en algunas muestras hasta un 25-30% de las secuencias. Esta observación es coherente con investigaciones previas que han identificado a miembros de este filo como componentes importantes de la microbiota oral de serpientes (Clavijo Vanegas, 2021).

*Actinomycetota*, aunque presente de manera consistente, mostró una abundancia relativa menor, por debajo del 10%. *Bacteroidota* y *Fusobacteriota* se detectaron en proporciones menores, cada uno representando menos del 5% de

la abundancia relativa total. A pesar de su baja abundancia, estos filos no deben ser subestimados, ya que estudios recientes han demostrado que incluso en bajas proporciones, pueden desempeñar roles importantes en la ecología microbiana y la salud del huésped (Bidell et al., 2022).

Con respecto a la composición bacteriana a nivel de familia en la cavidad oral de las serpientes, nuestros resultados arrojaron una clara dominancia de cinco familias principales, con *Morganellaceae* emergiendo como la familia más abundante seguida por *Pseudomonadaceae*, *Lysobacteraceae*, *Mycoplasmataceae* y *Alcaligenaceae*. La familia *Morganellaceae*, que incluye géneros como *Morganella*, *Proteus* y *Providencia*, que han sido reportados formando parte de la microbiota oral de serpientes (Clavijo Vanegas, 2021).

Estos hallazgos son consistentes con estudios recientes que han identificado a miembros de estas familias como componentes importantes de la microbiota oral de serpientes. Un estudio publicado en 2023 por Lin & Tsai encontró que *Pseudomonas aeruginosa*, perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, es una de las bacterias dominantes en la cavidad oral de serpientes. Además, la alta abundancia de *Morganellaceae* en nuestras muestras se alinea con investigaciones que han reportado a *Morganella morganii*, un miembro de esta familia, como una de las bacterias más comúnmente aisladas de las heridas por mordedura de serpiente (Lin et al., 2024).

La variabilidad observada en la distribución de estas familias entre las diferentes muestras sugiere una composición bacteriana heterogénea en la población estudiada. La composición microbiana puede variar significativamente entre especies y está influenciada por factores como la región geográfica y la temporada (Lin et al., 2024).

La secuenciación genómica reveló una diversidad taxonómica significativa, identificando 37 géneros bacterianos. Se obtuvo una variedad de géneros bacterianos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos. Nuestra observación de una ligera predominancia de géneros Gram-negativos (20) sobre los Gram-positivos (16) se alinea con hallazgos previos.

Un estudio reciente sobre la diversidad de bacterias aerobias aisladas de cavidades orales y cloacales de serpientes venenosas y no venenosas también reportó una variedad de morfologías bacterianas (Artavia-León et al., 2017). En cuanto al potencial patogénico, nuestro hallazgo de que 26 géneros se asocian potencialmente con patogenicidad en humanos y/o animales es particularmente relevante en el contexto de las mordeduras de serpiente. Esto se alinea con investigaciones previas que han destacado la importancia de las infecciones secundarias en las complicaciones de las mordeduras de serpiente (Campos-Ulate et al., 2024).

La prevalencia de bacilos en la microbiota oral de las serpientes, como se observa en nuestro estudio con 25 géneros identificados, es consistente con

hallazgos previos. Esta dominancia de formas bacilares sobre otras morfologías bacterianas podría explicarse por las adaptaciones específicas de estas bacterias al ambiente oral de las serpientes. Los bacilos tienen una mayor capacidad para formar biopelículas y adherirse a superficies, lo que les confiere ventajas competitivas en la colonización del entorno oral (Clavijo Vanegas, 2021). En el contexto de las cavidades orales de las serpientes, la formación de biopelículas por parte de los bacilos puede facilitar la colonización y persistencia, permitiendo que estos microorganismos superen a otras especies bacterianas en la competencia por recursos y espacio (Su et al., 2023; Lam et al., 2010).

La diversidad de requerimientos metabólicos observada en nuestro estudio, que incluye géneros aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos, refleja la heterogeneidad del ecosistema microbiano oral de las serpientes. Esta variabilidad metabólica es coherente con estudios previos reportados por Campos-Ulate et al., 2024. La capacidad de estas bacterias para adaptarse a diferentes condiciones de oxigenación dentro de la cavidad oral podría explicar su éxito en la colonización de este nicho ecológico. Además, esta diversidad metabólica podría tener implicaciones importantes en el contexto de las infecciones secundarias asociadas a mordeduras de serpiente, ya que permite la supervivencia y proliferación de estos microorganismos en diferentes condiciones ambientales durante el proceso infeccioso (Prescilla, 2014).

Los géneros bacterianos predominantes en nuestro estudio, incluyendo *Providencia*, *Morganella*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Mycoplasma*, han sido

previamente reportados en la microbiota oral de serpientes. Un estudio realizado en 2019 identificó a *Pseudomonas* y *Morganella* como géneros comúnmente aislados de la cavidad oral de serpientes (Torres et al., 2019). La variabilidad en la distribución de estos géneros entre diferentes especies de serpientes, como observamos en *Bothriechis nigroviridis*, *Bothrops asper*, *Cerrophidion sasai* y *Porthidium lansbergii*, sugiere que la composición de la microbiota oral puede ser específica e inherente de la especie. Esto es consistente con estudios que han encontrado diferencias en la microbiota oral entre diferentes especies de serpientes (Cruz et al., 2017).

Los resultados obtenidos en el análisis de la microbiota oral de *Bothrops asper* en cautiverio muestran diferencias significativas en comparación serpientes silvestres (Prescilla, 2014). En nuestro estudio, se observó un claro predominio del género *Morganella*, seguido por *Providencia*, mientras que el género *Pseudomonas* tuvo una presencia muy reducida. En contraste, Prescilla (2014) identificó una mayor diversidad bacteriana en serpientes silvestres, incluyendo géneros como *Stenotrophomonas*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Terracoccus*, *Elizabethkingia*, *Brucella*, *Serratia* y *Bacillus*. Esta disminución en la diversidad de géneros bacterianos en las serpientes en cautiverio podría atribuirse a factores como la dieta controlada y el ambiente más estéril.

Los resultados de nuestro estudio sobre la composición bacteriana en la cavidad oral y el veneno de *Porthidium lansbergii* y *Cerrophidion sasai* revelan diferencias

significativas entre estos dos nichos microbianos. En el caso de *P. lansbergii*, observamos una menor diversidad en el veneno, con predominancia de *Pseudomonas* y *Providencia*, mientras que la cavidad oral presenta una distribución más equilibrada entre cinco géneros. Ferreira et al. (2021) encontraron que el microbioma del veneno de serpientes puede ser distinto al de la cavidad oral, sugiriendo que el veneno podría ser un nicho ecológico único. Nuestros resultados, muestran la ausencia de *Mycoplasma* y *Morganella* en el veneno, pero su presencia en la cavidad oral, apoyan esta hipótesis.

La predominancia de *Pseudomonas* en el veneno de *P. lansbergii* (50% de abundancia relativa) es particularmente interesante. La alta abundancia de *Pseudomonas* en el veneno podría sugerir una adaptación específica de esta bacteria al ambiente del veneno. En cuanto a *C. sasai*, la marcada diferencia en la composición bacteriana entre la cavidad oral y el veneno es aún más pronunciada. La dominancia casi absoluta de *Pseudomonas* en el veneno (90% de abundancia relativa) contrasta fuertemente con su ausencia en la cavidad oral. Este hallazgo refuerza la idea de que el veneno puede actuar como un filtro selectivo para ciertas especies bacterianas, como se ha sugerido en estudios recientes (Esmailshirazifard et al., 2018).

La presencia de *Staphylococcus* en ambos nichos de *C. sasai*, aunque en bajas proporciones, es notable. Estudios previos han reportado la presencia de *Staphylococcus* en infecciones secundarias a mordeduras de serpiente, aunque

generalmente no se considera parte de la microbiota oral normal de estos reptiles (Campos-Ulate et al., 2024).

La comparación entre las dos fases de este estudio revela diferencias significativas en la capacidad de detección e identificación de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes venenosas. Esta discrepancia subraya las fortalezas y las limitaciones de los métodos dependientes e independientes de cultivo en la investigación microbiológica.

En la primera fase, utilizando métodos dependientes de cultivo, se logró aislar e identificar 41 cepas bacterianas pertenecientes a 12 géneros diferentes. Este enfoque, aunque valioso, demostró limitaciones inherentes, ya que no todas las muestras generaron crecimiento bacteriano visible, y algunas colonias no pudieron ser identificadas bioquímicamente. Estos resultados resaltan la conocida limitación de los métodos de cultivo tradicionales para capturar la totalidad de la diversidad microbiana en ecosistemas complejos.

En contraste, la segunda fase del estudio, empleando métodos independientes de cultivo basados en la secuenciación genómica, reveló una diversidad taxonómica significativamente mayor, identificando 37 géneros bacterianos. Esta diferencia sustancial en la detección de diversidad (12 vs. 37 géneros) subraya el poder de las técnicas moleculares para proporcionar una visión más completa del microbioma. La mayor diversidad obtenida mediante métodos independientes de

cultivo refleja su capacidad para detectar microorganismos no cultivables o de crecimiento lento, así como aquellos presentes en bajas concentraciones.

Sin embargo, es importante reconocer los desafíos asociados con los métodos independientes de cultivo. Estos incluyen el alto costo de los reactivos de secuenciación, la necesidad de equipos sofisticados como termocicladores y secuenciadores, y el requerimiento de instalaciones más avanzadas. Además, la interpretación de los datos generados por estas técnicas requiere habilidades bioinformáticas especializadas (Reuter et al., 2015). A pesar de estos desafíos, los métodos independientes de cultivo representan indudablemente el futuro de los estudios microbiológicos. Esta afirmación se sustenta en la proliferación de proyectos globales como los estudios de microbioma y otros enfocados en explorar la diversidad microbiana a gran escala (Gilbert et al., 2014; Turnbaugh et al., 2007; Earthmicrobiome, 2025).

## 9. Conclusiones

1. Se logró caracterizar una amplia diversidad de bacterias en la cavidad oral y el veneno de las serpientes estudiadas, utilizando métodos dependientes como independientes de cultivo. Esta diversidad bacteriana varió entre las diferentes especies de serpientes analizadas, revelando patrones específicos de colonización microbiana.
2. La caracterización de la microbiota oral en serpientes *Viperidae* mediante métodos dependientes de cultivo reveló una comunidad bacteriana dominada por bacterias Gram negativas (95% de los aislamientos), con *Morganella morganii* (27%) y *Providencia rettgeri* (24%) como especies más prevalentes. Estos hallazgos coinciden con reportes globales de infecciones post-mordedura, confirmando su papel como patógenos oportunistas en accidentes ofídicos.
3. Los métodos independientes de cultivo, basados en secuenciación del gen 16S rRNA, ampliaron significativamente el conocimiento sobre la diversidad microbiana. El análisis metagenómico identificó 247 variantes de secuencia (ASVs) agrupadas en 14 filos, con predominio de *Proteobacteria* (72.3%), *Bacteroidetes* (15.1%) y *Firmicutes* (8.4%). Esta aproximación detectó bacterias de relevancia clínica, como *Aeromonas* (8.2%) y *Clostridium* (5.7%).
4. La comparación entre especies demostró que *Porthidium lansbergii* alberga la mayor diversidad bacteriana (9 especies), mientras *Bothrops asper* presentó la menor (4 especies), lo que sugiere mecanismos

inmunológicos específicos y mayor riesgo de infecciones polimicrobianas en la primera.

5. Los métodos tradicionales subestimaron la diversidad detectada por secuenciación, evidenciando la necesidad de integrar enfoques moleculares. Sin embargo, los cultivos siguen siendo esenciales para evaluar viabilidad bacteriana y perfiles de resistencia *in vitro*, como en el caso de cepas de *M. morganii* resistentes a siete antibióticos, un hallazgo crítico para la producción de antivenenos.
6. La integración de métodos dependientes e independientes de cultivo demostró ser crucial para una caracterización comprensiva de la microbiota oral de las serpientes. Mientras que los métodos de cultivo permitieron la identificación y el análisis de susceptibilidad antimicrobiana de especies bacterianas cultivables, las técnicas de secuenciación revelaron una diversidad microbiana mucho mayor, incluyendo taxones no cultivables. Esta aproximación combinada proporciona una base sólida para futuros estudios sobre la ecología microbiana en reptiles y sus implicaciones en la salud pública y la medicina veterinaria.
7. Se estableció una base de datos comprehensiva que incluye tanto las bacterias identificadas por métodos dependientes de cultivo como las detectadas por técnicas moleculares. Esta base de datos proporciona información detallada sobre la composición taxonómica de la microbiota oral y del veneno de las serpientes estudiadas, incluyendo datos sobre la abundancia relativa de diferentes taxones bacterianos y sus perfiles de resistencia a antibióticos.

## 10. Recomendaciones

- Ampliar el estudio a otras especies de serpientes venenosas presentes en Panamá para tener una visión más completa de la diversidad bacteriana en ofidios.
- Realizar estudios longitudinales para evaluar cómo cambia la microbiota oral de las serpientes a lo largo del tiempo y en diferentes condiciones ambientales.
- Investigar la relación entre la composición de la microbiota oral y la virulencia del veneno en diferentes especies de serpientes.
- Explorar el potencial biotecnológico de las bacterias identificadas, especialmente aquellas con capacidades enzimáticas únicas.
- Optimizar los protocolos de extracción de ADN para aumentar el rendimiento en muestras con baja biomasa bacteriana.
- Utilizar técnicas de secuenciación de tercera generación o ampliar a la secuenciación de las 9 regiones variables del gen 16S rRNA para obtener lecturas más largas que permitan una mejor resolución taxonómica, que nos permita la identificación a nivel de especie.
- Utilizar la información sobre la microbiota para desarrollar probióticos específicos que puedan mejorar la salud de las serpientes en cautiverio.
- Considerar el impacto de los tratamientos antibióticos en la microbiota al manejar serpientes enfermas o heridas.

- Desarrollar programas educativos para el personal médico sobre la diversidad bacteriana asociada a mordeduras de serpientes y su implicación en el tratamiento.
- Establecer una base de datos nacional sobre la microbiota de serpientes venenosas que pueda ser consultada por profesionales de la salud en casos de accidentes ofídicos.

## 11. Bibliografía

1. Abellan-Schneyder, I., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., ... & Neuhaus, K. (2021). Primer, pipelines, parameters: issues in 16s rRNA gene sequencing. *mSphere*, 6(1).  
<https://doi.org/10.1128/msphere.01202-20>
2. Abuabara-Franco, E., Rico-Fontalvo, J., Leal-Martínez, V., Pájaro-Galvis, N., Bohórquez-Rivero, J., Barrios, N. d. J., ... & Figueroa-Quintero, M. (2022). Lesión renal aguda secundaria a mordedura de serpiente del género *Bothrops*: a propósito de un caso. *Revista Colombiana De Nefrología*, 9(1), e536.  
<https://doi.org/10.22265/acnef.9.1.536>
3. Akhter, A., Siddiquea, B. N., Chowdhury, H. A., Jackson, T. N. W., & Watt, A. D. (2024). Snakebite envenoming: a systematic review and meta-analysis of global morbidity and mortality. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 18(4), e0012080.  
[doi.org/10.1371/journal.pntd.0012080](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012080)
4. Alain K, Querellou J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*. 2009;13(4):583-594. [doi:10.1007/s00792-009-0261-3](https://doi.org/10.1007/s00792-009-0261-3)
5. Algammal AM, Eidaroos NH, Alfifi KJ, et al. oprL Gene Sequencing, Resistance Patterns, Virulence Genes, Quorum Sensing and Antibiotic Resistance Genes of XDR *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Broiler Chickens. *Infection And Drug Resistance*. 2023;Volume 16:853-867. [doi:10.2147/idr.s401473](https://doi.org/10.2147/idr.s401473)
6. Allen, M. E. (2005). MacConkey agar plates protocols. *American Society for Microbiology*, 1-4.

