



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS CON ESPECIALIZACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA

**“BIODIVERSIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA CAVIDAD BUCAL Y EL VENENO
DE LA SERPIENTE *Bothrops asper* EN PANAMÁ”**

PRESENTADA POR
ALEXA CECILIA PRESCILLA LEDEZMA

DIRECTORA DE TESIS
DRA. NORA ORTÍZ DE MORENO.

PANAMÁ, 10 DE ABRIL DE 2014

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

HOJA DE APROBACIÓN

“BIODIVERSIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA CAVIDAD BUCAL Y EL VENENO
DE LA SERPIENTE *Bothrops asper* EN PANAMÁ”

DIRECTORA

DRA. NORA ORTÍZ DE MORENO.....

Departamento de Microbiología Humana

Universidad de Panamá

Tesis presentada para optar por el Grado de Master en Ciencias Biomédicas
con especialidad en Microbiología.

Por la Licenciada Alexa Cecilia Prescilla Ledezma

PANAMÁ, 10 DE ABRIL DE 2014

DEDICATORIA

Con mucho cariño a mi madre, Sílvia Ledezma, que es el motor que impulsa cada uno de mis proyectos, aspiraciones y anhelos.

A mis hermanos, sobrinos y cuñados por su paciencia, confianza y comprensión.

A la abuela Inés María Sánchez (Q.E.P.D.), por sus oraciones, cuidados y atenciones en el tiempo compartido.

A la familia Aguilar-Carrasco, ángeles de Dios, que me han abierto las puertas de su familia y corazones, brindándome apoyo, cariño y fortaleza en todo momento.

Al Dios de la vida, que guía e ilumina cada paso de mi trayecto y me regala sus bendiciones cada día.

Un guerreero de la luz nunca olvida la gratitud. Durante la lucha fue ayudado por los ángeles; las fuerzas celestiales colocaron cada cosa en su lugar, y permitieron que pudiera dar lo mejor de sí. El guerreero a veces consigue mucho más de lo que su capacidad permite. Por eso cuando el sol se pone, se arrodilla y agradece el Manto Protector que lo rodea. su gratitud, no obstante, no se limita al mundo espiritual; jamás olvida a sus amigos, porque la sangre de ellos se mezcló con la suya en el campo de batalla.

Manual el guerreero de la luz

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a:

- Mi tutora Dra. Nora O de Moreno, por su tiempo, paciencia y consejos durante la ejecución de este proyecto y a lo largo de mi formación.
- Prof. Hildauro Acosta de Patiño, y al personal del CIIMET, por confiarme este proyecto tan importante, su guía y asesoramiento en cada fase del mismo.
- Dr. Rafael Otero (Colombia), por el entrenamiento, capacitación y el conocimiento compartido.
- Dr. Manuel Martínez Bueno, por la oportunidad brindada en su laboratorio en la Universidad de Granada, dedicación y aportes científicos.
- Dr. Antonio Osuna, por creer en este proyecto y facilitar el intercambio académico y científico con el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada.
- Dra. María Mireya Muñoz, el departamento de Microbiología Humana y todos los compañeros, colegas y amigos por su apoyo y colaboración durante los años de desarrollo de este proyecto.
- Prof. Abdiel Rodríguez, Sr. David Correa, Licdo. Dayvis Navarro y Licdo. Julio Saldaña, por su vasta experiencia y participación en las giras de colectas, la toma de muestras y extracción del veneno de las serpientes.
- Prof. Mitzy Cubillas, por su asesoría en el análisis estadístico del proyecto.
- Instituciones: Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panama, Centro Regional Universitario de Veraguas, C.S.S. y MINSA por el trabajo en conjunto.
- Finalmente agradezco a SENACYT a través de la I Convocatoria pública para nuevos investigadores 2010 (Proyecto APY-NI10-007).

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE GRAFICAS Y TABLAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
INDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	xix
CAPITULO I: GENERALIDADES DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
1.1 Planteamiento y estado actual del problema.....	2
1.2 Objetivos.....	4
1.3 Justificación.....	5
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Epidemiología del accidente ofídico.....	8
2.2 Antecedentes del accidente ofídico en Panamá.....	11
2.3 Impacto socioeconómico del accidente ofídico.....	12
2.4 Biología y generalidades de las serpientes <i>Bothrops asper</i>	15
2.4.1. Taxonomía de <i>B. asper</i>	16
2.4.2. Distribución geográfica de <i>B. asper</i>	16
2.4.3. Nombres comunes.....	18
2.4.4. Características morfológicas.....	18
2.4.5. Hábitat.....	21
2.4.6. Hábitos.....	21
2.4.7. Ciclo de reproducción.....	22
2.5 Características y composición del veneno.....	23
2.5.1 Fosfolipasa (PLA ₂).....	25
2.5.2 Metaloproteinasas (SVMPs).....	26
2.5.3 Serinaproteinasas.....	27
2.5.4 L-amino ácido oxidasa (LAAO).....	28

2.5.5 Lectina Tipo C.....	28
2.5.6 Desintegrinas.....	29
2.6 Fisiopatología del accidente ofídico.....	29
2.6.1 Efectos locales.....	30
2.6.2 Edema y dolor.....	31
2.6.3 Hemorragia local.....	32
2.6.4 Dermonecrosis y formación de ampollas.....	33
2.6.5 Degradación de la matriz extracelular.....	34
2.6.6 Mionecrosis local.....	34
2.6.7 Inflamación.....	35
2.6.8 Variación ontogénica en el veneno y las implicaciones en el daño tisular local.....	36
2.7 Complicaciones infecciosas y bacterias asociadas al accidente ofídico por <i>B. asper</i>	37
2.8 Identificación de la microbiota de la cavidad bucal y el veneno de la serpiente <i>B. asper</i>	40
2.8.1 Técnicas dependiente de cultivo.....	40
2.8.2 Técnicas independientes de cultivos.....	42
2.8.2.1 Huella genética.....	43
2.8.2.1.1. PCR-ARISA.....	44
2.8.2.1.2 PCR-TTGE.....	46
2.8.3 Secuenciación masiva.....	48
2.8.3.1. Pirosecuenciación.....	49
2.9 Estudios relacionados.....	53
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODO.....	56
3.1. Tipo de estudio.....	57
3.2. Universo y tamaño de la muestra.....	57
3.3. Criterios de inclusión.....	57
3.4. Materiales, reactivos y equipos.....	58
3.5. Procedimientos.....	60

3.5.1. Colecta de especímenes.....	60
3.5.2. Toma de muestras.....	61
3.5.3. Procesamiento de muestras.....	63
3.5.4. Identificación y sensibilidad bacteriana.....	65
3.5.4.1. Preparación de suspensión.....	65
3.5.4.2. Llenado y carga de tarjetas.....	66
3.5.4.3. Registro de información de las muestras.....	66
3.5.4.4. Lectura, validación e impresión de los resultados.....	67
3.5.5. Estudio de la biodiversidad microbiana a través de técnica independientes de cultivo.....	67
3.5.5.1. Recuperación de células bacterianas a partir del hisopo.....	68
3.5.5.2. Extracción de DNA genómico.....	69
3.5.5.2.1. Método de Qiagen.....	69
3.5.5.2.2. Método de Chelex.....	70
3.5.5.2.3. Método de Favorgen.....	71
3.5.5.2.4. Método de MSOP.....	73
3.5.5.3. Separación y visualización del ADN en gel de agarosa.....	74
3.5.5.4. Amplificación del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16 S.....	75
3.5.5.5. Amplificación de ADN mediante, the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA- PCR).....	77
3.5.5.6. Secuenciación de los productos ARISA-PCR.....	78
3.5.5.7. Purificación de los productos de PCR 16 S.....	79
3.5.5.8. PCR - TTGE.....	80
3.5.5.9. Electroforesis desnaturalizante en gradiente temporal de temperatura (TTGE).....	81
3.5.5.10. Secuenciación masiva (Pirosecuenciación).....	83
3.6. Métodos e instrumentos de colección de datos.....	83

3.7. Análisis estadístico.....	84
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	88
4.1 Resultados.....	89
4.1.1. Resultados de la colecta de especímenes.....	89
4.1.2. Resultados de la identificación y sensibilidad.....	89
4.1.3. Resultados de los métodos independiente de cultivos.....	92
4.1.4. Resultados de la secuenciación masiva.....	93
4.1.5. Resultados del análisis estadístico.....	108
4.2 Discusión.....	111
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	121
CONCLUSIONES.....	122
RECOMENDACIONES	124
ANEXO.....	125
BIBLIOGRAFIA.....	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1:	Clasificación Taxonómica de <i>B. asper</i>	16
Figura N° 2:	Distribución geográfica de <i>B. asper</i>	17
Figura N° 3:	Características morfológicas de <i>B. asper</i>	20
Figura N° 4:	Principales proteínas del veneno de <i>B. asper</i>	25
Figura N° 5:	Formación de ampollas hemorrágicas y necrosis 24 horas después de la mordida de <i>B. asper</i>	33
Figura N° 6:	Celulitis y absceso causado por <i>Morganella morganii</i>	38
Figura N° 7:	Operón ribosomal procariota con sitios de hibridación de cebadores ITSF / ITSReub	46
Figura N° 8:	Separación electroforética específica de secuencias de fragmentos de ADN mediante TTGE.....	48
Figura N° 9:	Representación esquemática de la pirosecuenciación.....	51
Figura N°10:	Representación del sistema de enzimas de la pirosecuenciación.....	52
Figura N° 11:	Zonas de colectas de <i>B. asper</i> en Panamá.....	61
Figura N° 12:	Sedación de los especímenes de <i>B. asper</i> con CO ₂	62
Figura N° 13:	Colecta de veneno e hisopado del fondo de saco mucoso de <i>B. asper</i>	63
Figura N° 14:	Cultivos y procesamiento de muestras.....	64
Figura N° 15:	Preparación de suspensiones bacterianas.....	66
Figura N° 16:	Diagrama de las estrategias moleculares utilizadas en el estudio de la diversidad bacteriana de <i>B. asper</i>	67
Figura N° 17:	Esquema de la recuperación de células bacterianas a partir de hisopos.....	68
Figura N° 18:	Déndrograma de las muestras estudiadas a través de PCR-ARISA y analizadas con el programa Speak Scanner.....	105
Figura N° 19:	Perfiles moleculares de la muestras procesadas por TTGE....	106
Figura N° 20:	Taxones obtenidos como resultado de la pirosecuenciación.....	107

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y TABLAS

Gráfica N° 1:	Especímenes de <i>B. asper</i> colectados por zona geográfica de Panamá.....	95
Gráfica N° 2:	Familias bacterianas identificadas en el fondo de saco mucoso y el veneno de <i>B. asper</i>	98
Grafica N° 3:	Microorganismos aislados del fondo de saco mucoso de <i>B. asper</i> en Panamá.....	99
Grafica N° 4:	Microorganismos aislados del veneno de <i>B. asper</i> en Panamá.....	100
Gráfica N° 5:	Microorganismos aislados del fondo de saco mucoso vs veneno de <i>B. asper</i> en Panamá.....	101
Grafica N° 6:	Susceptibilidad de los aislamientos de <i>M. morganii</i> en fondo de saco mucoso y veneno de <i>B. asper</i>	102
Grafica N° 7:	Susceptibilidad de los aislamientos de <i>P. rettgeri</i> en fondo de saco mucoso y veneno de <i>B. asper</i>	103
Grafica N° 8:	Susceptibilidad de los aislamientos de <i>A. hydrophila</i> en fondo de saco mucoso y veneno de <i>B. asper</i>	104
Grafica N° 9:	Relaciones entre zonas geográficas de colectas y bacterias identificadas y analizadas a través del programa estadístico Biplot logístico.....	110
Tabla N° 1:	Información morfométrica de <i>B. asper</i>	96
Tabla N° 2:	Bacterias aisladas del fondo de saco mucoso y veneno de <i>B. asper</i>	97

INDICE DE AVREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
ARISA	Análisis automatizado del espaciador ribosomal intergénico
ATP	Adenosin Trifosfato
BAV	Veneno de <i>Bothrops asper</i>
CCD	Charge coupled device
CIIMET	Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DGGE	Electroforesis de gel en gradiente lineal químico
dNTP	Deoxnucleotido
FAD	Flavín adenín dinucleótido
GPIb	Glicoproteína Ib
ITS	Espaciador transcripto intergénico
ITS Reub	Cebador marcado con el colorante de fosforamidita (HEX)
ITSF	Cebador marcado con el colorante carboxifluoresceína (FAM)
LAO	L-aminoácido oxidasa
LH-PCR	Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction
MP	Hemorraginas
OIT	Organismo Internacional del Trabajo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONG	Organismo No Gubernamental
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLA2	Fosfolipasa
PNB	Producto Nacional Bruto
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA _m	Ácido ribonucleico mitocondrial
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
SIM	Sulfuro- indol- motilidad

SSCP	Single-strand conformation polymorphism
SVMPs	Metaloproteinasa
SVSOs	Serinaproteasas
SVSPs	Serina proteinasa
T-RFLP	Terminal restriction fragment length polymorphism
tARN	Ácido ribonucleico de transferencia
TGGE	Electroforesis de gel en gradiente de temperatura
TSI	Triple azúcar hierro
TTGE	Electroforesis de gel en gradiente temporal de temperatura
UFC	Unidad formadora de colonia
WHO	World Health Organization

INDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1:	Formulario de registro de los datos de las colectas de serpientes.....	126
Anexo N° 2:	Diagrama de preparación de suspensión.....	127
Anexo N° 3:	Tabla de requisitos para selección de los medios de cultivos, según microorganismo aislado.....	128
Anexo N° 4:	Tabla de antibióticos utilizados para la sensibilidad tarjeta N-082.....	129
Anexo N° 5:	Diagrama de la prueba de tolerancia al oxígeno para microorganismos anaerobios.....	130

RESUMEN

RESUMEN

Panamá, es el país con mayor incidencia de mordeduras de serpiente en América Latina, con un estimado de 54-62 casos por 100,000 habitantes, y aproximadamente 2,000 mordeduras por año, donde el 70 % es causado por *Bothrops asper*. El 11 % - 30% de los pacientes con accidentes ofídicos puede presentar complicaciones, infecciosas causadas por diversos microorganismos. El objetivo de este trabajo es identificar la comunidad bacteriana localizada en el veneno y fondo de saco mucoso de *B. asper*. Para este estudio se colectaron especímenes de *B. asper* de 4 zonas geográficas del país, con reportes de alta incidencia de accidentes ofídicos. Se tomaron muestras del fondo de saco mucoso y del veneno, utilizando medios de colección y preservación y tubos eppendorf estériles. Las colonias aisladas se estudiaron con VITEK 2, tanto para identificación como para sensibilidad. Para las pruebas moleculares se extrajo el ADN y se determinó la huella genética de la comunidad microbiana mediante amplificación del espaciador intergénico (ARISA) entre el ADNr 16S-23 S y electroforesis en gel temporal de temperatura (TTGE). Posteriormente se enviaron a pirosecuenciar para identificar la comunidad microbiana presente.

En las muestras analizadas a través de los métodos dependientes de cultivos, se encontró predominio de la familia *Enterobacteriaceae* en un 64% de los aislamientos. Las bacterias de mayor incidencia fueron *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri* y *Aeromonas hydrophila* con patrones de susceptibilidad de baja resistencia a los antibióticos empleados. En los estudios independiente de cultivos, los clúster o agrupamientos producto del dendrograma, obtenidos de la huella genética, mostró que sólo 3 clúster de las 21 muestras estudiadas, coincidieron en más del 97 % de similitud de las comunidades. De las muestras pirosecuenciadas hay predominio del Reino *Bacteria* en un 98.42 %, con identificación de géneros bacterianas no identificadas con las técnicas tradicionales. Los microorganismos identificados a través de ambas metodología, nos muestra la importancia del uso de tratamiento adecuados y oportunos que eviten futuras complicaciones por el manejo empírico de los accidentes ofídico.

La aplicación de técnicas moleculares identificó taxones no detectados mediante

técnicas tradicionales, ampliando el panorama de abordaje y cobertura de los tratamientos que se deben utilizar.

SUMMARY

Panama is the country with the highest snakebite incidence in Latin America, with an estimate of 54-62 cases per 100,000 habitants and approximately 2,000 bites per year, of which *Bothrops asper* causes 70%. Aproximately, 11%-30% of patients affected by snakebites may develop infectious complications caused by different microorganisms. Treatment in this case is empirical, due to lack of information about the microbial flora present in *B. asper* bucal cavity. In our study, we aimed to depict information about bacterial species present in the oral cavity of *B. asper* in Panama, that could be related to secondary infection after snakebites in humans.. We collected 21 *B. asper* specimens from four geographical zones in our country with high snakebite incidence. We obtained the samples from the oral cavity mucosa and from the venom. Identification and susceptibility tests from isolated colonies were performed with Vitek 2 Compact. DNA was extracted directly from the specimen and the genetic fingerprint of the microbial community was determined by intergenic space amplification (ARISA) between rDNA 16S-23S and temporal temperature gel electrophoresis (TTGE). Afterwards, a pyrosequencing analysis was performed in order to identify the microbial communities present.

When using culture dependent methods, we found a predominance of the Enterobacteriaceae family in 64% of isolates. The Bacteria found were *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, and *Aeromonas hydrophila*, all showing low levels of resistance to tested antibiotics. In culture independent methods, clusters obtained by genetic fingerprint demonstrated that only three clusters of the 21 specimens showed more than 97% coincidence in the communities. By pyrosequencing, we found 98.42% of predominance of Bacteria Kingdom with isolation of bacteria genera unidentified by culture dependant techniques.

The results have allowed us to know what is the microbiota present in the oral cavity of *B. asper* in our country and hence define a potential link with the etiological agents of infections secondary to snakebite This may allow local clinical guidelines of ophidian accidents to suggest proper antibiotic treatment if infection would occur based on these findings.

The application of molecular techniques identified taxons not detected by culture

dependent methods, suggesting broadening of the therapeutic approach employed in the clinical management of patients affected by snakebites in our country.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los envenenamientos por mordeduras de serpientes constituyen un problema de gran importancia en salud pública a nivel mundial, especialmente en las regiones tropicales de África, Asia y América Latina, situación que afecta sobre todo a los trabajadores agrícolas que viven en zonas rurales de bajas condiciones socioeconómicas (Chippaux 1998). Se estima que anualmente 5.4 – 5.5 millones de personas son mordidas por serpientes en el mundo, trayendo como consecuencia 400 000 amputaciones, y entre 20 000 y 125 000 muertes (Williams et al. 2010). Bajo estas circunstancias, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incorporó en 2009, el envenenamiento por mordedura de serpiente en su lista de enfermedades tropicales desatendidas. (Gutiérrez, 2011).(Gutiérrez, Escalante, et al. 2009).

La tasa de incidencia del accidente ofídico en América Latina, varía de país en país (5-62 casos por 100 000 habitantes por año), correspondiendo aproximadamente a 130,000 - 150,000 nuevos casos cada año en toda la región, con un número estimado de 2,300 muertes (Otero-Patiño 2009a). La mayoría de los casos son ocasionados por *Bothrops asper* (50-80%) (Otero-Patiño 2009a)

Panamá es el país de América Latina con mayor incidencia de mordeduras de serpiente (54-62 casos por 100,000 habitantes /año), con aproximadamente 2,000 mordeduras anuales, causadas por *B. asper* en un 70% (Otero-Patiño 2009b). Los sitios anatómicos más comúnmente afectados son los pies (58%) y las manos (27%); los accidentes ocurren especialmente durante la época lluviosa y en horas diurnas.

El 11 % - 30% de los pacientes puede presentar complicaciones, especialmente

infecciosas locales, insuficiencia renal aguda (IRA), y en menor proporción hemorrágicas y síndrome compartimentar, según investigaciones recientes en Panamá y Colombia (Acosta, 2010; Otero et al., 2002; Otero-Patiño, 2009; Otero, 2013)(Otero, Gutiérrez, María Beatriz Mesa, et al. 2002)(Otero-Patiño 2009b) Diversos estudios hacen referencia al desarrollo de infección como complicación del envenenamiento por *B. asper*, por *B. jararaca* y víboras similares, específicamente en tejidos blandos en casos graves complicados por necrosis, produciendo impétigo, celulitis, abscesos y fascitis. La más frecuente es la celulitis y los abscesos causados por bacilos Gram negativos aerobios (*Morganella morganii*, *Proteus rettgeri*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Aeromonas hydrophila*). Los cocos Gram positivos también se aíslan como el *Staphylococcus aureus*. (Otero et al., 2002; Andrade et al., 1989; Arroyo et al., 1980; Jorge et al., 1990, 1994, 1998, 2004; Jorge & Ribeiro, 1997; Gutiérrez and Lomonte, 2003; Saravia-Otten et al., 2007). La infección se presenta posiblemente porque la mordedura inyecta un inóculo de las bacterias presentes en la boca, los colmillos y el veneno de la serpiente, las cuales encuentran un ambiente favorable para su multiplicación en aquellos casos complicados por intensa lesión tisular, especialmente la necrosis en los casos mas graves (Otero et al., 2002).

En Panamá no había bases de datos que registraran la biodiversidad de microorganismos que se encuentran en el fondo de saco mucoso y en el veneno de la serpiente *B. asper*. El objetivo de este estudio se enfocó en la identificación de estas bacterias en poblaciones de *B. asper* de 4 regiones de Panamá con alta tasa de incidencia de accidente ofídico, así como también en caracterizar sus patrones de sensibilidad. Esta información permitirá hacer correlaciones en un futuro con

la obtenida de los pacientes complicados de infección en accidente por *B. asper*. Los resultados demostraron que las bacterias predominantes tanto en el veneno como en el fondo de saco membranoso son bacilos Gram negativos, principalmente de la familia Enterobacteriaceae, sensibles a Cefoxitina, Cefotaxima, Imipenem, Meropenem, Amikacinas, Ciprofloxacina y Trimetropima/ Sulfametoxazol en un 80 a 100 % y resistentes a Ampicilina, Ampicilina/ sulbactan.

La aplicación de técnicas moleculares en el análisis de la diversidad microbiana en muestras del fondo de saco mucoso de *B. asper* permite generar la huella genética microbiana de la comunidad, poniendo de manifiesto taxones no detectados mediante otras técnicas.

De los agrupamientos encontrados en el dendrograma, sólo 3 clúster coincidieron mas del 97 %. *B. asper* muestra una gran diversidad bacteriana representada por los distintos géneros identificados. De las muestras pirosecuenciadas hasta el momento hay predominio del Reino Bacteria en un 98.42 %. La clasificación taxonómica de la población estudiada es muy compleja mostrando géneros bacterianos no identificados por los métodos tradicionales.

CAPITULO I

GENERALIDADES DE LA INVESTIGACIÓN

1. Planteamiento y estado actual del problema

Los accidentes con ofidios, principalmente con serpientes venenosas constituyen un problema de salud pública, ya que anualmente se estima que ocurren a nivel mundial más de 5 millones de casos. En Latinoamérica, la cifra puede llegar a 150,000 con aproximadamente de 2,000 a 3,000 defunciones (Congreso, Sao Paulo, Brasil 2007). En el caso específico de Panamá, es impactante conocer, que a pesar de su pequeña población de aproximadamente 4 millones de habitantes, la cifra de accidentados supera los 2.000 por año, siendo el país más afectado en Centroamérica (Otero-Patiño, 2009). Aún cuando tiene una mortalidad relativamente baja, las víctimas pueden quedar con importantes secuelas.

Actualmente, los riesgos de enfrentamiento con ofidios no solo se esperan en regiones rurales, factores como el aumento de la población, la deforestación, la minería, el turismo ecológico, cacería ilegal y otros han incrementado los casos. Mediante el resuelto ministerial No 268 del 17 de agosto de 2001, en Panamá, estos accidentes son de notificación obligatoria, pero aún así, existe un subregistro (Valderrama, Patiño y Perdomo 2004). Los datos obtenidos de los Centros de Atención, confirman que *Bothrops asper* (terciopelo, barba amarilla, rabo amarillo, equis, víbora negra, víbora blanca, víbora de gajo, mapaná, cuatro narices) causa más del 80% de las mordeduras (Gutiérrez et al, 2006; Otero-Patiño 2008).

Aunque Panamá, presenta una incidencia y prevalencia alta, por mordeduras de ofidios, carecemos de suficientes estudios formales que aporten los conocimientos locales necesarios para la toma de decisiones. Nuestro país fronterizo, Costa

Rica, cuenta con gran cantidad de investigaciones publicadas al respecto y lo mismo podemos decir de nuestros hermanos colombianos.

Ha sido tal impacto, que la Organización Panamericana de la Salud (OPS), promueve estrategias para que en los países, se instauren medidas encaminadas para la disminución de la incidencia de los accidente ofídicos y se establezcan redes de cooperación técnica (Congreso, Sao Paulo, Brasil, 2007).

2. Objetivo general

Identificar la biodiversidad microbiológica y realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos a los microorganismos aislados del fondo de saco mucoso y veneno de la serpiente *Bothrops asper* en Panamá lo que permitirá elaborar guías de atención a los pacientes con accidentes ofídicos.

Objetivos específicos

1. Realizar aislamiento del contenido microbiológico aerobio y anaerobio del veneno e hisopado de membranas y colmillos de serpientes *B. asper* de Panamá.
2. Identificar los microorganismos encontrados en el veneno y la cavidad bucal de *Bothrops asper* de Panamá.
3. Determinar la sensibilidad de las bacterias aisladas a los antibióticos de limitado y amplio espectro.
4. Elaborar una base de datos de la carga microbiana en las serpientes de Panamá.
6. Determinar las comunidades microbiana de *B. asper* utilizando herramientas moleculares.

3. Justificación

En los accidentes ofídicos la complicación más frecuente es la infección, ya que de por sí en la cavidad de la boca y dientes de cualquier animal coexiste una flora normal que puede estar incluso en el veneno, emitido por la serpiente. Se han realizado varios estudios buscando la identificación de estas bacterias en Colombia, Costa Rica, Brasil, Perú, Argentina y otros, pero en Panamá no tenemos información generada en ofidios locales. Las infecciones más comunes son el impétigo, celulitis, artritis, osteomielitis y abscesos de tejidos blandos, hasta la fasciitis necrosante y la sepsis, con focos supurados a distancia como la neumonía con derrame y hasta meningitis.

La mayoría de los autores recomiendan que los antibióticos, hagan parte del tratamiento de soporte del paciente con mordeduras por víboras de venenos altamente proteolíticos, como es el caso de los envenenamientos locales moderados y graves por *B. asper*. Sin embargo la recomendación del uso temprano de antibióticos continua siendo controversial para algunos autores, por lo que realizar estudios que aporten información para el uso racional de los antimicrobianos es crucial (Tagwireyis et al 2001). Si logramos esta información y la relacionamos con estudios que se realizan sobre caracterizaciones biomédicas y fisiopatológicas de los componentes del veneno, podríamos producir guías de atención basados en la realidad nacional. Existe una diversidad de microorganismos aislados y diferentes protocolos de manejo en los diferentes países aún en aquellos que comparten fronteras.

Por ejemplo en Colombia, no pocos autores recomiendan que no se apliquen antibióticos a menos que haya confirmación de infección bacteriana secundaria en el área de la mordedura, y recomiendan antibióticos de amplio espectro en accidente bothrópico moderado y grave solamente. En Panamá, y en otros países la terapia antibiótica se aplica desde el inicio y en cualquier grado de envenenamiento (Ávila-Agüero, 1999, Castillo-Vigil, et al 2008)

Este estudio permitirá el desarrollo de actividades que aportarán conocimientos básicos de gran impacto en el manejo y tratamiento de los pacientes mordidos por serpientes y que tienen potencial de desarrollar una complicación infecciosa, además de permitir crear un registro basado en información científica.

CAPITULO II
MARCO TEÓRICO

II MARCO TEÓRICO

2.1 Epidemiología del accidente ofídico.

A nivel mundial se registran anualmente cerca de 5 millones de accidentes por animales ponzoñosos, de los cuales entre el 50 y 75% requieren tratamiento para prevenir la muerte, amputaciones o secuelas permanentes. (Gutiérrez et al. 2010)

Se estima que alrededor de 400,000 personas sufren un accidente ofídico en el mundo, constituyendo un importante problema de Salud Pública principalmente en regiones tropicales y sub tropicales de África, Asia, Europa y Latinoamérica (Lomonte et al. 2012) (Gutiérrez et al. 2010)(Gutiérrez 2011)

Esta patología, que afecta fundamentalmente a personas pobres que habitan regiones rurales , ha sido tradicionalmente descuidada por las autoridades de salud, las agendas de investigación y las grandes empresas farmacéuticas en el mundo, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha incluido en la lista de “enfermedades desatendidas”.(Williams et al., 2010; Gutiérrez, 2011).

En Europa, las mordeduras de serpientes son relativamente raras . Las serpientes implicados pertenecen al género *Vípera* , representada en Europa por unas pocas especies que no están entre los más venenosos. Sin embargo en Gran Bretaña, hay aproximadamente 200 hospitalizaciones anualmente a partir de mordeduras de serpientes, pero no se han reportado muertes desde 1975. Por otro lado países como Francia, Suiza, España e Italia tienen una incidencia muy baja de mordeduras de serpiente. (Chippaux 1998)

En Europa, con una población, de 730 millones, el número anual de mordeduras de serpientes, podría alcanzar los 25,000, de los cuales 8,000 implican un envenenamiento. Alrededor del 90% de los pacientes envenenados son hospitalizadas y cerca de 30 muertes podría resultar cada año. (Chippaux, 1998).

En África, las picaduras de escorpión, son los eventos más frecuentes, y la mordeduras de serpientes son subestimadas por las autoridades de salud, sobre todo porque el sistema de información es inexacto. Por otra parte, la mala organización de los servicios de salud en muchos países, complica el manejo de los pacientes y representa la gran variación en la tasa de mortalidad.(Chippaux, 1998).

En Asia, hay una amplia variación en la incidencia de los accidentes ofídicos, de acuerdo a las actividades humana y tomando en consideración las especies de serpientes que participan. En Japón, la incidencia general de mordeduras de serpientes es de aproximadamente 1 caso por cada 100,000 personas, de manera que la tasa de mortalidad de los casos es inferior a 1% y la mortalidad global es de aproximadamente 0,5 por 100,000 habitantes. (Chippaux, 1998).

En Australia, la incidencia anual estimada de las mordeduras de serpientes oscila entre 3 y 18 por 100,000 habitantes, con una tasa de mortalidad promedio de 4 por cada 100,000 habitantes al año. Los accidentes ofídico ocurren durante los meses de calor en el sur de Australia y de todo el año en el norte tropical del país. (Chippaux, 1998).

En el Medio Oriente, con una población de 160 millones de personas, el número anual de mordeduras de serpientes, podría ser tan alto como 20,000, con un estimado 15,000 envenenamientos por año. Es probable que sólo

el 60% de los mordidos hayan asistido a un centro hospitalario, por lo que la mortalidad puede ser estimada en 100 muertes cada año.(Chippaux, 1998).

En este orden en Canadá y los EE.UU con una población aproximadamente de 270 millones de personas, la incidencia anual de mordeduras de serpientes, sobre todo en los EE.UU., es similar a la observada en Europa. Se ha estimado que 45 mil mordeduras de serpientes, ocurren cada año en América del Norte. De éstas, alrededor de 10,000 están causadas por especies venenosas, 6,500 requieren intervención médica, y aproximadamente 15 personas mordidas, mueren cada año. La tasa de letalidad es muy baja en vista de la elevada toxicidad del veneno de algunas de las especies de serpientes. La aplicación de un tratamiento adecuado es probablemente la razón de esta baja tasa de letalidad. Las muertes que se producen se deben al tratamiento tardío, insuficiente o que las personas rechazan la terapia. (Chippaux, 1998; Juckett, Hancox, 2002).(Juckett & Hancox 2002)

En el sur de México, Centroamérica y norte de Sudamérica *Bothrops asper* es la especie causante de el mayor número de envenenamientos. Se estima que, en los países centroamericanos, *B. asper* es responsable de más del 50% del número total de casos, y casi todas las muertes debidas a envenenamiento mordedura de serpiente. (Gutiérrez 2009)

En América Latina, la incidencia global de envenenamientos ofídicos, oscila con rangos de 5-62 casos por 10,000 habitantes por año, dependiendo del país (que corresponde aproximadamente a 130,000 a 150,000 casos en toda la región, con un número estimado de 2,300 muertes). (Otero-Patiño 2009a)

De igual forma la mayoría de los casos, sobre todo en Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Panamá, Colombia, Venezuela y Ecuador, son ocasionados por *B. asper*, donde es responsable de 50-80% de las mordeduras de serpientes. (Otero, 2009). La incidencia de mordeduras de serpientes, independientemente de la especie, varía de un país a otro, en función de factores tan diversos como el clima, los parámetros ecológicos, la biodiversidad, la distribución de las serpientes venenosas, la densidad de población humana, las actividades económicas y los tipos de viviendas, entre otros. (Otero, 2009).

Es importante resaltar que la mordedura de una serpiente no tiene el potencial de epidemia, como otras enfermedades como lo son las parasitarias, infecciosas y transmitidas por vectores, pero hay que destacar que la mortalidad anual, causada por la mordedura de la serpiente es mucho mayor que el atribuido a varias enfermedades tropicales desatendidas y reconocidas actualmente, incluso fiebre hemorrágica, dengue, el cólera, la leishmaniasis, la esquistosomiasis, la encefalitis japonesa y la enfermedad de Chagas. La razón podría ser que el reconocimiento de estas enfermedades importantes como problemas desatendidos ha alentado los esfuerzos para combatirlas. (Gutiérrez et al., 2009).

2.2 Antecedentes del accidente ofídico en Panamá.

Panamá es el país de América Latina con mayor incidencia de mordeduras de serpiente (54-62 casos por 100,000 habitantes / año), con aproximadamente 2,000 mordeduras anuales, causadas por *B. asper* en un 70% (Otero-Patiño, 2009). Los sitios anatómicos más comúnmente afectados son los pies (58%) y las manos (27%); los accidentes ocurren especialmente durante la época

lluviosa, y en horas diurnas. El 11% - 30% de los pacientes puede presentar complicaciones, especialmente infecciosas locales, insuficiencia renal aguda (IRA), y en menor proporción hemorrágicas y síndrome compartimental, según investigaciones recientes en Panamá y Colombia (Acosta, 2010; Otero et al., 2002; Otero-Patiño, 2009; Otero, 2013). Diversos estudios hacen referencia al desarrollo de infección como complicación del envenenamiento por *B. asper*, por *B. jararaca* y víboras similares, específicamente en tejidos blandos en casos graves complicados por necrosis, produciendo impétigo, celulitis, abscesos y fascitis.

2.3 Impacto socio-económico y poblaciones afectadas.

A nivel mundial el impacto real que causa el accidente ofídico, no se ha medido, pero se sabe que existe un grupo de población mas expuesto, según las actividades económicas que realiza, el sexo y la edad, que la mayoría de los afectados son hombres que laboran en el campo de edades entre 15 y 45 años.(Gómez, 2011).

Estos accidentes afectan principalmente a trabajadores agrícolas y sus familias; en mayor medida, a las comunidades rurales más empobrecidas de países en desarrollo de África, Asia, América latina y Oceanía. (Gutiérrez et al., 2010)

Las características de estos accidentes están muy relacionadas con comunidades tropicales aisladas, de bajos ingresos, con bajas condiciones higiénico-sanitarias. Además, como son poblaciones sin actividad política, las autoridades gubernamentales nacionales y regionales dedican pocos esfuerzos en sus

agendas para controlar y dar respuesta a dichos accidentes. (Williams et al., 2010). Los accidentes causados por animales venenosos, cumplen con dos criterios o denominaciones: el primero es el de *accidente ocupacional*, ya que afecta a un grupo poblacional trabajador, que posee alto riesgo de padecer dichos eventos; pero también cumple con los criterios que los catalogan, según la Organización Mundial de la Salud, como *enfermedad tropical olvidada*, ya que afecta casi exclusivamente a los países más pobres y políticamente débiles, con poblaciones, generalmente de bajos ingresos, que viven en zonas rurales de los países tropicales, casi siempre sin ningún tipo de protección en seguridad social. (Medeiros, 2003; Kindhauser, 2003).

En consecuencia en los últimos años el accidente ofídico, ha cobrado una creciente importancia, debido a las consecuencias y carga de la enfermedad creada por los accidentes graves. Esto se ha reflejado en los últimos años en el interés de la OMS, las autoridades nacionales y regionales de salud, los organismos gubernamentales y no gubernamentales (ONG), algunos fabricantes de antivenenos y grupos de investigación, todos los cuales han aportado en la discusión a la búsqueda de soluciones a este problema de salud pública tan complejo. (WHO, 2007; Gutiérrez et al., 2010).(Gutiérrez et al. 2010).

La Organización Internacional del Trabajo, informó en el 2002, que cada año hay en el mundo 270 millones de trabajadores que son víctimas de accidentes de trabajo y 160 millones contraen algún tipo de enfermedad profesional. El mismo informe reporta que los costos económicos vinculados a escala empresarial, nacional y global son magnánimos, calculados en pérdidas debidas a

de trabajo perdidos, interrupciones de la producción, formación y reconversión profesional, gastos médicos y otros (alrededor del 4% del PNB mundial). (OIT, 2002).

El agro, es el segundo sector mas afectado. En Europa, en 1996 se registraron 5,549 accidentes mortales en este sector, y 93 de cada 100 accidentes afectaron a hombres.(European Agency for Safety and Health at Works (EU-OSHA), 2000).

En países como Colombia, los accidentes ofídicos, en los sectores agrícola, pecuario y pesquero constituyen un importante problema de salud pública, por su frecuencia y gravedad, ya que afectan a la población joven en edad productiva cuyos accidentes implican sufrimiento, no solo para los trabajadores, sino también para sus familias, con graves consecuencias sociales y económicas, como amputación (aproximadamente el 5% de los casos) o muerte (aproximadamente el 6% de los casos).(Otero et al. 2004)

En Panamá mediante el Resuelto Ministerial N° 268 del 17 de agosto de 2001, se estableció que el accidente ofídico, fuese de notificación obligatoria. Según datos del Ministerio de Salud, las provincias con mayores tasas de incidencia son Darién, Coclé, Los Santos y Veraguas con un subregistro que no refleja su realidad. Las personas en la edad productiva son las mas afectadas (20-44 años), 44%, seguida de los adolescentes de 10 a 19 años de edad, (23%). (Valderrama 2010)

En Panamá, no existen estudios que reporten datos de sectores afectados, vinculándolos con impacto socio-económico, pero se han realizado

investigaciones, en cuanto al índice de vulnerabilidad a accidentes ofídicos en algunas áreas donde la incidencia es alta. Se identificó que la población dedicadas a actividades agrícolas, con ingresos menores a US\$ 100.00 mensuales, de etnia indígena, de etnia afro descendiente y con menos de 6 años de escolaridad ubicada en las comarcas indígenas Emberá- Waunaan, Gnäbe-Buglé y a la provincia de Darién, son las regiones con mayor vulnerabilidad en Panamá. (Acosta, 2012).

2.4 Biología y generalidades de la serpiente *Bothrops asper*.

Las serpientes, se originaron a principios del cretácico, hace mas de 135 millones de años. Existen aproximadamente 3,000 especies de serpientes, de las cuales un 15% pertenecen a la superfamilia Colubridae y son consideradas como peligrosas para los humanos.(Duque-Osorio et al., 2007).

Las serpientes venenosas poseen uno de los sistemas productores de veneno y dientes integrados más sofisticados del mundo natural. Las serpientes llamadas avanzadas (superfamilia Colubridae) constituyen > 80 % de los ~ 3,000 especies de serpiente descritos actualmente , y contienen todas las formas venenosas conocidas. (Fry 2005)

2.4.1. Taxonomía de *Bothrops asper*.

Nombre Científico	Bothrops asper
Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Clase	Reptilia
Orden	Squamata
Suborden	Serpentes
Familia	Viperidae
Subfamilia	Crotalinae
Género	Bothrops
Epíteto Específico	asper
Autor Epíteto Específico	Garman, 1883

Figura N° 1: Clasificación taxonómica de *B. asper* (Catalogue of life/Integrated Taxonomic Information System (ITIS) 2003.)

El género *Bothrops* comprende más de 37 especies, comúnmente conocidas como víbora de lanza que se distribuyen principalmente en América del Sur. Dos especies (*Bothrops punctatus* y *Bothrops asper*) llegan a América Central.

2.4.2. Distribución geográfica de *B. asper*.

América Latina posee una fauna de serpientes rica y variada, aproximadamente 180 especies de serpientes. Algunas especies clasificadas en la familia Colubridae y todas las especies de las familias Hydrophiidae, Elapidae y Viperidae producen venenos y son capaces de inyectar estas secreciones en humanos, generando cuadros clínicos de envenenamiento. (Bolaños 1983b).

Bothrops asper incluye la costa noroeste de América del Sur desde Ecuador a Venezuela, Trinidad, Centroamérica hasta el norte de México. Habita en las zonas costeras atlánticas de tierras bajas de Nicaragua, Costa Rica y Panamá. *Bothrops asper* también se encuentran en las zonas del norte, tanto Guatemala y Honduras.



Figura N° 2: Distribución geográfica de *B. asper*. (Núñez et al. 2009)

En América del Sur se encuentran típicamente al oeste y al norte de los Andes, aunque hay excepciones, sobre todo en Venezuela *B. asper*, se encuentra en las llanuras costeras Pacíficas y vertiente del Pacífico de Los Andes desde Colombia, hasta el sur, hasta la frontera de Perú y Ecuador. Estas serpientes se encuentran también en el norte de Perú, cerca de la costa del Pacífico. En Colombia su rango

se extiende desde el Pacífico hasta la llanura costera del Caribe, así como profundizar en el país, en los valles de los Andes. (Sasa, 2009; Campbell y Lamar, 2004)(Sasa et al. 2009)

2.4.3. Nombres Comunes

La especie tiene una variedad de nombres comunes que difieren según el idioma, región y tamaño de la serpiente y el patrón de color, como terciopelo, fer-de-lance, barba amarilla (Guatemala, Honduras, "barba amarilla"), equis "x" terciopelo (Ecuador y Panamá), taya equis (Colombia), nauyaca (México, del náhuatl Nahui, cuatro y yacatl, la nariz, "cuatro narices"), y tommygoff amarillo mandíbula (Belice). (Campbell y Lamar, 1989; Campbell y Lamar, 2004).

El nombre del género *Bothrops*, viene de las palabras griegas *bothros* y *ops*, lo que significa "pozo" y "cara" (u "ojo"), respectivamente en la región loreal (foseta loreal). Esta es una referencia a órganos muy sensibles que detectan calor de estas serpientes. El epíteto específico, *asper*, que es una palabra latina que significa "áspero" o "duro", puede aludir a la especie en quilla escamas dorsales. (Uetz, Peter. "*Bothrops asper* (Garman, 1883)". *Reptile-Database*. Zoological Museum Hamburg)

2.4.4. Características Morfológicas

Los miembros del género *Bothrops* se distinguen por sus grandes cabezas, aplanados que se diferencian del resto del cuerpo. Sus párpados (canto) son muy distintos. En las regiones más secas, Terciopelos tienen más escamas para

prevenir la pérdida de agua. *Bothrops asper* varía mucho fenotípicamente a través de su área de distribución geográfica . Esto ha llevado a la confusión entre ésta y otras especies, sobre todo *Bothrops atrox*, que es similar en color, pero a menudo contiene rayas amarilla o tonos y manchas rectangulares o trapezoidales. El Macho de *Bothrops asper* es medio a marrón oscuro o incluso negro. La parte inferior es común encontrarlos de color amarillo pálido. Los especímenes de esta especie pueden llegar a pesar hasta 6 kg y típicamente medir 1,2 a 1,8 m de longitud. (Campbell y Lamar , 2004 ; O'Shea, 2005; (Saldarriaga-Córdoba et al. 2009)(O'Shea 2008)

Como la mayoría de *Bothrops*, *B. asper* tiene diferentes modelos y colores en su parte dorsal y ventral y también exhibe una raya post-orbital . La parte ventral es de color amarillo, crema, o un gris blanquecino, con manchas oscuras (moteado) que aumenta en frecuencia hacia el extremo posterior. Vento-lateralmente, la víbora alterna escalas de grises oscuros que son más pálidas hacia la línea media. Dorsalmente, la víbora es de oliva, gris, marrón, marrón grisáceo, marrón claro o, a veces casi negro. Tiene triángulos oscuros con bordes pálidos lateralmente, que varían en el número del 18 al 25. En los espacios intermedios, hay manchas paravertebrales oscuras. Un espécimen puede tener una línea amarilla en zig - zag en forma de U, en cada lado del cuerpo . (Campbell y Lamar , 2004)

Terciopelos exhiben gran dimorfismo sexual. Desde el nacimiento, los machos son notablemente más pequeños en tamaño que las hembras. Las hembras tienen gruesos cuerpos pesados y pueden llegar hasta 10 veces el tamaño de los machos. También tienen cabezas de dos o tres veces mas grandes que los

machos y colmillos proporcionalmente más grandes (2,5 cm). (Campbell y Lamar, 2004 ; Sasa et al, 2009).



Figura Nº 3: Vista superior de *B. asper* (Garman 1884) Fase marrón claro. (Cortesía CIBUC)

B. asper tiene una dentición maxilar llamadas solenoglifas (solen = tubería). En estas serpientes los colmillos huecos son los únicos dientes de la maxila y rotan de modo que pueden ser "guardados" en el techo de la boca cuando no están en uso. Esto les permite tener colmillos largos que inyectan el veneno profundamente en su presa. (Lee MS, Scanlon JD, 2002; Vidal 2002) (Lee & Scanlon 2002)

2.4.5. Hábitat

B. asper le gusta los ambientes húmedos y se reproduce en la mayoría de las zonas de vida, situados en las elevaciones bajas o medias (600 metros). Habita principalmente la selva tropical y el bosques verde, pero también la podemos encontrar en las zonas más secas del bosque tropical, sabana cerca de lagos, ríos y arroyos. El área de acción de *B. asper* promedio es entre 3,71 y 5,95 hectáreas, que es relativamente pequeño en relación con otros pitvipers. (Sasa et al., 2009).

También se ha encontrado en una amplia variedad de otros hábitats, incluyendo las tierras bajas y en las regiones montañosas más bajas, las regiones secas de algunos bosques tropicales de hoja caduca, *Bothrops* prefiere los niveles más altos de humedad, pero los adultos se puede encontrar en las zonas desérticas, ya que tienen menos riesgo de deshidratación que sus contrapartes. Se conoce que *Bothrops*, acostumbra moverse en las áreas de tierras agrícolas, recientemente talados en muchos países. Estas víboras son principalmente terrestres, pero se sabe que algunos juveniles se suben a los árboles. Ello se han documentado en elevaciones desde el nivel del mar hasta los 2.640 m sobre el nivel del mar. (Cisneros-Heredia y Touzet, 2004)

2.4.6. Hábitos

Bothrops, debido a su gran distribución, se alimenta de una amplia variedad de

presas. El tamaño, la fuerza, y el veneno extremadamente tóxico hacen de Terciopelos depredadores eficaces. En la edad adulta, han sido conocidos por alimentarse de mamíferos, anfibios y reptiles, pero no se limitan a estos grupos. Los juveniles se alimentan de lagartijas e incluso insectos grandes, como *Scolopendra angulata*.

En algunos países, como Costa Rica, se conoce que los adultos se alimentan de ratas (*Rattus rattus*), zarigüeyas (*Caluros derbianus* y *Didelphis marsupialis*), y otros roedores, así como conejos (*Sylvilagus brasilienses*), ranas (*Lithobates forreri*) y lagartijas (*Gonatodes albogularis*). En Ecuador se alimentan principalmente de roedores. En la isla de Trinidad, *Bothrops* se ha sabido que se alimentan de todo, desde roedores y otros pequeños mamíferos, lagartos, ranas y aves o incluso cangrejos de río.

Esta especie es nocturna y solitaria, poca activa en los períodos fríos y más activa en los secos. *B. asper* tomar el sol durante el día y permanecer quieta y bien camuflada en la hojarasca o debajo de la cubierta forestal de espera para emboscar presas que viene dentro del rango durante la noche. Cuando es acorraladas o amenazadas, esta víbora puede ser muy defensiva y puede mostrar una pantalla de defensa en espiral. (Mattison, 2007).

2.4.7. Ciclo de Reproducción

El ciclo reproductivo y el tamaño de la camada de esta especie varían según la

ubicación y los patrones de lluvia, la reproducción es muy estacional. La época de reproducción es diferente entre las poblaciones de las tierras bajas del Caribe y del Pacífico. En el lado del Pacífico, el apareamiento tiene lugar entre septiembre y noviembre, para obtener crías en abril y junio. El número promedio de neonatos nacidos es de 5-40 en esta población. En el Atlántico, el apareamiento es en marzo, y los nacimientos se producen entre septiembre y noviembre. El número de crías es de 14-86. En ambas poblaciones, el tiempo de gestación varía de seis a ocho meses. Esta especie es considerado como la más prolifera de todas las serpientes en las Américas. (Solórzano y Cerdas, 1989) (Gutiérrez et al. 1986)

2.5 Características y composición del veneno de *B. asper*

Los venenos de serpientes son secreciones de naturaleza sero-mucosas que de forma muy general y atendiendo criterios fármaco-cinéticos, se pueden clasificar en toxinas o enzimas, considerando que hay componentes de venenos que muestran ambos tipos de actividad. (Chippaux y Goyfon, 1998; Duque-Osorio et al., 2007; Chippaux y Goyffon 1998)

Estas secreciones tóxicas son producidas por un par de glándulas exocrinas especializadas relacionadas con los colmillos por conducto. Son mezclas complejas de moléculas de diferente naturaleza bioquímica, con un predominio de proteínas, muchas de las cuales están dotadas con actividades enzimáticas. (Mackessy & Baxter 2006)

Por lo tanto, las actividades específicas de un veneno de serpiente se pueden atribuir a los componentes o toxinas particulares. Mientras que este principio

general ha sido muy útil e importante en el estudio de los venenos, no siempre es válido, ya que puede haber efectos que son causados por dos o más toxinas que actúan en combinación, es decir, de forma sinérgica. Por otra parte, una toxina determinada puede tener más de una actividad específica, y por lo tanto, puede desempeñar múltiples papeles en los efectos generales de envenenamiento. (Gutiérrez et al. 1995)

El veneno de *B. asper* contiene proteínas, que pertenecen al menos a ocho familias: metaloproteinasa + Zn_2 (41-44 %), la fosfolipasa A_2 (PLA₂: 29-45 %), serinaproteinasa(4-18 %), ácido L-aminoácido oxidasa (LAAO) (5-9%), desintegrina (1-2%), lectina tipo C secretora (0,5 %), toxinas (CRISP) (0,1 %), y la fragmentación de CC (< 0,1 %). (Alape-Giron et al. 2008)

Existen otras proteínas sin actividad enzimática como los péptidos natriuréticos, miotoxinas, toxinas CRISP(proteína secretora rica en cisteína), toxinas nerviosa y vascular de crecimiento del endotelio, y la cistatina e inhibidores de proteínasa de tipo Kunitz. (Calvete y Juárez, 2007) (Calvete et al. 2007)

Protein family	Toxin name	Properties	Sequence, PDB*	Reference
Phospholipase A ₂	PLA I	acidic, 32 kDa	-	Ferlan and Gubenšek (1978)
	PLA II	acidic, 16 kDa	-	Ferlan and Gubenšek (1978)
	PLA ₂ 1	acidic, 11 kDa	-	Alagón et al. (1980)
	PLA ₂ 2	acidic, 11 kDa	-	Alagón et al. (1980)
	PLA ₂ 3	acidic, 29 kDa	-	Alagón et al. (1980)
	myotoxin I	basic, 15 kDa	-	Gutiérrez et al. (1984)
	myotoxic PLA ₂	basic, 15 kDa	-	Mebs and Samejima (1986)
	myotoxin III	basic, pI 8.7, 15 kDa	P20474	Kaiser et al. (1990)
K49	myotoxin II	basic, pI 9.1, 15 kDa	P24605, 1CLP	Lomonte and Gutiérrez (1989)
	myotoxin IV	basic, 15 kDa	-	Díaz et al. (1995)
Metalloproteinase	proteinase G BaP1	neutral, pI 7.1, 18 kDa	-	Aragón and Gubenšek (1987)
		basic, pI 8.2, 23 kDa	P83512, 1ND1	Gutiérrez et al. (1995a)
P-III	BaH1	acidic, pI 4.5, 64 kDa	-	Borkow et al. (1993)
	BH2	acidic, pI 5.2, 26 kDa	-	Borkow et al. (1993)
	BH3	acidic, pI 5.0, 55 kDa	-	Borkow et al. (1993)
	BaH4	acidic, pI 5.3, 69 kDa	-	Franceschi et al. (2000)
	basparin A	acidic, 70 kDa	-	Loría et al. (2003)
Serine proteinase	asperase	acidic, 30 kDa	-	Aragón-Ortiz and Gubenšek (1978)
	ficozyme	acidic, 25 kDa	-	Fořtová et al. (1990)
	thrombin-like	acidic, 27 kDa	Q072L6	Pérez et al. (2008)
L-amino acid oxidase	Lao 1	acidic, 125 kDa	-	Umaña (1982a)
	Lao 2a	acidic, 125 kDa	-	Umaña (1982a)
	Lao 2b	acidic, 125 kDa	-	Umaña (1982a)
C-type lectin-like	aspercetin	acidic, 30 kDa	-	Rucavado et al. (2001)
Disintegrin	bothrasperin	acidic, 8 kDa	-	Pinto et al. (2003)

Nº4: Principales proteínas del veneno de *B. asper* (Angulo & Lomonte 2009)

2.5.1 Fosfolipasa PLA₂

Además de sus efectos miotóxicos, ciertas isoenzimas de PLA₂ pueden presentar efectos neurotóxicos, anticoagulantes, edematogénicos y/o cardiotoxicos. Estos efectos no solo dependen de las propiedades de la PLA₂, sino también de la presencia de receptores específicos o aceptores de estas proteínas en las células diana. Estos receptores pueden agruparse en dos tipos principales: M (muscular) y N (neuronal). Las PLA₂s no son exclusivas de los venenos y se clasifican en

tres clases principales de acuerdo a su estructura primaria, en el modo de los apareamientos disulfuro, requerimientos de calcio y localización celular. El veneno de *B. asper* contiene una proporción significativa de las enzimas PLA₂, tanto ácidos como básica. (Alape-Girón et al. 2009)

Por otro lado, PLA₂s básicas son más abundantes que sus contrapartes ácidas en el veneno de *B. asper* y varias isoformas han sido aislados. Se ha demostrado que dañan el tejido del músculo esquelético, en cuestión de minutos al momento de su inoculación intramuscular, reproduciendo mionecrosis drástica inducida por todo el veneno. Este grupo de proteínas ha sido comúnmente conocido como miotoxinas PLA₂, lo que indica que estas toxinas, son el principal componente responsables de mionecrosis en envenenamientos por esta especie. (Lomonte et al. 2008)

2.5.2. Metaloproteinasas (SVMPs)

Juegan un papel clave en el desarrollo de síntomas tales como hemorragia, edema, hipotensión, hipovolemia, inflamación y necrosis. (Fox & Serrano 2005)

Las metaloproteinasas dependientes Zn₂ se encuentran abundantemente en venenos de serpientes, y se clasifican en cuatro grupos estructurales, de PI a P-IV, sobre la base de su dominio de la composición. En el veneno de *B. asper*, la presencia de las metaloproteinasas de los tres primeros grupos se ha demostrado mediante técnicas proteómicas, aunque se han aislado sólo representantes de la PI y los grupos de P-III. La primera proteína de esta familia aislado de *B. asper* fue la metaloproteinasa G, una enzima glicosilada de 18 kDa, que probablemente pertenece al grupo de PI. Esta enzima hidroliza un número de sustratos de

proteínas in vitro tales como la caseína, la hemoglobina, gelatina y fibrinógeno. (Angulo et al. 1997)

La mayoría de SVMP, exponen principalmente la actividad hemorrágica, aunque otras funciones, tales como la activación de la protrombina y el factor X, la fibrina (fibrinogenólisis), la apoptosis y la inhibición de la agregación de plaquetas. Aunque la hemorragia inducida por SVMP, depende principalmente de la actividad proteolítica del dominio metaloproteasa, la potencia de esta actividad se incrementa por la presencia de las estructuras de dominios adicionales que están ausentes de la PI y de clase P-II. En consecuencia, P-III SVMP muestra típicamente los mayores actividades hemorrágicas. (Brust et al. , 2013; Markland y Swenson, 2012; (Brust et al. 2013)(Markland y Swenson 2013)

2.5.3 Serinaproteinasas (SVSPs)

La serinaproteinasas, se encuentran entre las enzimas de veneno mejor caracterizadas que afectan el sistema hemostático. Actúan sobre una variedad de componentes de la cascada de coagulación, en el sistemas de calicreína - quinina y fibrinolítico y en las células para causar un desequilibrio de el sistema hemostático de la presa. (Serrano y Maroun 2005)

En el veneno de *B. asper*, las serinaproteinasas son componentes abundantes, es decir de 5 a 18 % de las proteínas, dependiendo de la edad de la serpiente y las variaciones de región geográfica. Esta enzima tiene 27kDa con actividad in vitro similar a la trombina, promueve la desfibrinación. Además de su capacidad para inducir la coagulopatía, esta enzima tóxica también causa alteraciones del

comportamiento tales como la pérdida del reflejo de enderezamiento, opistótonos y rotaciones intermitentes sobre el eje largo del cuerpo. (Pérez et al. 2008)

2.5.4. L – aminoácido oxidasa (LAAO)

Se han aislado tres isoformas, de la enzima L - aminoácido oxidasa a partir de veneno de *B. asper*, con una masa molecular similar de 125 kDa, pero ligeras variaciones en su movilidad electroforética.(Umaña 1982)

LAAO es una flavoenzima que cataliza la desaminación oxidativa de un sustrato de L-aminoácido en un α -ceto ácido con la producción de amoníaco y peróxido de hidrógeno. LAAO es la única oxidasa dependiente de FAD que se encuentra en el veneno de serpiente, y la toxicidad del veneno puede estar relacionado con el peróxido de hidrógeno generado durante la reoxidación del cofactor de flavina por oxígeno molecular, atribuyéndole una actividad antibacteriana. (Torres et al. 2010)

2.5.5 Lecitina Tipo C

Es una proteína heterodimérica unida por puentes disulfuro, con una masa Molecular de 29.759 y un pH de 4,5. Aspercetin es un representante importante de la familia de las lectina tipo C, y es considerado potente agente causante de agregación plaquetaria, en la presencia de plasma o factor de Von Willebrand , ya que su actividad resulta de la interacción de este factor con receptor plaquetario GPIb. Esta proteína prolonga el tiempo de sangrado y promueve la hemorragia, contribuyendo de manera significativa a los efectos hemorrágicos prominentes, que se manifiestan en el envenenamientos por *B. asper*. (Rucavado et al. 2001)

2.5.6 Desintegrinas

Las desintegrinas, son polipéptidos no enzimáticos (40 a 100 aminoácidos), ricos en cisteína, ampliamente distribuidos en los venenos de serpientes *B. asper*, que antagonizan las funciones adhesivas de varios tipos de receptores de integrina. Las desintegrinas de tamaño mediano, son llamadas bothrasperin, fueron aisladas de veneno de *B. asper* y parcialmente caracterizadas. (Angulo & Lomonte 2009)

Las desintegrinas representan una familia de polipéptidos liberados en los venenos de serpientes Viperidae y Crotalidae (víboras y serpientes de cascabel) por el procesamiento proteolítico de PII Zn²⁺ + metaloproteinasas o sintetizados a partir de los RNAm de corta codificación. Las desintegrinas bloquean selectivamente la función de $\beta 1$ y $\beta 3$ receptores de la integrina. (Calvete et al. 2005) (Calvete 2013)

2.6 Fisiopatología del accidente ofídico:

El veneno de serpientes del género *Bothrops* provoca un complejo cuadro de alteraciones locales y sistémicas que pueden, según la gravedad del accidente, conducir a hemorragia generalizada y producir la muerte del paciente. (Gutiérrez et al. 1980)

Envenenamientos por *Bothrops asper* se asocian a menudo con manifestaciones patológicas locales complejas y graves, como edema, ampollas, dermonecrosis, mionecrosis y hemorragia. Estos efectos son sobre todo la consecuencia de la acción directa de las metaloproteinasas dependientes del zinc (SVMPs) y fosfolipasas A₂ (miotóxicos PLA₂s). La SVMPs, induce hemorragia, formación de

ampollas, dermonecrosis y la degradación de la matriz extracelular en general, mientras que PLA₂s inducen mionecrosis y también afectan a los vasos linfáticos. Además, las prominentes alteraciones vasculares que dan lugar a la hemorragia y el edema pueden contribuir a la isquemia y posterior necrosis del tejido. El daño tisular inducido producido por el veneno también juega un papel en la promoción de la infección bacteriana. Una reacción inflamatoria prominente se desarrolla como consecuencia de estas alteraciones patológicas locales, con la síntesis y liberación de mediadores abundantes, lo que resulta en edema y el dolor.

La regeneración de los tejidos después de los efectos patológicos inducidos por veneno a menudo se ve afectada, lo que resulta en pérdidas importantes de tejido y disfunción. El daño microvascular inducido por SVMP es probable que sea responsable de esta mala evolución regenerativa. Los antivenenos son sólo parcialmente eficaces en la neutralización de los efectos locales inducidos por *B. asper*. (Gutiérrez, Escalante, et al. 2009)

2.6.1. Efectos locales

Aparecen rápidamente, después de la mordedura en el sitio anatómico donde se inyecta el veneno. Estos efectos incluyen el edema y el dolor, hemorragia, necrosis muscular, formación de ampollas y dermonecrosis. Además, la infección local por las bacterias presentes en la boca de la serpiente o en la piel de los pacientes a menudo complica estos casos. (Otero et al. 2002)

2.6.2 . Edema y dolor

La síntesis y liberación de mediadores endógenos juegan un papel central en el edema, la hiperalgesia y la alodinia.