7. Almeida, V., Azevedó, J. F. D., Leal, H. F., Queiroz, A. T. L., Filho, H. P. d. S., & Reis, J. N. (2020). Bacterial diversity and prevalence of antibiotic resistance genes in the oral microbiome. *Plos One*, 15(9), e0239664. [doi.org/10.1371/journal.pone.0239664](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239664)
8. Anand M, Gonzalez A, Guichard F, Kolasa J, Parrott L. Ecological Systems as Complex Systems: Challenges for an Emerging Science. *Diversity*. 2010;2(3):395-410. [doi:10.3390/d2030395](https://doi.org/10.3390/d2030395)
9. Artavia-León A, Romero-Guerrero A, Sancho-Blanco C, Rojas N, Umaña-Castro R. Diversity of Aerobic Bacteria Isolated from Oral and Cloacal Cavities from Free-Living Snakes Species in Costa Rica Rainforest. *International Scholarly Research Notices*. 2017;2017:1-9. [doi:10.1155/2017/8934285](https://doi.org/10.1155/2017/8934285)
10. Azaroual SE, Kasmi Y, Aasfar A, et al. Investigation of bacterial diversity using 16S rRNA sequencing and prediction of its functionalities in Moroccan phosphate mine ecosystem. *Scientific Reports*. 2022;12(1). [doi:10.1038/s41598-022-07765-5](https://doi.org/10.1038/s41598-022-07765-5)
11. Azevedo, A., Guimarães, L., Ferraz, J., Whiting, M., & Magalhães-Sant'Ana, M. (2021). Pet reptiles—are we meeting their needs?. *Animals*, 11(10), 2964. <https://doi.org/10.3390/ani11102964>
12. Babalola MO, Balogun JA. THE ECOLOGY AND POTENTIAL HEALTH RISK OF THE ORAL MICROFLORA OF *Python regius* and *Clelia scyntalina*. *International Journal Of Microbiology Research*. 2013;5(1):349-356. [doi:10.9735/0975-5276.5.1.349-356](https://doi.org/10.9735/0975-5276.5.1.349-356)
13. Barbosa LN, Ferreira RS Jr, Mello PL, et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Bothrops insularis* bacterial and fungal microbiota.

- Journal Of Toxicology And Environmental Health.* 2018;81(6):142-153.  
[doi:10.1080/15287394.2017.1395581](https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1395581)
14. Bidell MR, Hobbs ALV, Lodise TP. Gut microbiome health and dysbiosis: A clinical primer. *Pharmacotherapy The Journal Of Human Pharmacology And Drug Therapy.* 2022;42(11):849-857. [doi:10.1002/phar.2731](https://doi.org/10.1002/phar.2731)
  15. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2019;38(6):1059-1070. [doi:10.1007/s10096-019-03520-3](https://doi.org/10.1007/s10096-019-03520-3)
  16. Brahma, R. K., McCleary, R. J. R., Kini, R. M. & Doley, R. Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. *Toxicon* 93, 1–10 (2015).
  17. Buxton, R. (2005). Blood agar plates and hemolysis protocols. *American Society for Microbiology*, 15, 1-9.
  18. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal.* 2017;11(12):2639-2643. [doi:10.1038/ismej.2017.119](https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119)
  19. Calvete JJ. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. *Biochemical Journal.* 2017;474(5):611-634. [doi:10.1042/bcj20160577](https://doi.org/10.1042/bcj20160577)
  20. Campagner MV, Bosco SMG, Bagagli E, et al. Microbiological Evaluation of Different Strategies for Management of Snakes in Captivity. *Journal Of Toxicology And Environmental Health.* 2012;75(16-17):1070-1080.  
[doi:10.1080/15287394.2012.697837](https://doi.org/10.1080/15287394.2012.697837)

21. Campbell, J. A., & Lamar, W. W. (2004). The venomous reptiles of the Western Hemisphere. Comstock Publishing Associates.
22. Campos-Ulate A, Fres-Miranda B, Bolívar-Zúñiga J, Gamboa-Alvarado J, Casasola-Salas W. Antibioticoterapia y microorganismos asociados a infección por mordedura de serpientes en Costa Rica y Latinoamérica. *Revista Hispanoamericana de Ciencias de la Salud*. 2024;10(2):92-103. [doi:10.56239/rhcs.2024.102.765](https://doi.org/10.56239/rhcs.2024.102.765)
23. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*. 2012;6(8):1621-1624. [doi:10.1038/ismej.2012.8](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8)
24. Casewell NR, Jackson TNW, Laustsen AH, Sunagar K. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. *Trends In Pharmacological Sciences*. 2020;41(8):570-581. [doi:10.1016/j.tips.2020.05.006](https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006)
25. Cercenado E, Saavedra-Lozano J. El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría Continuada*. 2009;7(4):214-217. [doi:10.1016/s1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/10.1016/s1696-2818(09)71927-4)
26. Cheng, Y., Li, Y., Xiong, Y., Zou, Y., Chen, S., Zhang, W., ... & Shi, Y. (2020). Liver-specific knockdown of angptl8 alters the structure of the gut microbiota in mice. *Annals of Microbiology*, 70(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01599-0>
27. Chinga, A. V., L., E. G., Seni, A., & Arévalo, N. C. (s/f). *Ophidian: general aspects and incidences research done at Dr. Verdi Cevallos Balda Hospital in Portoviejo, Province Manabí*. Edu.ec. Recuperado el 5 de agosto de 2024, de <https://rmedicina.ucsg.edu.ec/archivo/9.4/RM.9.4.06.pdf>

28. Chippaux JP. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *The Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases*. 2017;23(1). doi:10.1186/s40409-017-0127-6
29. Chippaux, J. (2017). Incidence and mortality due to snakebite in the americas. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(6), e0005662. doi.org/10.1371/journal.pntd.0005662
30. Chuang, P., Lin, W., Chen, Y., Chien, C., Chiu, I., & Tsai, T. (2022). Oral bacteria and their antibiotic susceptibilities in taiwanese venomous snakes. *Microorganisms*, 10(5), 951. doi.org/10.3390/microorganisms10050951
31. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004;17(4):840-862. doi:10.1128/cmr.17.4.840-862.2004
32. Colston TJ, Jackson CR. Microbiome evolution along divergent branches of the vertebrate tree of life: what is known and unknown. *Molecular Ecology*. 2016;25(16):3776-3800. doi:10.1111/mec.13730
33. Cruz Quintana, Sandra Margarita, Díaz Sjöstrom, Pedro, Arias Socarrás, Dunier, & Mazón Baldeón, Gloria Marlene. (2017). Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Revista Cubana de Estomatología*, 54(1), 84-99. Recuperado en 06 de febrero de 2025, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75072017000100008&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072017000100008&lng=es&tlng=es).
34. Del Brutto OH, Del Brutto VJ. Neurological complications of venomous snake bites: a review. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2011;125(6):363-372. doi:10.1111/j.1600-0404.2011.01593.x

35. Denegri MEG, Bustillo S, Romero-Vargas F, Leiva LC, Acosta OC. Actividades farmacológicas de la fosfolipasa A2 Ba SpII RP4 del veneno de *Bothrops alternatus*. *Revista Veterinaria*. 2012;23(1):25. doi:10.30972/vet.2311801
36. Dettori S, Portunato F, Vena A, Giacobbe DR, Bassetti M. Severe infections caused by difficult-to-treat Gram-negative bacteria. *Current Opinion In Critical Care*. 2023;29(5):438-445. doi:10.1097/mcc.0000000000001074
37. DeVine, D., Marsh, P. D., & Meade, J. (2015). Modulation of host responses by oral commensal bacteria. *Journal of Oral Microbiology*, 7(1), 26941. <https://doi.org/10.3402/jom.v7.26941>
38. Diab MR, Yassin AS, Amin M, Zedan H. Snake Antivenom Immunoglobulin Gram-Negative Bacteria during the Preparation of Polyvalent Quality Control Testing for Tracking Endotoxin-Producing. <https://www.semanticscholar.org/paper/Snake-Antivenom-Immunoglobulin-Gram-Negative-during-Diab-Yassin/6aa4ed6cf58dfdfd901cbcefb64c62115267f59c>. Published 2015.
39. Dipineto L, Russo TP, Calabria M, et al. Oral flora of *Python regius* kept as pets. *Letters In Applied Microbiology*. 2014;58(5):462-465. doi:10.1111/lam.12214
40. earthmicrobiome. <https://earthmicrobiome.org/>.
41. Egwuatu, T., Ogunrinde, O., Osibeluwo, B., & Osuagwu, C. (2023). Carbapenemase Genes in Gram-Negative Bacteria: Detection and Implications in Clinical Isolates from Patient Samples. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G. Microbiology*, 15(2), 13-25. doi:10.21608/eajbsg.2023.310649
- Novelli M, Bolla JM. RND Efflux Pump Induction: A Crucial Network Unveiling Adaptive Antibiotic Resistance Mechanisms of

Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*. 2024;13(6):501.

[doi:10.3390/antibiotics13060501](https://doi.org/10.3390/antibiotics13060501)

42. Eriquez LA, Hodinka NE. Development of a test system for rapid differentiation of *Neisseria* and *Haemophilus* spp. *Journal Of Clinical Microbiology*. 1983;18(5):1032-1039. [doi:10.1128/jcm.18.5.1032-1039.1983](https://doi.org/10.1128/jcm.18.5.1032-1039.1983)
43. Esmailshirazifard E, Usher L, Trim C, et al. Microbial adaptation to venom is common in snakes and spiders. *bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. junio 2018. [doi:10.1101/348433](https://doi.org/10.1101/348433)
44. Estrada JEC, Guerrero TN, Reyes-Enríquez DF, et al. Potential Biotechnological Applications of Venoms from the Viperidae Family in Central America for Thrombosis. *Toxins*. 2024;16(3):142. [doi:10.3390/toxins16030142](https://doi.org/10.3390/toxins16030142)
45. Fakruddin Md, Mannan KSB, Andrews S. Viable but Nonculturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective. *ISRN Microbiology*. 2013;2013:1-6. [doi:10.1155/2013/703813](https://doi.org/10.1155/2013/703813)
46. Fan HW, Monteiro WM. History and perspectives on how to ensure antivenom accessibility in the most remote areas in Brazil. *Toxicon*. 2018;151:15-23. [doi:10.1016/j.toxicon.2018.06.070](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.070)
47. Feitosa, E. L., Sampaio, V. d. S., Salinas, J., Queiroz, A. M., Silva, I. M. d., Gomes, A. A., ... & Monteiro, W. M. (2015). Older age and time to medical assistance are associated with severity and mortality of snakebites in the brazilian amazon: a case-control study. *Plos One*, 10(7), e0132237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132237>
48. Ferreira RS Junior, Siqueira AK, Campagner MV, et al. Comparison of wildlife and captivity rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) microbiota. *Pesquisa*

*Veterinária Brasileira*. 2009;29(12):999-1003. doi:10.1590/s0100-736x2009001200008

49. Feva. (2022). Las serpientes: biología, casos clínicos y accidentes ofídicos. Federación Veterinaria Argentina. Recuperado de <https://federacionveterinaria.com.ar/curso-virtual-las-serpientes-biologia-casos-clinicos-y-accidentes-ofidicos/>
50. Fonseca M, Moreira W, Cunha K, Ribeiro A, Almeida M. Oral microbiota of Brazilian captive snakes. *The Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases*. 2009;15(1):54-60. doi:10.1590/s1678-91992009000100006
51. Franco-Gonzalez JF, Matamoros-Recio A, Torres-Mozas A, Rodrigo-Lacave B, Martin-Santamaria S. Lipid-A-dependent and cholesterol-dependent dynamics properties of liposomes from gram-negative bacteria in ESKAPE. *Scientific Reports*. 2022;12(1). doi:10.1038/s41598-022-22886-7
52. Franzosa EA, Morgan XC, Segata N, et al. Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*. 2014;111(22). doi:10.1073/pnas.1319284111
53. Galanti, L., Shasha, D., & Gunsalus, K. C. (2021). Pheniqs 2.0: accurate, high-performance bayesian decoding and confidence estimation for combinatorial barcode indexing. *BMC Bioinformatics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04267-5>
54. Garg A, Sujatha S, Garg J, Acharya NS, Parija SC. Wound infections secondary to snakebite. *The Journal Of Infection In Developing Countries*. 2009;3(03). doi:10.3855/jidc.39

55. Garner O, Mochon A, Branda J, et al. Multi-centre evaluation of mass spectrometric identification of anaerobic bacteria using the VITEK® MS system. *Clinical Microbiology And Infection*. 2013;20(4):335-339. doi:10.1111/1469-0691.12317
56. Gilbert JA, Jansson JK, Knight R. The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biology*. 2014;12(1). doi:10.1186/s12915-014-0069-1
57. Gilbert JA, Quinn RA, Debelius J, et al. Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature*. 2016;535(7610):94-103. doi:10.1038/nature18850
58. Gill, A. C., Wiggert, J. v. d., Blow, F., & Darby, A. C. (2016). Evaluation of lysis methods for the extraction of bacterial dna for analysis of the vaginal microbiota. *Plos One*, 11(9), e0163148. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163148>
59. Girish, K. S., Katkar, G. D., Harrison, R. A., & Kemparaju, K. (2019). Research into the causes of venom-induced mortality and morbidity identifies new therapeutic opportunities. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(5), 1043-1048. [doi.org/10.4269/ajtmh.17-0877](https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0877)
60. Girling, S. J., & Raiti, P. (2004). *Veterinary nursing of exotic pets*. John Wiley & Sons.
61. Goldstein EJ, Tyrrell KL, Citron DM, Cox CR, Recchio IM, Okimoto B, Bryja J, Fry BG. Anaerobic and aerobic bacteriology of the saliva and gingiva from 16 captive Komodo dragons (*Varanus komodoensis*): new implications for the "bacteria as venom" model. *J Zoo Wildl Med*. 2013 Jun;44(2):262-72. doi:10.1638/2012-0022R.1.

62. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. 2016;17(6):333-351. doi:10.1038/nrg.2016.49
63. Gracheva EO, Ingolia NT, Kelly YM, et al. Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature*. 2010;464(7291):1006-1011. doi:10.1038/nature08943
64. Gutiérrez J, Escalante T, Rucavado A, Herrera C. Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. *Toxins*. 2016;8(4):93. doi:10.3390/toxins8040093
65. Gutiérrez JM, Burnouf T, Harrison RA, et al. A Call for Incorporating Social Research in the Global Struggle against Snakebite. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(9):e0003960. doi:10.1371/journal.pntd.0003960
66. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3(1). doi:10.1038/nrdp.2017.63
67. Gutiérrez JM, Warrell DA, Williams DJ, et al. The Need for Full Integration of Snakebite Envenoming within a Global Strategy to Combat the Neglected Tropical Diseases: The Way Forward. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(6):e2162. doi:10.1371/journal.pntd.0002162
68. Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW, Warrell DA. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*. 2010;56(7):1223-1235. doi:10.1016/j.toxicon.2009.11.020
69. Gutiérrez, J. M. (2011). Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. *Boletín de*

<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113263739>

70. Gutiérrez, J. M. (2019). Snakebite envenoming in Central America. *Toxicon*, 167, 83-102.
71. Habib AG, Kuznik A, Hamza M, et al. Snakebite is Under Appreciated: Appraisal of Burden from West Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(9):e0004088. doi:10.1371/journal.pntd.0004088
72. Hadavand, F., Naseri, S. R., Mardani, M., Tabarsi, P., Keyvanfar, A., Gachkar, L., ... & Aghazade, K. (2024). An outbreak of pan-drug resistant providencia species in an intensive care unit: a case-series. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 19(3). <https://doi.org/10.5812/archcid-145826>
73. Harr KE, Alleman AR, Dennis PM, et al. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguanas. *Journal Of The American Veterinary Medical Association*. 2001;218(6):915-921. doi:10.2460/javma.2001.218.915
74. Haughton, M. A. (2019). Caracterización clínico-epidemiológica de los accidentes ofídicos, Hospital Luis Chicho Fábrega, Santiago de Veraguas, enero 2015 a diciembre 2017. *Revista Médica Panamérica*, 38(1), 13-19.
75. Houcke, S., Résière, D., Lontsingoula, G. R., Cook, F., Lafouasse, P., Pujo, J. M., ... & Kallel, H. (2022). Characteristics of snakebite-related infection in french guiana. *Toxins*, 14(2), 89. [doi.org/10.3390/toxins14020089](https://doi.org/10.3390/toxins14020089)
76. Hu, S., Lou, Z., Shen, Y., & Tu, M. (2022). Bacteriological studies of venomous snakebite wounds in hangzhou, southeast china. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(4), 925-929. [doi.org/10.4269/ajtmh.21-1314](https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-1314)

77. Hu, X., Yang, L., Zhang, Y., Yang, M., Li, J., Fan, Y., ... & Tian, Z. (2024). Fecal and oral microbiome analysis of snakes from china reveals a novel natural emerging disease reservoir. *Frontiers in Microbiology*, 14. [doi.org/10.3389/fmicb.2023.1339188](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1339188)
78. Huang, W., Kao, C., Mao, Y., Lai, C., Lai, K., Lai, C., ... & Liu, P. (2021). *Shewanella* algae and *Morganella morganii* coinfection in cobra-bite wounds: a genomic analysis. *Life*, 11(4), 329. [doi.org/10.3390/life11040329](https://doi.org/10.3390/life11040329)
79. Illumina (2013). 16S Metagenomic Sequencing Library preparation. Part # 15044223 Rev. B [https://support.illumina.com/downloads/16s\\_metagenomic\\_sequencing\\_library\\_preparation.html](https://support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html).
80. J., A. F. G., H., R. G. B., G., M. A. M., Rodríguez, C. A., & Zuluaga, A. F. R. (2017). Caracterización de los casos de accidente ofídico atendidos por el centro de información y estudio de medicamentos y tóxicos (ciemto) de medellín, colombia durante 2016. *Revista De La Universidad Industrial De Santander. Salud*, 49(3), 450-457. <https://doi.org/10.18273/revsal.v49n3-2017003>
81. Jacobson, E. R. (2007). *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text*. CRC Press.
82. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal Of Clinical Microbiology*. 2007;45(9):2761-2764. [doi:10.1128/jcm.01228-07](https://doi.org/10.1128/jcm.01228-07)

83. Jho, Y.-S., Park, D.-H., Lee, J.-H., & Lyoo, Y. (2011). Aerobic bacteria from oral cavities and cloaca of snakes in a petting zoo. *Korean J Vet Res*, 51(3), 243–247.
84. Jimenez-Canale, J., Velázquez-Contreras, E. F., & Sarabia-Sainz, J. A. (2022). Potencial farmacológico de venenos de serpientes de sonora, México. *Epistemus*, 16(33). <https://doi.org/10.36790/epistemus.v16i33.226>
85. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*. 2019;10(1). [doi:10.1038/s41467-019-13036-1](https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1)
86. Jurburg, S. D., Konzack, M., Eisenhauer, N., & Heintz-Buschart, A. (2020). The archives are half-empty: a field-wide assessment of the availability of microbial community sequencing data.. <https://doi.org/10.1101/2020.04.28.063271>
87. Kapinusova G, Marin MAL, Uhlik O. Reaching unreachables: Obstacles and successes of microbial cultivation and their reasons. *Frontiers In Microbiology*. 2023;14. [doi:10.3389/fmicb.2023.1089630](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1089630)
88. Karlsson F, Tremaroli V, Nielsen J, Bäckhed F. Assessing the Human Gut Microbiota in Metabolic Diseases. *Diabetes*. 2013;62(10):3341-3349. [doi:10.2337/db13-0844](https://doi.org/10.2337/db13-0844)
89. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, De Silva N, et al. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Medicine*. 2008;5(11):e218. [doi:10.1371/journal.pmed.0050218](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218)
90. Kipanyula, M. J. and Kimaro, W. H. (2015). Snakes and snakebite envenoming in northern tanzania: a neglected tropical health problem. *Journal of Venomous*

Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 21(1).

<https://doi.org/10.1186/s40409-015-0033-8>

91. Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*. 2018;16(7):410-422. doi:10.1038/s41579-018-0029-9
92. Kovačević Z, Čabarkapa I, Šarić L, et al. Natural Solutions to Antimicrobial Resistance: The Role of Essential Oils in Poultry Meat Preservation with Focus on Gram-Negative Bacteria. *Foods*. 2024;13(23):3905. doi:10.3390/foods13233905
93. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied And Environmental Microbiology*. 2013;79(17):5112-5120. doi:10.1128/aem.01043-13
94. Krecsák L, Zamfirescu S, Korsos Z. An updated overview of the distribution of the Moldavian Steppe Viper (*Vipera ursinii moldavica* Nilson, *ResearchGate*. Published online 1 de enero de 2003. [https://www.researchgate.net/publication/285699617\\_An\\_updated\\_overview\\_of\\_the\\_distribution\\_of\\_the\\_Moldavian\\_Steppe\\_Viper\\_Vipera\\_ursinii\\_moldavica\\_Nilson\\_Andren\\_and\\_Joger\\_1993](https://www.researchgate.net/publication/285699617_An_updated_overview_of_the_distribution_of_the_Moldavian_Steppe_Viper_Vipera_ursinii_moldavica_Nilson_Andren_and_Joger_1993)
95. Krishnankutty, S. P., Muraleedharan, M., Perumal, R. C., Michael, S., Benny, J., Balan, B., ... & Zachariah, A. (2018). Next-generation sequencing analysis reveals high bacterial diversity in wild venomous and non-venomous snakes

- from india.. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 24(1). [doi.org/10.1186/s40409-018-0181-8](https://doi.org/10.1186/s40409-018-0181-8)
96. Lagier JC., Armougom F, Million M, et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology And Infection*. 2012;18(12):1185-1193. [doi:10.1111/1469-0691.12023](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12023)
97. Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jan;28(1):237-64. [doi: 10.1128/CMR.00014-14](https://doi.org/10.1128/CMR.00014-14).
98. Lam KK, Crow P, Ng KH, Shek KC, Fung HT, Ades G, Grioni A, Tan KS, Yip KT, Lung DC, Que TL, Lam TS, Simpson ID, Tsui KL, Kam CW. A cross-sectional survey of snake oral bacterial flora from Hong Kong, SAR, China. *Emerg Med J*. 2011 Feb;28(2):107-14. [doi: 10.1136/emj.2009.086694](https://doi.org/10.1136/emj.2009.086694).
99. Laugier J. The "comfort timing" strategy: a potential pathway for the cultivation of uncultured microorganisms and a possible adaptation for environmental colonisation. *FEMS Microbiol Ecol*. 2023 Mar 23;99(4):fiad026. [doi: 10.1093/femsec/fiad026](https://doi.org/10.1093/femsec/fiad026).
100. Leão I, De Carvalho TB, Henriques V, Ferreira C, Sampaio-Maia B, Manaia CM. Pseudomonadota in the oral cavity: a glimpse into the environment-human nexus. *Applied Microbiology And Biotechnology*. 2022;107(2-3):517-534. [doi:10.1007/s00253-022-12333-y](https://doi.org/10.1007/s00253-022-12333-y)
101. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers In Microbiology*. 2014;5. [doi:10.3389/fmicb.2014.00258](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258)

102. Li MN, Han Q, Wang N, Wang T, You XM, Zhang S, Zhang CC, Shi YQ, Qiao PZ, Man CL, Feng T, Li YY, Zhu Z, Quan KJ, Xu TL, Zhang GF. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification and infectious disease diagnosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2024 Dec 20;739:150974. doi:  
[10.1016/j.bbrc.2024.150974](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150974).
103. Lillywhite HB, Brischoux F. Is it better in the moonlight? Nocturnal activity of insular cottonmouth snakes increases with lunar light levels. *Journal Of Zoology.* 2011;286(3):194-199. doi:[10.1111/j.1469-7998.2011.00866.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2011.00866.x)
104. Lin WH, Tsai TS, Chuang PC. The Presence of Four Pathogenic Oral Bacterial Species in Six Wild Snake Species from Southern Taiwan: Associated Factors. *Microorganisms.* 2024;12(2):263. doi:[10.3390/microorganisms12020263](https://doi.org/10.3390/microorganisms12020263)
105. Lin WH, Tsai TS. Comparisons of the Oral Microbiota from Seven Species of Wild Venomous Snakes in Taiwan Using the High-Throughput Amplicon Sequencing of the Full-Length 16S rRNA Gene. *Biology.* 2023;12(9):1206. doi:[10.3390/biology12091206](https://doi.org/10.3390/biology12091206)
106. Liu, P., Ling-ling, W., Tseng, S., Huang, C., Cheng, C., Mao, Y., ... & Tung, K. (2017). Colistin resistance of pseudomonas aeruginosa isolated from snakes in taiwan. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology,* 2017, 1-5. [doi.org/10.1155/2017/7058396](https://doi.org/10.1155/2017/7058396)
107. Lizarazo, J., Patiño, R., Lizarazo, D., & Osorio, G. (2020). Hemorragia cerebral fatal después de una mordedura de serpiente bothrops asper en la región del catatumbo, colombia. *Biomédica,* 40(4), 609-615. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5181>

108. Lloyd KG, Steen AD, Ladau J, Yin J, Crosby L. Phylogenetically novel uncultured microbial cells dominate Earth microbiomes. *mSystems*. 2018;3(5). [doi:10.1128/msystems.00055-18](https://doi.org/10.1128/msystems.00055-18)
109. Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, et al. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*. 2017;550(7674):61-66. [doi:10.1038/nature23889](https://doi.org/10.1038/nature23889)
110. Lomonte B, Rey-Suárez P, Tsai WC, et al. Snake venomomics of the pit vipers *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas*, and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: Toxicological and taxonomical insights. *Journal Of Proteomics*. 2011;75(5):1675-1689. [doi:10.1016/j.jprot.2011.12.016](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.016)
111. Longhi G, Argentini C, Fontana F, et al. Saponin treatment for eukaryotic DNA depletion alters the microbial DNA profiles by reducing the abundance of Gram-negative bacteria in metagenomics analyses. *Microbiome Research Reports*. 2023;3(1). [doi:10.20517/mrr.2023.02](https://doi.org/10.20517/mrr.2023.02)
112. López, N., Lopera, C., & Ramírez, A. (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 Médica Colombiana*, 33(3), 127-134.
113. Lorch JM, Knowles S, Lankton JS, et al. Snake fungal disease: an emerging threat to wild snakes. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B Biological Sciences*. 2016;371(1709):20150457. [doi:10.1098/rstb.2015.0457](https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0457)
114. Magalhães, S. F. V., Peixoto, H. M., Freitas, L. R. S. d., Monteiro, W. M., & Oliveira, M. R. F. d. (2022). Snakebites caused by the genera *Bothrops* and *Lachesis* in the Brazilian Amazon: a study of factors associated with severe cases

- and death. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 55.  
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0558-2021>
115. Magdaleno-Tapial J, Valenzuela-Oñate C, Weth MMGVD, et al. Aislamiento de *Haemophilus* spp. en exudados uretrales como posible agente etiológico de uretritis aguda: estudio de 38 casos. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2018;110(1):38-42. [doi:10.1016/j.ad.2018.09.003](https://doi.org/10.1016/j.ad.2018.09.003)
116. Malani A, Keoliya A. A Study of Snake Oral Flora-An Aid in Management of Snake Bite. *Indian Journal Of Forensic Medicine & Toxicology*. 2016;10(2):47.  
[doi:10.5958/0973-9130.2016.00060.8](https://doi.org/10.5958/0973-9130.2016.00060.8)
117. Manos J, Belas R. The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. En: *Springer eBooks*. ; 2006:245-269. [doi:10.1007/0-387-30746-x\\_12](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x_12)
118. Mao, Y., Chuang, H., Shih, C., Hsieh, H., Jiang, Y., Chiang, L., ... & Liu, P. (2021). An investigation of conventional microbial culture for the naja atra bite wound, and the comparison between culture-based 16s sanger sequencing and 16s metagenomics of the snake oropharyngeal bacterial microbiota. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(4), e0009331.  
[doi.org/10.1371/journal.pntd.0009331](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009331)
119. Maritz B, Penner J, Martins M, et al. Identifying global priorities for the conservation of vipers. *Biological Conservation*. 2016;204:94-102.  
[doi:10.1016/j.biocon.2016.05.004](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.05.004)
120. Martins, N. B., Ferreira, L. A. R., Queiroz, C. L., Buiatte, A. B. G., Lima, A. M. C., Souza, R. R. d., ... & Santos, A. L. Q. (2021). Caseous stomatitis caused by *pseudomonas aeruginosa* in *boa constrictor amarali*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 49. [doi.org/10.22456/1679-9216.105257](https://doi.org/10.22456/1679-9216.105257)

121. Meeran, S. S., T, R. K., & Thomson, S. (2016). A study on clinical profile of snakebite victims in a semiurban tertiary care centre. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 5(57), 3894-3897. <https://doi.org/10.14260/jemds/2016/892>
122. Mejía-Toro, S., & Hoyos-Pulgarín, L. (2021). Complicaciones infecciosas en pacientes con accidente ofídico. *Biblioteca Digital Universidad de Antioquia*. Recuperado de [https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/20303/1/MejiaSantiago\\_HoyosLina\\_2021\\_AccidenteOf%C3%ADdico.pdf](https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/20303/1/MejiaSantiago_HoyosLina_2021_AccidenteOf%C3%ADdico.pdf)
123. Ministerio de Salud de Panamá. (2021). Situación Epidemiológica de la Picadura de Alacrán y Mordedura de Ofidio en la República de Panamá. Años: 2020 y 2021.
124. Mohammadzadeh A, Mardaneh J, Ahmadi R, Adabi J. Evaluation of the Virulence Features and Antibiotic Resistance Patterns of Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Gonabad, Iran. <https://www.semanticscholar.org/paper/Evaluation-of-the-Virulence-Features-and-Antibiotic-Mohammadzadeh-Mardaneh/e35a93d566d1a8889fdf5ad169c0611f744081c6>. Published 2017.
125. Mohapatra, B., Warrell, D. A., Suraweera, W., Bhatia, P., Dhingra, N., Jotkar, R., ... & Jha, P. (2011). Snakebite mortality in india: a nationally representative mortality survey. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4), e1018. [doi.org/10.1371/journal.pntd.0001018](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001018)
126. Morgan KN, Tromborg CT. Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science*. 2006;102(3-4):262-302. [doi:10.1016/j.applanim.2006.05.032](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.05.032)