Edema local y el dolor aparecen muy rápidamente después de la inyección de veneno de *B. asper*. El curso de tiempo de edema depende en gran medida de la dosis de veneno inyectado. Esto probablemente refleja diferentes mecanismos en la génesis de desequilibrio de líquidos en los tejidos que conduce al edema. La fisiopatología de la formación de edema inducido por el veneno de *B. asper* es multifactorial. Hay un daño directo sobre los microvasos, es decir, capilares y vénulas, por la acción de las toxinas hemorrágicas, con la consiguiente extravasación. Además, el edema está mediado por la acción de mediadores de la inflamación, puesto en libertad o sintetizado en el curso de envenenamiento, que inducen incrementos en la permeabilidad de los microvasos. (Gutiérrez y Lomonte, 2003) (Teixeira et al. 2003)

De la misma manera, que la base farmacológica de la hiperalgesia y la alodinia inducida por este veneno ha sido investigado, y la participación de los diversos mediadores, tales como la bradiquinina y leucotrienos, pone en evidencia un mecanismo multifactorial en la aparición del dolor. (Chacur et al. 2001)

Altas dosis de veneno de *B. asper*, provocan un edema de larga duración, es decir, que las alteraciones patológicas en los tejidos y la vasculatura son responsables de un prolongado desequilibrio de líquidos intersticiales. Es posible que el daño patológico a microvasos pueda ser considerable, ya que el veneno afecta drásticamente la integridad de los capilares, las vénulas y las pequeñas arterias. (Arce et al. 1991)(Moreira et al. 1992)

2.6.3 Hemorragia local

Las metaloproteinasas dependientes del zinc son responsables de la actividad hemorrágica de los venenos de *B. asper*. Estas metaloproteinasas (SVMPs) se clasifican en varios grupos (PI - IV), de acuerdo con la composición de sus dominios. La P -III SVMPs, que comprende metaloproteinasas, con dominios ricos en cisteína - desintegrinas, ejercen una actividad hemorrágica más potente que la PI SVMPs, que presentan sólo el dominio metaloproteinasas. Las SVMPs degradan diversos componentes de la membrana basal y también son capaces de hidrolizar las proteínas de membrana de células endoteliales, tales como integrinas y cadherinas, que participan en la matriz celular y la adhesión célula-célula. La hemorragia inducida por SVMPs, es un evento extremadamente rápido in vivo, con las células endoteliales de los capilares que muestra alteraciones estructurales drásticos dentro de pocos minutos. (Gutiérrez et al. 2005)

Las toxinas hemorrágicas más potentes pertenecen a la categoría P -III SVMPs, y hay fuertes evidencias que sugiere que los dominios ricos en *Dis* y *Cys* contribuyen a la alta actividad hemorrágica en la microvasculatura y, afectar a la coagulación. (Loría et al. 2003)

La concentración de PI SVMPs, es mayor que el de P - III SVMPs en el veneno de los especímenes adultos de *B. asper*, mientras que los venenos de los recién nacidos tienen un predominio de P - III SVMPs. (Alape-giro et al. 2008)

2.6.4. Dermonecrosis y formación de ampollas

La inyección intramuscular o subcutánea del veneno de *B. asper*, en víctimas humanas resulta en daño agudo a la piel, provocando una hemorragia, dermonecrosis y ampollas (Warrell, 2004). (Otero, et al. 2002)

Las ampollas se forman dentro de la primera hora de la inyección, con una clara separación de la dermis y la epidermis y con la acumulación de un exudado proteico, predominantemente por la escisión proteolítica de los componentes de la interfaz dermo-epidérmica, en la región de la lámina lúcida, con la consiguiente separación de la epidermis de la dermis y con componentes de la lámina densa y las fibrillas de anclaje, que permanezcan unidas a la dermis.

Esta escisión proteolítica, puede ser debido a la acción directa de la SVMP o, alternativamente, a la acción de proteinasas endógenas, sintetizan y se liberan en el tejido como consecuencia de la reacción inflamatoria subsiguiente. (Rucavado et al. 1998).

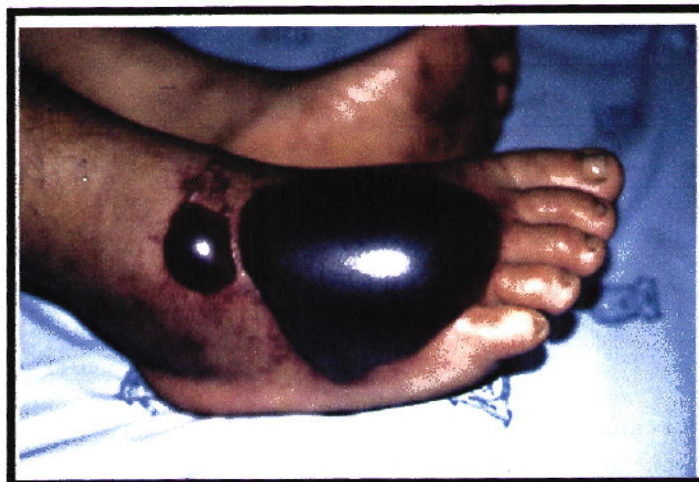


Figura N° 5: Formación de ampollas hemorrágicas y necrosis 24 horas después de la mordedura de *B. asper*. (Otero-Patiño 2009a)

2.6.5. Degradación de la matriz extracelular.

La inyección de veneno en los tejidos después de la mordedura de serpiente, con la consecuente hidrólisis de componentes de la matriz extracelular, constituye un aspecto altamente relevante de la patología, inducida local del veneno.

En el caso del veneno de *B. asper*, SVMPs, serinaproteinasas y hialuronidasas, entre otros son componentes, jugar un papel relevante en el daño de la matriz extracelular. (Gutiérrez, Rucavado, et al. 2009)

Se ha demostrado que la hidrólisis de ácido hialurónico por hialuronidasa, que se producen in vitro por el veneno de *B. asper*, desempeña un papel como un factor de ensanchamiento, e incrementa la actividad hemorrágica local de SVMP.

Por otro lado, la degradación de la matriz extracelular por SVMPs puede contribuir a la difusión local y sistémica de los componentes del veneno, además de la acción directa de hidrolasas de veneno en los componentes de la matriz extracelular, la respuesta inflamatoria de los tejidos a la inyección del veneno implica la expresión de las proteinasas endógenas, especialmente las MMP.

(Rucavado et al. 1998) (Saravia-Otten et al. 2004)

2.6.6. Mionecrosis local

La mionecrosis es causante de serias secuelas, por pérdida de masa muscular o segmentos de extremidades. Investigaciones han demostrado que la miotoxicidad de los venenos de *Bothrops*, se debe a la acción de hemorraginas (MP), causantes de isquemia por hemorragia. Este tipo de daño muscular deja secuelas porque el proceso de reparación, lleva a la fibrosis. En los venenos de *Bothrops spp*, se han aislado PLA₂ miotóxicas, que inducen lesión difusa en la membrana

plasmática y degeneración de la miofibrilla por influjo desmesurado de calcio y macromoléculas, evento que puede ser detectado tan precozmente como 30 minutos después de la inoculación del veneno. La lesión inicial de la membrana se denomina lesión delta.

A diferencia de las miotoxinas hemorrágicas (MP), las PLA₂ miotóxicas no dejan secuelas porque la regeneración del músculo es total en plazo de 15 días. Pero, algunas de estas miotoxinas son también neurotoxinas (por ejemplo, la crotoxina), son nefrotóxicas y muy letales. El efecto de las miotoxinas de *Bothrops* también puede extenderse al miocardio y es así como se han descrito focos de hemorragia y necrosis en el miocardio. (Otero-Patiño 2009b)

2.6.7. Inflamación

El veneno de *B. asper*, provoca entre otras alteraciones, una respuesta inflamatoria pronunciada en el sitio de la inyección, tanto en seres humanos y animales experimentales. El edema local prominente es un hallazgo clínico frecuente en víctimas mordidas por *B. asper*, que con frecuencia causa la isquemia y la compresión de los nervios, lo que lleva a la pérdida permanente de los tejidos, la discapacidad o la amputación.

Este es un hecho relevante, ya que la terapia antiveneno no revierte las manifestaciones locales de envenenamiento. (Ohsaka , 1979 ; Otero et al, 2002; Jorge et al. 1994; Mora et al. 2008)

Estudios sobre la dinámica de daño tisular local inducida veneno de *B. asper* (BAV), mostraron pérdida de plasma, a partir de pequeñas vénulas y capilares adyacentes, después de unos 2 minutos de exposición al veneno y la estasis en la microcirculación con empaquetamiento denso de los eritrocitos en los capilares y pequeñas vénulas. (Lomonte et al. 1994)

Además, la capacidad del BAV para producir la vasoconstricción de los vasos linfáticos está asociada con una reducción de la luz del vaso y una interrupción en el flujo de la linfa. Por lo tanto, el efecto de BAV en el sistema linfático, puede ser un mecanismo relevantes para la patogénesis del edema en los tejidos. (Gutiérrez, Rucavado, et al. 2009)

2.6.8. Variaciones ontogenéticas en el veneno y las implicaciones en el daño tisular local.

Se han descrito diferencias importantes entre los venenos de ejemplares recién nacido / neonato y los de ejemplares adultos de *B. asper*. En cuanto a los efectos locales, los venenos de los especímenes recién nacidos inducen hemorrágicas y actividades de formación de edema más fuertes que las de los adultos, mientras que el segundo induce mionecrosis fuerte. (Saldarriaga et al. 2003)

Dichos perfiles fisiopatológicos diferentes pueden entenderse a la luz de los proteomas de estos venenos, ya que los de los recién nacidos tienen un gran contenido de P-III SVMPs y un contenido muy bajo de PLA₂s básicos miotóxicos y homólogos PLA₂. En contraste, los venenos de los adultos presentan un contenido relativamente bajo de P-III SVMPs, y una alta cantidad de PLA₂s miotóxicos. Por estas razones los venenos de *B. asper* recién nacido, tiene un perfil

predominantemente vasculotóxico, mientras que los de los adultos presentan un perfil predominantemente miotóxico. Otra consideración importante es el volumen de veneno de que se suministra por ejemplares recién nacidos y adultos es muy diferente. (Alape-Girón et al. 2008)(Lomonte & Carmona 1992)

2.7 Complicaciones infecciosas y bacterias asociadas al accidente ofídico por *B. asper*.

La infección de tejidos blandos, después de las mordeduras de víboras se le han atribuido a la actividad proteolítica, hemorrágica, necrotizante, miotóxica y los factores inductores de edema que están presentes en el venenos y que pueden crear un ambiente favorable para la multiplicación de bacterias presente en la boca, colmillos, y el veneno de la serpiente . (Jorge et al. 1994) (Jorge et al. 1998)

Las complicaciones más frecuentes descritas en pacientes envenenados por *B. asper* son: la infección de tejidos blandos (11-30 % de los casos), caracterizado por el impétigo, celulitis, absceso, fascitis, predominantemente celulitis y abscesos causados por bacilos gramnegativos. Sin embargo, artritis, osteomielitis, septicemia, neumonía y meningitis son complicaciones menos frecuentes, pero se han descrito en envenenamientos *B. asper*. El cultivo de los aspirados es una guía valiosa para identificar los organismos que infectan. (Gutiérrez y Lomonte, 2003).

La bacteria, que con mayor frecuencia causan infección son las enterobacterias, principalmente *Morganella morganii*, *Proteus rettgeri*, *Enterobacter spp.*, y *Escherichia coli*. También están involucrados algunos microorganismos Gram

positivos como *Streptococos del grupo D* incluido aquí *Enterococcus spp.* y *Bacteroides spp.* La infección se presenta con mayor frecuencia en envenenamientos graves y moderados, cuando ocurren edema local extenso, hemorragia, necrosis y miotoxicidad, que pueden crear un entorno favorable para la multiplicación de las bacterias presentes en la boca, colmillos y veneno de la serpiente. (Andrade et al, 1989; Arroyo et al, 1980; Jorge y col, 1990, 1994, 1998, 2004; Gutiérrez y Lomonte, 2003; Saravia - Otten et al, 2007; Otero et al, 1992a, 1996, 1999, 2002a, 200; Otero - Patiño et al, 1998, 2007; Saldarriaga y Otero, 1995; Theakston et al, 1990).



Figura N° 6: Celulitis y absceso causado por *M. morganii*. (Otero, 2008.)

Bacterias como Aeromonas hydrophila son de aislamiento común en infecciones de tejidos blandos, produciendo abscesos con exudados purulentos que complican las mordeduras de la serpiente. *B. asper* como ya se ha mencionado,

tienen un veneno necrotizante, miotóxico, que induce edema local, lo que favorece la multiplicación en el tejido lesionado de cepas de *A. hydrophila*, que probablemente estuvieron presentes en la boca, colmillos o veneno de las serpientes.

El cloranfenicol parece ser una buena alternativa para el tratamiento empírico de la infección de los tejidos blandos complicando mordedura de serpiente, porque es activo contra la mayoría de las bacterias anaerobias y aerobias encontrado en estos abscesos, incluyendo *A. hydrophila*; se puede administrar por vía oral, y suele ser barato. Alternativas adecuadas son cotrimoxazol o fluoroquinolonas, a la que *Aeromonas* son generalmente susceptibles in vitro, asociada con antibióticos, tales como la clindamicina y metronidazol, con un espectro anti-anaeróbico. (Jorge et al. , 1998)

Otros estudios de la sensibilidad de estas bacterias, han sugerido que esta infección debe ser tratada con cloranfenicol, como un único agente antimicrobiano, o con las combinaciones de bencilpenicilina o ampicilina con aminoglucósido o trimetoprim / sulfametoxazol. En algunos países los servicios de salud gubernamentales no recomiendan el uso profiláctico de medicamentos antimicrobianos, todavía no está claro que un procedimiento de este tipo no sería útil en los casos con una alta probabilidad de infección. (Jorge et al. , 1994)

En este contexto el uso de antibióticos profilácticos para prevenir la infección como complicación del envenenamiento necrótico local es controversial, de manera que, el uso de algunos antibióticos por vía oral, para las víctimas con mordidas de la serpiente del género *Bothrops*, con signos de envenenamiento

local, no es eficaz para la prevención de infecciones locales. (Jorge et al. , 2004).

2.8 Identificación de la microbiota de la cavidad bucal y el veneno de la serpiente *B. asper*.

El aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en la cavidad bucal de *B. asper*, tiene gran relevancia clínica y epidemiológica. La tasa de incidencia del accidente ofídico en América Latina, varía de país en país (5-62 casos por 100 000 habitantes por año), correspondiendo aproximadamente a 130, 000 -150,000 nuevos casos cada año en toda la región, con un número estimado de 2,300 muertes (Otero, 2009, 2013). La mayoría de los casos son ocasionados por *Bothrops asper* (50-80%) (Otero-Patiño, 2009, 2013).

La teoría de que los gérmenes de la propia serpiente, participan en la formación de los abscesos, se ha mejorado por los estudios de diversos autores que han aislado bacterias potencialmente patógenas de la boca y / o a partir del veneno.

Estudios recientes han demostrado que únicamente entre 0.1 y 10% de las bacterias de la flora y ambiente son cultivables. Antes de 1990 la diversidad bacteriana se evaluaba mediante pruebas fenotípicas. En los últimos años el análisis de las bacterias se basa en el gen 16S rRNA y la metagenómica. (Popa et al. 2009)

2.8.1. Técnicas dependientes de cultivo

Las técnicas de identificación de los microorganismos dependientes de cultivo incluyen tanto las técnicas microbiológicas tradicionales, basadas en caracteres fenotípicos, manuales y automatizadas.

Entre las primeras podemos mencionar el empleo de pruebas manuales como TSI (triple azúcar hierro), SIM, Citrato, urea entre otras y la identificación automatizada con la utilización del equipo **VITEK® 2 Compact**, de BioMérieux.

Aunque las pruebas bioquímicas, siguen siendo hoy día muy importantes en la identificación de los microorganismos, sin embargo tienen serios inconvenientes, entre los que podemos mencionar, que no siempre son reproducibles, no permiten obtener información sobre la diversidad genética de los distintos aislados, ni por supuesto diversidad genética de la comunidad de la cual se han aislado, la cuantificación en algunos casos puede resultar laboriosa y engorrosa, sólo se pueden aplicar en aquellos microorganismos cultivables.

En este sentido, conviene diferenciar entre bacterias viables no cultivables y bacterias en situación de estrés o dañadas. Mientras las primeras no pueden crecer en medios selectivos ni en medios no selectivos, las segundas no suelen crecer en medios selectivos pero sí pueden hacerlo a veces en medios y/o condiciones determinadas. Los sistemas de identificación y tipificación tradicionales han estado basados fundamentalmente en el estudio de cepas cultivables, las cuales pueden representar sólo una pequeña proporción de la diversidad microbiana existente. De ahí que en los últimos años se haya hecho un esfuerzo considerable en el desarrollo de una metodología complementaria, que combine reproducibilidad, velocidad, sencillez y bajos costos en la identificación microbiana. (Giraffa et al. 2001)

Sin embargo, a pesar de la gran variedad metodológica existente, hoy día no

existe una técnica que por sí sola permita conocer la diversidad microbiana completa de un ecosistema. Por ello, es necesario combinar varias metodologías, incluyendo las técnicas tradicionales dependientes de cultivo, con las técnicas independientes de cultivo, para que podamos generar una imagen más realista del conjunto de microorganismos, que se encuentran en un ecosistema. Es lo que hoy día se conoce como taxonomía polifásica, que engloba información fenotípica, genotípica y filogenética.(Dahllöf, 2002; Giraffa, 2004).

2.8.2 Técnicas independientes de cultivo

Las técnicas independientes de cultivo tratan de resolver algunos de los problemas asociados con la identificación bacteriana que ya se han expuesto en el apartado 2.8.1. Fundamentalmente tratan de determinar la diversidad microbiana en los ecosistemas, tanto en el espacio como en el tiempo, sin necesidad de recurrir a su aislamiento.

Las limitaciones de estos procedimientos, suelen estar asociados con aspectos técnicos, por ejemplo en la extracción de ADN/ARN de la muestra, los errores propios de la amplificación del ADN (falta de anillamiento con los cebadores, anillamientos erróneos, competencia entre los cebadores, preferencias del cebador, etc.) entre otros. El gen más utilizado en el análisis de comunidades microbianas es el ADNr 16S, que a pesar de sus numerosas ventajas también presenta algunos inconvenientes, como por ejemplo la heterogeneidad intra-específica o la escasa discriminación entre especies muy próximas. (Giraffa y

Neviani, 2001; Ercolini, 2004; Ogieret al., 2002).

La disponibilidad hoy día de secuencias de ADN, prácticamente de la mayoría de las especies descritas, junto con la presencia de catálogos de cebadores específicos de determinados taxones, ha permitido el desarrollo de numerosas técnicas basadas en la amplificación del ADN, que permiten la identificación exacta a nivel de género y especie, con una enorme reducción de costes y tiempo. Estos métodos están basados en la amplificación de secuencias diana específicas, secuencias de ADN repetidas, amplificación al azar, o la propia secuenciación de los productos amplificados.

2.8.2.1 Huella genética

La huella genética, genera un perfil de las comunidades microbianas, basado en el análisis directo de los productos de PCR, amplificados a partir de ADN del medio ambiente. Estas técnicas incluyen DGGE / TTGE, SSCP, RAPD, ARDRA, T-RFLP, LH-PCR, ARISA, y RAPD y producen una huella digital comunitaria basada en el polimorfismo de secuencia o polimorfismos en la longitud. En general, la huella genética son técnicas rápidas y permiten el análisis simultáneo de múltiples muestras. Enfoques de fingerprinting se han ideado para demostrar un efecto, en las comunidades microbianas o diferencias entre las comunidades microbianas y nos proporcionan identidades taxonómicas directas. Las "huellas digitales" de diferentes muestras, se comparan mediante análisis de conglomerados con ayuda de computadora con paquetes de software. tales como Peak Scanner, y relaciones en las comunidades son inferidas. Las huellas

digitales de la Comunidad, se puntúan como presentes o ausentes, y las similitudes entre las muestras se determinan mediante el coeficiente Jaccards. (Muyzer, 1999).

2.8.2.1.1. PCR-ARISA

El análisis automatizado del espaciador ribosomal intergénico (ARISA) es una técnica automatizada independiente del cultivo, adecuada para analizar estructuras de las comunidades microbianas del medio ambiente. Esta técnica basada en PCR, desarrollado por Fisher y Triplett, se basa en el uso de un cebador fluorescente, para la amplificación de espaciadores transcritos internos (ITS) ribosomales microbianos, usando ADN extraído de muestras ambientales como plantilla.

El método implica una separación por electroforesis capilar basada en la longitud de amplicones marcados fluorescentemente. Estos amplicones se obtienen a partir de la amplificación del espacio intergénico (ITS: *internal transcribed spacer*) dentro del operón que codifica para el ARN ribosomal (rARN). En particular, el fragmento analizado corresponde a aquel espacio entre los genes que codifican para la subunidad pequeña (16S) y grande (23S) del mismo. (Fisher & Triplett 1999). Este espacio intergénico 16S-23S se caracteriza por ser heterogéneo tanto en su secuencia como en la longitud. Esta heterogeneidad se debe, principalmente, a la presencia (en bacterias Gram (-)) o ausencia (en bacterias Gram (+)) de secuencias que codifican para ARN de transferencia (tARN) en esta región intergénica (Liao 2000). Estos dos tipos de variación (secuencia y longitud)

hacen a este espacio intergénico una región muy útil para la tipificación de cepas y separación entre especies bacterianas cercanas entre sí, en aquellos casos donde la secuencia del gen ribosomal 16S rARN no permite suficiente resolución (Scheinert *et al.* 1996).

Los productos de PCR, se analizan mediante un sistema de electroforesis capilar automatizado, que produce un electroferograma, los picos que se producen corresponden a fragmentos de ADN discretos, detectados por un sistema de detección de fluorescencia basada en láser. La sensibilidad de ARISA es muy alta (nivel de detección, de un solo nucleótido de diferencia), y la reproducibilidad está garantizada por instrumentos automatizados, como para la longitud de la heterogeneidad de la reacción en cadena de la polimerasa (LH-PCR), y el polimorfismo de terminales de fragmentos de restricción de longitud (T-RFLP), técnicas automatizadas de uso común en el estudio de estructura de la comunidad microbiana. Estudios comparativos han demostrado que el conjunto de cebadores adecuados para ARISA de las comunidades bacterianas ambientales es el **ITSF y ITSReub**. Los datos globales muestran que ITSF y ITSReub generan más información (en términos de número de pico) y perfiles reproducibles y produjeron una gama más amplia de tamaños de espaciadores (134 a 1387) que los otros cebadores que se limitaban en la detección de fragmentos largos. (Cardinal *et al.* , 2004).

ARISA-PCR, puede generar fragmentos de ADN de hasta 1,400 pb de longitud. La discriminación de estos fragmentos de mayor tamaño representa una nueva aplicación para el sistema de electroforesis capilar empleada. ARISA se ha

utilizado para analizar las estructuras genéticas de varias comunidades bacterianas y / o fúngicas de las muestras de agua dulce, bacterioplancton, y los diferentes suelos y ha permitido una estimación precisa de la complejidad de la comunidad, la detección de 38 a 232 picos por el perfil. En general, los resultados sugieren que ARISA es un método rápido y eficaz para evaluar la diversidad de la comunidad microbiana y composición que puede ser especialmente útil en las escalas espaciales y temporales sutiles necesarios en los estudios ecológicos. (Fisher y Triplett, 1999).

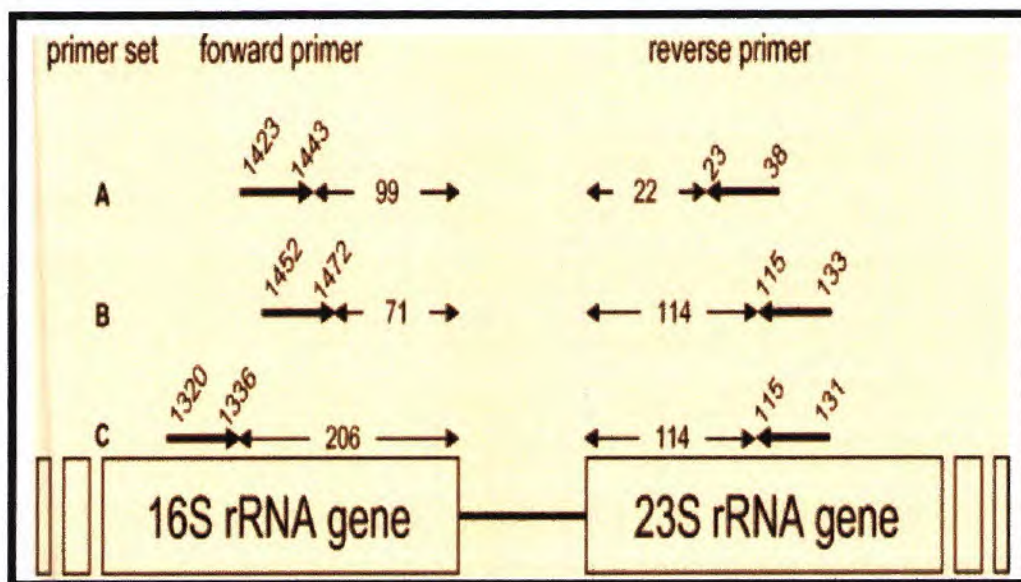


Figura N° 7: Operón ribosomal procariota con sitios de hibridación de cebadores ITSF / ITSReub.(A) (Cardinale, 2004.)

2.8.2.1.2 PCR- TTGE

Las técnicas, TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) y electroforesis

en gradiente temporal de temperatura o TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis), se han usado con éxito en el estudio de la composición y dinámica de comunidades microbianas. (Muyzer, 1999)

Se basan en la amplificación de las regiones variables de los genes correspondientes al ARNr 16S, a partir del ADN extraído de una muestra compleja, y la posterior separación de los fragmentos de ADN amplificados. Los cebadores utilizados, corresponden a regiones conservadas del ADNr, uno de los cuales lleva un pinza en el extremo 5', con un alto contenido en Guanina Citosina. La separación de los productos amplificados se realiza sobre la base de la reducción de la movilidad electroforética de una cadena de ADN doble, cuando está parcialmente desnaturalizada.

La T_m de una secuencia de ADN depende de su contenido en guanidina y citosina (GC), propiedad que va a permitir separar gradualmente moléculas de ADN de distinta secuencia (diferente T_m) en un gradiente desnaturalizante. Cuando el punto de fusión se alcanza, la doble hebra se separa parcialmente, creando una molécula ramificada con movilidad reducida en un gel de poliacrilamida. El ambiente desnaturalizante se crea mediante una concentración alta de urea (6-8 M) y un gradiente temporal de temperatura. La separación total de las hebras de ADN se evita mediante una cola rica de G y C que se acopla al extremo del oligonucleótido usado en la reacción de PCR. Si los fragmentos obtenidos poseen una secuencia rica en GC, la desnaturalización será más difícil y por lo tanto migrarán más rápido en la electroforesis. Se puede establecer un gradiente lineal químico (DGGE), un gradiente lineal de temperatura (TGGE) o un gradiente

temporal de temperatura (TTGE). (Ercolini et al., 2001)

Para la determinación de las identidades filogenéticas de las huellas dactilares DGGE/TGGE, las bandas pueden ser sacadas del gel, se amplifican nuevamente, y se secuencian o se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron a sondas moleculares específicas para diferentes grupos taxonómicos.

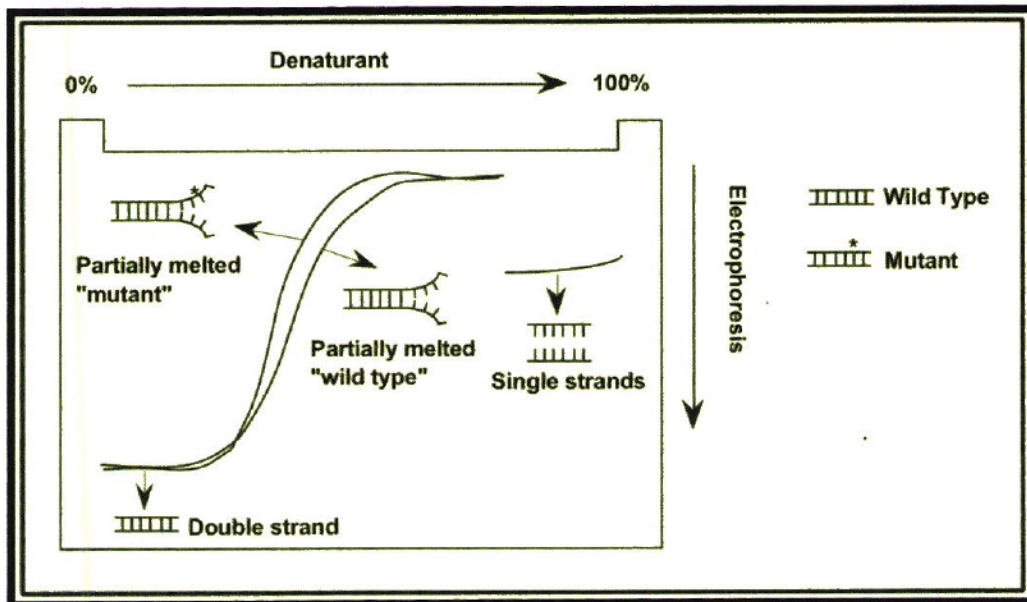


Figura N° 8: Separación electroforética específica de secuencia de fragmentos de ADN mediante TTGE (CatalogNumbers 170-9080 through 170-9104. BIO-RAD)

3.8.3 Secuenciación masiva.

Metagenómica, se refiere a los métodos independientes de cultivos para el estudio del conjunto colectivo de los genomas de las comunidades microbianas mixtas, y se puede aplicar a la exploración de todos los genomas microbianos en

consorcios que residen en nichos ambientales, en las plantas o en huéspedes animales. (Petrosino et al. 2009)

Los avances en el campo de la secuenciación del ADN están cambiando el horizonte científico y prometiendo una era de medicina personalizada para la salud humana. Nos encontramos en un punto en la historia donde los genomas individuales están comenzando a aparecer, pero donde el costo es demasiado alto para la secuenciación de genomas enteros de rutina. Estas necesidades son satisfechas por las plataformas miniaturizadas y paralelizadas que permiten utilizar muestras pequeñas, con un consumo menor de plantilla o microplacas, que aumenta la velocidad de producción de información y la reducción de costos. Estos sistemas paralelos de información masiva actuales, están proporcionando y mejorado significativamente el rendimiento frente a los sistemas de secuenciación de Sanger y el futuro de la molécula de DNA. (Pettersson et al. 2009a)

La extracción de ADN y la amplificación por PCR son pasos esenciales en las diferentes aplicaciones, incluyendo la medicina forense, secuenciación, análisis metagenómicos (es decir, el estudio de los perfiles comunitarios) y la comparación de los ecosistemas utilizando sus perfiles microbianos. (Jaric et al. 2013)

La secuenciación de Sanger ha sido una de las innovaciones más influyentes en la investigación biológica desde que se presentó por primera vez en 1977. Un poco más de 20 años después, un enfoque de secuenciación por bioluminiscencia vio la luz del día. (Nyrén 2007)

2.8.3.1 Pirosecuenciación

La **pirosecuenciación**, es una tecnología de determinación de secuencia de ADN

a gran escala, aplicable a genomas completos, mediante luminiscencia. A diferencia del sistema de Sanger, capaz de resolver 67.000 bases cada hora, el método 454, puede determinar la secuencia de 20 millones en 4,5 horas, lo cual abarata enormemente el costo del proceso. (Clarke 2005)

La muestra biológica se carga en una placa «PicoTiterPlate Device», de fibra óptica, que permite transmitir la luz producida por quimioluminiscencia durante la reacción de secuenciación hasta la cámara CCD de captación de imágenes. Dicha placa, en forma de panel, posee multitud de pocillos. La particularidad es el tamaño del ADN a secuenciar en cada pocillo (500 y 1000 nucleótidos). La genoteca de ADN genómico, con la cual se comienza la secuenciación se carga en la placa y cada fragmento se amplifica de forma aislada, mediante PCR en tiempo real o PCR basada en emulsión, de modo que se amplifique hasta 10 millones de veces; este incremento facilita la detección de la señal. (Pettersson et al. 2009b)

El fundamento de la secuenciación se basa en controlar el flujo secuencial y cíclico de nucleótidos, sobre la placa en combinación con un sistema de detección bioluminiscente que permite convertir los productos generados durante la incorporación de nucleótidos (pirofosfato) en luz (por medio de la luciferasa) que es detectable por el dispositivo CCD. (Fakruddin & Chowdhury 2012)

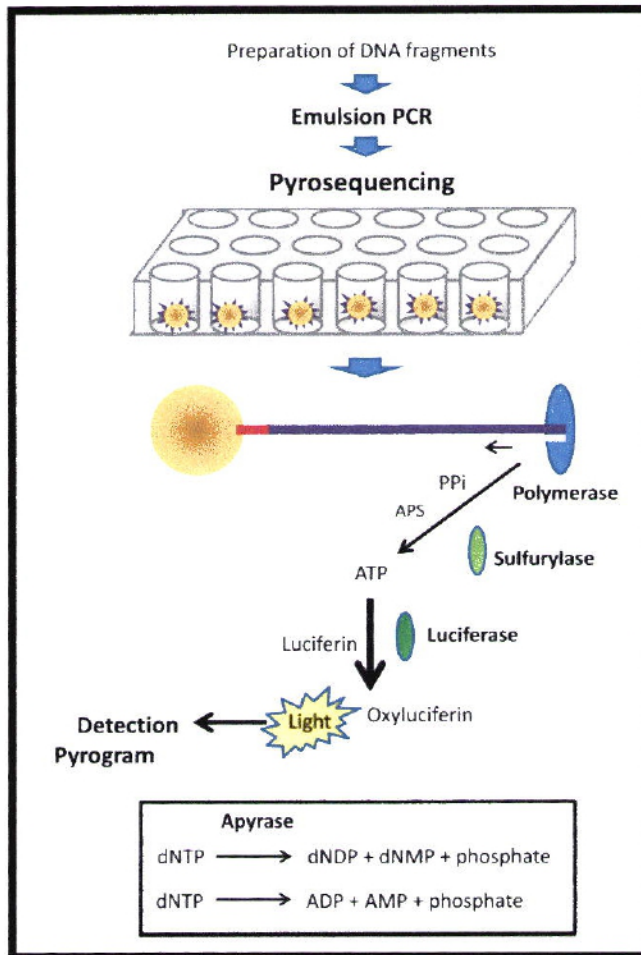


Figura N° 9: Representación esquemática de la pirosecuenciación

(Fakruddin y Chowdhury 2012)

La inyección de los dNTPs en cada pocillo acarrea la interacción con al menos un nucleótido complementario al situado en ese punto del ADN, de secuencia desconocida, en cada punto de la secuencia sólo un dNTP puede ser individualmente unido de forma correcta, y cada vez que esto sucede el establecimiento de un enlace químico, provoca la liberación de una molécula de

pirofosfato. (Siqueira et al. 2012)

En cada pocillo de la placa PicoTiter se añade, además del ADN molde, la polimerasa que va incorporando las bases complementarias de la secuencia. Al añadirlas, se produce el pirofosfato, el cual mediante la enzima sulfurilasa es transformado en ATP. Este ATP, es cogido por la enzima luciferasa que al unírsele a la luciferina, genera un haz de luz que indica la secuencia para ese punto. Tampoco nos podemos olvidar el papel de la enzima apirasa, esta enzima es la encargada de degradar aquellos nucleótidos que no han sido incorporados y quedan sueltos, con el fin de que al añadir un nuevo dNTP, no existan restos de reacciones anteriores. (Ahmadian et al. 2006)

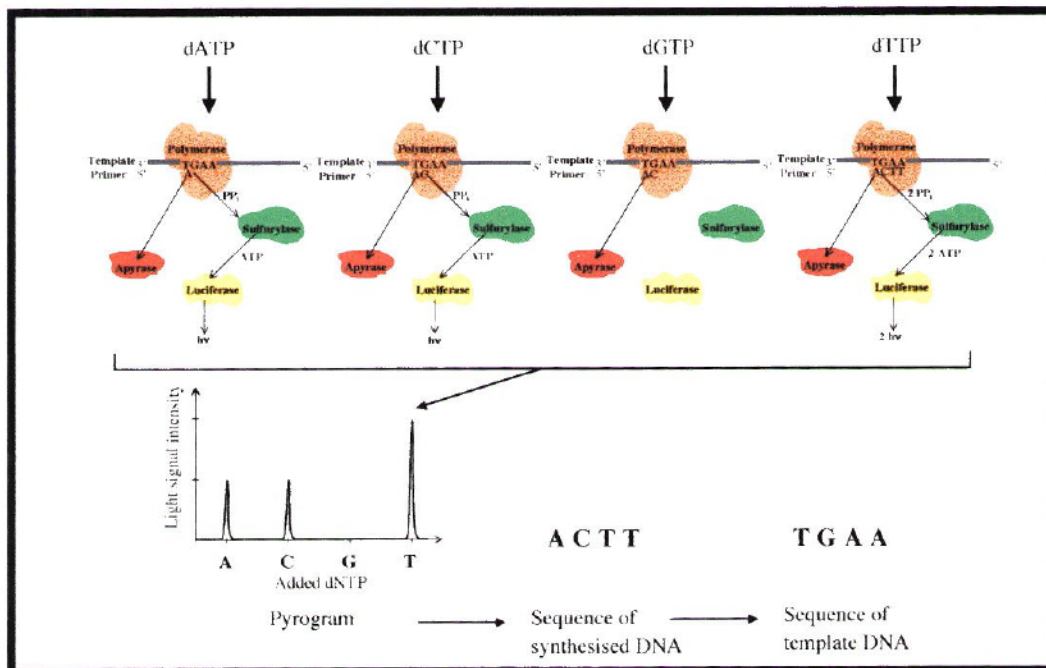


Figura N° 10: Representación del sistema de enzima de la pirosecuenciación (Ahmadian et al. 2006)

2.9 Estudios Relacionados

Aunque la evolución y curso de la mordedura bothrópica suele ir acompañada de la formación de abscesos, hasta hace poco no se conocía mucho, acerca de la bacteria responsable de esta inflamación. Diversos investigadores como Teixeira y colaboradores, se refiere a una flora mixta compuesta principalmente por bacterias Gram-negativas y también anaeróbicos, debido a las características físicas y el olor de la secreción purulenta. (Teixeira, 1979)

En Río de Janeiro, Galvão, encontró diplococos capsulados, Gram-positivos, cocos Gram-positivos y *Trichomonas* spp. en el material obtenido por punción y aspirado. (Galvão, 1980).

En São Paulo, Rosa et al., detectó *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, así como también las bacterias del género *Clostridium*, incluyendo *C. histolyticum*, en los abscesos de 14 pacientes. (Rosas et al., 1983)

En São Paulo, en un primer estudio, se encontraron: *Morganella morganii* (3 casos), *Proteus* spp. (2 casos) y *Bacteroides* spp. (2 casos) en cinco abscesos. En un segundo estudio, se encontró: *M. morganii* (10 casos), *Escherichia coli* (4 casos), *Proteus rettgeri* (3 casos), *Streptococcus* grupo D (3 casos) y *Streptococcus -viridans* (1 caso), de un total de 15 abscesos. (Jorge et al., 1987; 1998).

En otro estudio en Goiás, se encuentra principalmente, *M. morganii* (44 casos), *E. coli* (20 casos), *Providencia* spp. (13 casos), *Klebsiella* spp. (10 casos), *Alcaligenes* spp. (9 casos), *Enterobacter* spp. (8 casos), *S. aureus* (8 casos), y *S. epidermidis* (7 casos) en un total de 99 abscesos. (Andrade et al., 1989).

En Minas Gerais, se aisló *E. coli* (5 casos), *M. Morganella* (2 casos) y *Citrobacter diversus* (2 casos) en 18 abscesos. (Nishioka y Silveira, 1992).

Estos estudios son retrospectivos y/o se obtienen a partir de cultivos de los materiales de las lesiones previamente abiertos, y/o se basan en los resultados de los cultivos que se examinaron sólo para las bacterias aeróbicas.

Más recientemente, en São Paulo, en un estudio prospectivo, Jorge y colaboradores perforan asépticamente los abscesos cerrados de 40 pacientes mordidos por serpientes del género *Bothrops*, y realiza cultivos para organismos aerobios y anaerobios y obtuvo aislamientos de *Morganella* (23 casos), *P. rettgeri* (7 casos), *Enterobacter* spp (4 casos), *E. coli* (3 casos), *Citrobacter freundii* (1 caso), *Streptococcus* del grupo D (11 casos), *S. aureus* (2 casos), *S. viridans* (1 caso) *Bacteroides* spp. (6 casos). (Jorge et al., 1994).

Se han considerado diversos orígenes de las bacterias en el sitio de la mordedura venenosa, como por ejemplo la ropa de la víctima y la piel que se perforó, a través de los colmillos de la serpiente, las sustancias que se aplican a la región de la mordedura, el corte o instrumentos punzantes utilizados en el intento de facilitar y hacer la succión del veneno del sitio de la mordedura y la saliva de la persona que hizo la succión son todas las posibles fuentes de la infección. En pacientes hospitalizados, las bacterias del propio hospital podrían contaminar la lesión y causar la infección. (Jorge y Ribeiro, 1997).

Los estudios prospectivos han demostrado que la inoculación de los colmillos de la serpiente y perforación de la ropa de la víctima aportan porcentajes tan bajos como 4,3% en São Paulo y de hasta el 26,7 % en Uberlândia. (Pinto et al., 1994; Ribeiro et al., 1988; Silva et al., Silva et al., 1995).

Aunque los colmillos tienen que pasar a través de la piel de la víctima antes de penetrar en los tejidos profundos, bacterias como *Streptococcus pyogenes* y *S. aureus*, que se encuentra comúnmente en la piel humana, rara vez están presentes en los abscesos. (Andrade et al. , 1989; Jorge et al. , 1989; 1988).

La hipótesis de que los gérmenes de la propia serpiente participan en la génesis de los abscesos, se ha mejorado por los estudios de diversos autores que aislaron bacterias potencialmente patógenas de la boca y/o a partir del veneno de serpientes venenosas de diversas partes del mundo. Por otro lado bacterias como *Streptococos del grupo D* y enterobacterias incluyendo *M. morgani* fueron encontrados en los colmillos y en el veneno de serpientes de gran tamaño del género *Bothrops* en el estado de São Paulo. (Jorge et al. , 1990).

La infección puede ser el resultado del desarrollo de las bacterias en el tejido previamente lesionado por el veneno, las propias bacterias originalmente procedente de la serpiente, que se inocularon en el momento de la mordedura. (Fonseca, 1949; Jackson, 1933; Jorge y Ribeiro, 1990).

CAPITULO III
MATERIALES Y MÉTODO

III. MATERIALES Y MÉTODO

3.1. Tipo de estudio

El presente estudio es descriptivo con el uso de técnicas fenotípicas y moleculares para la identificación de la diversidad microbiana de la cavidad bucal y veneno de la serpiente *B. asper* de Panamá.

3.2. Universo y tamaño de la muestra.

Se colectaron 21 especímenes en 4 zonas específicas del país, como lo son las provincias de Chiriquí, Veraguas, Coclé Panama y Darién.

3.3. Criterios de inclusión

- Todas las serpientes que lleguen en buen estado físico al serpentario.
- Serpientes que sean muestreadas antes de la 72 horas de su captura.
- Serpientes que puedan ser manipuladas y anestesiadas con CO₂.
- Serpientes con el tamaño adecuado para ser manipuladas y anestesiadas.

3.4. Materiales, reactivos y equipos

- Hisopos estériles
- Medios de Transporte e-Swab™
- Tubos estériles de tapa rosca
- Yodo estéril 0.7%
- Taque de CO₂
- Cajas plásticas de almacenamiento
- Medios de cultivo: Agar sangre, Mac conkey, chocolate, PEA, Bacitracina vancomicina, ANA.
- Tubos plásticos
- Solución salina estéril 0.9%
- Portaobjetos
- Jarra de anaerobiosis
- Jarra con vela
- Indicador de anaerobiosis
- Sobre de anaerobiosis
- Asas y agujas
- Mecheros
- Tarjetas Vitek para Gram positivos y Gram negativo.
- Agua destilada
- Buffer TE
- Etanol al 70%
- Etanol Absoluto

- Isopropanol
- Cloruro de magnesio
- Dinucleótidos (DNTP's)
- Buffer de carga
- Bromuro de ethidium
- Agua grado molecular
- Gel de agarosa
- Tubos de eppendorf de 2.0 ml
- Tubos de PCR de 0.5 ml
- Puntas con filtro de 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l.
- Kit de extracción Bioneer
- Kit de purificación Bionner AccuPrep® PCR (Bionner Corporation, USA.)
- Taq polimerasa
- Buffer TAE 1X
- Balanza
- Micro pipetas de 0.5 -10 μ l, 10-50 μ l y de 100-1000 μ l.
- Vitek Compac 2
- Densitómetro: densiCheck
- Vortex
- Termociclador C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Microcentrifuga
- Cabina de bioseguridad tipo II
- Cámara de electroforesis
- Transluminador (Vilber Lourmat) Francia

- Secuenciador "ABI Prim 310 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems)
- Software Peak-Scanner V1.0
- Software Fingerpring II Informatix (Bio- Rad)
- Cámara de electroforesis vertical Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad)

3.5. Procedimientos

3.5.1 Colecta de especímenes

Se capturaron un total de 21 ejemplares de *Bothrops asper*, en las provincias de Chiriquí, Veraguas, Coclé, Darién y Panamá, a través de giras organizadas por el Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET) de la Facultad de Medicina.

Zona1: Caribe (Bocas del Toro, norte de Veraguas, Colón Güna Yala)

Zona2: (Chiriquí y sur de Veraguas)

Zona3: (Azüero y Coclé)

Zona4: (Panamá y Darién)

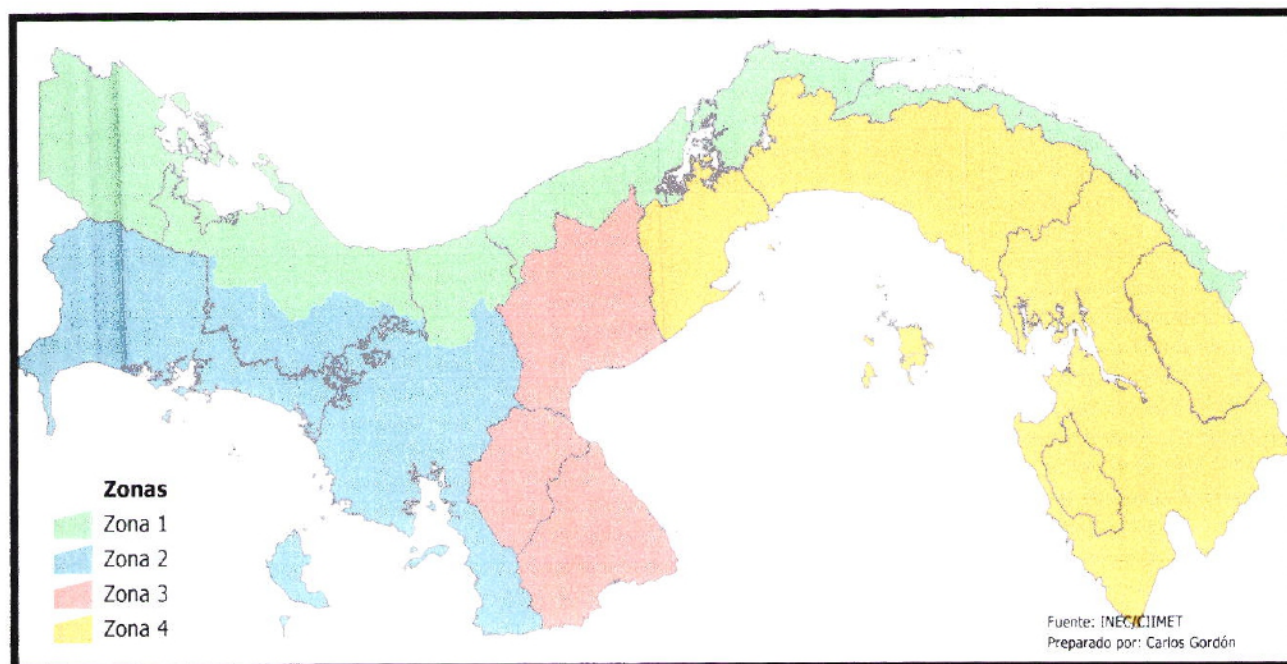


Figura N° 11: Zonas de colectas de *B. asper* en Panamá (INEC/CIIMET)

3.5.2 Toma de muestra

Una vez establecidas las condiciones saludables y adecuadas de los especímenes y antes de que se cumplieran las primeras 72 horas en cautiverio (desde el momento en que fueron colectados los ejemplares), y previa sedación con CO₂ durante 10-20 minutos según su tamaño (menor o mayor de un metro), se realizó la toma de muestras para estudios microbiológicos. La sedación fue aprovechada para realizar las mediciones morfométricas (peso, sexo y talla).

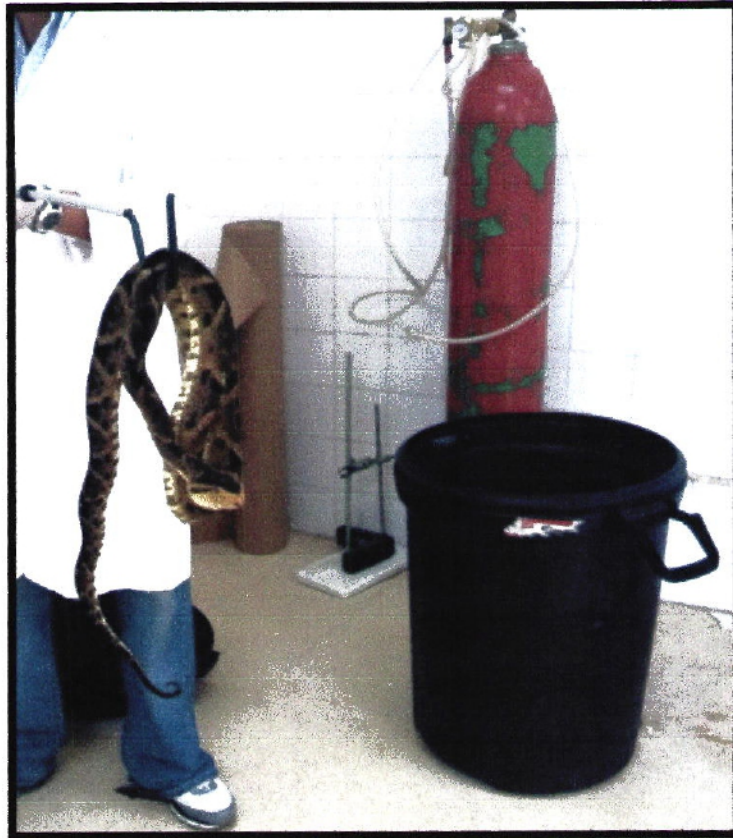


Figura N° 12: Sedación con CO₂ de los especímenes.

(Prescilla y Acosta, 2013.)

El veneno extraído manualmente fue colectado directamente en tubos estériles y transportado en refrigeración hasta el laboratorio de microbiología donde se efectuó la siembra. Para el hisopado de los fondos de saco membranosos que albergan los colmillos, se frotaron en dicha mucosa dos hisopos secos estériles, de consistencia firme y fina. Cada muestra del hisopado se colocó en el medio de colección y preservación eSwab™, que permite el mantenimiento de microorganismos aerobios, anaerobios y bacterias fastidiosas, hasta el momento de la siembra.

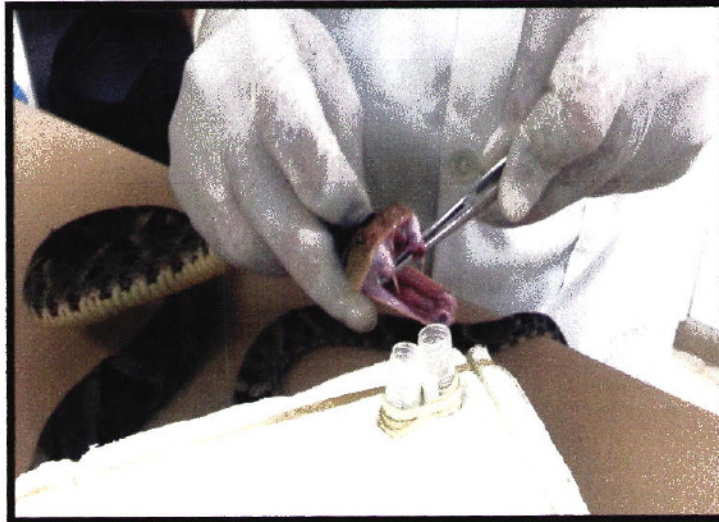


Figura N° 13: Colecta de veneno e hisopado del fondo de saco mucoso de *B. asper*. (Prescilla y Acosta- Patiño, 2012.)

3.5.3 Procesamiento de muestras

Cada muestra del hisopado se colocó en el medio de colección y preservación eSwab™, que permite el mantenimiento de microorganismos aerobios, anaerobios y bacterias fastidiosas, hasta el momento de la siembra.

Las muestras fueron sembradas en medios específicos de cultivos para aerobios

y anaerobios (Agar Sangre, Mc Conky, Chocolate, PEA o alcohol feniletítico y agar anaerobio, entre otros) se incubaron en aerobiosis y anaerobiosis a 37°C.

Se realizó tinción de Gram a los frotis de los colmillos y a las diferentes colonias aisladas de los diversos cultivos, para identificar las posibles morfologías bacterianas que se encontraban en los especímenes muestreados.

A las 24 horas de incubación de los medios, se seleccionaron las colonias en aerobiosis para procesarlas.

Los medios de cultivos en anaerobiosis se incubaron por un periodo de 2 a 5 días y posteriormente se les realizó la prueba de tolerancia al oxígeno.

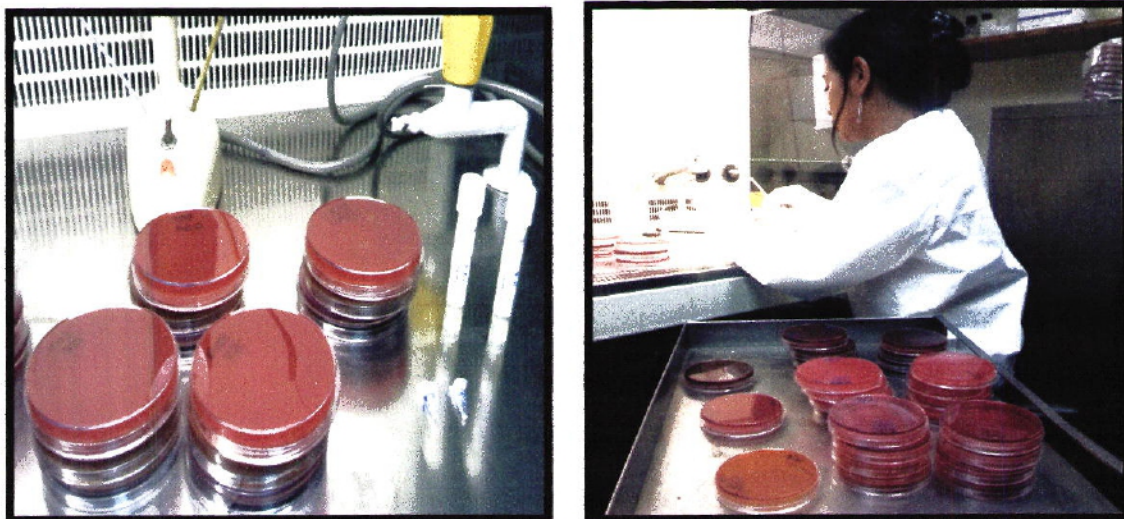


Figura N° 14: Cultivo y procesamiento de muestras (Prescilla 2012.)

3.5.4 Identificación y sensibilidad bacteriana.

La identificación y sensibilidad de las especies o cepas bacterianas fue realizada a través del método automatizado (VITEK® 2 Compact, BioMérieux) utilizando las recomendaciones de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (CLSI, 2012)

Identificación: Para la identificación se utilizaron tarjetas GN (Gram negativos), GP (Gram positivos). Para la sensibilidad utilizamos para los Gram negativos la tarjeta Vitek AST-N082, que contiene los antibióticos de primera elección para enterobacterias. Para Gram positivos se utilizó la AST-P577.

3.5.4.1 Preparación de suspensión.

La suspensión para la tarjeta de identificación (ID) la hicimos colocando 3 ml de solución salina 0.45% estéril en tubo plástico, y agregamos de 1 a 2 colonias bacterianas utilizando cultivos con aproximadamente 18 a 24 horas de crecimiento, sembradas en medios validados por el fabricante para el procedimiento. La suspensión que se preparó se ajustó a la densidad óptica adecuada con un densiCheck en un rango de 0.5 – 0.63 Mac Farland, utilizada tanto para bacterias Gram positivos como para Gram negativos.

La suspensión para la tarjeta de sensibilidad (AST) se preparó, colocando 3 ml de solución salina 0.45% estéril a un tubo plástico y se le agregó 145 ul de la suspensión de Gram negativos y 280 ul de la suspensión de Gram positivos.



Figura N° 15: Preparación de suspensión bacteriana. (Prescilla 2012)

3.5.4.2 Llenado y carga de tarjetas.

Las suspensiones con sus respectivas tarjetas, se colocaron en un casete con código de barras, que se introdujo en el módulo de llenado del equipo VITEK® 2 Compact, el cual transfirió la suspensión de los tubos plásticos a las respectivas tarjetas.

El casete se colocó en la estación de carga, donde se dio el proceso de corte, sellado e incubación de las mismas y donde permanecieron hasta su validación final.

3.5.4.3 Registro de información de las muestras.

Cada muestra fue ingresada al sistema a través de un código que asignamos producto de la conjugación del código del proyecto (APY-NI10-007) y el número de muestra por orden de llegada, para un adecuado manejo de los datos. También se tomó en cuenta la procedencia de la muestra, ya que las mismas se tomaron del fondo de saco y el veneno.

3.5.4.4 Lectura, validación e impresión de los resultados.

A las 24 horas de análisis en el equipo VITEK® 2 Compact, se revisó los resultados de las muestras en estudio. Cada resultado presento el porcentaje de veracidad de la identificación bacteriana y los patrones de sensibilidad de acuerdo a la tarjeta utilizada.

Los resultados se compararon con los perfiles de sensibilidad del equipo, se validaron y se imprimieron.

3.5.5 Estudio de la biodiversidad microbiana a través de técnicas independiente de cultivos

Para el estudio de la biodiversidad bacteriana a través de técnicas independientes de cultivo se utilizó el siguiente flujo grama:

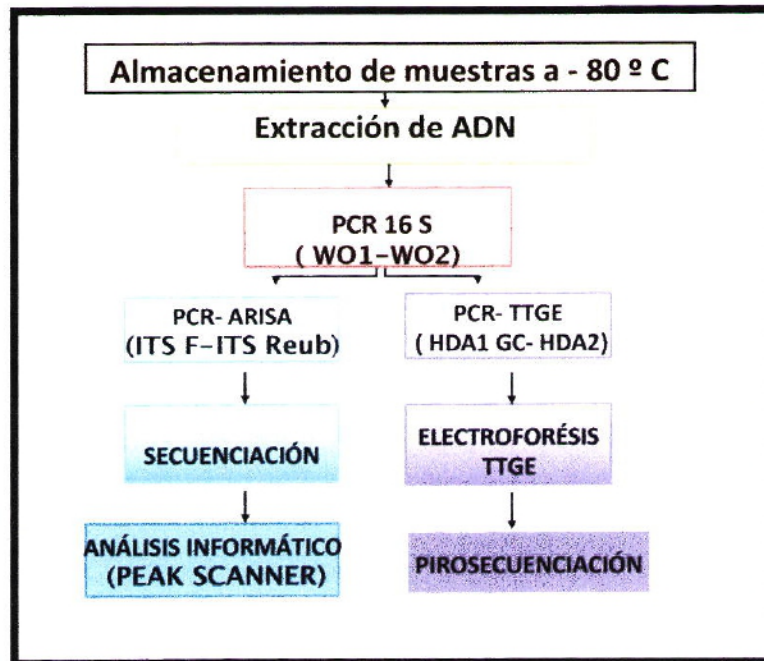


Figura N° 16 :Diagrama de las estrategias moleculares utilizadas en el estudio de la diversidad microbiana de *B. asper*.

3.5.5.1 Recuperación de células bacterianas a partir del hisopo.

- Los hisopos contenidos en medio de transporte ESwab fueron volteados y colocados en tubos de Microcentrifuga de 0.5 ml, que previamente se le realizó un orificio en la parte inferior, y el mismo se colocó en otro tubo de Microcentrifuga de 1.5 ml, para ser centrifugado durante 10 min a 14.000 rpm.

- Se descartó el hisopo y se resuspendieron las células obtenidas, con el volumen restante contenidas en el medio de transporte, para maximizar la recuperación celular.

- Con las células del hisopo recuperadas en su totalidad se procedió a alicuotar el volumen obtenido, para realizar los diferentes métodos de extracción de ADN.

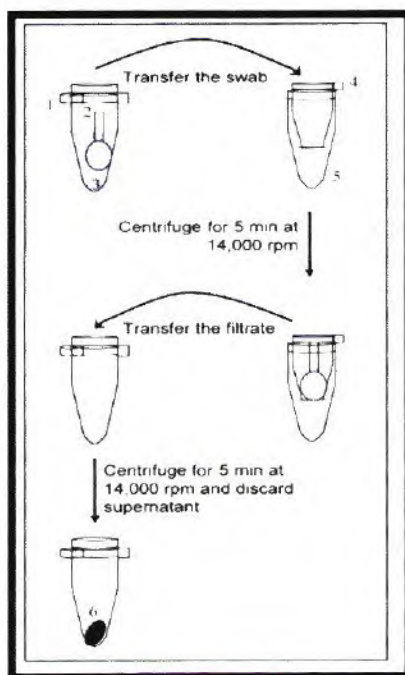


Figura N° 17: Esquema de la recuperación de células bacterianas a partir de hisopos. (Martín-Platero et al. 2010)

3.5.5.2 Extracción de DNA genómico .

La extracción del DNA, total se llevó a cabo utilizando 4 metodologías diferentes para comparar la calidad del mismo.

Los métodos utilizados fueron Qiagen, CHELEX, FAVORGEN y MSOP.

La calidad del DNA, se determinó mediante su análisis en geles de agarosa 0.7 %.

3.5.5.2.1 Método de Qiagen

- Las alícuotas se colocaron en tubos de Microcentrífuga 2 ml y se le agregó 400 ul de PBS, adicionada de lisozima.

- Luego se añadió 20 ul de proteinasa K y 400 ul de buffer AL a la muestra, se mezcló inmediatamente por agitación durante 15 s. Con el fin de asegurar la lisis eficiente, es esencial que la muestra y tampón AL se mezclaran inmediatamente y completamente y se incubó 1 min a 56 ° C . Se Centrifugó brevemente o se le dio un spin, para quitarle las gotas del interior de la tapa.

- Se Añadió 400 ul de etanol (96-100%) a la muestra, y se mezcló de nuevo mediante agitación en Vortex. Se realizó un spin brevemente para quitar las gotas del interior de la tapa.

- Seguidamente se adicionó 700 ul de la mezcla anterior a la columna de centrifugación QIAamp Mini (en un tubo colector de 2 ml) sin mojar el borde y se centrifugó 1 min a 8000 rpm.

- En este paso de la extracción se colocó la columna QIAamp mini en un tubo colector limpio de 2 ml , y se desechó el tubo que contenía el filtrado. Este paso se realizo por duplicado.

- Luego se utilizó una nueva columna QIAamp mini y se añadió 500 ul de buffer AW1 y se centrifugó durante 1 min a 8000 rpm , colocando la columna en un nuevo tubo colector limpio de 2 ml para desechar el tubo de colector que contenía el filtrado.