127. Munford RS. Sensing Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides: a Human Disease Determinant? *Infection And Immunity*. 2007;76(2):454-465. [doi:10.1128/iai.00939-07](https://doi.org/10.1128/iai.00939-07)
128. Nikaido, H. 1996. Outer membrane, p. 29-47. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, Jr., B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
129. Nina-Cueva, O., Olazabal-Chambilla, D. Y., Quispe-Arpasi, J., Alzamora-Sánchez, A., Gomes-Helena, M., & Huancahuire-Vega, S. (2020). Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente *bothrops roedingeri mertens*, 1942, y sus actividades edematógena, hemorrágica y miotóxica. *Biomédica*, 40(4), 682-692. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5228>
130. Nossa CW, Oberdorf WE, Yang L, et al. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World Journal Of Gastroenterology*. 2010;16(33):4135. [doi:10.3748/wjg.v16.i33.4135](https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i33.4135)
131. Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2019). Situación de los laboratorios públicos productores de antivenenos en las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 43, e92.
132. Osorio, J. F. D., Sánchez, A., Fierro, L., Garzón, S., & Castaño, R. S. (2023). Venenos de serpientes y moléculas antiveneno. *Revista De La Academia Colombiana De Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 31(118), 109-137. [https://doi.org/10.18257/raccefyn.31\(118\).2007.2320](https://doi.org/10.18257/raccefyn.31(118).2007.2320)

133. Otto, S. J. G., Haworth-Brockman, M., Miazga-Rodriguez, M., Wierzbowski, A., & Saxinger, L. (2022). Integrated surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial use: evaluation of the status in Canada (2014–2019). *Canadian Journal of Public Health*, 113(1), 11-22. <https://doi.org/10.17269/s41997-021-00600-w>
134. Ozcan N, Bacalan F, Cakir F, Akpolat N. Identification and antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria isolated from clinical samples. *Journal Of Bacteriology & Mycology Open Access*. 2020;8(1). [doi:10.15406/jbmoa.2020.08.00269](https://doi.org/10.15406/jbmoa.2020.08.00269)
135. Özen AI, Ussery DW. Defining the Pseudomonas Genus: Where Do We Draw the Line with Azotobacter? *Microbial Ecology*. 2011;63(2):239-248. [doi:10.1007/s00248-011-9914-8](https://doi.org/10.1007/s00248-011-9914-8)
136. PANAFTOSA. (2022). Cada año, aproximadamente 5 millones de personas son mordidas por serpientes. Organización Panamericana de la Salud.
137. PANAFTOSA. (2023). Más de 130.000 personas mueren cada año por mordedura de serpiente en el mundo. Organización Panamericana de la Salud.
138. Panda, S. K., Padhi, L., & Sahoo, G. (2018). Oral bacterial flora of Indian cobra (naja naja) and their antibiotic susceptibilities. *Heliyon*, 4(12), e01008. [doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01008](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01008)
139. Panta, D. A. M., Mero, P. L. C., & Mejía, J. P. C. (2020). Síndrome hemolítico urémico posterior a ingesta de veneno de serpiente Bothrops: reporte de un caso. *Revista Colombiana De Nefrología*, 7(2). <https://doi.org/10.22265/acnef.7.2.444>

140. Paré JA. An Overview of Pentastomiasis in Reptiles and Other Vertebrates. *Journal Of Exotic Pet Medicine*. 2008;17(4):285-294. [doi:10.1053/j.jepm.2008.07.005](https://doi.org/10.1053/j.jepm.2008.07.005)
141. Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2011;35(5):820-855. [doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x)
142. Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S., & Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena Infectología*, 36(2), 180–189.
143. Peters EJ. Molecular microbiology in surgery. *Br J Surg*. 2016 Jun;103(7):783-5. [doi: 10.1002/bjs.10185](https://doi.org/10.1002/bjs.10185). Epub 2016 Apr 7. PMID: 27061398.
144. Prescilla Ledezma, Alexa. Biodiversidad microbiológica de la cavidad bucal y el veneno de la serpiente *Bothrops asper* en Panamá - UP-RID - Repositorio Institucional Digital de la Universidad de Panamá. 2014. <https://up-rid.up.ac.pa/6350/>.
145. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*. 2017;35(9):833-844. [doi:10.1038/nbt.3935](https://doi.org/10.1038/nbt.3935)
146. Quintana-Castillo, J. C., Ávila-Gómez, I. C., Ceballos-Ruiz, J. F., Muñoz, L. J. V., & Estrada-Gómez, S. (2017). Efecto citotóxico de fosfolipasas a2 del veneno de *crotalus durissus cumanensis* de Colombia. *Revista Investigación en Salud Universidad De Boyacá*, 4(1), 16-37. <https://doi.org/10.24267/23897325.194>
147. Raeside, J. (2011). A proving of *Hydrophis cyanocinctus*. *Homeopathy*, 100(1-2), 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.homp.2011.02.008>

148. Rahimzadeh M, Shahbazi S, Sabzi S, Habibi M, Karam MRA. Antibiotic Resistance and Genetic Diversity Among *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Urinary Tract Infections in Iran. *Future Microbiology*. 2023;18(16):1171-1183. [doi:10.2217/fmb-2023-0118](https://doi.org/10.2217/fmb-2023-0118)
149. Rajni, E., Jain, A., Garg, V. K., Sharma, R., Vohra, R., & Jain, S. (2022). *Providencia* causing urinary tract infections: are we reaching a dead end?. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 26(4), 448-453. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-24163>
150. Rappé MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annual Review Of Microbiology*. 2003;57(1):369-394. [doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090759](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759)
151. Résière D, Olive C, Kallel H, et al. Oral Microbiota of the Snake *Bothrops lanceolatus* in Martinique. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*. 2018;15(10):2122. [doi:10.3390/ijerph15102122](https://doi.org/10.3390/ijerph15102122)
152. Resiere, D., Mehdaoui, H., Névière, R., Olive, C., Severyns, M., Beaudoin, A., ... & Kallel, H. (2020). Infectious complications following snakebite by *bothrops lanceolatus* in martinique: a case series. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(1), 232-240. [doi.org/10.4269/ajtmh.19-0369](https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0369)
153. Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-ThroughPut Sequencing Technologies. *Molecular Cell*. 2015;58(4):586-597. [doi:10.1016/j.molcel.2015.05.004](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004)
154. Rivas GA, Pose E, Delfederico L. Estudio de Biodiversidad por Técnicas Dependientes e Independientes de Cultivo de una Bodega Ubicada en una

Región Re-emergente Argentina. *Divulgatio Perfiles Académicos de Posgrado*. 2024;8(23):23-45. [doi:10.48160/25913530di23.430](https://doi.org/10.48160/25913530di23.430)

155. Roberts, N. L. S., Johnson, E. K., Zeng, S., Hamilton, E. B., Abdoli, A., Alahdab, F., ... & Ong, K. L. (2022). Global mortality of snakebite envenoming between 1990 and 2019. *Nature Communications*, 13(1). [doi.org/10.1038/s41467-022-33627-9](https://doi.org/10.1038/s41467-022-33627-9)
156. Rokyta DR, Wray KP, Margres MJ. The genesis of an exceptionally lethal venom in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) revealed through comparative venom-gland transcriptomics. *BMC Genomics*. 2013;14(1):394. [doi:10.1186/1471-2164-14-394](https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-394)
157. Rokyta DR, Wray KP, McGivern JJ, Margres MJ. The transcriptomic and proteomic basis for the evolution of a novel venom phenotype within the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*). *Toxicon*. 2015;98:34-48. [doi:10.1016/j.toxicon.2015.02.015](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.015)
158. Rooney AM, Cochrane K, Fedsin S, et al. A microbial consortium alters intestinal Pseudomonadota and antimicrobial resistance genes in individuals with recurrent *Clostridioides difficile* infection. *mBio*. julio 2023. [doi:10.1128/mbio.03482-22](https://doi.org/10.1128/mbio.03482-22)
159. Rosselló GAM, Pérez MÁB. Antibiograma rápido en Microbiología Clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2015;34(1):61-68. [doi:10.1016/j.eimc.2014.11.014](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.11.014)
160. Rudnick, W., Mukhi, S., Reid-Smith, R., German, G. J., Nichani, A., & Mulvey, M. R. (2022). Overview of Canada's antimicrobial resistance network (amrnet): a data-driven one health approach to antimicrobial resistance surveillance.

Canada Communicable Disease Report, 48(11/12), 522-528.

<https://doi.org/10.14745/ccdr.v48i1112a05>

161. Rueda, A. Q. and Soares, A. M. (2010). Functional and structural characterization of phospholipases a<sup>2</sup> isolated from bothrops asper snake venom in panamá. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 16(4), 664-664. <https://doi.org/10.1590/s1678-91992010000400019>
162. Rueda, A. Q., Rodríguez, I. G., Arantes, E. C., Setúbal, S. d. S., Calderón, L. A., Zuliani, J. P., ... & Soares, A. M. (2013). Biochemical characterization, action on macrophages, and superoxide anion production of four basic phospholipases a<sup>2</sup> from panamanian bothrops asper snake venom. *BioMed Research International*, 2013, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2013/789689>
163. Saldarriaga MM, Otero R, Núñez V, Toro MF, DÍAz A, Gutiérrez JM. Ontogenetic variability of Bothrops atrox and Bothrops asper snake venoms from Colombia. *Toxicon*. 2003;42(4):405-411. [doi:10.1016/s0041-0101\(03\)00171-5](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(03)00171-5)
164. Samonis G, Vouloumanou EK, Christofaki M, et al. Serratia infections in a general hospital: characteristics and outcomes. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2011;30(5):653-660. [doi:10.1007/s10096-010-1135-4](https://doi.org/10.1007/s10096-010-1135-4)
165. Sarkar, B., Sultana, A., Binti, N. N., Chowdhury, F. T., Afrin, S., Mohammad, F., ... & Rahman, M. S. (2024). Nature&#217;s pharmacy under siege: investigating antibiotic resistance pattern in endophytic bacteria of medicinal plants. *Advances in Microbiology*, 14(04), 183-208. [doi.org/10.4236/aim.2024.144014](https://doi.org/10.4236/aim.2024.144014)

166. Sasa, M. and Cano, S. E. S. (2020). New insights into snakebite epidemiology in costa rica: a retrospective evaluation of medical records. *Toxicon*: X, 7, 100055. [doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100055](https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100055)
167. Savage, J. (2002). The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna Between Two Continents, Between Two Seas. *ResearchGate*. Savage J. The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna Between Two Continents, Between Two Seas. *ResearchGate*. Published online 1 de enero de 2002. [https://www.researchgate.net/publication/37695427\\_The\\_Amphibians\\_and\\_Reptiles\\_of\\_Costa\\_Rica\\_A\\_Herpetofauna\\_Between\\_Two\\_Continents\\_Between\\_Two\\_Seas](https://www.researchgate.net/publication/37695427_The_Amphibians_and_Reptiles_of_Costa_Rica_A_Herpetofauna_Between_Two_Continents_Between_Two_Seas)
168. Schachtschneider, K. M., Yeoman, C. J., Isaacson, R. E., White, B. A., Schook, L. B., & Pieters, M. (2013). Modulation of systemic immune responses through commensal gastrointestinal microbiota. *PLoS ONE*, 8(1), e53969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053969>
169. Schumacher J. Selected Infectious Diseases of Wild Reptiles and Amphibians. *Journal Of Exotic Pet Medicine*. 2006;15(1):18-24. [doi:10.1053/j.jepm.2005.11.004](https://doi.org/10.1053/j.jepm.2005.11.004)
170. SEDLÁŘ, K. Methods for comparative analysis of metagenomic data. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Electrical Engineering and Communication, Department of Biomedical Engineering, 2018. 124 p. Doctoral thesis. Doctoral thesis supervisor: prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
171. Seni J, Akaro IL, Mkinze B, et al. Gastrointestinal Tract Colonization Rate of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria and

- Associated Factors Among Orthopaedic Patients in a Tertiary Hospital in Tanzania: Implications for Infection Prevention. *Infection And Drug Resistance*. 2021;Volume 14:1733-1745. [doi:10.2147/idr.s303860](https://doi.org/10.2147/idr.s303860)
172. Shaikh IK, Dixit PP, Pawade BS, Potnis-Lele M, Kurhe BP. Assessment of Cultivable Oral Bacterial Flora from Important Venomous Snakes of India and Their Antibiotic Susceptibilities. *Current Microbiology*. 2017;74(11):1278-1286. [doi:10.1007/s00284-017-1313-z](https://doi.org/10.1007/s00284-017-1313-z)
173. Shek KC, Tsui KL, Lam KK, Crow P, Ng KH, Ades G, Yip KT, Gioni A, Tan KS, Lung DC, Lam TS, Fung HT, Que TL, Kam CW. Oral bacterial flora of the Chinese cobra (*Naja atra*) and bamboo pit viper (*Trimeresurus albolabris*) in Hong Kong SAR, China. *Hong Kong Med J*. 2009 Jun;15(3):183-90. PMID: 19494373.
174. Sheraba NS, Diab MR, Yassin AS, Amin MA, Zedan HH. Quality Control Testing for Tracking Endotoxin-Producing Gram-Negative Bacteria during the Preparation of Polyvalent Snake Antivenom Immunoglobulin. *PubMed*. 2015;69(4):499-510. [doi:10.5731/pdajpst.2015.01058](https://doi.org/10.5731/pdajpst.2015.01058)
175. Shine R, Olsson M, Moore I, Lemaster M, Greene M, Mason R. Body size enhances mating success in male garter snakes. *Animal Behaviour*. 2000;59(3):F4-F11. [doi:10.1006/anbe.1999.1338](https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1338)
176. Shine R. Reproductive strategies in snakes. *Proceedings Of The Royal Society B Biological Sciences*. 2003;270(1519):995-1004. [doi:10.1098/rspb.2002.2307](https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2307)
177. Silva, H. D., Kasturiratne, A., Pathmeswaran, A., & Laloo, D. G. (2013). Snakebite: the true disease burden has yet to be determined. *Ceylon Medical Journal*, 58(3), 93. [doi.org/10.4038/cmj.v58i3.6101](https://doi.org/10.4038/cmj.v58i3.6101)

178. Solórzano, A. (1997). Notes on the reproduction of the Costa Rican pit viper *Porthidium picadoi* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Copeia*, 1990(4), 1154-1157.
179. Solórzano, A. (2004). *Serpientes de Costa Rica: Distribución, taxonomía e historia natural*. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio).
180. Sood, S. and Nerurkar, V. (2014). Fatal necrotizing soft tissue infection by aeromonas hydrophila. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. [doi.org/10.7860/jcdr/2014/7833.4270](https://doi.org/10.7860/jcdr/2014/7833.4270)
181. Spain, M., Fuller, G., & Allard, S. (2020). Effects of habitat modifications on behavioral indicators of welfare for madagascar giant hognose snakes (*leioheterodon madagascariensis*). *Animal Behavior and Cognition*, 7(1), 70-81. <https://doi.org/10.26451/abc.07.01.06.2020>
182. Spawls, S., Howell, K., Hinkel, H., & Menegon, M. (2018). *Field Guide to East African Reptiles*. 2<sup>nd</sup> edition. Bloomsbury Publishing.
183. Steen AD, Crits-Christoph A, Carini P, et al. High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured. *The ISME Journal*. 2019;13(12):3126-3130. [doi:10.1038/s41396-019-0484-y](https://doi.org/10.1038/s41396-019-0484-y)
184. Stenglein MD, Guzman DSM, Garcia VE, et al. Differential Disease Susceptibilities in Experimentally Reptarenavirus-Infected Boa Constrictors and Ball Pythons. *Journal Of Virology*. 2017;91(15). [doi:10.1128/jvi.00451-17](https://doi.org/10.1128/jvi.00451-17)
185. Su, H., Hussain, B., Hsu, B., Lee, K., Mao, Y., Chiang, L., ... & Chen, J. (2023). Bacterial community analysis identifies *klebsiella pneumoniae* as a native symbiotic bacterium in the newborn protobothrops mucrosquamatus. *BMC Microbiology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02936-4>