-Se abrió con cuidado la columna QIAamp mini y se agregó 500 ul de Buffer AW2. Se cerró la tapa y se centrifugó a máxima velocidad 14.000 rpm durante 3 min.

- Posteriormente se colocó la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y desechó el tubo anterior para centrifugar a máxima velocidad durante 1 min.

- Finalmente se realizó la elución colocando la columna de centrifugación QIAamp mini en un tubo de Microcentrífuga limpio de 1,5 ml , y desechó el tubo colector que contiene el filtrado. Se abrió la columna y se añadió 150 ul de agua destilada y se incubó a temperatura ambiente durante 1 min, para luego centrifugarlo a 8000 rpm durante 1 min.

- Se almacenó a -20°C.

3.5.5.2.2 Método de CHELEX

- Cada alícuota se centrifugó por 5 min a 14.000 rpm y se retiró el sobrenadante.

- Seguidamente se agregó 80 ul de solución TE (Tris-HCl 0.04 M, pH 8.0; EDTA 1 mM), adicionada con 20 ul de lisozima 10 mg/ ml, se sometió a vortex y se incubó 45 min a 37 °C.

- A continuación se realizó la lisis celular, agregando 1 ul de Poteinasa K y 1 ul de SDS 10 % (lauril sulfato sódico 25 gr/ 225 ml H₂O), se mezcló y se incubó 30 min a 37°C.

- Posteriormente se agregó el reactivo de CHELEX- 100 (Sigma, EE.UU.), se colocó en vortex y se incubó 30 min a 56°C.

- Luego se sometió a vortex por 10 seg y se incubó 10 min a 100 °C.

- Pasado el tiempo de incubación, las muestras se retiraron del bloque caliente y se dejaron 10 min a temperatura ambiente.

- Por último las muestras se centrifugaron 10 min a 14.000 rpm, y se recuperó el sobrenadante, sin remover el pellet, para almacenarse a -20°C.

3.5.5.2.3 Método de FAVORGEN

- Las alícuotas obtenidas en el paso anterior, se centrifugaron por 10 min a 14,000 rpm.

- Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 180 ul de solución TES (25 mM Tris-HCl mM, pH 8.0; EDTA 10 mM; sacarosa 10%), adicionándole 20 ul de lisozima 10mg/ml y se incubó 30 min a 37°C.

- Pasado el tiempo de incubación se agregó 4 ul de RNasa (100mg/ ml) y se

incubó 2 min a temperatura ambiente.

- Seguidamente se adicionó 200 ul de buffer FABG y 5 ul de proteinasa K, se colocó en vortex y se incubó 15 min a 60°C, sometiendo las muestras de 2 a 3 veces a vortex durante el período de incubación.

- Se realizó 1 spin y se adicionó 200 ul de etanol absoluto (96%), se colocó en vortex por 30 seg y luego se le realizo 1 spin.

- Las muestras se transfirieron a los tubos colectores con columnas y se centrifugaron por 1 min a 14,000 rpm, para seguidamente descartar el filtrado del tubo colector y colocar la columna en un nuevo tubo colector.

- En el siguiente paso se agregó 500 ul de solución buffer W1, se centrifugó 1 min a 14,000 rpm y se descartó el filtrado.

- En un nuevo tubo colector se colocó la columna y se agregó 750 ul de solución de lavado, se centrifugó 1 min a 14,000 rpm y seguidamente se descartó el filtrado.

- Se centrifugó 3 min adicionales a 14,000 rpm en un nuevo tubo colector.

- Finalmente se realizó la elución de la columna utilizando 100 ul de ddH₂O, agregada en el centro de la columna y dejada en reposo por 3 min.

- Las muestras fueron centrifugadas 2 min a 14,000 rpm, se eliminó la columna y se almacenó la elución a -20°C.

3.5.5.2.4 Método de MSOP

- Las muestras alicuotadas luego de la recuperación de los hisopos se resuspendieron en 100 µl de solución I (10% sacarosa; 25mM tris-HCL [pH 8.0] ; 10 mM EDTA; 10 mg/ml de lisozima y 40 µg/ml ARNasa), y se incubaron durante 30 min a 37° C.

- Luego se añadió 600 µl de solución II o solución de lisis (100 mM Tris-HCL [pH 8.0]; 100 mM EDTA; 10 mM NaCl y SDS 1%), adicionada de 10 ul de proteinasa K (10 mg/ml) para aumentar pureza. Se dejó actuar la solución II de 5-10 min y se mezcló por inversión suave, y después se incubó 11 min a 37 °C.

- En el siguiente paso se incubaron durante 5 min. a 80 °C y de 5 a 10 min. a temperatura ambiente para potenciar la lisis celular, aumentar el rendimiento en ADN, e inactivar los enzimas líticas (lisozima o proteinasa) presentes.

- Seguidamente, se adicionó 200 µl de solución III, (Acetato de sodio 3 M [pH 5.2]) agitándose en vortex durante 10-15 seg, e incubándose en hielo durante 10-15 min.

- Después de centrifugar 15 min a 14.000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de Microcentrífuga, y el ADN, se precipitó con un volumen de Isopropanol (aprox. 600 µl), agitándose por inversión repetidas veces. En esta fase de la extracción se realizó la salificación y precipitación de proteínas y residuos celulares.

- Luego de centrifugar 10 min a 14.000 rpm, el precipitado se lavó con 80 ul de

etanol al 70 %, se descarta el sobrenadante y una vez seco, se resuspendió en 200 µl de agua milliQ.

-Se almacenó el DNA a 4°C para su posterior análisis en gel de agarosa.

3.5.5.3 Separación y visualización del ADN en gel de agarosa.

La Separación y visualización del ADN genómico y los productos de PCR se realizó a través de electroforesis sumergida horizontal en gel de agarosa de baja electroendosmósis (Molecular Biology Grade, Bio-Rad) a 0.7 %. El tampón utilizado fue TAE 1X y la misma fue corrida a 90 V.

Se preparó la cubeta sobre el soporte de presión, y se colocó el peine con el número de muestras necesarias. Se pesó 0.7 gramos de agarosa y se mezcló con 100 ml de solución TAE 1X en un bote de vidrio y se colocó en el horno durante 1 min, aproximadamente para fundir.

Una vez homogenizada la agarosa y a temperatura soportable, se agregó a la cubeta evitando que formara burbujas y se dejó solidificar por 20 min.

Se preparó una mezcla de carga de 10 µl, (5 µl de ADN genómico, 1 µl de buffer de carga o azul de bromofenol y 4 µl de agua milliQ) y se depositaron en los pocillos del gel, aplicando voltajes de 90 V, hasta que migraron lo suficiente para ser visualizadas.

Para visualizar el ADN producto de los PCR, se realizó una mezcla de carga (2µl de ADN amplificado; 1 µl de buffer de carga y 7 µl de agua milliQ)

Para conocer el tamaño aproximado de los ADNs presentes en la muestra

sometidas a electroforesis, se utilizó como patrón, los fragmentos de restricción *Hind*III del fago λ (BiorRad).

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) (0.5 μ g/ ml en agua destilada) durante 15 min, luego se cambió a otra solución de agua destilada por 5 minutos para eliminar el exceso de bromuro de etidio.

El ADN se visualizó por exposición a la luz ultravioleta (302 nm) en un transluminador (Vilber Lourmat, Francia).

Tampón TAE (50X)	
Tris base	242,0 gr
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA- Na_2 0,5 M, pH 8	100 ml
Agua destilada	Aforado hasta 1 L

Solución de carga(10X)	
Glicerol	50 % (v/v)
TE (10mM Tris-HCl pH 8; EDTA 1 mM pH	49,75% (v/v)
Azul de bromofenol	0,25 %

3.5.5.4 Amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16 S.

Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador C1000™

Thermal Cycler (Bio-Rad). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR, fueron los WO1-WO12, que incluyen las regiones variables V1-V4. La ADN polimerasa utilizada fue Taq polimerasa (MBL).

Se produce un fragmento de 700 pb del gen 16S del ADN ribosomal, . La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 ul, cuya composición general de amplificación fue la siguiente:

Compuesto	Concentración	Cantidades
ADN molde	20-40 ng/ul	2 ul
Cebador WO1	10 pM	2.5 ul
Cebador WO12	10 pM	2.5 ul
dNTPs	10 mM	1 ul
Tampón de la Taq polimerasa	5 X	5 ul
Cloruro de Magnesio	25 mM	2 ul
Taq polimerasa	1.5 U	0.2 ul
H ₂ O milliQ		9.8 ul
Volumen final		25 ul

El programa de PCR para la amplificación con los oligonucleótidos WO1 (5'-AGA GTT TGA TC (AC) TGG CTC-3') y WO12 (5'-TAC TTT GCA CAC C (GT) C TAC A-3') consistió en lo siguiente:

CICLOS	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
C ₀	Desnaturalización inicial	94 °C	4 min.
C ₁	Desnaturalización	94 °C	30 seg.
C ₂	Hibridación	50 °C	30 seg.
C ₃	Extensión	72 °C	1 min.
El número de ciclos fue de 30 (incluidos C ₁ a C ₃)			
C ₄	Terminación	72 °C	2 min.

3.5.5.5 Amplificación de ADN mediante, the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA- PCR)

Los productos de PCR de 16 S, fueron reamplificados a través de la técnica de ARISA-PCR, que analizó la longitud de las regiones intergénicas 16S y 23 S del gen rRNA, llamados región ITS presente en casi todas bacterias y Archaea.

ARISA-PCR produce fragmentos que varían en tamaño desde 400 a 1.200 pb utilizando los oligonucleótidos ITS F(5'-GTCG TAACAAGGTAGCCGTA-3') y el ITSReub (5'-GCCAAGGCAT CCACC-3' que está marcado con el fluorocromo fosforamidita HEX, razón por la cual la mezcla se realizó protegida de la luz y en un volumen total de 25 ul. La mezcla general de amplificación fue la siguiente:

Compuesto	Concentración	Cantidades
ADN molde	20-40 ng/ul	2 ul
Cebador ITS F	20 uM	2.5 ul
Cebador ITS Reub	20 uM	2.5 ul
dNTPs	10 mM	1 ul
Tampón de la Taq polimerasa	5 X	2.5 ul
Cloruro de Magnesio	25 mM	2 ul
Taq polimerasa	1.5 U	0.2 ul
H ₂ O milliQ		12.3 ul
Volumen final		25 ul

El ARISA-PCR se llevo a cabo en las siguientes condiciones:

CICLOS	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
C ₀	Desnaturalización inicial	94 °C	2 min.
C ₁	Desnaturalización	94 °C	45 seg.
C ₂	Hibridación	52 °C	40 seg.
C ₃	Extensión	72 °C	1 min.
El número de ciclos fue de 30 (incluidos C ₁ a C ₃)			
C ₄	Terminación	72 °C	5 min.

Los productos de ARISA se les corrió un gel de agarosa 0.7 %, para visualizar las bandas.

3.5.5.6 Secuenciación de los productos ARISA-PCR

Los productos del ARISA-PCR fueron diluidos 1:10, con H₂O milliQ en un volumen final de 50 ul y enviados al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, y secuenciados en un analizador genético "ABI Prim 310 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems). El resultado de la secuenciación fue analizada a través del programa informático Peak-Scanner software v1.0 de Applied Biosystems.

Una vez se analizó todas las muestras y se corrigieron los picos en base a los estándares de referencias(ROC500 / ITS) se depuró y creo un archivo txt, que fue exportado y analizado a través del programa informático Fingerprinting II informatrix software (Bio-Rad)

3.5.5.7 Purificación de los productos de PCR 16 S

La purificación de las muestras se realizó con AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer Corporation, U.S.A). Este kit está diseñado para la purificación de hasta 10 µg de fragmento de ADN de PCR y otros productos enzimáticos. El rango de tamaño de depuración efectiva es de 100 pb - 10 kb. El rendimiento de recuperación sobrepasa el 80%.

El principio de este kit se basa en la adsorción de ADN en el filtro de vidrio. La adsorción del ADN es tan selectiva que otras proteínas y sales no se adsorben y pasan a través del filtro de vidrio. El lavado elimina las sales y otras proteínas, los fragmentos de ADN de alta pureza se eluyeron al agregar el buffer (10 mM de Tris-Cl, pH 8,5) o agua destilada.

El protocolo de purificación utilizado fue el siguiente:

- Se añadió 5 volúmenes de tampón PB a 1 volumen de la reacción de PCR (dilución 1:10).

- Se colocó el tubo de la columna de unión en un tubo de 2ml y se agregó la muestra.

- Posteriormente se centrifugó durante 1 min para que la muestra pasara a través de la columna, y se desechó el filtrado.

- Nuevamente se colocó la columna sobre el tubo de unión y se agregó 500 µl de tampón WB y se centrifugó durante 1 min, para lavar. Este paso elimina las sales e impurezas solubles. La pérdida de ADN es insignificante.

- Luego se desechó el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo, se repitió el lavado con 500 µl de tampón WB, y se centrifugó por 2 min para secar y

remover el tampón WB totalmente ya que residuos podían interrumpir las reacciones enzimáticas posteriores.

- Finalmente la columna se colocó en un tubo de 1.5 ml y se agregó 50 ul de H₂O milliQ en el centro de la misma, se dejó reposar por 1 min y se centrifugó durante 1 min para elución.

- Se almacenó el ADN a -20° C.

3.5.5.8 PCR - TTGE

Los productos del PCR obtenido con los cebadores WO1-WO2 de aproximadamente 700-1.500 pb, se purificaron mediante el "Accuprep PCR purification Kit" (Bionner) según las instrucciones del fabricante, y se utilizaron como molde, para una segunda PCR (PCR anidada), con los oligonucleótidos HDA1 GC – HDA2, con el objeto de amplificar exclusivamente la región variable V3 para su análisis posterior mediante electroforesis desnaturalizante en gradiente temporal de temperatura (TTGE).

Composición de la PCR para TTGE:

Compuesto	Concentración	Cantidades
ADN molde de la PCR 1	20-40 ng/ul	3 ul
Cebador HDA1 GC	10 pmol/ul	2 ul
Cebador HDA2	10 pmol/ul	2 ul
dNTPs	10 mM	2 ul
Tampón de la Taq polimerasa	5 X	2.5 ul
Cloruro de Magnesio	25 mM	2 ul
Taq polimerasa	1.5 U	0.5 ul
H ₂ O milliQ		32.5 ul
Volumen final		50 ul

Las condiciones de PCR para amplificación con los oligonucleótidos HDA1 GC y HDA2 fueron:

CICLOS	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
C ₀	Desnaturalización inicial	94 °C	1 min.
C ₁	Desnaturalización	94 °C	30 seg.
C ₂	Hibridación	52 °C	30 seg.
C ₃	Extensión	72 °C	30 min.
El número de ciclos fue de 30 (incluidos C ₁ a C ₃)			
C ₄	Terminación	72 °C	5 min.

3.5.5.9 Electroforesis desnaturizante en gradiente temporal de temperatura (TTGE)

Esta técnica se basa en la temperatura de fusión del ADN (T_m). La T_m , de una secuencia de ADN depende de su contenido en guanidina y citosina (GC), propiedad que va a permitir separar gradualmente moléculas de ADN de distinta secuencia (diferente T_m) en un gradiente desnaturizante. Cuando el punto de fusión se alcanza, la doble hebra se separa parcialmente, creando una molécula ramificada con movilidad reducida en un gel de poliacrilamida. El ambiente desnaturizante se crea, mediante una concentración alta de urea (6-8 M) y un gradiente temporal de temperatura. La separación total de las hebras de ADN se evita mediante una cola rica de G y C que se acopla al extremo del oligonucleótido usado en la reacción de PCR. Si los fragmentos obtenidos poseen una secuencia rica en GC, la desnaturalización será más difícil y por lo tanto migrarán más rápido en la electroforesis. La posición final va a depender de numerosas variables: tamaño, secuencia nucleotídica, tiempo de electroforesis, concentración de urea,

concentración de acrilamida, concentración de TAE, rango de temperatura de electroforesis, rampa de incremento de temperatura de electroforesis y voltaje de electroforesis. De esta forma, es posible diferenciar amplicones que poseen un sólo nucleótido de diferencia en su secuencia nucleotídica.

La electroforesis en gradiente temporal de temperatura (TTGE) se realizó mediante un equipo Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad).

Las reacciones de PCR se realizaron sobre el ADN purificado extraído de los hisopos de muestras, según se indican en los apartados 3.5.5.7 de esta sección. En todos los casos se emplearon geles de 16 cm x 16 cm x 1 mm.

Para el llenado del tanque se utilizaron 7 litros de tampón TAE precalentado a 50 °C. Se cargaron 10 µl de muestra obtenida mezclando 5 µl del producto de PCR y 5 µl de solución de carga 2× (glicerol 70%, azul de bromofenol 0,05%, xilencianol 0,05%).

Los geles empleados para visualizar los fragmentos de PCR correspondientes al ADNr se prepararon con la siguiente composición:

Gel 8% Acr./Bis; 1,25 x TAE; 7 M Urea	
TAE (50X)	0.7 ml
40% Acrilamida: Bisacrilamida	6 ml
Urea	12,6 gr
TEMED	30 ul
Persulfato amónico 10%	300 ul
Volumen final	30 ml

Los geles, se revelaron mediante tinción en bromuro de etidio. Para ello los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 15 minutos y a continuación se lavaron mediante inmersión en agua milliQ durante 20 minutos. Seguidamente se visualizaron con la luz ultravioleta, en un transluminador (Vilber Lourmat, Francia) y se fotografiaron en videocámara UVP ImageStore 5000 para digitalizar las imágenes en formato TIFF.

Los fragmentos separados mediante TTGE, se extrajeron con una micropipeta de 1000 μl . El ADN, de cada fragmento se eluyó con 100 μl de agua Milli-Q estéril, durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$. Cinco microlitros del ADN eluido de cada banda de TTGE fue reamplificado con los mismos cebadores utilizados según las condiciones de PCR descritas en el apartado 3.5.5.8.

3.5.5.10 Secuenciación masiva. (Pirosecuenciación)

Las muestras fueron almacenadas a -20 $^{\circ}\text{C}$, para ser enviadas al servicio de Instrumentación del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada para su posterior Pirosecuenciación.

3.6 Métodos e instrumentos de colección de datos.

Para tabular los datos del estudio se diseñó un instrumento en donde se registró, toda la información de procedencia, morfometría, colecta, manejo y procesamiento de la muestra, al cual se le asignó un código según el orden de llegada de cada espécimen.

3.7 Análisis estadístico.

Entre los métodos de análisis multivariante de datos, los Biplot han sido fuente de continuas contribuciones a la ciencia desde su origen en 1971. Su objetivo general es la aproximación de una matriz de datos, de tal forma que permita su descripción o modelización a través de mapas geométricos construidos como proyecciones de nubes de puntos filas y columnas sobre sub espacios de ajuste óptimo. (Cárdenas 2007)

En este sentido Vicente-Villardón *et al.* (2006), bajo el enfoque de regresiones o interpolaciones alternadas proponen el ajuste de un Biplot Logístico (BL) lineal para datos binarios, en el cual la respuesta a lo largo de las dimensiones es logística. En este Biplot Logístico (BL) los individuos se representan como puntos y las variables a través de vectores centrados en el origen. Desde el punto de vista geométrico se considera que la proyección de un individuo, sobre una dirección de un vector predice la probabilidad de la presencia de ese carácter o variable. (Vicente-Villardón 2006)

El Biplot Logísticos se considera como una alternativa confiable al Análisis de Correspondencias múltiple para el caso de variables presencia/ausencia con distribución binomial, Vicente-Villardón *et al.* (2006) consideran el enfoque de los Biplot de Predicción y lo aplican sobre los Biplot ajustados a través de Regresión Bilineal Generalizada. Utilizan para la aproximación Biplot el modelo con término constante.

Posteriormente, Demey *et al.* (2008), propusieron un procedimiento que combina en un mismo algoritmo, el análisis de coordenadas principales y la regresión logística, para construir la técnica conocida como un Biplot Logístico Externo. La propuesta se basa en el hecho, de que la regresión en el procedimiento alterno para datos binarios no es más que una regresión logística que se puede articular a la configuración obtenida a partir del Análisis de Coordenadas Principales. La representación gráfica del Biplot Logístico Externo permite visualizar con alta confiabilidad las relaciones entre individuos y atributos; esta metodología se adapta a las características de los datos obtenidos en nuestro estudio y será la que aplicaremos.

El primer paso del algoritmo se inicia con un análisis de coordenadas principales, con el fin de posicionar a los géneros bacterianos en un espacio euclídeo, en el cual las bacterias, son representadas con puntos; por tanto, aquellas con perfiles similares aparecen representadas muy próximas en el espacio euclídeo. Las dimensiones del análisis de coordenadas principales se interpretan como gradientes. El siguiente paso del algoritmo radica en ajustar un modelo de regresión logística para cada índice usando los gradientes latentes como variables explicativas. Los coeficientes de regresión son los vectores que muestran la dirección que mejor predice la probabilidad de presencia de cada índice. Finalmente, a través de las coordenadas Biplot, se han obtenido y representado los cluster, así como también la calidad de representación de los mismos.

Al obtener los resultados del Biplot Logístico Externo, la calidad de representación de cada variable se puede medir con tres elementos fundamentales:

- El p-valor a partir del cual determinamos qué variables son significativas en el modelo de regresión logística,
- El coeficiente de determinación, r^2 cuadrado.
- El porcentaje de variables bien clasificadas obtenidas de las probabilidades esperadas, tomando de referencia un porcentaje de 0.5 como indicador de corte (la predicción de presencia y ausencia).

Para cada variable el diagrama de ordenación es dividido en dos regiones que predicen presencia o ausencia del atributo. (Vicente-Villardón *et al* 2011). Ambas regiones quedan separadas por una línea que es perpendicular al vector que representa a la variable (índice) y corta al vector en el punto 0,5. El origen de cada vector corresponde con la probabilidad de 0.5 indicador de presencia de la característica; en tanto, el otro extremo o punta de la flecha corresponde con la probabilidad de 0.75.

En la representación gráfica del Biplot Logístico, hay conceptos básicos que no podemos dejar de lado al momento de la interpretación del mismo:

- El ángulo entre cada vector y el eje factorial señala el grado de relación entre el vector (variable) y el eje (gradiente)
- El ángulo entre vectores indica el grado de asociación entre esas variables. Ángulos agudos indican que las variables están estrechamente relacionadas.
- La dirección a la que apunta el vector indica la zona positiva del gradiente; pudiendo determinarse que variables se asocian con cada eje.
- La longitud del vector indica el poder discriminante de la variable; a menor longitud, mayor poder discriminante, y viceversa

- La proyección de las empresas sobre el vector que representa la variable permite predecir la presencia o ausencia de dicha característica. Si se proyecta en la zona de probabilidad positiva, el índice y/o indicador está presente. Si el vector apunta hacia dentro (zona negativa del gradiente), entonces el índice y/o indicador está ausente.

Para el análisis de la información se ha utilizado el programa MultBiplot, un ambiente de programación integrada en MATLAB y desarrollado por Vicente-Villardón (2010).

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

4.1.1. Resultados de la colecta de especímenes.

Se capturaron 21 serpientes provenientes de 4 zonas geográficas de la república de Panamá.

Zona 1: Caribe (Bocas del Toro, Norte de Veraguas, Colon y Güna Yala)

Zona 2: Chiriquí y Sur de Veraguas.

Zona 3: Azuero y Coclé

Zona 4: Panamá y Darién

La zona 4 fue la que presento mayor número de especies colectada (34%), seguida por la zona 3 (29 %), la zona 2 (19%) y, por último, la zona 1 (14%).

(Gráfica N° 1)

De las serpientes colectadas el 57% eran hembras, 24% machos y en el 19 % el sexo no fue determinado. El 24 % eran adultas (Mayor de 100 cm), 76 % eran juveniles y neonatos. (Tabla N° 1)

4.1.2. Resultados de la identificación y sensibilidad

La tabla N° 2, muestra el número de aislamientos realizados en ambos tipos de muestras (fondo de saco mucoso y veneno), en donde claramente se observa que se obtuvieron un total de 61 aislamientos, que corresponden a 15 familias bacterianas.

De los microorganismos identificados el 45% (7) corresponde a bacterias de la familia de las Enterobacteriaceae, 13% (2) *Aeromonadaceae* y un 7% (1) a las

familias: *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Rhizobiaceae*, *Micrococcaceae*, y *Staphylococcaceae*. **(Gráfica N° 2)**

En el fondo de saco mucoso fueron identificadas doce cepas bacterianas, que corresponde el 59% del total de los aislamientos. Estos resultados contiene las siguientes especies: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Citrobacter freundii*, *Cupriavidus pauculus*, *Morganella morganii*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomona spp*, *Providencia rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Rhizobium radiobacter*, *Shewanella algae*. **(Gráfica N° 3)**

En el veneno fueron identificadas 10 cepas bacterianas, representando el 41% de los aislamientos y reuniendo las siguientes especies: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromona hydrophila*, *Cupriavidus pauculus*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Pseudomona spp*, *Providencia rettgeri*, *Rhizobium radiobacter*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus spp*. **(Gráfica N° 4).**

Del total de los aislamientos, siete especies bacterianas, fueron aisladas, tanto del fondo de saco mucoso como del veneno. Ellas fueron: *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas spp*, *Cupriavidus pauculus* y *Rhizobium radiobacter*. **(Gráfica N° 5)**

Las bacterias que se aislaron con mayor frecuencia en ambas muestras (fondo de saco mucoso y el veneno, respectivamente) fueron: *M. morganii* (28% / 24%), *P. rettgeri* (19% / 24%) y *A. hydrophila*(17% / 20%) **(Gráfica N° 5)**.

La susceptibilidad encontrada en las bacterias aisladas coincide con las de cepas salvaje con una resistencia reducida a los antibióticos utilizados. Los siguientes resultados se refieren a las tres bacterias con mayores aislamiento en el estudio.

Los antibióticos que presentaron mayor resistencia para *M. morganii* fueron Ampicilina (AM), Ampicilina/Sulbactam (AMS), Piperacilina/tazobactam y Cefalotina (CEP) con un 90% de resistencia. Por otro lado los antibióticos como Cefoxitina (FOX), Cefotaxima(CTX), Ceftazidima (CAZ), presentaron sensibilidades por encima del 70 % en los aislamientos del Fondo de saco mucoso y 80% para los aislamiento del veneno, mientras que Cefepima (CEP), Imipenem (IPM), Meropenem (MER), Amikacina (AN), Ciprofloxacina (CIP), Trimetoprima/ Sulfametoxazol (SXT) presentaron una sensibilidad del 100%.

(Gráfica N° 6)

P. rettgeri, tiene una resistencia notable del 70 % en los aislamientos del fondo de saco mucoso y de un 85% en el veneno para antibióticos como Ampicilina (M), Ampicilina/ Sulbactam (AMS) y Cefalotina (CEP). Sin embargo es 100% sensible para el resto de los antibióticos en los aislamientos del Fondo de saco mucoso y por arriba del 80% para el veneno. **(Gráfica N°7).**

En la Gráfica N°8 se observa claramente los patrones de resistencia a los antibióticos de los aislamientos de *A. hydrophila*. Los antibióticos con mayor porcentaje de resistencia son Ampicilina (AM), 100%, en los 2 tipos de muestras. Ampicilina/ Sulbactam(AM) y Cefalotina (CEP) presentan resistencias mayor del 80% y Cefoxitina se observa con una modera resistencia en ambas muestras (50/60%) respectivamente. Sin embargo es muy notable que todas las cepas aisladas son 100% sensibles a el restos de los antibióticos en los dos tipos de muestras.

4.1.3. resultados de los métodos independiente de cultivo.

De los 4 métodos de extracción utilizados, el método de Chelex, fue el que mejores resultados obtuvo en cuanto a calidad y cantidad de ADN extraído, cuantificado a través de nanodrop y verificado en gel de agarosa al 0.5%.

El AND extraído de 30 muestras en estudio se le realizó PCR-ARISA y se enviaron al Servicio de Instrumentación de Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada y se secuenciaron para su posterior análisis.

Los archivos enviados del servicio de secuenciación fueron procesados y analizados a través de programa bioinformático Peak Scanner.

Del análisis se obtuvo un dendrograma que contiene clústeres en donde claramente se puede observar que las comunidades microbianas encontradas en las muestras colectada de las 4 zonas geográficas, no presentan similitud entre los taxones presentes, ya que la mayoría de los agrupamientos están por debajo del 50 % y sólo 3 clústeres presentan una similitud por encima del 97%. **(Figura N° 14)**

Los agrupamientos según método de extracción muestran similitud en un 70%, como es en el caso de la muestras 19, 12, 17, 1, 11, 14 y 9.

Los agrupamientos según zona de extracción presentan marcada diferencias

Para el análisis por TTGE, Se realizaron 3 corridas electroforéticas, cada una con 15 muestras por gel. Las mismas se intercalaban en las corridas para establecer comparaciones entre las calles formadas.

En el perfil genético de la **figura N°15**, se puede observar que solo una banda esta presente en la mayoría de las muestras, lo que indica que cada muestra presentaba poblaciones microbianas diferentes no repetitivas, ya que las bandas

de ADN se ubicaron en posiciones distintas, lo que confirma la gran variabilidad de la comunidad microbiana presente en las muestras.

El perfil genético de la comunidad obtenido a partir de TTGE consistió en un patrón de bandas en donde cada banda fue considerada como una unidad taxonómica operativa (OTU). Cada una de estas OTU fue considerada como similar de cada grupo filogenéticamente coherente y predominante de organismos presentes en la comunidad.

4.1.4 Resultados de la secuenciación masiva.

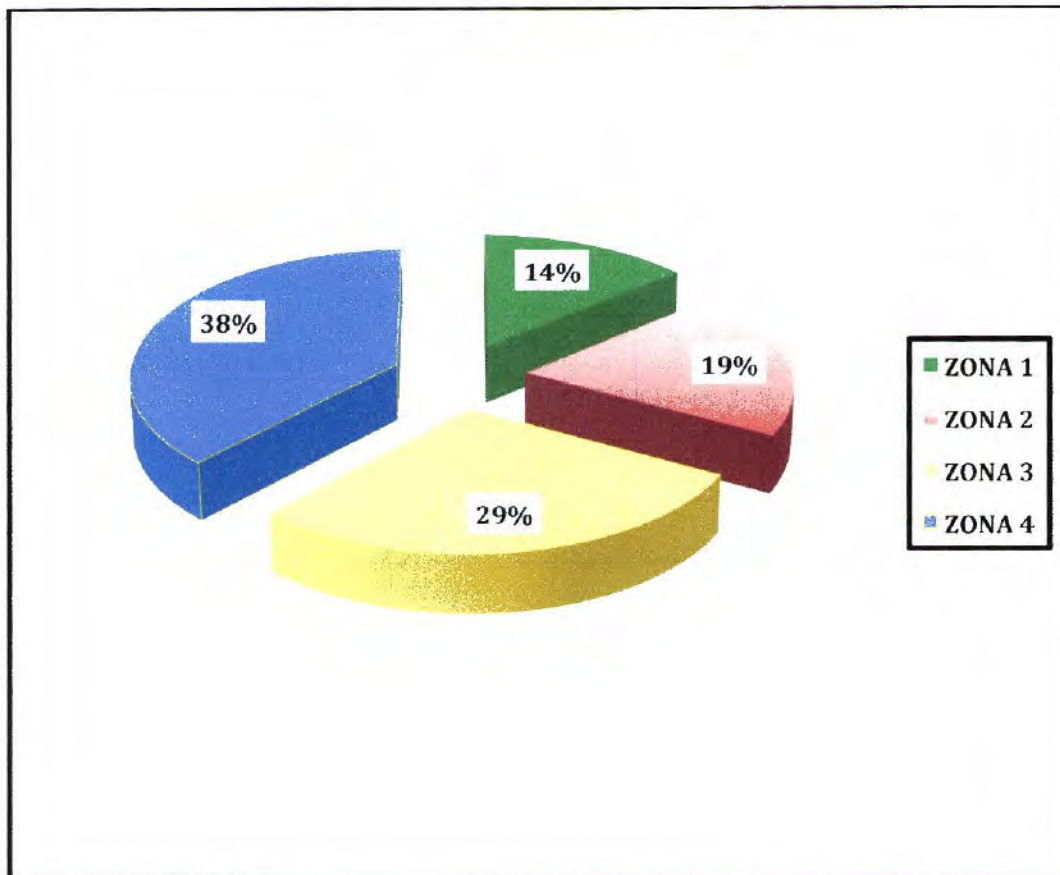
El análisis de pirosecuenciación de las muestras analizadas clasificó las poblaciones microbiana en 7 categoría taxonómica que se resumirán en la **Figura N° 16**.