186. Sukumar, S., Roberts, A. P., Martin, F. E., & Adler, C. (2016). Metagenomic insights into transferable antibiotic resistance in oral bacteria. *Journal of Dental Research*, 95(9), 969-976. [doi.org/10.1177/0022034516648944](https://doi.org/10.1177/0022034516648944)
187. Tanaka T, Kawasaki K, Daimon S, Kitagawa W, Yamamoto K, Tamaki H, Tanaka M, Nakatsu CH, Kamagata Y. A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Dec;80(24):7659-66. doi: 10.1128/AEM.02741-14.
188. Tang, W., Zhu, G., Shi, Q., Yang, S., Ma, T., Mishra, S. K., ... & Li, D. (2019). Characterizing the microbiota in gastrointestinal tract segments of rhabdophis subminiatus: dynamic changes and functional predictions. *MicrobiologyOpen*, 8(7). <https://doi.org/10.1002/mbo3.789>
189. Terán, M. and Lomonte, B. (2016). Actividad letal de seis venenos de serpientes de importancia médica en el ecuador. *Revista Ecuatoriana De Medicina Y Ciencias Biológicas*, 37(2). <https://doi.org/10.26807/remcb.v37i2.4>
190. Tetzlaff SJ, Allender M, Ravesi M, Smith J, Kingsbury B. First report of snake fungal disease from Michigan, USA involving Massasaugas, *Sistrurus catenatus* (Rafinesque 1818). <https://www.biotaxa.org/hn/article/view/9658>. Published 10 de marzo de 2015.
191. Torres Galvis, T, Vidales Serrano, O y Yela Caicedo, A. (2019). *Descripción de la microbiota oral de las serpientes de los géneros Bothrops, Lachesis y Crotalus asociada a infecciones secundarias por accidente ofídico en latinoamérica. Revisión bibliográfica.* Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

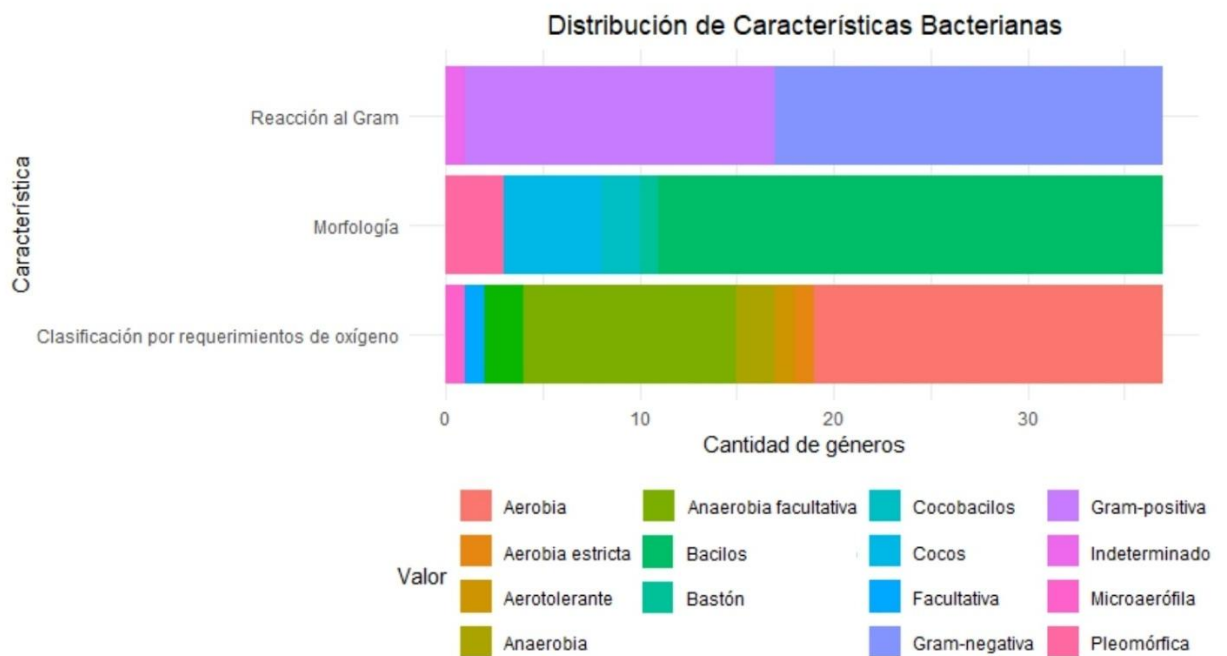
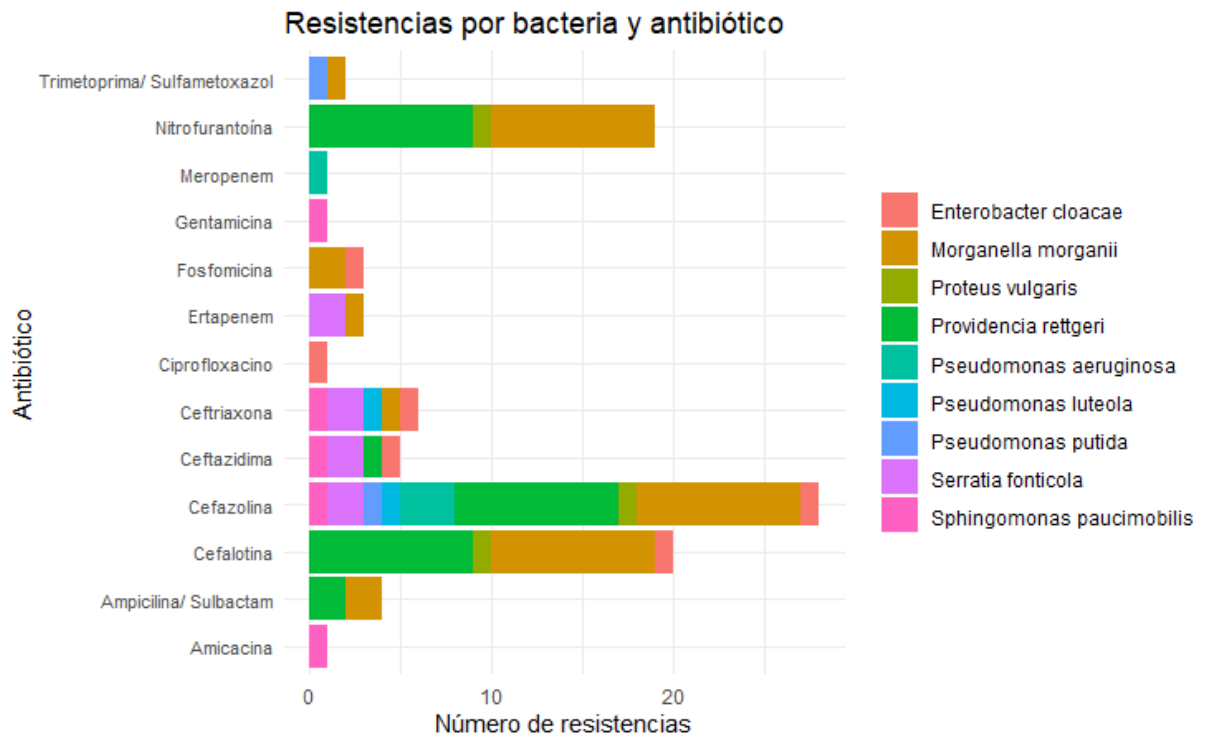
192. Tully, T. N., Mitchell, M. A., & Jackson, C. G. (2018). Reptile medicine and surgery in clinical practice. John Wiley & Sons.
193. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. *Nature*. 2007;449(7164):804-810. [doi:10.1038/nature06244](https://doi.org/10.1038/nature06244)
194. Vaiyapuri, S., Vaiyapuri, R., Ashokan, R., Ramasamy, K., Nattamaisundar, K., Jeyaraj, A., ... & Hutchinson, E. G. (2013). Snakebite and its socio-economic impact on the rural population of tamil nadu, india. *PLoS ONE*, 8(11), e80090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080090>
195. Valderrama, A. (2003). Accidente ofídico en Panamá: Epidemiología, fisiopatología y manejo. *Revista Médica de Panamá*, 16(1), 28-36.
196. Valencia, B. M. and Zavaleta, A. (2017). La medicina complementaria en el tratamiento de las enfermedades tropicales desatendidas: accidentes ofídicos. *Revista Peruana De Medicina Integrativa*, 2(1), 58-67. <https://doi.org/10.26722/rpmi.2017.21.45>
197. Valsan C, Rao TV, Sathiavathy A. A case of Snakebite complicated by *Morganella morganii* subspecies *morganii* Biogroup I infection. <https://ispub.com/IJID/6/2/12447>. Published 31 de diciembre de 2007.
198. Vargas, C. M., Chinchá-Lino, O., Vilcapoma, P., & Morante, D. (2020). Update on snake bites. *Revista Médica Herediana*, 31(1), 48-55. <https://doi.org/10.20453/rmh.v31i1.3729>
199. Vargas, C. M., Chinchá-Lino, O., Vilcapoma, P., & Morante, D. (2020). Update on snake bites. *Revista Médica Herediana*, 31(1), 48-55. <https://doi.org/10.20453/rmh.v31i1.3729>

200. Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. Published online 27 de abril de 2010:no. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x
201. Vásquez-Cruz V. REPRODUCCIÓN DE LA SERPIENTE TEPOXO, *Atropoides nummifer* (SERPENTES: VIPERIDAE), EN CAUTIVERIO. *Revista Latinoamericana de Herpetología*. 2018;1(2):29. doi:10.22201/fc.25942158e.2018.2.30
202. Vila J, Álvarez-Martínez MJ, Buesa J, Castillo J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009;27(7):406-411. doi:10.1016/j.eimc.2008.11.009
203. vLex Panamá. (2023). Ley N° 421: Que promueve la investigación, desarrollo, producción y comercialización de sueros antiponzoñosos, antivenenos y otros antídotos en Panamá.
204. Waeyenberge, J. V., Aerts, J., Hellebuyck, T., Pasmans, F., & Martel, A. (2018). Stress bij in het wild en in gevangenschap levende slangen: kwantificatie, gevolgen en het belang van management. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 87(2). <https://doi.org/10.21825/vdt.v87i2.16082>
205. Wafula, S. T., Namakula, L. N., Ninsiima, L. R., Ssekamatte, N. K., Walekhwa, A. W., Mugume, I. B., ... & Musoke, D. (2023). Barriers and opportunities for improving management of snakebites: perspectives of healthcare workers in northern uganda. *Plos One*, 18(9), e0291032. [doi.org/10.1371/journal.pone.0291032](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0291032)

206. Wagener, M., Naidoo, M., & Aldous, C. (2017). Wound infection secondary to snakebite. *South African Medical Journal*, 107(4), 315. [doi.org/10.7196/samj.2017.v107i4.12084](https://doi.org/10.7196/samj.2017.v107i4.12084)
207. Wang J, Jia H. Metagenome-wide association studies: fine-mining the microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14(8):508-522. [doi:10.1038/nrmicro.2016.83](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.83)
208. Warrell DA. Snake bite. *The Lancet*. (2010);375(9708):77-88. [doi:10.1016/s0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(09)61754-2)
209. Warwick C, Arena P, Lindley S, Jessop M, Steedman C. Assessing reptile welfare using behavioural criteria. *In Practice*. 2013;35(3):123-131. [doi:10.1136/inp.f1197](https://doi.org/10.1136/inp.f1197)
210. Warwick C, Arena P, Steedman C. Spatial considerations for captive snakes. *Journal Of Veterinary Behavior*. 2019;30:37-48. [doi:10.1016/j.jveb.2018.12.006](https://doi.org/10.1016/j.jveb.2018.12.006)
211. Wen-Yu H. Identification and Biological Characteristics of Staphylococcus lentus Strain Isolated from Hamsters. <https://www.semanticscholar.org/paper/Identification-and-Biological-Characteristics-of-Wen-yu/0274cb0cf2b4e1348b2ec7a997dd1e33adf79c8a>. Published 2010.
212. Williams DJ, Faiz MA, Abela-Ridder B, et al. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2019;13(2):e0007059. [doi:10.1371/journal.pntd.0007059](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007059)

213. Wüster W, Golay P, Warrell DA. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics. *Toxicon*. 1997;35(3):319-340. doi:10.1016/s0041-0101(96)00152-3
214. Yang B, Wang Y, Qian PY. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*. 2016 Mar 22;17:135. doi: 10.1186/s12859-016-0992-y
215. Yuan C, Wei Y, Zhang S, et al. Comparative Genomic Analysis Reveals Genetic Mechanisms of the Variety of Pathogenicity, Antibiotic Resistance, and Environmental Adaptation of *Providencia* Genus. *Frontiers In Microbiology*. 2020;11. doi:10.3389/fmicb.2020.572642
216. Zalas, P., Michalska, A., & Gospodarek, E. (2012). Mechanizmy oporności na antybiotyki *Morganella* sp .rods – characteristics, infections, mechanisms of resistance to antibiotics. *Postepy Hig Med Dosw*, 66, 242–251.
217. Zhang, B., Ren, J., Yang, D., Liu, S., & Gong, X. (2019). Comparative analysis and characterization of the gut microbiota of four farmed snakes from southern china. *PeerJ*, 7, e6658. <https://doi.org/10.7717/peerj.6658>

## 12. Anexos



Fuente: Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia *Viperidae* en cautiverio.



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO

COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN Y EL BIENESTAR DE LOS ANIMALES (CEIBA)

Panamá, 10 de julio de 2024

CEIBA-UP-032-2024

Investigadora  
**STEPHANY YOUNG**  
Facultad de Medicina  
E. S. D.

Respetado Investigador:

El Comité de Ética de la Investigación y el Bienestar de los Animales de la Universidad de Panamá CEIBAUP otorga **aval** al protocolo de investigación titulado: **“Estudio de la diversidad bacteriana presente en la cavidad oral y el veneno de serpientes de la familia Viperidae en cautiverio en el CIIMET”**, investigador principal: Stephany Young Yusty.

Se le agradece que finalizada la investigación haga entrega de una copia del informe final de esta investigación al CEIBAUP.

Sin más que agregar,

Atentamente,

**Dr. Julio Ramos**

Presidente

# 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

## *Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System*

Introduction	2
16S Library Preparation Workflow	5
Amplicon PCR	6
PCR Clean-Up	8
Index PCR	10
PCR Clean-Up 2	13
[Optional] Validate Library	15
Library Quantification, Normalization, and Pooling	16
Library Denaturing and MiSeq Sample Loading	17
MiSeq Reporter Metagenomics Workflow	20
Supporting Information	21

### **IMPORTANT NOTICE**

This document provides information for an application for Illumina technology that has been demonstrated internally and may be of interest to customers. This information is provided as-is and is not an Illumina product and is not accompanied by any rights or warranties. Customers using or adapting this information should obtain any licenses required and materials from authorized vendors. Illumina products mentioned herein are for research use only unless marked otherwise. While customer feedback is welcomed, this application is not supported by Illumina Technical Support and Field Application Scientists.

## Introduction

Metagenomic studies are commonly performed by analyzing the prokaryotic 16S ribosomal RNA gene (16S rRNA), which is approximately 1,500 bp long and contains nine variable regions interspersed between conserved regions. Variable regions of 16S rRNA are frequently used in phylogenetic classifications such as genus or species in diverse microbial populations.

Which 16S rRNA region to sequence is an area of debate, and your region of interest might vary depending on things such as experimental objectives, design, and sample type. This protocol describes a method for preparing samples for sequencing the variable V3 and V4 regions of the 16S rRNA gene. This protocol can also be used for sequencing other regions with different region-specific primers. This protocol combined with a benchtop sequencing system, on-board primary analysis, and secondary analysis using MiSeq Reporter or BaseSpace, provides a comprehensive workflow for 16S rRNA amplicon sequencing.

Workflow Summary:

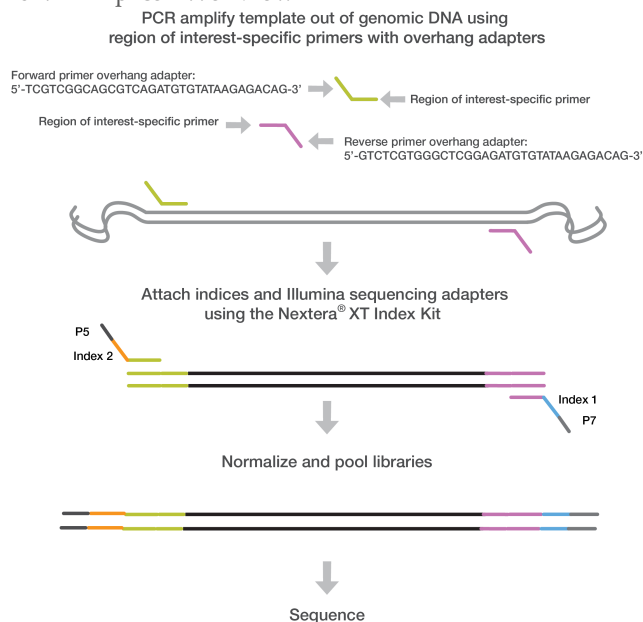
- 1 Order amplicon primers—The protocol includes the primer pair sequences for the V3 and V4 region that create a single amplicon of approximately ~460 bp. The protocol also includes overhang adapter sequences that must be appended to the primer pair sequences for compatibility with Illumina index and sequencing adapters. Illumina does not sell these primers. They must be ordered from a third party. See [Amplicon Primers, on page 3](#) for more information on amplicon primers.
- 2 Prepare library—The protocol describes the steps to amplify the V3 and V4 region and using a limited cycle PCR, add Illumina sequencing adapters and dual-index barcodes to the amplicon target. Using the full complement of Nextera XT indices, up to 96 libraries can be pooled together for sequencing.
- 3 Sequence on MiSeq—Using paired 300-bp reads, and MiSeq v3 reagents, the ends of each read are overlapped to generate high-quality, full-length reads of the V3 and V4 region in a single 65-hour run. The MiSeq run output is approximately > 20 million reads and, assuming 96 indexed samples, can generate > 100,000 reads per sample, commonly recognized as sufficient for metagenomic surveys.
- 4 Analyze on MSR or BaseSpace—The Metagenomics workflow is a secondary analysis option built into the MiSeq Reporter (on-system software) or available on BaseSpace (cloud-based software). The Metagenomics Workflow performs a taxonomic classification using the Greengenes database showing genus or species level classification in a graphical format.

This protocol can be used to sequence alternative regions of the 16S rRNA gene and for other targeted amplicon sequences of interest. When using this protocol for amplicon sequencing other than 16S rRNA, use the Generate FASTQ Workflow (secondary analysis option). For more information, see [MiSeq Reporter Metagenomics Workflow, on page 20](#).



### DISCLAIMER

The information in this Illumina Demonstrated Protocol is being provided as a courtesy; in some cases reagents are required to be purchased from non-authorized third-party suppliers. Illumina does not guarantee nor promises technical support for the performance of our products used with reagents purchased from a non-authorized third-party supplier.

**Figure 1** 16S V3 and V4 Amplicon Workflow

User-defined forward and reverse primers that are complementary upstream and downstream of the region of interest are designed with overhang adapters, and used to amplify templates from genomic DNA. A subsequent limited-cycle amplification step is performed to add multiplexing indices and Illumina sequencing adapters. Libraries are normalized and pooled, and sequenced on the MiSeq system using v3 reagents.

## Amplicon Primers

- The gene-specific sequences used in this protocol target the 16S V3 and V4 region. They are selected from the Klindworth et al. publication (Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplles J, Quast C, et al. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41(1).) as the most promising bacterial primer pair. Illumina adapter overhang nucleotide sequences are added to the gene-specific sequences. The full length primer sequences, using standard IUPAC nucleotide nomenclature, to follow the protocol targeting this region are:  
 16S Amplicon PCR Forward Primer = 5'  
 TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG  
 16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5'  
 GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC
- This method can also be utilized to target other regions on the genome (either for 16S with other sets of primer pairs, or non-16S regions throughout the genome; ie any amplicon). The overhang adapter sequence must be added to the locus-specific primer for the region to be targeted (Figure 1). The Illumina overhang adapter sequences to be added to locus-specific sequences are:  
 Forward overhang: 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[locus-specific sequence]  
 Reverse overhang: 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[locus-specific sequence]

- The following considerations are recommended for designing other locus-specific primers:
  - a Illumina recommends targeting regions that result in an amplicon that when sequenced with paired-end reads has at least ~50 bp of overlapping sequence in the middle. For example, if running 2x300 bp paired-end reads Illumina recommends having an insert size of 550 bp or smaller so that the bases sequenced at the end of each read overlap.
  - b The locus-specific portion of primer (not including overhang sequence) must have a melting temperature ( $T_m$ ) of 60°–65°C. You can use online PCR primer sequence analysis tools (e.g. <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) to check the properties of primer designs. For the  $T_m$  calculation only, the gene-specific portion must be used in calculation. For hairpin and dimer calculations, the fully-assembled primer sequence (including the overhang) should be used.
  - c Illumina recommends using standard desalting purification when ordering oligo primer sets.



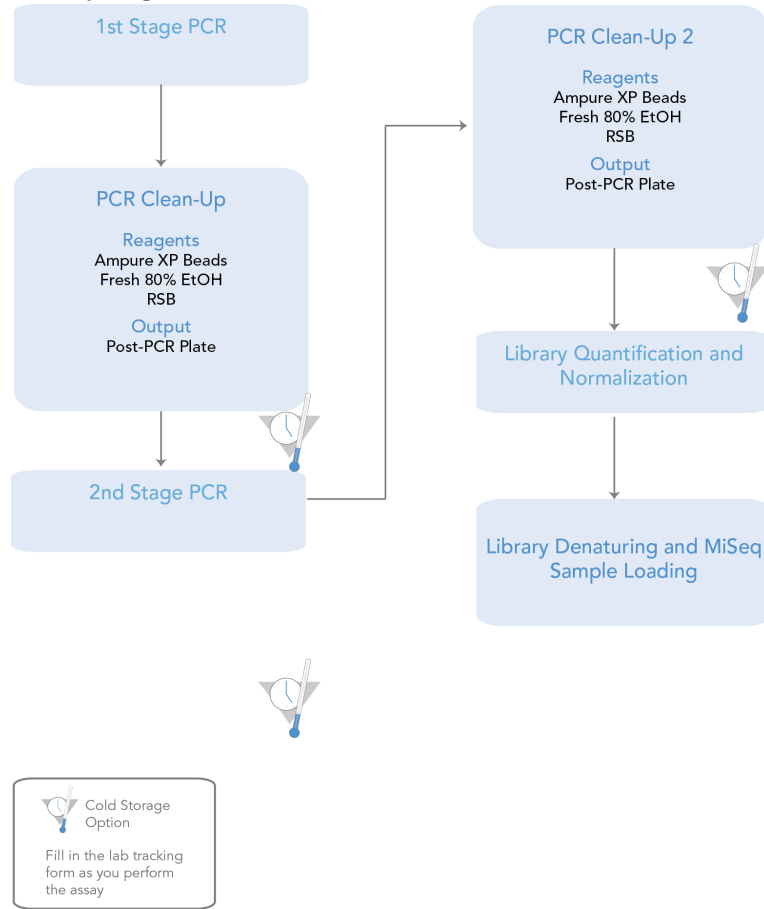
**NOTE**

For more information on reagents used in the protocol, see [Consumables and Equipment](#), on page 21.

# 16S Library Preparation Workflow

The following diagram illustrates the workflow using the 16S Library Preparation Protocol. Safe stopping points are marked between steps.

**Figure 2** 16S Library Preparation Workflow



## Amplicon PCR

This step uses PCR to amplify template out of a DNA sample using region of interest-specific primers with overhang adapters attached. For more information on primer sequences, see [Amplicon Primers](#), on page 3.

### Consumables



#### NOTE

For more information on consumables and equipment for this protocol see [Consumables and Equipment](#), on page 21.

Item	Quantity	Storage
Microbial Genomic DNA (5 ng/ $\mu$ l in 10 mM Tris pH 8.5)	2.5 $\mu$ l per sample	-15° to -25°C
Amplicon PCR Reverse Primer (1 $\mu$ M)	5 $\mu$ l per sample	-15° to -25°C
Amplicon PCR Forward Primer (1 $\mu$ M)	5 $\mu$ l per sample	-15° to -25°C
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5 $\mu$ l per sample	-15° to -25°C
Microseal 'A' film		
96-well 0.2 ml PCR plate	1 plate	
[Optional] Bioanalyzer chip (Agilent DNA 1000 kit catalog # 5067-1504)		

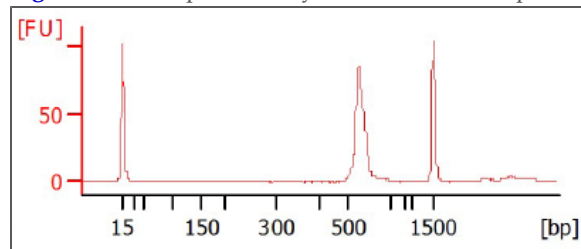
### Procedure

- 1 Set up the following reaction of DNA, 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, and primers:

	Volume
Microbial DNA (5 ng/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ l
Amplicon PCR Forward Primer 1 $\mu$ M	5 $\mu$ l
Amplicon PCR Reverse Primer 1 $\mu$ M	5 $\mu$ l
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

- 2 Seal plate and perform PCR in a thermal cycler using the following program:
  - 95°C for 3 minutes
  - 25 cycles of:
    - 95°C for 30 seconds
    - 55°C for 30 seconds
    - 72°C for 30 seconds
  - 72°C for 5 minutes
  - Hold at 4°C
- 3 **[Optional]** Run 1  $\mu$ l of the PCR product on a Bioanalyzer DNA 1000 chip to verify the size. Using the V3 and V4 primer pairs in the protocol, the expected size on a Bioanalyzer trace after the Amplicon PCR step is ~550 bp.

**Figure 3** Example Bioanalyzer Trace after Amplicon PCR Step



## PCR Clean-Up

This step uses AMPure XP beads to purify the 16S V3 and V4 amplicon away from free primers and primer dimer species.

### Consumables

Item	Quantity	Storage
10 mM Tris pH 8.5	52.5 $\mu$ l per sample	-15° to -25°C
AMPure XP beads	20 $\mu$ l per sample	2° to 8°C
Freshly Prepared 80% Ethanol (EtOH)	400 $\mu$ l per sample	
96-well 0.2 ml PCR plate	1 plate	
[Optional] Microseal 'B' film		
[Optional] 96-well MIDI plate	1 plate	

### Preparation

- Bring the AMPure XP beads to room temperature.

### Procedure

- 1 Centrifuge the Amplicon PCR plate at 1,000  $\times$  g at 20°C for 1 minute to collect condensation, carefully remove seal.
- 2 **[Optional - for use with shaker for mixing]** Using a multichannel pipette set to 25  $\mu$ l, transfer the entire Amplicon PCR product from the PCR plate to the MIDI plate. Change tips between samples.



#### NOTE

Transfer the sample to a 96-well MIDI plate if planning to use a shaker for mixing. If mixing by pipette, the sample can remain in the 96-well PCR plate.

- 3 Vortex the AMPure XP beads for 30 seconds to make sure that the beads are evenly dispersed. Add an appropriate volume of beads to a trough depending on the number of samples processing.
- 4 Using a multichannel pipette, add 20  $\mu$ l of AMPure XP beads to each well of the Amplicon PCR plate. Change tips between columns.
- 5 Gently pipette entire volume up and down 10 times if using a 96-well PCR plate or seal plate and shake at 1800 rpm for 2 minutes if using a MIDI plate.
- 6 Incubate at room temperature without shaking for 5 minutes.
- 7 Place the plate on a magnetic stand for 2 minutes or until the supernatant has cleared.
- 8 With the Amplicon PCR plate on the magnetic stand, use a multichannel pipette to remove and discard the supernatant. Change tips between samples.

- 9 With the Amplicon PCR plate on the magnetic stand, wash the beads with freshly prepared 80% ethanol as follows:
  - a Using a multichannel pipette, add 200  $\mu$ l of freshly prepared 80% ethanol to each sample well.
  - b Incubate the plate on the magnetic stand for 30 seconds.
  - c Carefully remove and discard the supernatant.
- 10 With the Amplicon PCR plate on the magnetic stand, perform a second ethanol wash as follows:
  - a Using a multichannel pipette, add 200  $\mu$ l of freshly prepared 80% ethanol to each sample well.
  - b Incubate the plate on the magnetic stand for 30 seconds.
  - c Carefully remove and discard the supernatant.
  - d Use a P20 multichannel pipette with fine pipette tips to remove excess ethanol.
- 11 With the Amplicon PCR plate still on the magnetic stand, allow the beads to air-dry for 10 minutes.
- 12 Remove the Amplicon PCR plate from the magnetic stand. Using a multichannel pipette, add 52.5  $\mu$ l of 10 mM Tris pH 8.5 to each well of the Amplicon PCR plate.
- 13 Gently pipette mix up and down 10 times, changing tips after each column (or seal plate and shake at 1800 rpm for 2 minutes). Make sure that beads are fully resuspended.
- 14 Incubate at room temperature for 2 minutes.
- 15 Place the plate on the magnetic stand for 2 minutes or until the supernatant has cleared.
- 16 Using a multichannel pipette, carefully transfer 50  $\mu$ l of the supernatant from the Amplicon PCR plate to a new 96-well PCR plate. Change tips between samples to avoid cross-contamination.

**SAFE STOPPING POINT**

If you do not immediately proceed to *Index PCR*, seal plate with Microseal "B" adhesive seal and store it at -15° to -25°C for up to a week.

## Index PCR

This step attaches dual indices and Illumina sequencing adapters using the Nextera XT Index Kit.