De los resultados preliminares obtenidos se encontró que el reino bacteria es el predominante, en la clasificación de Phylum hay tres grupos importantes: Proteobacterias, Actinobacterias y Firmicutes. En la clasificación de clase encontramos 5 grupos relevantes: *Gammaproteobacterias*, *Alphaproteobacterias*, *Actinobacterias*, *Bacilli* y *Clostridia*. Siguiendo con la clasificación taxonómica correspondiente a orden, tenemos 8 grupos: *Rhizobiales*, *Actinomycetales*, *Xanthomonadales*, *Enterobacteriales*, *Bacillales*, *Lactobacillales* y *Clostridiales*.

En el grupo taxonómico que corresponde a Familia se identificaron 9: *Xanthomonadaceae*, *Brucellaceae*, *Microbacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Planococcaceae* y *Staphylococcaceae*.

Por ultimo en la clasificación de género se identificaron 9 grupos bacterianos:
Stenotrophomonas Ochrobactrum, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Terracoccus*,
Elizabethkingia, *Brucella*, *Serratia* y *Bacillus*.

Gráfica N° 1: Especímenes de *B. asper* colectados por zona geográfica de Panamá (n=21)



Fuente: Instrumento de colecta de datos.

Zona 1: Caribe (Bocas del Toro, Norte de Veraguas, Colon y Güna Yala)

Zona 2: Chiriquí y Sur de Veraguas.

Zona 3: Azuero y Coclé

Zona 4: Panamá y Darién

Tabla N°1 : Información morfométrica de *B. asper*.

Nº	Longitud (cm)	Sexo*	Peso (g)
1	140	H	670
2	134	H	630
3	41	M	14
4	42	H	17
5	63	H	32.4
6	63	H	50.9
7	46	H	22.5
8	104	H	180
9	74	H	100
10	46	M	26
11	75	H	102
12	162	M	1210
13	46.5	H	30
14	55.5	ND	32
15	41	M	15.3
16	72	ND	ND
17	64.5	ND	ND
18	57	ND	ND
19	112	H	791
20	36	H	11.3
21	69	H	68.2

*M: macho, H: hembra

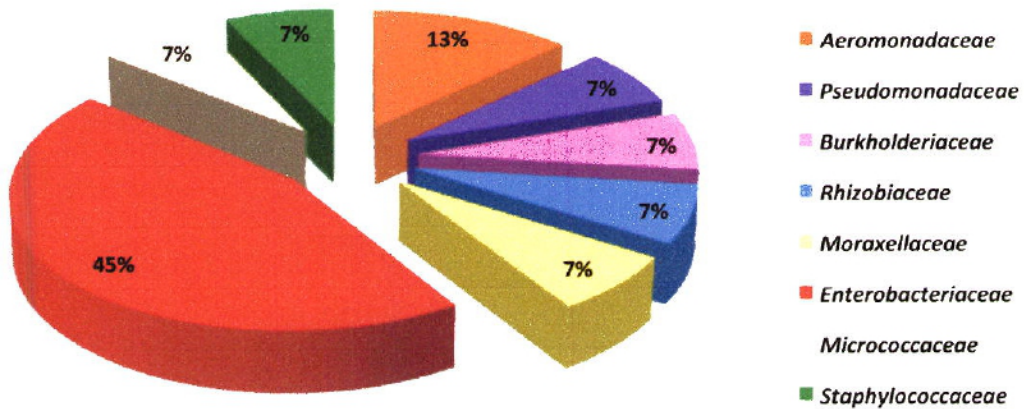
Fuente: Datos obtenidos de los especímenes colectados durante las giras en las 4 zonas geográficas.

Tabla N° 2: Bacterias aisladas e identificadas del fondo de saco mucoso y veneno de *B. asper*. Clasificación taxonómica por familia.

Microflora	Fondo de saco mucoso	Veneno	Familias
<i>Morganella morganii</i>	10(28%)	6 (24%)	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Providencia rettgeri</i>	7 (19%)	6 (24%)	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6 (17%)	5 (20%)	<i>Aeromonadaceae</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 (5.5%)	1 (4%)	<i>Moraxellaceae</i>
<i>Pseudomonas spp</i>	2 (5.5%)	1 (4%)	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Cupriavidus pauculus</i>	1 (2.8%)	1 (4%)	<i>Burkholderiaceae</i>
<i>Rhizobium radiobacter</i>	1 (2.8%)	1 (4%)	<i>Rhizobiaceae</i>
<i>Aeromonas sobria</i>	1 (2.8%)	-	<i>Aeromonadaceae</i>
<i>Citrobacter freundii complex</i>	1 (2.8%)	-	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	1 (2.8%)	-	<i>Micrococcaceae</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	3 (8.0%)	-	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Shewanella algae</i>	1 (2.8%)	-	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	2(8%)	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Serratia marcescens</i>	-	1 (4%)	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Staphylococcus capitis</i>	-	1 (4%)	<i>Staphylococcaceae</i>
<i>Total de aislamientos</i>	36	25	

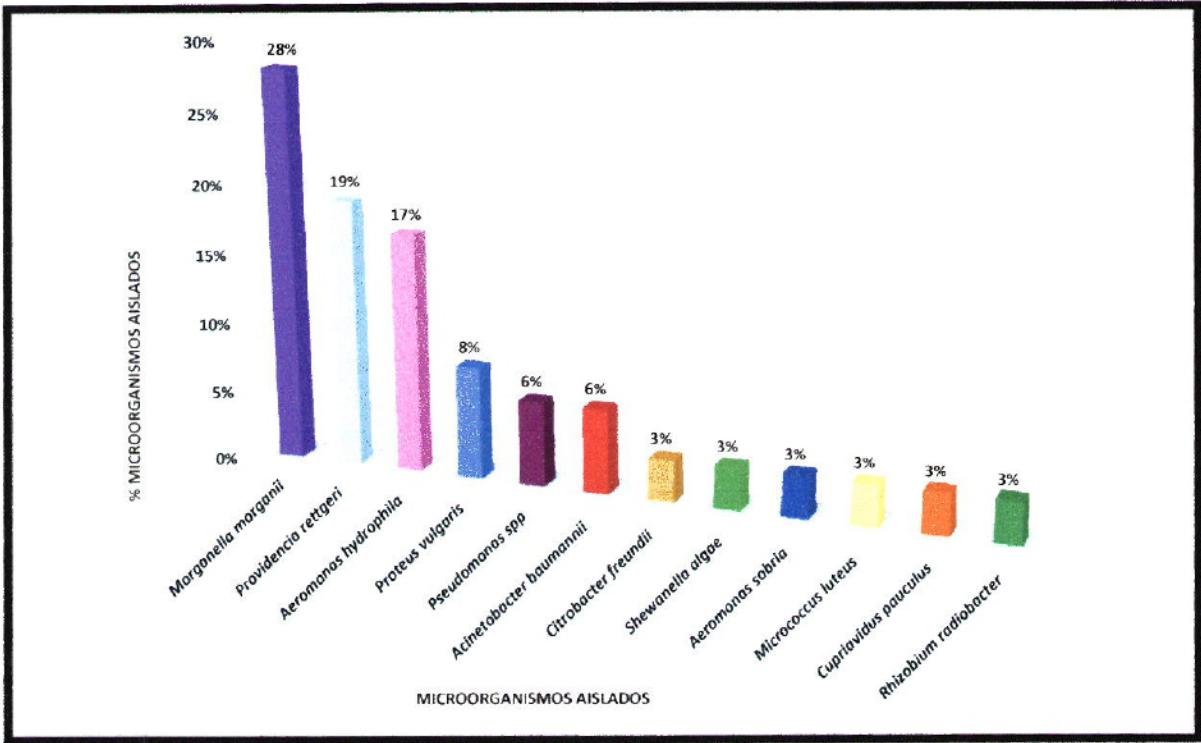
Fuente: Datos obtenidos de la caracterización fenotípica realizada en el equipo Vitek Compac 2

Gráfica N° 2: Familias bacterianas identificadas en el fondo de saco mucoso y veneno de *B. asper*. (n=61).



Fuente: Caracterización fenotípica de las familias identificadas del fondo de saco mucoso y veneno de *B. asper*, obtenidas a través de las pruebas dependientes de cultivo en el Vitek Compac 2

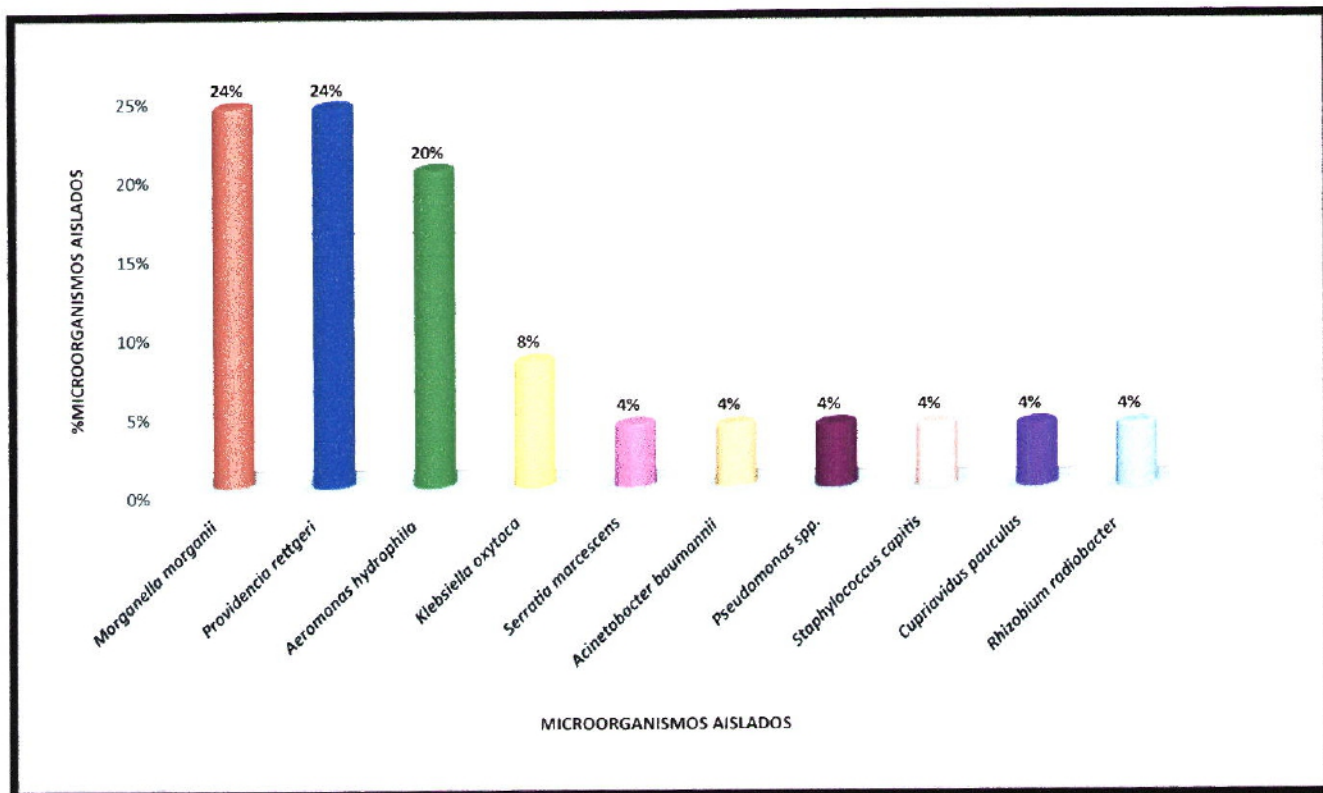
Gráfica N° 3: Microorganismos aislados del fondo de saco mucoso de *B. asper* en Panama. (n=21)



Fuente: Datos obtenidos de la caracterización fenotípica realizada en el equipo Vitek Compac 2.

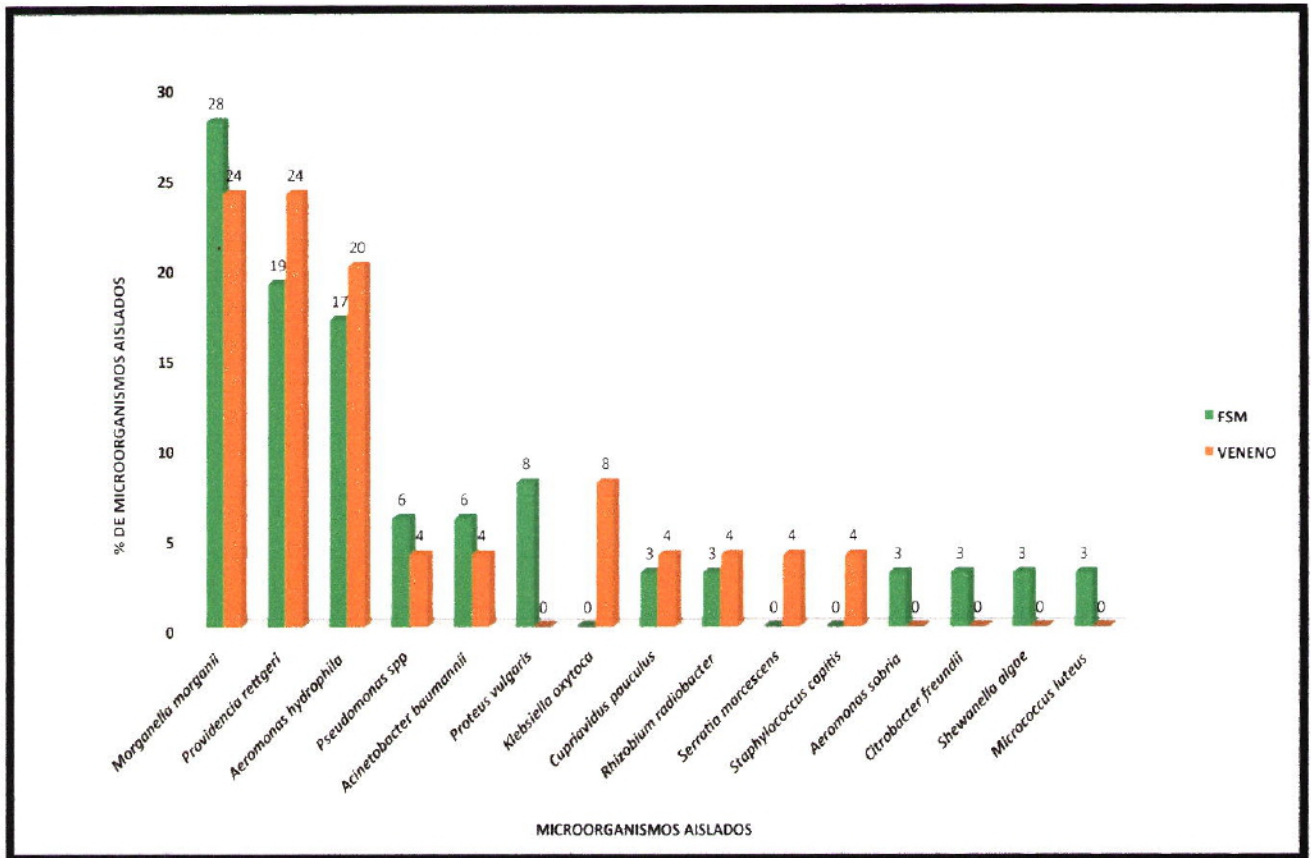
Gráfica N° 4: Microorganismos aislados del veneno de *B. asper* en Panamá.

(n= 21)



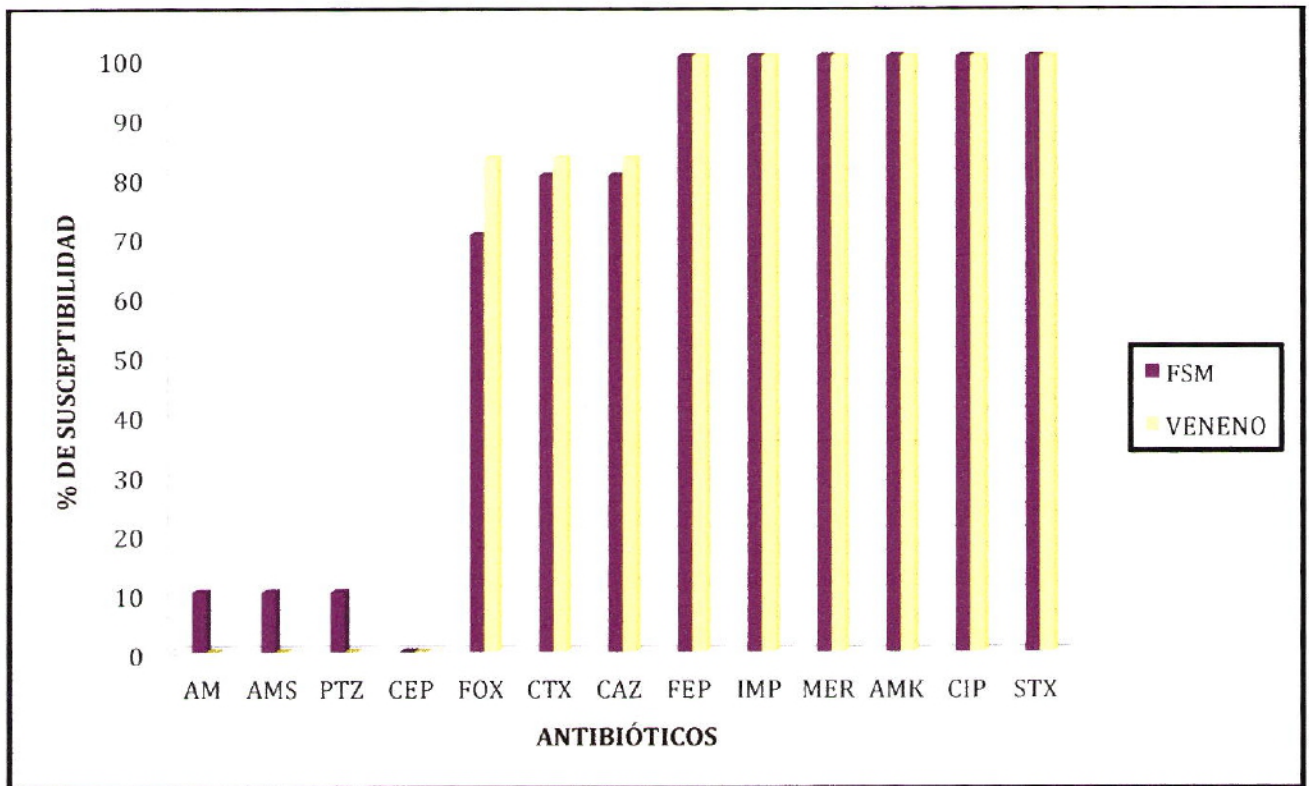
Fuente: Caracterización fenotípica de los microorganismos aislados del veneno de *B. asper* en Panamá, obtenida a través de las pruebas dependientes de cultivo realizadas en el Vitek Compac 2.

Gráfica N° 5: Microorganismos aislados del fondo de saco mucoso vs veneno de *B. asper* en Panamá. (n= 21).



Fuente: Comparación de la caracterización fenotípica de los microorganismos identificados en fondo de saco mucoso y veneno de *B. asper*, a través del método dependiente de cultivo. (Vitek Compac 2)

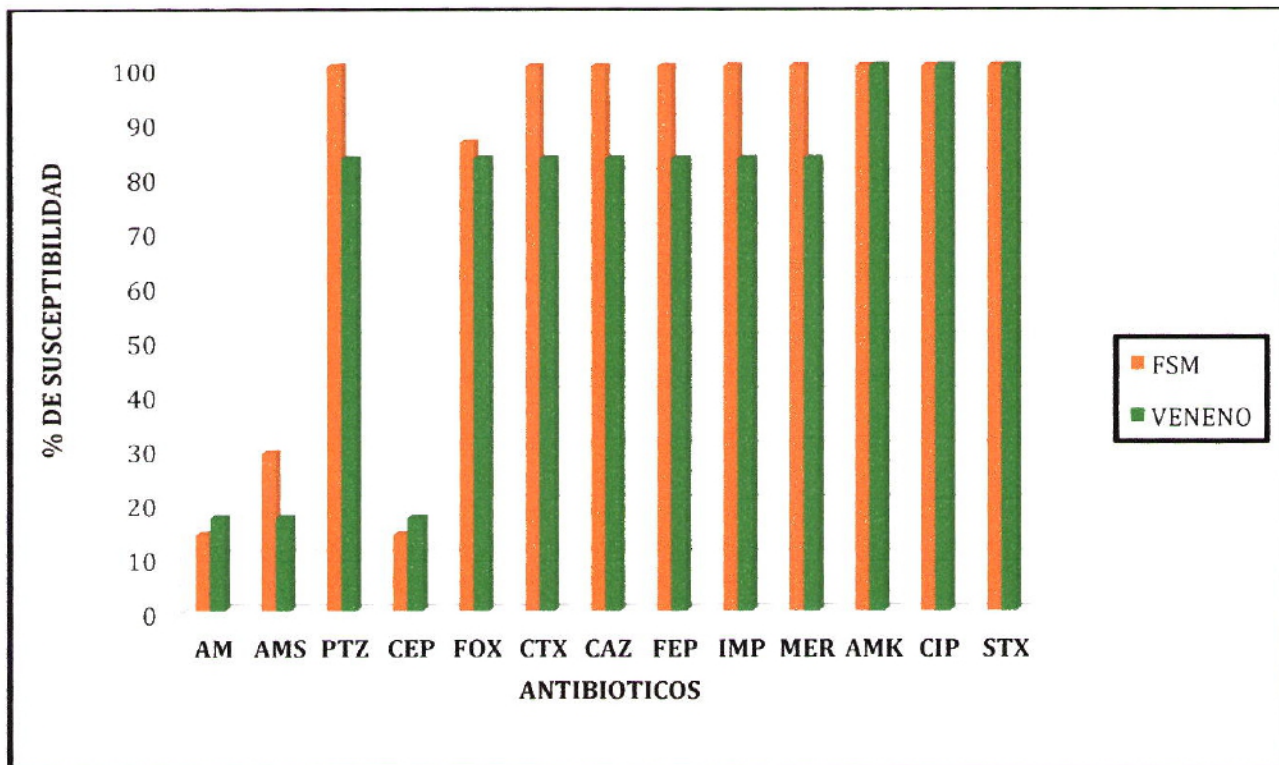
Gráfica N° 6: Susceptibilidad de los aislamientos de *M. morganii* del fondo de saco mucoso y veneno de *B. asper* en Panamá. (FSM: n=10) (Veneno: n= 6)



Ampicilina (AM), Ampicilina/ Sulbactam (AMS), Piperacilina/tazobactam (PTZ), Cefalotina (CEP), Cefoxitina (FOX), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Cefepima (FEP), Imipenem (IPM), Meropenem (MER), Amikacina (AN), Ciprofloxacina (CIP), Trimetroprima/ Sulfametoxazol (SXT).

Fuente: Datos obtenidos de las muestras procesadas en el equipo Vitek Compac 2

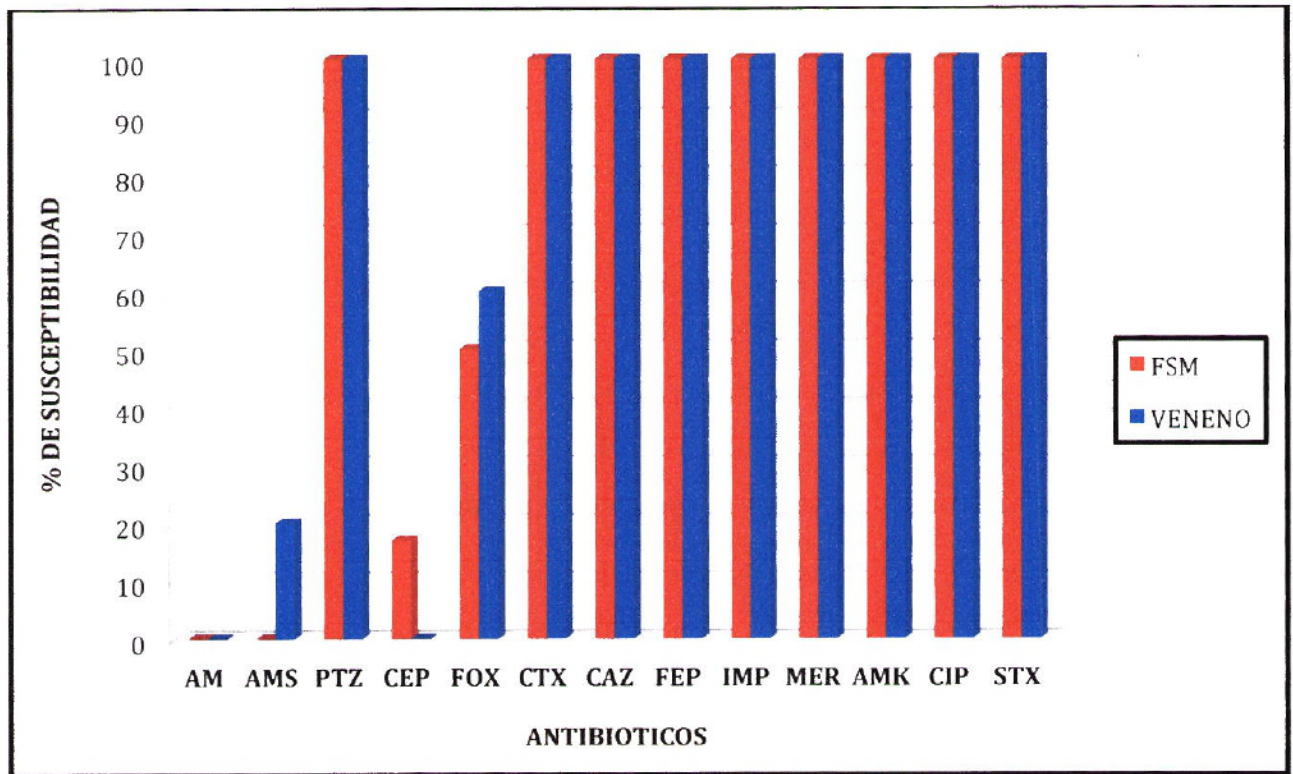
Gráfica N° 7: Susceptibilidad de los aislamientos de *P. rettgeri* del fondo de saco mucoso y veneno de *B. asper* en Panamá. (FSM: n=7) (Veneno: n= 6)



Ampicilina (AM), Ampicilina/ Sulbactam (AMS), Piperacilina/tazobactam (PTZ), Cefalotina (CEP), Cefoxitina (FOX), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Cefepima (FEP), Imipenem (IPM), Meropenem (MER), Amikacina (AN), Ciprofloxacina (CIP), Trimetroprima/ Sulfametoxazol (SXT).

Fuente: Datos obtenidos de las muestras procesadas en el equipo Vitek Compac 2

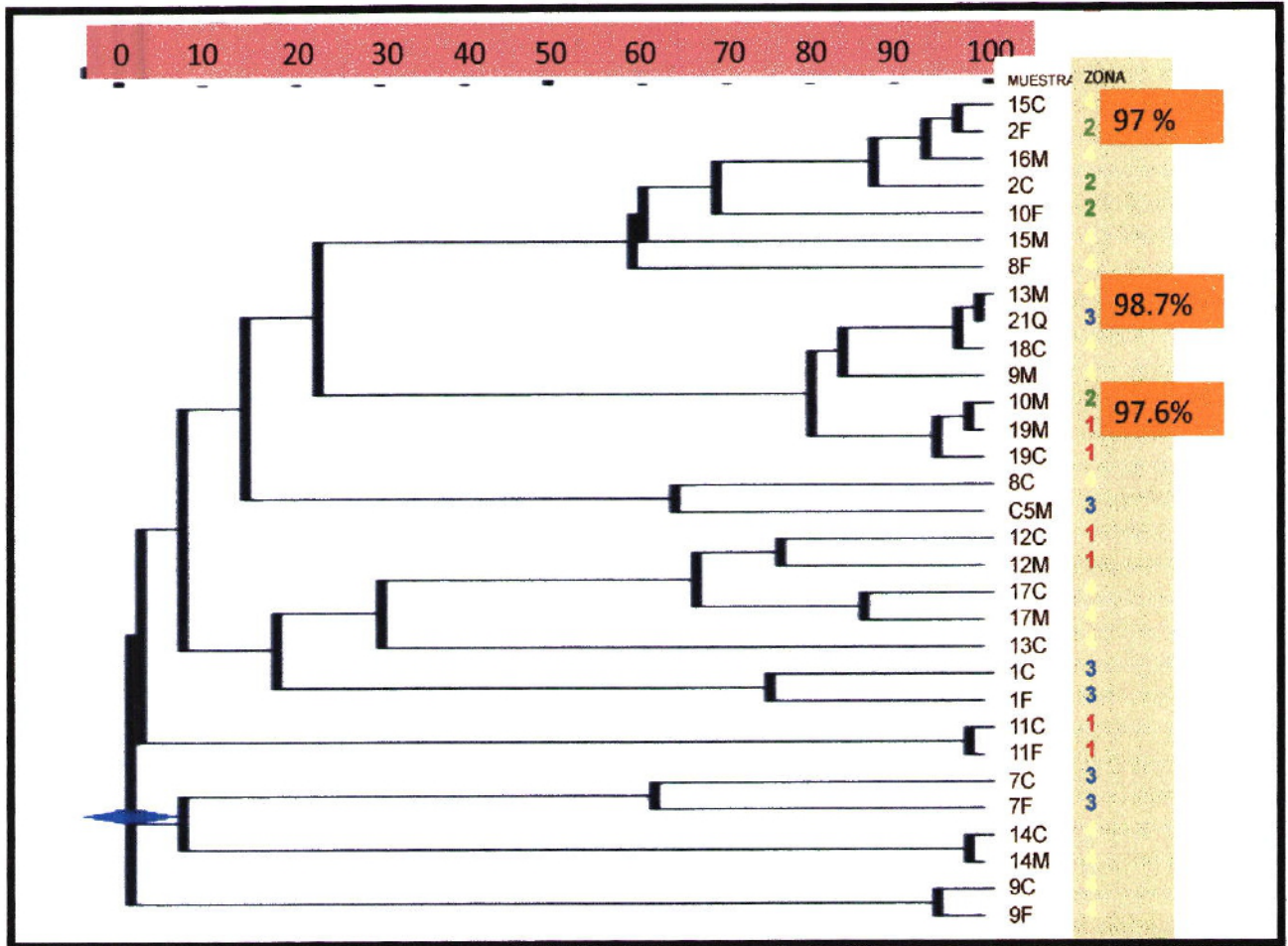
Gráfica N° 8: Susceptibilidad de los aislamientos de *A. hydrophila* del fondo de saco mucoso y veneno de *B. asper* en Panamá. (FSM: n=6) (Veneno: n=5)



Ampicilina (AM), Ampicilina/ Sulbactam (AMS), Piperacilina/tazobactam (PTZ), Cefalotina (CEP), Cefoxitina (FOX), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Cefepima (FEP), Imipenem (IPM), Meropenem (MER), Amikacina (AN), Ciprofloxacina (CIP), Trimetroprima/ Sulfametoxazol (SXT).

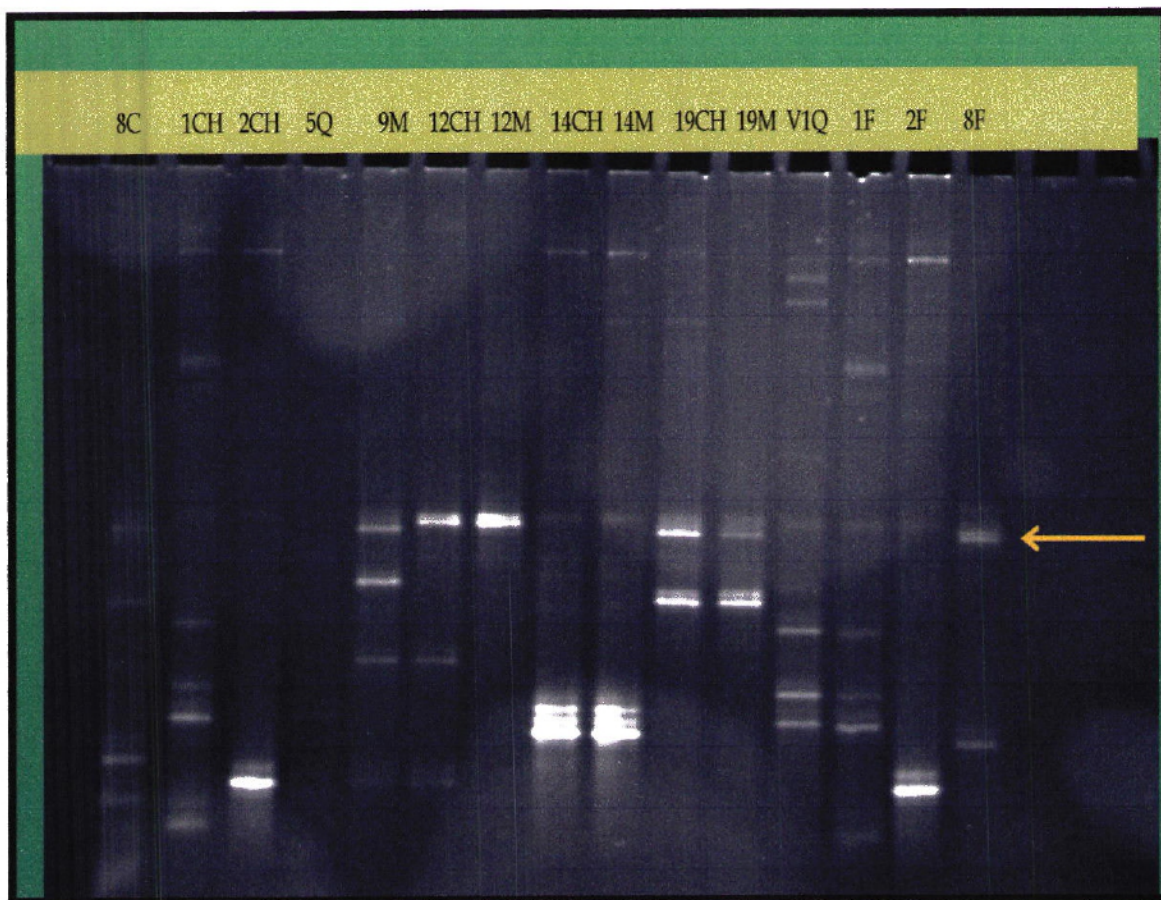
Fuente: Datos obtenidos de las muestras procesadas en el equipo Vitek Compac 2

Figura N° 18: Dendrograma de las muestras estudiadas a través de ARISA y analizadas con el programa Speak scanner.



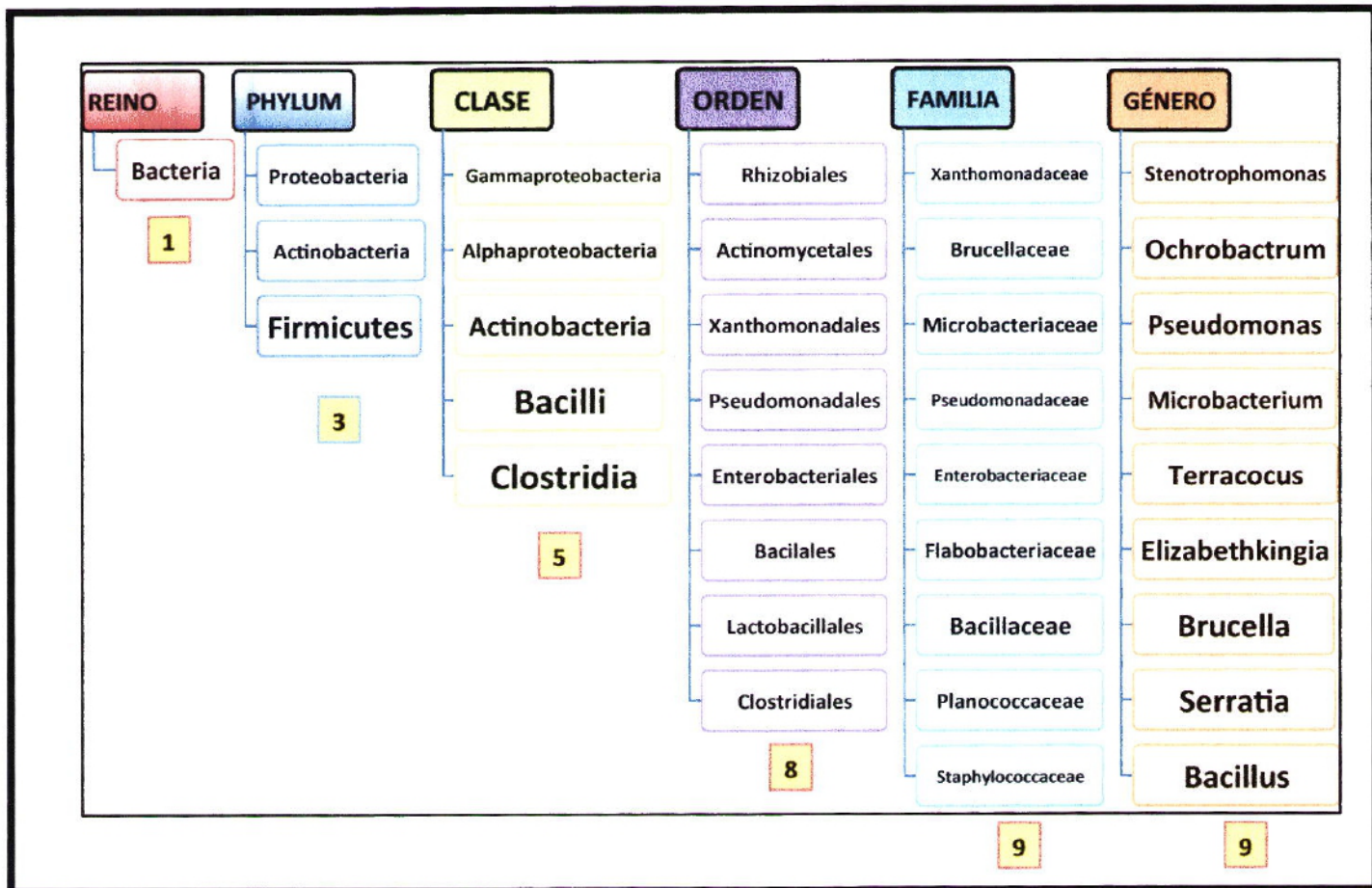
Fuente: Agrupamientos o clústeres realizados con las muestras estudiadas por técnicas independiente de cultivo, ARISA y analizadas a través del programa bioinformático Speak Scanner.

Figura N° 19: Perfiles moleculares obtenidos por la TTGE .



Fuente: Gel de poliacrilamida con la corrida electroforética a través del Método TTGE.

Figura N° 20: Taxones obtenidos como resultado de la pirosecuenciación.



Fuente: Datos de la Clasificación taxonómica de las muestras procesada por métodos de secuenciación masiva.

4.1.5. Resultados del análisis estadístico a través del Biplot logístico

Los resultados obtenidos fueron analizados a través del programa estadístico Multibiplot, creado en el departamento de estadística de la Universidad de Salamanca. Se trata de un enfoque estadístico multivariante que realiza una representación gráfica simultánea de filas (individuos) y columnas (variables) a partir de una matriz de datos.

Sin embargo, en estudios amplios de diversidad, donde se desconoce la estructura genética de la población estos resultados están ajustados a la realidad.

La metodología propuesta permite que, sobre cada individuo, se observe cómo es su variabilidad respecto a los diferentes descriptores o marcadores que se le han observado simultáneamente y organizar su estructura multidimensional en el sentido de conocer con cuánto contribuye cada descriptor o marcador a su relación con el resto.

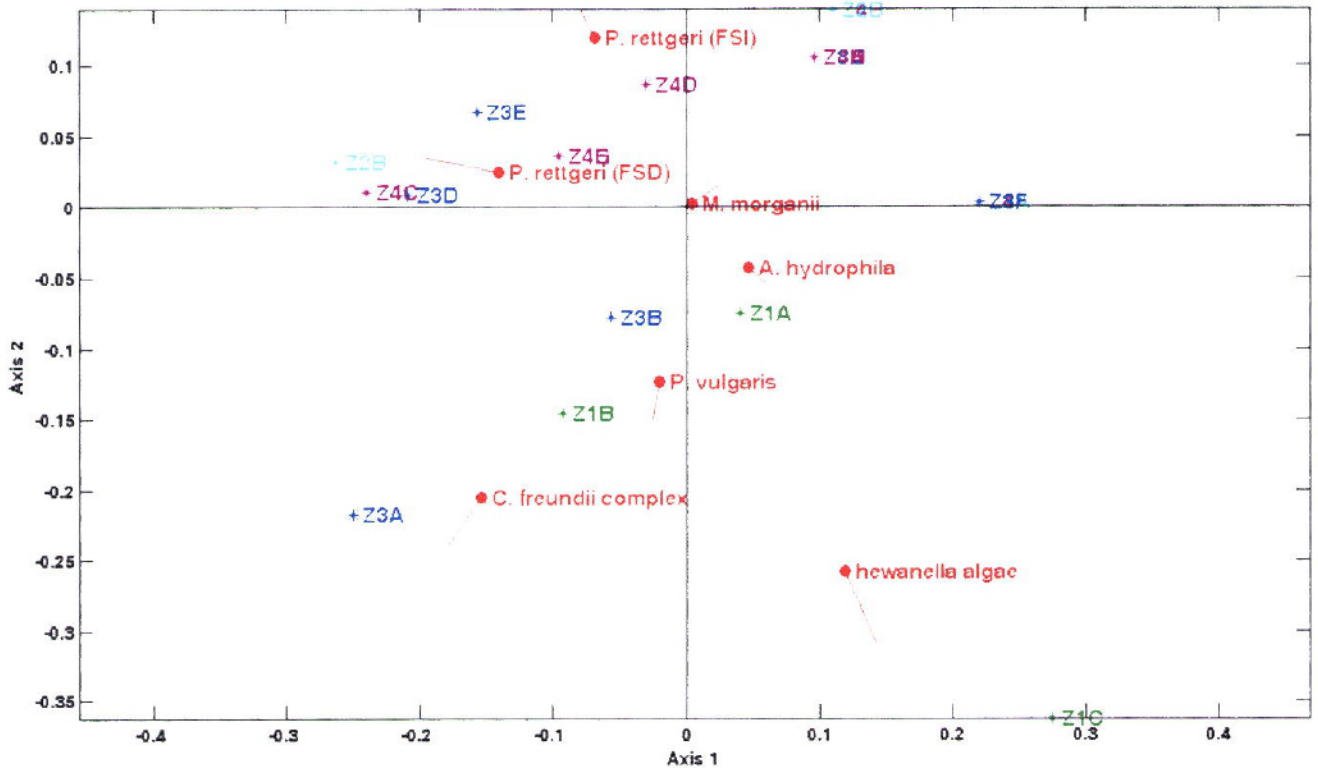
En la gráfica N° 9 podemos observar los vectores (puntos rojos) que corresponde a las bacterias identificadas, en donde los puntos representan las variables las zonas geográficas de colectas. Las flechas o vectores para las variables cuantitativas muestran la dirección de aumento de cada variable, y la longitud de la flecha indica el grado de correlación con los ejes de coordinación.

Este estudio reveló que las 4 zonas estudiadas representada en la gráfica tienen gran variación en las poblaciones encontradas, coherente a las condiciones que pueden tener cada una. Las comunidades bacterianas en diferentes zonas también pueden mostrar variación temporal no vinculadas. Esto pone de relieve la

importancia de la estructura espacial y temporal de la ecología de comunidades de bacterias, que forman parte de un microambiente. Una variación significativa a lo largo de las condiciones ambientales de cada zona y a lo largo de todo el territorio de muestreo. Es de esperar que la considerable cantidad de varianza, explicada en los perfiles de ARISA (Figura N° 14) representa las respuestas individualistas de la comunidad a los diversos factores ambientales de alimentación, temperatura. Geográficos y las interacciones antagónicas entre otros factores que no fueron medidos aquí, pero que se han demostrado ser importantes en otros estudios.

GRÁFICA Nº 9: Relaciones entre zonas geográficas de colectas y bacterias identificadas y analizadas a través del programa estadístico Biplot logístico.

BIPLOT LOGISTICO



Fuente: Datos provenientes de las giras de colecta de serpiente y de la identificación bacteriana.

4.2. DISCUSIÓN.

Panamá, es el país de América Latina con mayor incidencia de mordeduras de serpientes, con aproximadamente 2,000 mordeduras anuales, causadas por *B. asper* en un 70%. (Otero-Patiño 2009a)

Las 4 zonas de colectas de serpiente, fueron seleccionadas considerando la elevada incidencia de casos de accidentes ofídico que ocurren en las provincias de Darién, Coclé, Los Santos y Veraguas, categorizando las zonas en 1, 2, 3 y 4. (Valderrama 2003).

En nuestro estudio la mayor cantidad de colectas se realizaron en la zona 3 y 4 coincidiendo con Saldarriaga y colaboradores, (Saldarriaga-Córdoba et al. 2009) ya que señalan como áreas importantes en el accidente ofídico a Chiriquí, pero con mayor incidencia las tierras del centro del país, incluida la zona del Canal, en el este de Panamá, pues son áreas de abundancia de *B. asper*.

Este es el primer estudio microbiológico que se realiza en el país, para identificar la comunidad bacteriana existente en el contenido del fondo de saco mucoso y veneno de la serpiente *B. asper* de Panamá.

Los resultados encontrados son muy similares a los estudios realizados en países como Colombia y Brasil, que muestran la prevalencia de microorganismos Gram negativo, principalmente enterobacterias, aisladas del fondo de saco mucoso de *B. asper*. Debemos considerar que estas bacterias, también forman parte de la flora normal del intestino grueso de animales y el hombre. (Jorge et al. 1994) (Cuesta et al. 2008.)

Podemos observar que prevalece tanto en el veneno como en el fondo de saco mucoso, microorganismos Gram negativos como *M. morgani*, *P. rettgeri* y *A.*

hydrophila, de allí la importancia de estas bacterias como principales agentes causantes de complicaciones infecciosas en tejidos blandos (11 -30 % de los casos).(Otero-Patiño 2009b)

Estos hallazgos en común, son de gran importancia, dado que la cavidad oral de las serpientes son colonizadas por gran cantidad de bacterias, además que el daño tisular causado por los colmillos y el veneno, favorece la entrada de bacterias propias de la piel. (Jorge et al. 1994).

En un estudio realizado por Arroyo y colaboradores (Arroyo et al. 1980), se reportó que había una elevada incidencia de bacilos, Gram negativos aerobios como *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia spp*, *Klebsiella spp*, *Pseudomona spp*, *E. coli*, y anaerobios en cavidades orales y veneno de serpiente del género *Bothrops*. En cuanto a su sensibilidad, todos los aislamientos fueron sensibles a gentamicina, kanamicina y tetraciclina mostrando diversos grados de resistencia a otros antibióticos como ampicilina, penicilina, cefalosporinas, polimixina y estreptomycinina.

Por otro lado Bolaños y Brunker (Bolanos 1983a) demostraron la presencia de un importante número de especies de microorganismos aerobios y anaerobios, tanto en el veneno como en la cavidad oral de serpientes venenosas. En el estudio utilizaron técnica aséptica y modernas para colectar las muestras. Estos gérmenes en cantidades de millones de unidades formadora de colonias, son capaces de entrar a los tejidos durante la mordedura e inoculación del veneno.

En este mismo estudio ellos encuentran bajo conteo de bacterias en el veneno, considerando la hipótesis de que en la glándula el conteo es mínimo y que el

mismo, adquiere bacterias durante su pasaje a través del canal del colmillo, supuestamente altamente contaminado.

Sin embargo en un estudio realizado por (Angulo y Lomonte 2009) acerca de las propiedades de las principales proteínas del veneno de *B. asper*, se habla de la capacidad que tiene la L-amino ácido oxidasa (LAAO) para producir amoníaco y peróxido de hidrógeno, producto de una reacción de desaminación, lo que le atribuye una actividad antibacteriana, pudiendo ser esta la causa de la disminución del conteo bacteriano en el veneno.

Por otro lado en un estudio de 15 serpientes del género *Bothrops* que se llevó a cabo en Brasil para identificar la flora residente en los colmillos, la membrana que los recubre y el veneno, se encontró la presencia de *Streptococcus* de grupo D, *Enterobacter spp*, *P. rettgeri*, *Providencia spp*, *E. coli*, *Morganella morganii* y *Clostridium spp*. No obstante aislamientos bacterianos similares se han descrito en la cavidad oral de otras serpientes venenosas como *Crotalus durissus terrificus* sin que ocurra un mayor índice de infecciones. (García-Lima y Laure 1987).

Diversos estudios han demostrado que las bacterias que forman parte de la piel de los seres humanos no son las que se aíslan con mayor frecuencia del sitio de la mordedura, por el contrario, pareciera que son los gérmenes que se encuentran en la cavidad oral de la serpiente las que ocasionan las infecciones. (Jorge et al. 1990).

En este sentido podemos decir que el accidente bothrópico tiene características particulares entre las que se menciona el hecho de que este género de serpientes, posee colmillos más largos que inoculan las bacterias en sitios más profundos y que el veneno que inyectan causa mayor daño tisular. (Lopez et al.

2008). De forma que las infecciones de la piel, tejido blandos y músculos son complicaciones, comunes que pueden conllevar graves secuelas locales o sistémicas, incluida la amputación.(Cuesta et al. 2008.)

Recuentos bacterianos tan elevados como 2×10^6 bacterias por ml de veneno, pueden ser inoculados cada vez que ocurre una mordedura de serpiente(Arroyo et al. 1980), convirtiéndose en focos probables de infección.

En nuestros resultados observamos, que la flora polimicrobiana aislada del fondo de saco y veneno de las serpientes *B.asper* de Panamá, tiene grandes semejanzas con las bacterias encontradas en los abscesos de pacientes con accidente ofídico (Arroyo et al. 1980)(Andrade et al. 1989) (Criales 1994)

En este estudio la bacteria con mayor número de aislados tanto en el fondo de saco mucoso como en veneno fue *M. morganii*, por lo que existe una correlación en cuanto a la presencia de esta bacteria en complicaciones infecciosas como abscesos e infecciones de tejido blando, confirmado con estudios como el de Jorge y colaboradores, donde puncionaron asépticamente abscesos cerrados de 40 pacientes con accidente bothrópico, cultivando el material obtenido para aerobios y anaerobios, recuperando con mayor frecuencia a la bacteria *M. Morganii*. (Jorge et al. 1994)

De igual forma Andrade y colaboradores encontraron a *M. morganii* con la mayor incidencia en abscesos por accidente bothrópico en Brasil, en un estudio que realizaron a 99 abscesos causados por mordedura de por serpiente del género *Bothrops*.(Andrade et al. 1989)

Otras especies aisladas con gran frecuencias en este estudio fueron *Providencia rettgeri* y *Aeromona hydrophila*, esta ultima que aunque no es enterobacteria es

bacilos Gram negativo que participan en formación de abscesos y complicaciones infecciosas.(Arroyo et al. 1980)

Las especies de *Aeromonas*, son microorganismos ubicuos que se encuentran tanto en los hábitats acuáticos y ambientales. *A. hydrophila* es muy estudiada debido a su presencia en los alimentos, agua, estuario, resistencia a los antibióticos y capacidad de causar infecciones en seres humanos y animales. *A. hydrophila* ha sido identificado como agente causante de enfermedades humanas tales como septicemia , meningitis , infecciones de la herida como resultado de la exposición al medio ambiente contaminado. (Sciences 2012). Este género presenta una Betalactamasa Cromosómicas inducible, considerada como el principal mecanismo de resistencia para la mayoría de *Aeromonas*, aunque la expresión de una metalo betalactamasa también induce resistencia en este género. (Janda & Abbott 2010)

En Este estudio la resistencia de los aislamientos de *A. hydróphila* a los antibióticos es mínima, ya que solo antibióticos de bajo espectro fueron resistentes, Ampicilina (AM), Ampicilina/ Sulbactam (AMS) y Cefalotina (CEP), manteniendo antibióticos como Piperacilina/tazobactam (PTZ), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Cefepima (FEP), Imipenem (IPM), Meropenem (MER), Amikacina (AN), Ciprofloxacina (CIP) y Trimetroprima/ Sulfametoxazol (SXT), sensibles en un 100% en ambos tipos de muestras.

En general los patrones de sensibilidad encontrado en las especies aislada, muestran una baja resistencia dentro del grupo de antibióticos utilizados, ya que los de amplio espectro permanecen en un 80 % sensibles a las cepas aisladas.

Los 3 microorganismos de mayor aislamiento fueron bacilos Gram negativos y en este estudio presentaron resistente a la ampicilina, y a la combinación Ampicilina/ Sulbactam pero sensibles a las cefalosporinas de tercera generación, o fluoroquinolonas (Gráficas 6, 7 y 8). Sobre la base de las bacterias aisladas en este estudio y su sensibilidad a los antimicrobianos, antibióticos de amplio espectro puede ser recomendado para los pacientes con envenenamiento bothrópico moderadas o graves.(Otero et al. 2002)

Algunos autores recomiendan según el patrón de sensibilidad de los agentes obtenidos, la prescripción de antibióticos cuyo espectro cubra Gram positivos, Gram negativos y anaerobios, postulando alternativas que incluyan ciprofloxacina más clindamicina o una cefalosporinas de tercera generación. (Cuesta et al. 2008) Por otro lado es importante agregar que la quimioprofilaxis está restringida a situaciones en las que se ha demostrado que la administración de antimicrobianos disminuye eficazmente la aparición de infecciones o secuelas infecciosas en personas con alto riesgo de adquirirlas, siendo el beneficio mucho mayor al riesgo que conlleva su uso. (Cuesta et al. 2008.).

La gran mayoría de las bacterias no son cultivables, y por lo tanto, desconocidas para el ser humano. Para contrarrestar esta limitante, se han desarrollado métodos moleculares para poder aislar y amplificar el material genético de bacterias no cultivables en diferentes ambientes. (Hernández-León et al. 2010.)

Sin embargo, dado que son técnicas moleculares basadas en la extracción del ADN total de la comunidad y su posterior amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*), tanto la técnica de ARISA como la de TTGE están sujetas a los errores sistemáticos introducidos por estos procedimientos (Suzuki y Giovannoni 1996; Wintzingerode *et al.* 1997; Crosby y Criddle 2003).

En el caso de los perfiles obtenidos a partir de la técnica de ARISA, Fisher y Triplett (1999) han concluido que las relaciones entre el número de fragmentos en el perfil y la diversidad absoluta de la comunidad que el perfil representa debe ser realizada con cautela. Estos autores señalan que, por un lado, la existencia de solapamiento en la longitud del espacio intergénico entre organismos no relacionados puede llevar a una subestimación de la diversidad mientras que, por otro lado, un mismo organismo puede estar aportando más de una señal al perfil como consecuencia de diferencias en las longitudes de los espacios intergénicos de las distintas copias del operón, dentro de un mismo genoma.

En relación a la técnica de TTGE, se estima que esta técnica puede detectar entre 1-2% de las especies totales que conforman la comunidad, es decir, sólo las especies dominantes (MacNaughton *et al.* 1999) Además, los distintos fragmentos de ADN que difieren en su secuencia pueden presentar características similares de movilidad dentro del gel de poliacrilamida. En consecuencia, fragmentos diferentes migran juntos, dificultando la diferenciación (Gelsomino *et al.* 1999). Por otro lado, una misma especie puede llegar a generar más de una señal en el

perfil como consecuencia de la existencia de múltiples copias del gen 16S rARN que difieren ligeramente en sus secuencias (Maarit Niemi et al. 2001).

Un punto de conflicto en la utilización de las técnicas de huella genética se relaciona con el uso de los datos cuantitativos para describir el patrón general de abundancia de estos organismos. Existen numerosos ejemplos en la literatura que documentan que la aplicación de la técnica de PCR en muestras heterogéneas (como aquellas que resultan de la extracción de ADN total de una muestra ambiental) puede modificar la proporción del producto respecto a su proporción original (Suzuki & Giovannoni 1996). influyendo, así, sobre la determinación de la abundancia natural de organismos en la muestra (Farrelly et al. 1995)

Los resultados obtenidos a través de los estudios por pirosecuenciación muestran la gran diversidad de géneros bacterianos obtenidos, en comparación con las técnicas tradicionales dependientes de cultivos. En las muestras analizadas por Metagenómica el 98 % pertenecen a el Dominio Bacteria.

Las bacterias identificadas por métodos tradicionales nos permitió obtener 15 especies bacterianas, perteneciente a 3 familias y de las cuales el 64% pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. (Otero-Patiño 2009a). Sin embargo a través del uso de la Metagenómica en las muestras estudiadas hasta el momento, se obtuvo géneros perteneciente a nueve familias diferentes, lo que muestra la importancia del uso de plataformas de secuenciación y herramientas bioinformáticas a través de métodos basados en la Metagenómica. (Miller et al. 2013)

La Metagenómica incluso pueden determinar las secuencias de todo el genoma de patógenos, permitiendo inferencias acerca de la resistencia a los antibióticos , la virulencia , la evolución y la transmisión a realizar.

Con respecto a las proporciones de géneros y especies, se encontraron importantes diferencias, si bien siempre resultaron mayoritarias las poblaciones encontradas por los métodos de secuenciación masiva, no se puede dejar de mencionar que la familia Enterobacteriaceae, se mantiene presente y que también esta presente una abundante Microflora no identificada por las técnicas tradicionales.

El presente estudio nos ha permitido identificar poblaciones microbianas presente en un microambiente con condiciones variadas y extremas, como es el caso del fondo de saco mucoso y el veneno de *B. asper*. Las diversas metodologías empleadas muestran la variabilidad de la microbiota identificada y pone de manifiesto la ventaja del uso de métodos moleculares.

Las bacterias identificadas son potencialmente patógenas al entrar en contacto con nuestro cuerpo y sobre todo al encontrar las condiciones favorable para desencadenar infecciones (Jorge & Ribeiro 1997). A pesar que diversos estudios hablan sobre el bajo porcentaje de las complicaciones infecciosas producidas por la mordedura de *B. asper*, no deja de ser un problema de salud pública con poca claridad en el abordaje en los esquemas de tratamiento antibiótico, para pacientes con mordeduras de serpiente por el género *Bothrops*.(Otero-Patiño 2009b)(Lopez et al. 2008).

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se pretende hacer un ajuste en el abordaje clínico en los esquema y protocolo de tratamiento del accidente ofídico, que por muchos años se ha manejado de forma empírica y que aunque no dejan de ser efectivos, permiten hacer recomendaciones de terapia mas apropiadas y oportunas en nuestra población susceptible a los accidentes ofídicos.

**CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES**

CONCLUSIONES

1. En la cavidad bucal y veneno de la serpiente estudiada se encontraron diversos microorganismos, con predominio de bacilos Gram negativos.
2. La mayoría de las bacterias corresponden a la familia Enterobacteriaceae, que forman parte de la flora normal del intestino grueso de animales y el hombre.
3. La bacteria que predominó en los aislamientos tanto en el fondo de saco como en el veneno fue *Morganella morganii*, seguida de *Providencia rettgeri* y posteriormente *Aeromonas hydrophila*.
4. Los patrones de susceptibilidad de las bacterias aisladas muestran baja resistencia o casi nula a los distintos antibióticos de amplio espectro, que son los de elección para los tratamientos profilácticos, en caso de complicaciones infecciosas.
5. El método de elección para hacer las extracciones de ADN es el Chelex, ya que permitió obtener un ADN, óptimo para el estudio.
6. Los agrupamientos de los clústeres en el dendrograma son independientes del método de extracción y las zonas de colectas.

7. Desde el punto de vista metodológico, la comparación de las técnicas tradicionales y moleculares utilizadas para el análisis de esta comunidad, resultaron aproximaciones adecuadas y congruentes para describir la estructura del microambiente estudiado y mejor comprensión de los patrones y comportamientos de las bacterias identificadas.

8. Los métodos independiente de cultivo y herramientas moleculares permitieron identificar una gran variedad de géneros que no se evidenciaron con las técnicas tradicionales.