### Consumables

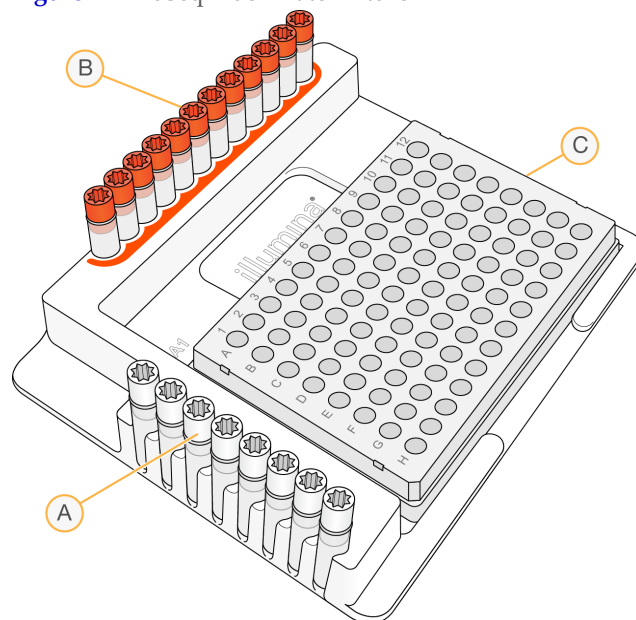
Item	Quantity	Storage
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µl per sample	-15° to -25°C
Nextera XT Index 1 Primers (N7XX) from the Nextera XT Index kit (FC-131-1001 or FC-131-1002)	5 µl per sample	-15° to -25°C
Nextera XT Index 2 Primers (S5XX) from the Nextera XT Index kit (FC-131-1001 or FC-131-1002)	5 µl per sample	-15° to -25°C
PCR Grade Water	10 µl per sample	
TruSeq Index Plate Fixture (FC-130-1005)	1	
96-well 0.2 ml PCR plate	1 plate	
Microseal 'A' film	1	

### Procedure

- Using a multichannel pipette, transfer 5 µl from each well to a new 96-well plate. The remaining 45 µl is not used in the protocol and can be stored for other uses.
- Arrange the Index 1 and 2 primers in a rack (i.e. the TruSeq Index Plate Fixture) using the following arrangements as needed:
  - Arrange Index 2 primer tubes (white caps, clear solution) vertically, aligned with rows A through H.
  - Arrange Index 1 primer tubes (orange caps, yellow solution) horizontally, aligned with columns 1 through 12.

For more information on index selection, see [Dual Indexing Principle](#), on page 23.

**Figure 4** TruSeq Index Plate Fixture



- A** Index 2 primers (white caps)
- B** Index 1 primers (orange caps)
- C** 96-well plate

- 3** Place the 96-well PCR plate with the 5  $\mu$ l of resuspended PCR product DNA in the TruSeq Index Plate Fixture.
- 4** Set up the following reaction of DNA, Index 1 and 2 primers, 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, and PCR Grade water:

	Volume
DNA	5 $\mu$ l
Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)	5 $\mu$ l
Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)	5 $\mu$ l
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 $\mu$ l
PCR Grade water	10 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

- 5** Gently pipette up and down 10 times to mix.
- 6** Cover the plate with Microseal 'A'.
- 7** Centrifuge the plate at 1,000  $\times$  g at 20°C for 1 minute.

- 8** Perform PCR on a thermal cycler using the following program:
  - 95°C for 3 minutes
  - 8 cycles of:
    - 95°C for 30 seconds
    - 55°C for 30 seconds
    - 72°C for 30 seconds
  - 72°C for 5 minutes
  - Hold at 4°C

## PCR Clean-Up 2

This step uses AMPure XP beads to clean up the final library before quantification.

### Consumables

Item	Quantity	Storage
10 mM Tris pH 8.5	27.5 $\mu$ l per sample	-15° to -25°C
AMPure XP beads	56 $\mu$ l per sample	2° to 8°C
Freshly Prepared 80% Ethanol (EtOH)	400 $\mu$ l per sample	
96-well 0.2 ml PCR plate	1 plate	
[Optional] Microseal 'B' film		
[Optional] 96-well MIDI plate	1 plate	

### Procedure

- 1 Centrifuge the Index PCR plate at  $280 \times g$  at 20°C for 1 minute to collect condensation.
- 2 **[Optional - for use with shaker for mixing]** Using a multichannel pipette set to 50  $\mu$ l, transfer the entire Index PCR product from the PCR plate to the MIDI plate. Change tips between samples.



#### NOTE

Transfer the sample to a 96-well MIDI plate if planning to use a shaker for mixing. If mixing by pipette, the sample can remain in the 96-well PCR plate.

- 3 Vortex the AMPure XP beads for 30 seconds to make sure that the beads are evenly dispersed. Add an appropriate volume of beads to a trough.
- 4 Using a multichannel pipette, add 56  $\mu$ l of AMPure XP beads to each well of the Index PCR plate.
- 5 Gently pipette mix up and down 10 times if using a 96-well PCR plate or seal plate and shake at 1800 rpm for 2 minutes if using a MIDI plate.
- 6 Incubate at room temperature without shaking for 5 minutes.
- 7 Place the plate on a magnetic stand for 2 minutes or until the supernatant has cleared.
- 8 With the Index PCR plate on the magnetic stand, use a multichannel pipette to remove and discard the supernatant. Change tips between samples.
- 9 With the Index PCR plate on the magnetic stand, wash the beads with freshly prepared 80% ethanol as follows:
  - a Using a multichannel pipette, add 200  $\mu$ l of freshly prepared 80% ethanol to each sample well.
  - b Incubate the plate on the magnetic stand for 30 seconds.
  - c Carefully remove and discard the supernatant.

- 10 With the Index PCR plate on the magnetic stand, perform a second ethanol wash as follows:
  - a Using a multichannel pipette, add 200  $\mu$ l of freshly prepared 80% ethanol to each sample well.
  - b Incubate the plate on the magnetic stand for 30 seconds.
  - c Carefully remove and discard the supernatant.
  - d Use a P20 multichannel pipette with fine pipette tips to remove excess ethanol.
- 11 With the Index PCR plate still on the magnetic stand, allow the beads to air-dry for 10 minutes.
- 12 Remove the Index PCR plate from the magnetic stand. Using a multichannel pipette, add 27.5  $\mu$ l of 10 mM Tris pH 8.5 to each well of the Index PCR plate.
- 13 If using a 96-well PCR plate, gently pipette mix up and down 10 times until beads are fully resuspended, changing tips after each column. If using a MIDI plate, seal plate and shake at 1800 rpm for 2 minutes.
- 14 Incubate at room temperature for 2 minutes.
- 15 Place the plate on the magnetic stand for 2 minutes or until the supernatant has cleared.
- 16 Using a multichannel pipette, carefully transfer 25  $\mu$ l of the supernatant from the Index PCR plate to a new 96-well PCR plate. Change tips between samples to avoid cross-contamination.



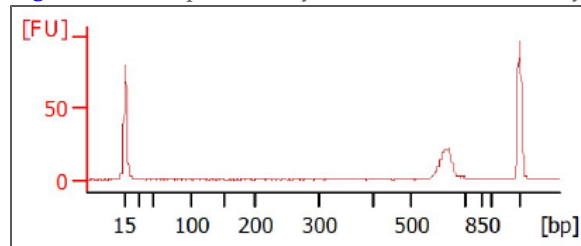
**SAFE STOPPING POINT**

If you do not plan to proceed to *Library Quantification, Normalization, and Pooling*, on page 16, seal the plate with Microseal "B" adhesive seal. Store the plate at -15° to -25°C for up to a week.

## [Optional] Validate Library

Run 1  $\mu\text{l}$  of a 1:50 dilution of the final library on a Bioanalyzer DNA 1000 chip to verify the size. Using the V3 and V4 primer pairs in the protocol, the expected size on a Bioanalyzer trace of the final library is ~630 bp.

**Figure 5** Example Bioanalyzer Trace of Final Library



## Library Quantification, Normalization, and Pooling

Illumina recommends quantifying your libraries using a fluorometric quantification method that uses dsDNA binding dyes.

Calculate DNA concentration in nM, based on the size of DNA amplicons as determined by an Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer trace:

$$\frac{(\text{concentration in ng}/\mu\text{l})}{(660 \text{ g/mol} \times \text{average library size})} \times 10^6 = \text{concentration in nM}$$

For example:

$$\frac{15 \text{ ng}/\mu\text{l}}{(660 \text{ g/mol} \times 500)} \times 10^6 = 45 \text{ nM}$$

Dilute concentrated final library using Resuspension Buffer (RSB) or 10 mM Tris pH 8.5 to 4 nM. Aliquot 5  $\mu\text{l}$  of diluted DNA from each library and mix aliquots for pooling libraries with unique indices. Depending on coverage needs, up to 96 libraries can be pooled for one MiSeq run.

For metagenomics samples, >100,000 reads per sample is sufficient to fully survey the bacterial composition. This number of reads allows for sample pooling to the maximum level of 96 libraries, given the MiSeq output of > 20 million reads.

## Library Denaturing and MiSeq Sample Loading

In preparation for cluster generation and sequencing, pooled libraries are denatured with NaOH, diluted with hybridization buffer, and then heat denatured before MiSeq sequencing. Each run must include a minimum of 5% PhiX to serve as an internal control for these low-diversity libraries. Illumina recommends using MiSeq v3 reagent kits for improved run metrics.

### Consumables

Item	Quantity	Storage
10 mM Tris pH 8.5 or RSB (Resuspension Buffer)	6 $\mu$ l	-15° to -25°C
HT1 (Hybridization Buffer)	1540 $\mu$ l	-15° to -25°C
0.2 N NaOH (less than a week old)	10 $\mu$ l	-15° to -25°C
PhiX Control Kit v3 (FC-110-3001)	4 $\mu$ l	-15° to -25°C
MiSeq reagent cartridge	1 cartridge	-15° to -25°C
1.7 ml microcentrifuge tubes (screw cap recommended)	3 tubes	
2.5 L ice bucket		

### Preparation

- 1 Set a heat block suitable for 1.7 ml microcentrifuge tubes to 96°C
- 2 Remove a MiSeq reagent cartridge from -15°C to -25°C storage and thaw at room temperature.
- 3 In an ice bucket, prepare an ice-water bath by combining 3 parts ice and 1 part water.

### Denature DNA

- 1 Combine the following volumes of pooled final DNA library and freshly diluted 0.2 N NaOH in a microcentrifuge tube:
  - 4 nM pooled library (5  $\mu$ l)
  - 0.2 N NaOH (5  $\mu$ l)
- 2 Set aside the remaining dilution of 0.2 N NaOH to prepare a PhiX control within the next 12 hours.
- 3 Vortex briefly to mix the sample solution, and then centrifuge the sample solution at 280  $\times$  g at 20°C for 1 minute.
- 4 Incubate for 5 minutes at room temperature to denature the DNA into single strands.
- 5 Add the following volume of pre-chilled HT1 to the tube containing denatured DNA:
  - Denatured DNA (10  $\mu$ l)

- Pre-chilled HT1 (990  $\mu$ l)
- Adding the HT1 results in a 20 pM denatured library in 1 mM NaOH.

- 6 Place the denatured DNA on ice until you are ready to proceed to final dilution.

## Dilute Denatured DNA

- 1 Dilute the denatured DNA to the desired concentration using the following example:



### NOTE

Illumina recommends targeting 800–1000 K/mm<sup>2</sup> raw cluster densities using MiSeq v3 reagents. It is suggested to start your first run using a 4 pM loading concentration and adjust subsequent runs appropriately.

Final Concentration	2 pM	4 pM	6 pM	8 pM	10 pM
20 pM denatured library	60 $\mu$ l	120 $\mu$ l	180 $\mu$ l	240 $\mu$ l	300 $\mu$ l
Pre-chilled HT1	540 $\mu$ l	480 $\mu$ l	420 $\mu$ l	360 $\mu$ l	300 $\mu$ l

- 2 Invert several times to mix and then pulse centrifuge the DNA solution.
- 3 Place the denatured and diluted DNA on ice.

## Denature and Dilution of PhiX Control

Use the following instructions to denature and dilute the 10 nM PhiX library to the same loading concentration as the Amplicon library. The final library mixture must contain at least 5% PhiX.

- 1 Combine the following volumes to dilute the PhiX library to 4 nM:
  - 10 nM PhiX library (2  $\mu$ l)
  - 10 mM Tris pH 8.5 (3  $\mu$ l)
- 2 Combine the following volumes of 4 nM PhiX and 0.2 N NaOH in a microcentrifuge tube:
  - 4 nM PhiX library (5  $\mu$ l)
  - 0.2 N NaOH (5  $\mu$ l)
- 3 Vortex briefly to mix the 2 nM PhiX library solution.
- 4 Incubate for 5 minutes at room temperature to denature the PhiX library into single strands.
- 5 Add the following volumes of pre-chilled HT1 to the tube containing denatured PhiX library to result in a 20 pM PhiX library:
  - Denatured PhiX library (10  $\mu$ l)
  - Pre-chilled HT1 (990  $\mu$ l)
- 6 Dilute the denatured 20 pM PhiX library to the same loading concentration as the Amplicon library as follows:

Final Concentration	2 pM	4 pM	6 pM	8 pM	10 pM
20 pM denatured library	60 $\mu$ l	120 $\mu$ l	180 $\mu$ l	240 $\mu$ l	300 $\mu$ l
Pre-chilled HT1	540 $\mu$ l	480 $\mu$ l	420 $\mu$ l	360 $\mu$ l	300 $\mu$ l

- 7 Invert several times to mix and then pulse centrifuge the DNA solution.
- 8 Place the denatured and diluted PhiX on ice.

## Combine Amplicon Library and PhiX Control



### NOTE

The recommended PhiX control spike-in of  $\geq 5\%$  for low diversity libraries is possible with RTA v1.17.28 or later, which is bundled with MCS v2.2. For optimal performance, update to v3 software (MCS 2.3). If you are using an older version of the MiSeq software or sequencing these libraries on the GA or HiSeq, Illumina recommends using  $\geq 25\%$  PhiX control spike-in.

- 1 Combine the following volumes of denatured PhiX control library and your denatured amplicon library in a microcentrifuge tube:
  - Denatured and diluted PhiX control (30  $\mu$ l)
  - Denatured and diluted amplicon library (570  $\mu$ l)
- 2 Set the combined sample library and PhiX control aside on ice until you are ready to heat denature the mixture immediately before loading it onto the MiSeq v3 reagent cartridge.
- 3 Using a heat block, incubate the combined library and PhiX control tube at 96°C for 2 minutes.
- 4 After the incubation, invert the tube 1–2 times to mix and immediately place in the ice-water bath.
- 5 Keep the tube in the ice-water bath for 5 minutes.



### NOTE

Perform the heat denaturation step immediately before loading the library into the MiSeq reagent cartridge to ensure efficient template loading on the MiSeq flow cell.

## MiSeq Reporter Metagenomics Workflow

After samples are loaded, the MiSeq system provides on-instrument secondary analysis using the MiSeq Reporter software (MSR). MSR provides several options for analyzing MiSeq sequencing data. For this demonstrated 16S protocol, select the Metagenomics workflow.

By following this 16S Metagenomics protocol, the Metagenomics workflow classifies organisms from your V3 and V4 amplicon using a database of 16S rRNA data. The classification is based on the Greengenes database (<http://greengenes.lbl.gov/>). The output of this workflow is a classification of reads at several taxonomic levels: kingdom, phylum, class, order, family, genus, and species. The analysis output includes:

- Clusters Graph – shows numbers of raw cluster, clusters passing filter, clusters that did not align, clusters not associated with an index, and duplicates.
- Sample Table – summarizes the sequencing results for each sample.
- Cluster Pie Chart – a graphical representation of the classification breakdown for each sample.

See the *MiSeq Reporter Metagenomics Workflow – Reference Guide* (Part # 15042317) for detailed instructions and guidance.

The method described in this 16S Metagenomics protocol can be used for any targeted amplicon sequencing, relevant to virus research, mutation detection, or other microbiology-related studies. If you use the protocol for other targeted amplicon sequencing studies, select the MiSeq Reporter Generate FASTQ Workflow for on-instrument generation of FASTQ files for downstream analysis. For specific guidance on the Generate FASTQ Workflow, see the *MiSeq Reporter Generate FASTQ Workflow – Reference Guide* (Part # 15042322).

## Supporting Information

The protocols described in this guide assume that you are familiar with the contents of this section and have obtained all of the requisite equipment and consumables.

### Acronyms

**Table 1** Acronyms

Acronym	Definition
HT1	Hybridization Buffer
IEM	Illumina Experiment Manager
MSR	MiSeq Reporter
PCR	Polymerase Chain Reaction
rRNA	Ribosomal RNA
RSB	Resuspension Buffer

### Consumables and Equipment

Check to make sure that you have all of the necessary user-supplied consumables and equipment before proceeding to sample preparation.

**Table 2** User-Supplied Consumables

Consumable	Supplier
1.7 ml microcentrifuge tubes	General lab supplier
10 $\mu$ l barrier pipette tips	General lab supplier
10 $\mu$ l multichannel pipettes	General lab supplier
10 $\mu$ l single channel pipettes	General lab supplier
20 $\mu$ l barrier pipette tips	General lab supplier
20 $\mu$ l multichannel pipettes	General lab supplier
20 $\mu$ l single channel pipettes	General lab supplier
200 $\mu$ l barrier pipette tips	General lab supplier
200 $\mu$ l multichannel pipettes	General lab supplier
200 $\mu$ l single channel pipettes	General lab supplier
1000 $\mu$ l barrier pipette tips	General lab supplier

Consumable	Supplier
1000 µl multichannel pipettes	General lab supplier
1000 µl single channel pipettes	General lab supplier
96-well 0.2 ml skirtless PCR plates or Twin.Tec 96-well PCR plates	Bio-Rad, part # MSP-9601
Agencourt AMPure XP 60 ml kit	Beckman Coulter Genomics, part # A63881
Ethanol 200 proof (absolute) for molecular biology (500 ml)	Sigma-Aldrich, part # E7023
Amplicon PCR Forward Primer (Standard desalting)	
Amplicon PCR Reverse Primer (Standard desalting)	
KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)	KAPA Biosystems, part # KK2601
Microseal 'A' adhesive seals	Bio-Rad, part # MSA-5001
Microseal 'B' adhesive seals	Bio-Rad, part # MSB-1001
MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle)	Illumina, catalog # MS-102-3003
Nextera XT Index Kit	Illumina, catalog # FC-131-1001 or Illumina, catalog # FC-131-1002
PhiX Control Kit v3	Illumina, catalog # FC-110-3001
PCR grade water	General lab supplier
Fluorometric quantitation with dsDNA binding dye reagents	General lab supplier
RNase/DNase-free 8-well PCR strip tubes and caps	General lab supplier
RNase/DNase-free multichannel reagent reservoirs, disposable	VWR, part # 89094-658
Tris-HCl 10 mM, pH 8.5	General lab supplier
[Optional] 96-well storage plates, round well, 0.8 ml ("MIDI" plate)	Fisher Scientific, part # AB-0859

**Table 3** User-Supplied Equipment

Equipment	Supplier
2.5 L ice bucket	General lab supplier
96-well thermal cycler (with heated lid)	General lab supplier

Equipment	Supplier
Fluorometer for quantitation with dsDNA binding dyes	General lab supplier
Magnetic stand-96	Life Technologies, catalog # AM10027
Microplate centrifuge	General lab supplier
TruSeq Index Plate Fixture Kit (reusable)	Illumina, catalog # FC-130-1005
[Optional] 2100 Bioanalyzer Desktop System	Agilent, part # G2940CA
[Optional] Agilent DNA 1000 Kit	Agilent, part # 5067-1504
[Optional] High Speed Micro Plate Shaker	VWR, catalog # 13500-890 (110V/120V) or VWR, catalog # 14216-214 (230V)

## Dual Indexing Principle

The dual indexing strategy uses two 8 base indices, Index 1 (i7) adjacent to the P7 sequence, and Index 2 (i5) adjacent to the P5 sequence. Dual indexing is enabled by adding a unique Index 1 (i7) and Index 2 (i5) to each sample. The 96 sample Nextera XT Index Kit (FC-131-1002) use 12 different Index 1 (i7) adapters (N701–N712) and 8 different Index 2 (i5) adapters (S501–S508). The 24 sample Nextera XT Index Kit (FC-131-1001) uses 6 different Index 1 (i7) adapters (N701–N706) and 4 different Index 2 (i5) adapters (S501–S504). In the Index adapter name, the N or S refers to Nextera XT sample preparation, 7 or 5 refers to Index 1 (i7) or Index 2 (i5), respectively. The 01–12 refers to the Index number. A list of index sequences is provided for generating sample sheets to demultiplex the samples:

Index 1 (i7)	Sequence	Index 2 (i5)	Sequence
N701	TAAGGCCGA	S501	TAGATCGC
N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	S503	TATCCTCT
N704	TCCTGAGC	S504	AGAGTAGA
N705	GGACTCCT	S505	GTAAGGAG
N706	TAGGCATG	S506	ACTGCATA
N707	CTCTCTAC	S507	AAGGAGTA
N708	CAGAGAGG	S508	CTAAGCCT
N709	GCTACGCT		
N710	CGAGGCTG		
N711	AAGAGGCA		
N712	GTAGAGGA		

## Low Plexity Pooling Guidelines

Illumina uses a green laser or LED to sequence G/T and a red laser or LED to sequence A/C. At each cycle, at least one of two nucleotides for each color channel are read to ensure proper registration. It is important to maintain color balance for each base of the index read being sequenced, otherwise index read sequencing could fail due to registration failure. If you choose the dual-indexed sequencing workflow, always use at least two unique and

compatible barcodes for each index (index 1 and index 2). The following tables illustrate possible pooling strategies:

**Table 4** Libraries Pooled: 6 or fewer; Sequencing Workflow: Single Index

Plex	Index 1 (i7) Selection	Index 2 (i5) Selection
1-plex (no pooling)	Any Index 1 adapter	Any Index 2 adapter
2-plex	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [option 1] N702 and N701</li> <li>• [option 2] N702 and N704</li> </ul>	
3-plex	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [option 1] N701, N702, and N704</li> <li>• [option 2] N703, N705, and N706</li> </ul>	
4- or 5-plex	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [option 1] N701, N702, N704, and any other Index 1 adapter</li> <li>• [option 2] N703, N705, N706, and any other Index 1 adapter</li> </ul>	
6-plex	N701, N702, N703, N704, N705, and N706	

**Table 5** Sequencing Workflow: Single or Dual Index

Plex	Index 1 (i7) Selection	Index 2 (i5) Selection
7–12 plex, Dual Index	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [option 1] N701, N702, N704, and any other Index 1 adapter (as needed)</li> <li>• [option 2] N703, N705, N706, and any other Index 1 adapter (as needed)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [option 1] S501 and S502</li> <li>• [option 2] S503 and S504</li> <li>• [option 3] S505 and S506</li> </ul>
7–12 plex, Single Index (96 sample Nextera Index adapter kit)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• N701–N706 and any other Index 1 adapter (as needed)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Any Index 2 (i5) adapter</li> </ul>
Greater than 12-plex	N701, N702, N703, N704, N705, N706, and any other Index 1 adapter	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [option 1] S501, S502, and any other Index 2 adapter (as needed)</li> <li>• [option 2] S503, S504, and any other Index 2 adapter (as needed)</li> <li>• [option 3] S505, S506, and any other Index 2 adapter (as needed)</li> </ul>

These strategies represent only some of the acceptable combinations. Alternatively, check the real sequences of each index in the tables to make sure that each base position has a signal in both color channels for the index read:

Good				Bad			
Index 1		Index 2		Index 1		Index 2	
705	GGACTCCT	503	TATCCTCT	705	GGACTCCT	502	CTCTCTAT
706	TAGGCATG	503	TATCCTCT	706	TAGGCATG	502	CTCTCTAT
701	TAAGGCGA	504	AGAGTAGA	701	TAAGGCGA	503	TATCCTCT
702	CGTACTAG	504	AGAGTAGA	702	CGTACTAG	503	TATCCTCT
	√√√√√√√√		√√√√√√√√		√√√√√√√√		√√√√xxxx

√=signal in both color

x=signal missing in one color channel

## Prevent PCR Product Contamination

The PCR process is commonly used in the laboratory to amplify specific DNA sequences. Unless proper laboratory hygiene is used, PCR products can contaminate reagents, instrumentation, and genomic DNA samples, causing inaccurate and unreliable results. PCR product contamination can shut down lab processes and significantly delay normal operations.

Make sure that the lab is set up appropriately to reduce the risk of PCR product contamination:

- **Physically Separate Pre-PCR and Post-PCR Areas**
  - Physically separate laboratory space where pre-PCR processes are performed (DNA extraction, quantification, and normalization) from the laboratory space where PCR products are made and processed (post-PCR processes).
  - Never use the same sink to wash pre-PCR and post-PCR troughs.
  - Never share water purification systems for pre-PCR and post-PCR processes.
  - Store all supplies used in the protocols in the pre-PCR area, and transfer to the post-PCR area as needed.
- **Use Dedicated Equipment and Supplies**
  - Dedicate separate full sets of equipment and supplies (pipettes, centrifuges, oven, heat block, etc.) to pre-PCR and post-PCR lab processes, and never share between processes.
  - Dedicate separate storage areas (freezers and refrigerators) to pre-PCR and post-PCR consumables.

Because the pre- and post-amplification reagents are shipped together, it is important to unpack the reagents in the pre-PCR lab area. After unpacking the reagents, move the post-amplification reagents to the proper post-PCR storage area.

## Pre-PCR and Post-PCR Lab Procedures

To prevent PCR product contamination, it is important to establish lab procedures and follow best practices. Illumina recommends daily and weekly cleaning of lab areas using

0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach).



**CAUTION**

To prevent sample or reagent degradation, make sure that all vapors from the cleaning solution have fully dissipated before beginning any processes.

## Daily Cleaning of Pre-PCR Area

A daily cleaning of the pre-PCR area using a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution helps to eliminate PCR product that has entered the pre-PCR area.

Identify pre-PCR areas that pose the highest risk of contamination, and clean these areas with a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution before beginning any pre-PCR processes. High-risk areas might include, but are not limited to, the following items:

- Benchtops
- Door handles
- Refrigerator/freezer door handles
- Computer mouse
- Keyboards

## Daily Cleaning of Post-PCR Area

Reducing the amount of PCR product in the post-PCR area helps reduce the risk of contamination in the pre-PCR area. Daily cleaning of the post-PCR area using a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution helps reduce the risk of contamination.

Identify post-PCR areas that pose the highest risk of contamination, and clean these areas with a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution daily. High-risk areas might include, but are not limited to, the following items:

- Thermal cyclers
- Bench space used to process amplified DNA
- Door handles
- Refrigerator/freezer door handles
- Computer mouse
- Keyboards

## Weekly Cleaning of All Lab Areas

One time a week, perform a thorough cleaning of the pre-PCR and post-PCR areas using 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach).

- Clean all benchtops and laboratory surfaces.
- Clean all instruments that are not cleaned daily.
- Thoroughly mop lab floors.
- Make sure that personnel responsible for weekly cleaning are properly trained on prevention of PCR product contamination.

## Items Fallen to the Floor

The floor is contaminated with PCR product transferred on the shoes of individuals coming from the post-PCR area; therefore, anything falling to the floor must be treated as contaminated.

- Disposable items that have fallen to the floor, such as empty tubes, pipette tips, gloves, lab coat hangers, must be discarded.

- Non-disposable items that have fallen to the floor, such as a pipette or an important sample container, must be immediately and thoroughly cleaned. Use a 0.5% Sodium Hypochlorite (10% Bleach) solution to remove PCR product contamination.
- Clean any lab surface that has come in contact with the contaminated item. Individuals handling anything that has fallen to the floor, disposable or non-disposable, must discard their lab gloves and put on a new pair.

## Best Practices

When preparing libraries for sequencing, always adhere to good molecular biology practices. Read through the entire protocol before starting to make sure that all of the required materials are available and your equipment is programmed and ready to use.

### Handling Liquids

Good liquid handling measures are essential, particularly when quantifying libraries or diluting concentrated libraries for making clusters.

- Small differences in volumes ( $\pm 0.5 \mu\text{l}$ ) can sometimes cause large differences in cluster numbers ( $\sim 100,000$ ).
- Small volume pipetting can be a source of potential error in protocols requiring the generation of standard curves, such as qPCR, or small but precise volumes, such as the Agilent Bioanalyzer.
- If small volumes are unavoidable, use due diligence to make sure that pipettes are correctly calibrated.
- Make sure that pipettes are not used at the volume extremes of their performance specifications.
- Prepare the reagents for multiple samples simultaneously, to minimize pipetting errors, especially with small volume enzyme additions. As a result, pipette one time from the reagent tubes with a larger volume, rather than many times with small volumes. Aliquot to individual samples in a single pipetting movement to allow for standardization across multiple samples.

### Handling Magnetic Beads



#### NOTE

Cleanup procedures have only been validated using the 96-well plates and the magnetic stand specified in the *Consumables and Equipment* list. Comparable performance is not guaranteed when using a microcentrifuge tube or other formats, or other magnets.

- Before use, allow the beads to come to room temperature.
- Do not reuse beads. Always add fresh beads when performing these procedures.
- Immediately before use, vortex the beads until they are well dispersed and the color of the liquid is homogeneous.
- When pipetting the beads, pipette slowly and dispense slowly due to the viscosity of the solution.
- Take care to minimize bead loss, which can affect final yields.
- Change the tips for each sample, unless specified otherwise.
- Let the mixed samples incubate at room temperature for the time indicated in the protocol for maximum recovery.

- When removing and discarding supernatant from the wells, use a single channel or multichannel pipette and take care not to disturb the beads.
- When aspirating the cleared solution from the reaction plate and wash step, it is important to keep the plate on the magnetic stand and not disturb the separated magnetic beads. Aspirate slowly to prevent the beads from sliding down the sides of the wells and into the pipette tips.
- To prevent the carryover of beads after elution, approximately 2.5  $\mu\text{l}$  of supernatant is left when the eluates are removed from the bead pellet.
- Be sure to remove all of the ethanol from the bottom of the wells, as it can contain residual contaminants.
- Keep the reaction plate on the magnetic stand and let it air-dry at room temperature to prevent potential bead loss due to electrostatic forces. Allow for the complete evaporation of residual ethanol, because the presence of ethanol affects the performance of the subsequent reactions. Illumina recommends at least minutes drying time, but a longer drying time can be required. Remaining ethanol can be removed with a 10  $\mu\text{l}$  pipette.
- Avoid over drying the beads, which can impact final yields.
- Do not scrape the beads from the edge of the well using the pipette tip.
- To maximize sample recovery during elution, incubate the sample/bead mix for 2 minutes at room temperature before placing the samples onto the magnet.

## Avoiding Cross-Contamination

Practice the following to avoid cross-contamination:

- Open only one adapter tube at a time.
- Change the tips for each sample, unless specified otherwise.
- Pipette carefully to avoid spillage.
- Clean pipettes and change gloves between handling different adapter stocks.
- Clean work surfaces thoroughly before and after the procedure.

## Potential DNA Contaminants

When handling and processing samples using this protocol, use best practices to avoid PCR contamination, as you would when preparing PCR amplicons.

## Temperature Considerations

Temperature is an important consideration for making libraries:

- Keep libraries at temperatures  $\leq 37^{\circ}\text{C}$ , except where specifically noted.
- Place reagents on ice after thawing at room temperature.

## Equipment

- Review the programming instructions for your thermal cycler user guide to make sure that it is programmed appropriately using the heated lid function.
- It is acceptable to use the thermal cycler tracked heating lid function.