RECOMENDACIONES

1. Incluir nuevas áreas de colectas y ampliar el número de muestras para continuar con los estudios.
2. Validar los resultados de la susceptibilidad de las bacterias aisladas para futuros esquemas de profilaxis hospitalaria.
3. Hacer estudios comparativos entre serpientes silvestres y serpientes en cautiverio.
4. Utilizar el método de Chelex para todas las extracciones de ADN.
5. Utilizar las herramientas moleculares para futuros estudios, ya que brindan información mas completa y consistente

ANEXOS

Anexo N°1: Formulario de registro de las colectas de serpientes

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

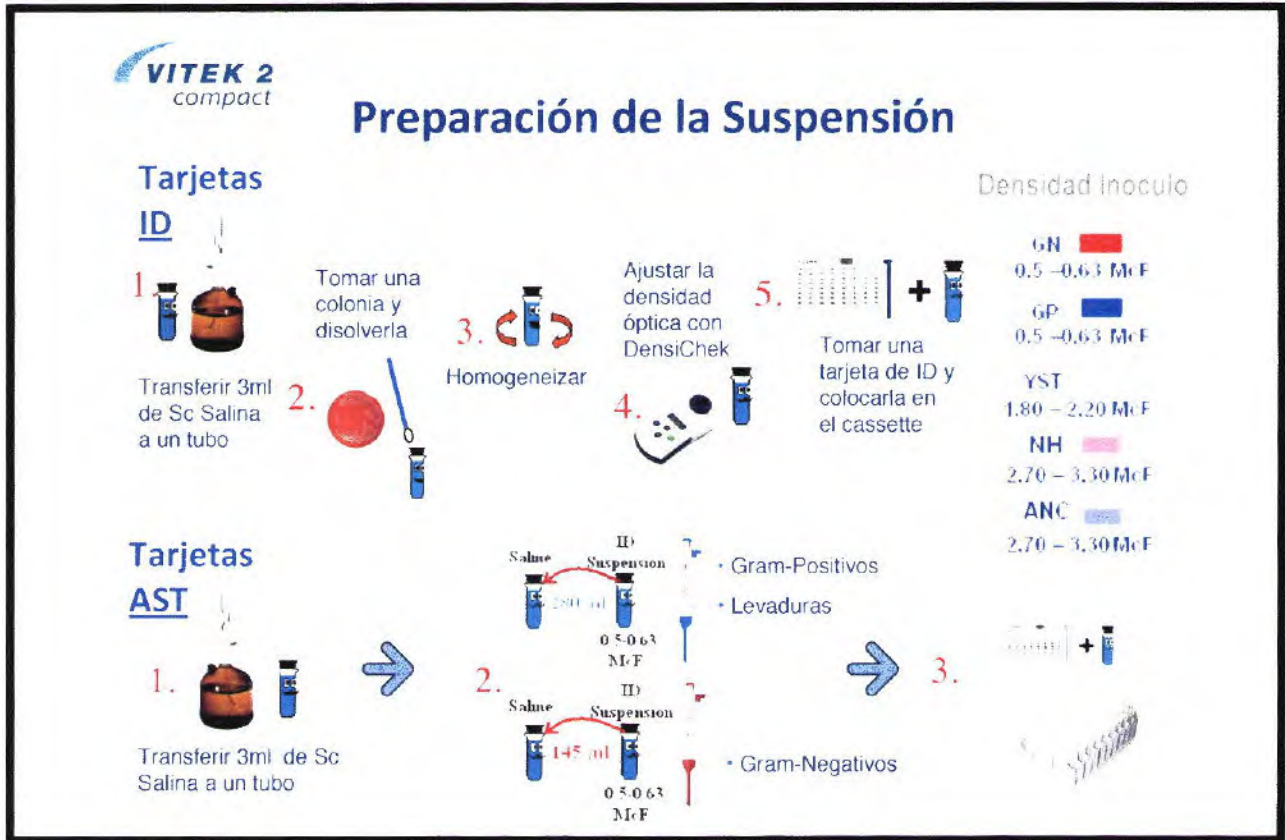
SENACYT

PROYECTO DE OFIDISMO: APY- NI10-007

FORMULARIO N° 1: RECOLECCIÓN DE DATOS

DATOS GENERALES	FECHA DE LLEGADA AL SERPENTARIO	
	HORA DE LLEGADA	
	CÓDIGO DEL EJEMPLAR	
DATOS DEL EJEMPLAR Y LA COLECTA	TALLA	
	PESO	
	SEXO	
	FECHA DE LA COLECTA	
	ENCARGADO DE LA COLECTA	
	LUGAR DE PROCEDENCIA	
DATOS DE LA TOMA DE MUESTRA	FECHA DE TOMA DE MUESTRA	
	HORA DE TOMA DE MUESTRA	
	PERSONA QUE MANIPULA EL EJEMPLAR	
	PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA	
	PERSONA QUE PROCESA LA MUESTRA	
	NÚMERO DE MUESTRAS	
	VOLUMEN DEL VENENO COLECTADO	
	OBSERVACIONES	

Anexo Nº 2: Diagrama de preparación de suspensión



Anexo N° 3: Tabla de requisitos para cultivo e incubación de medios, según microorganismo aislado.



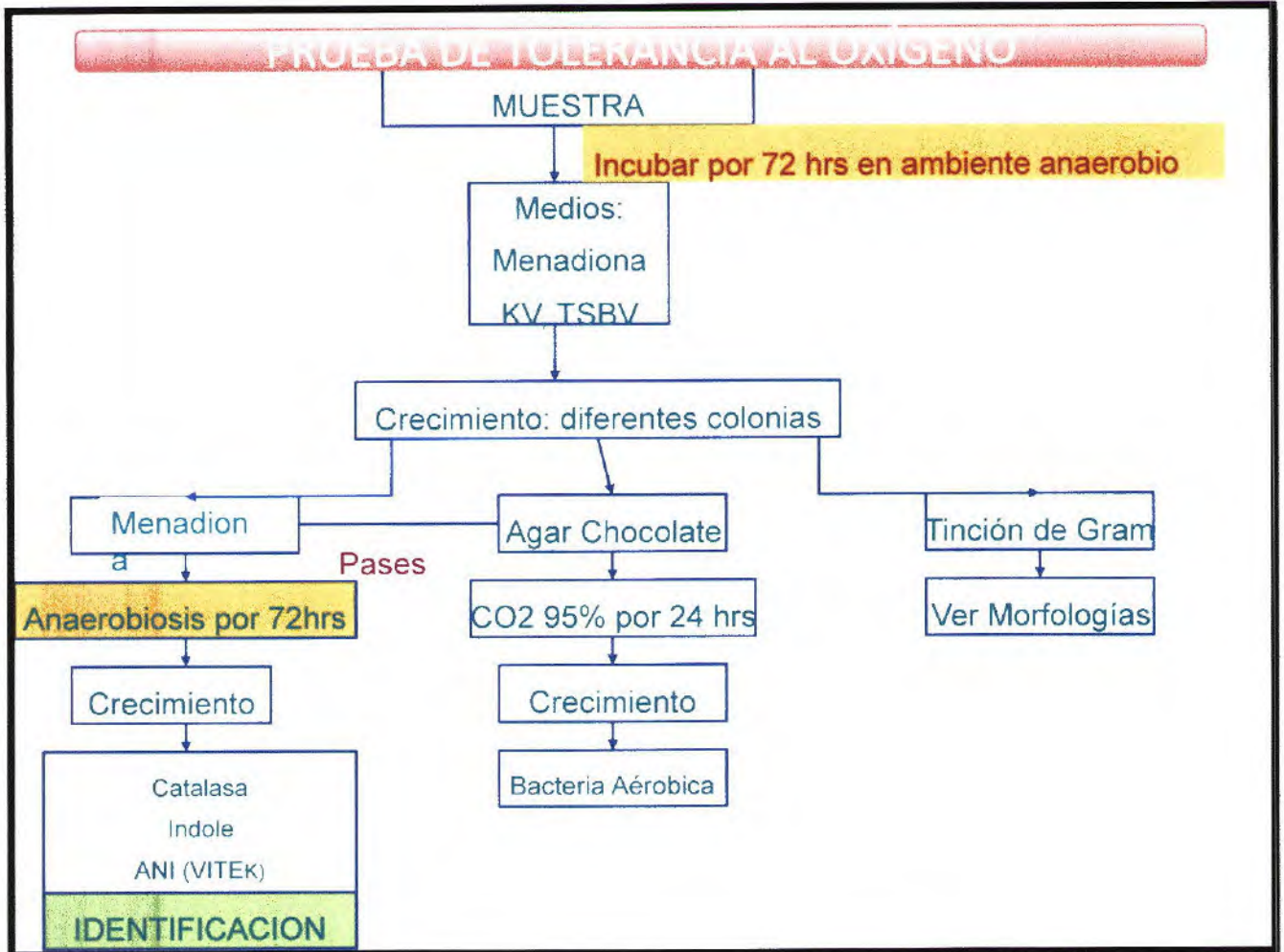
Requisitos de Cultivo e Incubación

Tarjeta	Medios Validados	Edad del Cultivo (hs)	Condiciones de Incubación
Bacilos Gram-negativos – GN	Agar Trypticasa Soya Agar Sangre Columbia Agar MacConkey CPS-ID3 (cromogénico)	18-24	35-37°C Aerobico
Cocos Gram-positivos – GP	Agar Trypticasa Soya Agar Sangre Columbia CPS-ID3 (cromogénico)	12-48	35-37° C Aerobico <u>Strepto:</u> 5-10%CO ₂ <u>Micrococci:</u> noCO ₂
Levaduras – YST	Agar Sabouraud Dextrosa Agar Trypticasa Soya+5%sangre	18-72	35-37° C Aerobico
Neisseria, Haemophilus- NH	<u>Campylobacter:</u> Agar Trypticasa Soya + 5% sangre <u>Fastidious:</u> Chocolate or Chocolate + Polyvitex	18-24	<u>Campy:</u> 35-37°C, microaerofilia <u>Fastidious:</u> 35-37°C, 5-10% CO ₂
Anaerobios, Corynebacterias – ANC	Agar sangre Columbia Agar CDC Anaerobios	Coryne: 18-24 Anaero: 18-72	35°C to 37°C. CO ₂ o anaerobiosis

Anexo N° 4: Tabla del los antibióticos utilizado. Tarjeta N-082.

ANTIBIOTICO	N-082 (gram negativos)	N-086 Gram negativos	N-087 Gram negativos
amikacin	x	x	x
amox CA		x	
amp sulb	x	x	x
ampicilina	x	x	x
aztreonam			x
cefalotin	x	x	
cefazolin			
cefepime	x	x	x
cefixime		x	
cefotaxime	x		
cefotetan			
cefoxitin	x	x	x
ceftazidime	x	x	x
ceftriaxone		x	x
cefuroxime		x	
cipro	x	x	x
colistin	x		x
ertapenem			x
esbl	x	x	x
gatifloxacina			
gentamicina	x	x	x
imipenem	x		x
levofloxacina			
meropenem	x		x
nalidixic acid	x		x
nitrofurantoin	x	x	
norfloxacina		x	
piperacilina			
piperacilina tzo	x	x	x
tetraciclina			
ticarcilina AC			
tigeciclina			x
tobramicina			
trimet sulfa	x	x	

Anexo N° 5: Diagrama de la prueba de tolerancia al oxígeno.



Fuente: Oduber, 2012.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta. H. 2012. Índice de Vulnerabilidad a accidentes ofídicos por la serpiente *Bothrops asper* en Panamá. In: Memorias XIV Congreso de APANAC, Panamá.
2. Acosta H. 2012 Accidente ofídico en la provincia de Coclé, Panamá, 2008. In: Memorias XIII Congreso de APANAC, Panamá.
3. Agencia Europea para la seguridad y salud en el trabajo EU. El estado de la seguridad y salud en el trabajo de la Unión Europea. Estudio piloto. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas; 2000. p. 59.
4. Ahmadian, A., Ehn, M. & Hober, S., 2006. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. ***Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry***, 363(1-2), pp.83–94.
5. Alape-Girón, A. et al., 2008. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic , Individual , and Ontogenetic Variations research articles. ***Journal of proteomics***, pp.3556–3571.
6. Alape-Girón, A. et al., 2009. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. ***Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology***, 54(7), pp.938–48.
7. Andrade, J.G. et al., 1989. Bacteriologic study of abscesses caused by bites of snakes of the genus *Bothrops*. ***Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo***, 31(6), pp.363–7.
8. Angulo, Y. et al., 1997. Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A2 from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. ***Archives of biochemistry and biophysics***, 339(2), pp.260–6.
9. Angulo, Y. & Lomonte, B., 2009. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. ***Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology***, 54(7), pp.949–57.
10. Arce, V., Brenes, F. & Gutiérrez, J.M., 1991. Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: a histochemical and immunocytochemical study. ***International journal of experimental pathology***, 72(2), pp.211–26.

11. Arroyo, O., Bolaños, R. & Muñoz, G., 1980. The bacterial flora of venoms and mouth cavities of Costa Rican snakes. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 14(3), pp.280–5.
12. Bolaños, R. 1982. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. *Rev. Costarric. Cienc. Méd.* 3(2):165-85.
13. Bolanos, R., 1983a. Bacteriología del veneno y de las glándulas veneníferas de *Bothrops asper* y *Crotalus durissus durissus* de Costa Rica. *Revista costarricense de ciencias médicas*, 4, S27-30.
14. Bolaños, R., 1983b. Las serpientes venenosas de Centro América y el problema del ofidismo. Segunda parte: recursos terapéuticos y tratamiento. *Revista costarricense de ciencias médicas*, 4(1), pp17-25.
15. Bolaños R. 1984. Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica. Editorial Universidad de Costa Rica.
16. Brust, A. et al., 2013. Differential evolution and neofunctionalization of snake venom metalloprotease domains. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 12(3), pp.651–63.
17. Calvete, J.J. et al., 2005. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 45(8), pp.1063–74.
18. Calvete, J.J., 2013. The continuing saga of snake venom disintegrins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 62, pp.40–9.
19. Calvete, J.J., Juárez, P. & Sanz, L., 2007. Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of mass spectrometry : JMS*, 42(11), pp.1405–14.
20. Calvete, J.J, et al.2007 . Snake venomomics. Strategy and applications. *J. Mass Spectrom*, 42, 1405–1414.
21. Campbell, J.A., Lamar, W.W., 1989. The Venomous Reptiles of Latin America. Comstock, Cornell University, Ithaca, NY, 425 pp.
22. Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. 2 volumes. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, NY, 774 pp.
23. Cárdenas, O; Galindo, P y Vicente-Villardón , J. L. 2007. Los métodos Biplot: Evolución y aplicaciones. *Análisis de Coyuntura*.13:279-303.

24. Cardinale M, et al. 2004. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. ***Appl Environ Microbiol***, 70(10):6147–56.
25. Catalogue of life/Integrated Taxonomic Information System (ITIS) 2003 http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=585769&print_version=PRT&source=to_print.
26. Cisneros-Heredia, D. and J. Touzet. 2004. Distribution and conservation status of *Bothrops asper* (GARMAN, 1884) in Ecuador. ***Herpetozoa***, 17(3/4): 135-141.
27. Chacur, M. et al., 2001. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. ***Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology***, 39(8), pp.1173–81.
28. Chippaux, J.P., 1998. Snake bites: appraisal of the global situation. ***Bull. World Health. Organ*** 76, 515–524.
29. Chippaux, J.P. & Goyffon, M., 1998. Venoms, antivenoms and immunotherapy. ***Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology***, 36(6), pp.823–46.
30. Clarke, S.C., 2005. Pyrosequencing: nucleotide sequencing technology with bacterial genotyping applications. ***Expert review of molecular diagnostics***, 5(6), pp.947–53.
31. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing - Twenty-first informational supplement. document M100-S21 Wayne, PA: CLSI; 2011.
32. Criales, J., & Arguedas, A. (1994). Infecciones bacterianas de tejidos blandos en niños mordidos por serpientes, en el Hospital Nacional de Niños, entre enero de 1988 y diciembre de 1992. ***Revista Médica Del Hospital Nacional De Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera***. 29, 31-5.
33. Cuesta, J., Peña, L. & Zuluaga, A.F. 2008. Is antibiotic prophylaxis necessary in ophidism? ***Infectio***, 12(1), pp.54–63.
34. Dahllöf, Ingela, and Staffan Kjelleberg. 2002. "Multivariate Optimization of Polymerase Chain Reaction for Microbial Community Analysis." ***Marine biotechnology***, 4(4):423–30.

35. Demey J, Vicente-Villardón JL, Galindo MP, Zambrano A (2008) Identifying molecular markers associated with classification of genotypes using external logistic biplots. *Bioinformatics*, 24:2832–2838.
36. Duque-Osorio J, et al. 2007. Venenos de serpiente y moléculas antiveneno. *Rev. Acad. Coloma. Cienc.* 31:118. 109-137.
37. Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods* 56: 297-314.
38. Fakruddin & Chowdhury, A., 2012. Pyrosequencing-An Alternative to Traditional Sanger Sequencing. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(1), pp.14–20.
39. Farrelly, V., Rainey, F.A. & Stackebrandt, E., 1995. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and environmental microbiology*, 61(7), pp.2798–801.
40. Fisher, M.M. & Triplett, E.W., 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), pp.4630–6.
41. Fonseca F. 1949. Animais peçonhentos. São Paulo: Empresa Gráfica da "Revista dos Tribunais". 376p.
42. Fox, J.W. & Serrano, S.M.T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 45(8), pp.969–85.
43. Fry, B.G., 2005. From genome to "venome": molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome research*, 15(3), pp.403–20.
44. Gabriel, K. R. (1971), "The biplot-graphic display of matrices with application to principal component analysis", *Biometrika*, 58: 453-467.
45. Galvão, F. O. 1980. Acidente botrópico. *Res. Med.* 9, 10-2.
46. Garcia-Lima, E. & Laure, C.J.1987. A study of bacterial contamination of rattlesnake venom. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 20(1), pp.19–21.

47. Garman, S., 1984. The reptiles and batrachians of North America. **Mem. Mus. Comp. Zool** 8,1-185.1883
48. Gelsomino, A. et al., 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of microbiological methods**, 38(1-2), pp.1–15.
49. Giraffa, G. et al., 2001. Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. **Journal of applied microbiology**, 91(5), pp.937–43.
50. Giraffa, Giorgio. 2004. "Studying the Dynamics of Microbial Populations During Food Fermentation." **FEMS microbiology reviews** 28(2):251–60.
51. Gómez, JP. 2011. Accidente por animales ponzoñosos y venenosos: su impacto en la salud ocupacional en Colombia. **Rev. Fac. Nac. Salud Pública**. 29(4): 419-431.
52. Gutiérrez, J.M., Chaves, F. & Bolaños, R., 1980. Comparative study of venoms of newborn and adult specimens of *Bothrops asper*. **Revista de biología tropical**, 28(2), pp.341–51.
53. Gutiérrez, J.M. et al., 1986. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom. **Toxicon**, 24(3):223-31.
54. Gutiérrez, J.M. et al., 1995. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, 33(1), pp.19–29.
55. Gutiérrez, J.M. & B. Lomonte. 2003. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en América Latina, p. 310-323. In: J.L.C. Cardoso; F.O.S. França; F.H. Wen; C.M.S Málaque; V.
56. Gutiérrez, J.M. et al., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, 45(8), pp.997–1011.
57. Gutiérrez, J.M., 2009. *Bothrops asper*: beauty and peril in the neotropics. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, 54(7), pp.901–3.
58. Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., et al., 2009. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, 54(7), pp.958–75.

59. Gutiérrez, J.M., Escalante, T. & Rucavado, A., 2009. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by Bothrops asper snake venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, 54(7), pp.976–87.
60. Gutiérrez, J.M. et al., 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, 56(7), pp.1223–35.
61. Gutiérrez, J.M., 2011. Snakebite poisoning in Latin America and the Caribbean: an integral view from a regional perspective. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, 51(1), pp.1–16.
62. Hernández-León, R. et al., 2010. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. **Phyton (Buenos Aires)**, 79(2), pp.133–139.
63. <http://www.Bothrops asper | The Reptile Database>.
64. Jackson, D. 1934. Tratamiento quirúrgico del ofidismo. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 19, 13, 423-33.
65. Janda, J.M. & Abbott, S.L., 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical microbiology reviews**, 23(1), pp.35–73.
66. Jaric, M. et al., 2013. Better primer design for metagenomics applications by increasing taxonomic distinguishability. **BMC proceedings**, 7(Suppl 7), p.S4.
67. Jorge, MT, et al. 1987. Bacilos Gram-negativos aeróbios en abscessos por accidente botrópico **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 20 (supl.), 55.
68. Jorge, M.T. et al., 1990. Bacterial flora of the oral cavity, fangs and venom of *Bothrops jararaca*: possible source of infection at the site of bite. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 32(1), pp.6–10.
69. Jorge, M.T. et al., 1998. *Aeromonas hydrophila* soft-tissue infection as a complication of snake bite: report of three cases. **Annals of tropical medicine and parasitology**, 92(2), pp.213–7.
70. Jorge, M.T. et al., 1994. Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: a prospective study. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, 32(6), pp.743–8.

71. Jorge, M.T. & Ribeiro, L.A., 1997. Infections in the bite site after envenoming by snakes of the Bothrops genus. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 3(2), pp.264–272.
72. Jorge, MT, et al. 1990. Flora bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de Bothrops jararaca: possível fonte de infecção no local da picada. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 32, 6-10.
73. Jorge MT., Ribeiro LA.1990. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 36, 66-77.
74. Jorge MT, et al. 1994. Bacteriology of abscesses complicating Bothrops snake bite in humans: a prospective study. *Toxicon*, 32: 743-8.
75. Jorge MT, et al. 1988. Bacteria isolated from abscess caused by Bothrops sp. bites. In: International Congress for Infectious Diseases and Congresso da Sociedade Brasileira de Infectologia, 10, Rio de Janeiro, 1988. Abstract book... Rio de Janeiro, 177.
76. Jorge, M.T, et al. 2004. Failure of chloramphenicol prophylaxis to reduce the frequency of abscess formation as a complication of envenoming by Bothrops snakes in Brazil: a double-blind randomized controlled trial. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 529–534.
77. Juckett, G. & Hancox, J.G., 2002. Venomous snakebites in the United States: management review and update. *American family physician*, 65(7), pp.1367–74.
78. Kindhauser M. Communicable Diseases 2002. Global Defense Against the Infectious Disease Threat: World Health Organization, Geneva.; 2003.
79. Lee, M.S.Y. & Scanlon, J.D., 2002. Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 77(3), pp.333–401.
80. Lomonte, B. et al., 2008. Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers Bothriechis lateralis and Bothriechis schlegelii. *Journal of proteome research*, 7(6), pp.2445–57.
81. Lomonte, B. et al., 2012. Snake venomomics and toxicological profiling of the arboreal pitviper Bothriechis supraciliaris from Costa Rica. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 59(5), pp.592–9.
82. Lomonte, B. et al., 1994. The dynamics of local tissue damage induced by Bothrops asper snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 32(1), pp.41–55.

83. Lomonte, B. & Carmona, E., 1992. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. ***Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry***, 102(2), pp.325–329.
84. Lomonte B. 2012. Snake venoms: from research to treatment. ***Acta méd. costarric.*** 54 (2): 86-96.
85. Lopez et al., 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 Colombiánadica Colombiana***, 33, pp.127–130.
86. Loría, G.D. et al., 2003. Characterization of “basparin A,” a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. ***Archives of biochemistry and biophysics***, 418(1), pp.13–24.
87. Maarit Niemi, R. et al., 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. ***Journal of microbiological methods***, 45(3), pp.155–65.
88. Mackessy, S.P. & Baxter, L.M., 2006. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. ***Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology***, 245(3-4), pp.147–159.
89. MacNaughton, S.J. et al., 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. ***Applied and environmental microbiology***, 65(8), pp.3566–74.
90. Madeiros, CR. 2003. Acidentes por abelhas e vespas. En: Cardoso JL FF, Wen FH, Malaque CM, Haddad V, editores. Animais peçonhentos no Brasil: biología, clínica e terapéutica dos accidentes. Segunda edição ed. São Paulo: sarvier.
91. Manual de Procedimientos del VITEK 2 compact. Biomerieux. Fecha de acceso: junio de 2013. Disponible en:
<http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/home>.
92. Markland, F.S. & Swenson, S., 2013. Snake venom metalloproteinases. ***Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology***, 62, pp.3–18.
93. Mattison, C. 2007. The New Encyclopedia of Snakes. New Jersey, USA: Princeton University Press (Princeton and Oxford).

94. Mora, J. et al., 2008. Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: insights into a hidden aspect of envenomation. ***PLoS neglected tropical diseases***, 2(10), p.e318.
95. Moreira, L. et al., 1992. Ultrastructural alterations in mouse capillary blood vessels after experimental injection of venom from the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). ***Experimental and molecular pathology***, 57(2), pp.124–33.
96. Martin-Platero, A.M. et al., 2010. Chelex-based DNA isolation procedure for the identification of microbial communities of eggshell surfaces. ***Analytical biochemistry***, 397(2), pp.253–5.
97. Miller, R.R. et al., 2013. Metagenomics for pathogen detection in public health. ***Genome medicine***, 5(9), p.81.
98. Moura-DA-Silva, et al. 2008. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. ***Biochimie***, 90, 484–492.
99. Muyzer, G. 1999. Genetic fingerprinting of microbial communities– present status and future perspectives. *Methods of microbial community analysis. Proceedings of the 8th international symposium on microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.*
100. Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. ***Curr. Opin. Microbiol.*** 2: 317-322.
101. Nishioka, SA., Silveira, PVP. 1992. Bacteriology of abscesses complicating bites of lance-headed vipers. ***Ann. Trop. Med. Parasitol.***, 86, 89-91.
102. Núñez, V. et al., 2009. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. ***Journal of proteomics***, 73(1), pp.57–78.
103. Nyrén, P., 2007. The history of pyrosequencing. ***Methods in molecular biology*** (Clifton, N.J.), 373, pp.1–14.
104. Odeyemi et al. 2012. “Antibiotics resistance and putative virulence factors of *Aeromonas hydrophila* isolated from estuary,” ***Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences***, 1(6), pp. 1339–1357.

105. Ogier, J.-C, et al. 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature-gradient gel electrophoresis. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 68: 3691- 3701.
106. Ohsaka, A., 1979. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: Lee, C.Y. (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 52. *Springer Verlag, Berlin*, pp. 480–546.
107. Organización Internacional del Trabajo. Informe de introducción al XVI Congreso Mundial sobre Seguridad y Salud en el Trabajo, Viena, 26-31 de mayo de 2002. Decent Work – Safe Work (Ginebra). Viena: oit; 2002.
108. O'shea, M. 2005. *Venomous Snakes of the World*. Singapore: Pica Digital Pte Ltd, Singapore.
109. O'Shea, M., 2008. *Venomous Snakes of the World*, New Holland Publishers.
110. Otero, R., Gutiérrez, J., Beatriz Mesa, M., et al., 2002. Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. ***Toxicon***, 40(8), pp.1107–1114.
111. Otero, R. et al., 2004. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. ***Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene***, 98(12), pp.742–50.
112. Otero-Patiño, R., 2009a. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of Bothrops asper bites. ***Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology***, 54(7), pp.998–1011.
113. Otero, R, et al. 1992a. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989- febrero de 1990). ***Acta Med. Colomb.*** 17, 229–249.
114. Otero, R, et al. 1996. The Regional Group on Antivenom Therapy Research (REGATHER). A randomized double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by Bothrops atrox in Colombia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90, 696–700.
115. Otero, R, et al. 1999. A randomized blind clinical trial of two antivenoms prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG, in Bothrops and Porthidium snake bites in Colombia. Correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. ***Toxicon*** 37, 895–908.

116. Otero, R, et al. 2006. Efficacy and safety of two whole IgG polyvalent antivenoms, refined by caprylic acid fractionation with or without b-propionolactone, in the treatment of Bothrops asper bites in Colombia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 100, 1173–1182.
117. Otero-Patiño, R, et al. 2007. Accidente bothrópico en Colombia: estudio multicéntrico de la eficacia y seguridad de Antivipmyn-Tri®, un antiveneno polivalente producido en México. **Iatreia** 20, 244–262.
118. Pérez, A. V et al., 2008. Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake Bothrops asper. *Brazilian journal of medical and biological research. Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica*, 41(1), pp.12–7.
119. Petrosino, J.F. et al., 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical chemistry*, 55(5), pp.856–66.
120. Pettersson, E., Lundeberg, J. & Ahmadian, A., 2009a. Generations of sequencing technologies. **Genomics**, 93(2), pp.105–11.
121. Popa, R. et al., 2009. Limitations and benefits of ARISA intra-genomic diversity fingerprinting. **Journal of microbiological methods**, 78(2), pp.111–8.
122. Rosa, RR, et al. 1983. Isolamento de bactérias de lesões provocadas por picadas de ofídios. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 19, Rio de Janeiro. Programas e Resumos... Rio de Janeiro, 166.
123. Rucavado, A. et al., 2001. Characterization of aspercetin, a platelet aggregating component from the venom of the snake Bothrops asper which induces thrombocytopenia and potentiates metalloproteinase-induced hemorrhage. **Thrombosis and haemostasis**, 85(4), pp.710–5.
124. Rucavado, A., Núñez, J. & Gutiérrez, J.M., 1998. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake Bothrops asper. **International journal of experimental pathology**, 79(4), pp.245–54.
125. Saldarriaga, M. and Otero, R. 1995. Morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas en serpientes venenosas mantenidas en cautiverio. Tesis de Grado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia, Medellín, 78p.

126. Saldarriaga, M.M. et al., 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. ***Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology***, 42(4), pp.405–11.
127. Saldarriaga-Córdoba, M.M. et al., 2009. Phenotypic differences in a cryptic predator: factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* (Garman, 1884; Serpentes: Viperidae). ***Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology***, 54(7), pp.923–37.
128. Saravia-Otten, P. et al., 2004. Membrane independent activation of fibroblast proMMP-2 by snake venom: novel roles for venom proteinases. ***Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology***, 44(7), pp.749–64.
129. Saravia-Otten, P. et al. 2007. Increased Infectivity of *Staphylococcus aureus* in an Experimental Model of Snake Venom-induced Tissue Damage. ***J. Infect. Dis.*** 196, 748–754.
130. Sasa, M., Wasko, D.K. & Lamar, W.W., 2009. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. ***Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology***, 54(7), pp.904–22.
131. Serrano, S.M.T. & Maroun, R.C., 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. ***Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology***, 45(8), pp.1115–32.
132. Silva, C.J. Et al. 1995. Epidemiologia dos acidentes ofídicos em Uberlândia, MG e municípios próximos. Dados preliminares. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,31, São Paulo,1995. Resumos... São Paulo, 1995: 10.
133. Siqueira, J.F., Fouad, A.F. & Rôças, I.N., 2012. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. ***Journal of oral microbiology***, 4. pp.1-15
134. Solórzano, A; Cerdas, L. (1989). "Reproductive biology and the distribution of the Terciopelo, *Bothrops asper* Garman (Serpentes, Viperidae), in Costa Rica". ***Herpetologica***, 45 (4): 444–450.
135. Suzuki, M.T. & Giovannoni, S.J., 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. ***Applied and environmental microbiology***, 62(2), pp.625–30.
136. Teixeira, R. 1979. Forma grave do acidente por ofídios da sub-família crotalinae. ***An. Acad. Med. Bahia***, 2, 109-37.

137. Teixeira, C.F.P. et al., 2003. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. ***Muscle & nerve***, 28(4), pp.449–59.
138. Theakston, R.D.G., et al. 1990. Bacteriological studies of the venom and mouth cavities of wild Malayan pit vipers (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 875–879.
139. Torres, A. et al., 2010. Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom. ***Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases***, 16(4), pp.614–622.
140. Uetz, P. "*Bothrops asper* (GARMAN, 1883)". Reptile-Database. Zoological Museum Hamburg.
141. Umaña, V., 1982. Purification and isolation of isoenzymes of L-amino acid oxidase from the venom of *Bothrops asper*. ***Revista de biología tropical***, 30(1), pp.59–64.
142. Valderrama, O., et al. 2003. El accidente ofídico en Panamá. Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos. ***Revista Medico Científica***, 16(1): 28-36.
143. Vicente-Villardón, J. L., Galindo, M. P. and Blazquez-Zaballos, A. (2006). Logistic Biplots. Multiple Correspondence Analysis and related methods 491-509.
144. Vicente-Villardón, J. L. (2011). Logistic Biplots for Binary, Nominal and Ordinal Data. ***Agrocampus Ouest, Rennes FRANCE***, 63.
145. Vidal, N. 2002. Colubroid Systematics: Evidence for an Early Appearance of the Venom Apparatus Followed by Extensive Evolutionary Tinkering. ***J Toxicol Toxin Rev*** 21:21-41.
146. Warrell, D.A., 2004. Epidemiology, clinical features and management of snake bites in Central and South America. In: Campbell, J., Lamar, W. W. (Eds.), *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, pp. 709–761.
147. Williams, D. et al., 2010. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. ***Lancet***, 375(9708), pp.89–91.
148. World Health Organization. 2007. Rabies and envenomings: A neglected public health issue: report of a Consultative Meeting. Geneva: who; . 32 p.

149. World Health Organization. 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First who report on neglected tropical diseases. France. who;18 p.
150. WHO IRIS: Rabies and envenomings : a neglected public health issue : report of a consultative meeting, World Health Organization, Geneva, 10 January 2007.
151. World Health Organization. 2003. Communicable diseases 2002. Global defence against the infectious disease threat. WHO/CDS/ 15.