

Clostridios Aislados de Venenos de Culebras Costarricenses*

DR. TILLMANN BRUNKER**

DR. BERNAL FERNÁNDEZ**

Varios estudios han revelado la presencia de una flora bacteriana normal en la orofaringe y en el veneno de serpientes (3, 5, 6, 8, 9), habiéndose encontrado tanto organismos aerobios como anaerobios.

La mordedura de culebra, por su naturaleza traumática y estando presentes los elementos de sepsis, se presta para que ocurran variadas infecciones, dentro de las que es necesario destacar aquellas causadas por clostridios histotóxicos; éstos dan cuadros de necrosis tan semejantes a los atribuibles a los factores agresivos presentes en ciertos venenos de serpiente (6), que hacen prácticamente imposible la diferenciación clínica de la etiología del cuadro.

Dado que en la población costarricense ocurren cerca de 2.000 casos de accidentes por ofidios anualmente (1), muchos de los cuales presentan cuadros gangrenosos, creímos importante averiguar qué participación podrían tener en ellos los microorganismos anaerobios y especialmente el grupo de los clostridios —importante por incluir a los agentes de la gangrena y el tétano.

Así, decidimos iniciar nuestra investigación empleando los venenos de culebra que son extraídos y desecados en el Instituto Clodomiro Picado con el objeto de usarlos en la producción de sueros antiofídicos.

MATERIAL Y METODOS

Se obtuvieron 8 lotes de veneno cristalizado y refrigerado, de los que normalmente destina el Instituto Clodomiro Picado a la inmunización de caballos para la preparación de sueros antiofídicos. Cuatro de estos lotes incluían el veneno de culebras de la especie *Bothrops nummifer*, uno de *B. ophryomegas*, dos de *B. atrox* y uno de *B. lateralis*.

* Los venenos para esta investigación fueron aportados por el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica.

Trabajo realizado con la colaboración del Laboratorio de Anaerobios, Virginia Polytechnic Institute and State University, U.S.A.

** Cátedras de Microbiología General y de Microbiología para Estudiantes de Medicina, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Para los primoaislamientos de clostridios se empleó un medio de cultivo que consistía en volúmenes de 6 ml. de Caldo Triypticase Soya (BBL) con 0.1 g. de carne molida de res, envasados en tubos de 15 x 125 mm. con tapa de rosca y esterilizados al autoclave. Antes de emplearlos, se colocaban los tubos en agua hirviendo durante 15 minutos con el fin de extraer el oxígeno disuelto en el medio; luego se inoculaban con unos 10 mg. del veneno en cuestión y de inmediato se cubría la superficie del medio con una capa de parafina fundida para evitar así la reoxidación del medio.

Después de incubar los tubos a 37° C durante 48 horas, se hicieron coloraciones de Gram a los cultivos y éstas se examinaron en busca de bacilos grampositivos esporulados. De estar éstos presentes, se procedía a calentar el tubo de cultivo correspondiente a 60° C por 10 minutos con el propósito de destruir los microorganismos no esporulados. La suspensión de esporas sobrevivientes servía luego de inóculo para iniciar otro cultivos.

Cuando al examen microscópico de la tinción de Gram se observó más de un morfotipo en una preparación dada, se procedió a separarlos mediante rayado en agar sangre y subsecuente incubación en jarra anaerobia de Brewer durante 24 horas a 37° C.

Todos los aislamientos fueron probados en cuanto a su incapacidad para crecer en presencia de aire usando platos de agar sangre y un período de incubación de 48 horas a 37° C. Los aislamientos que, además de satisfacer los criterios anteriores, eran también catalasa negativos fueron considerados como pertenecientes al género *Clostridium*. Siguiendo las técnicas descritas por Holdeman y Moore (4) se procedió a determinar una serie de características que permitiera la identificación de cada aislamiento al nivel de especie, entre ellas: la fermentación de adonitol, almidón, amigdalina, arabinosa, celobiosa, dextrina, dulcitol, eritrol, esculina, fructosa, galactosa, glicerol, glucosa, inositol, inulina, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melibiosa, melicitosa, rafinosa, ramnosa, ribosa, sacarosa, salicina, sorbitol, sorbosa, trealosa y xilosa; reducción de nitratos; hidrólisis de almidón, esculina y gelatina; producción de catalasa, hemólisis, indol, lecitinasa, lipasa y sulfuro de hidrógeno; aspecto del crecimiento en medios líquidos y sólidos; crecimiento en leche; tipo de flagelación; antibiograma y cromatografía de gases para la detección de los productos finales de la fermentación.

Los diferentes clostridios aislados fueron probados también en cuanto a su histotoxicidad. Para ello se cultivaron en caldo con carne y glucosa a 37° C por 24 horas, se centrifugaron y del sobrenadante se inyectó 0.5 ml. intraperitonealmente a cada uno de dos ratones para la prueba de cada cultivo. Los ratones se observaron diariamente a través de 3 días en cuanto a síntomas y sobrevivencia.

RESULTADOS Y DISCUSION

Por el método descrito se logró aislar y caracterizar 14 cepas de clostridios a partir de los 8 lotes de veneno. De estas cepas, una no pudo ser identificada, posiblemente por tratarse de especie no descrita aún; las otras 13 cepas quedaron distribuidas en 6 especies, a saber: *Clostridium bifermentans*, *C. cadaveris*, *C. glycolicum*, *C. hastiforme*, *C. putrificum* y *C. sporogenes*.

De una revisión de la literatura (2, 6, 7) se desprende que han sido pocos los trabajos de bacteriología anaerobia que han sido hechos sobre los venenos de culebra; también se concluye que se aíslan más anaerobios a partir de veneno recién obtenido (6) que de veneno congelado y aún más que del cristalizado. Cualquiera que sea el origen de la muestra, el uso de un medio de aislamiento apropiado

parece ser decisivo para el propósito (6), siendo que el uso de tioglicolato es de lo menos aconsejable. A pesar de que empleamos venenos cristalizados, pudimos aislar dos cepas distintas de clostridios de todos los venenos excepto en dos. Es de suponer que si hubiéramos trabajado con veneno recién obtenido y técnica anaerobia aún más estricta, nuestra tasa de aislamiento habría sido superior.

De las 14 cepas, 5 mostraron gran toxicidad hacia los tejidos del ratón y el resto de ellas presentó una histotoxicidad moderada, según podemos ver en el cuadro 1. De las 6 especies que identificamos, dos son agentes de celulitis anaerobia (*C. bifermentans* y *C. putrificum*) y uno lo es de grangena gaseosa (*C. bifermentans*) (7).

En el cuadro 2 presentamos los patrones de sensibilidad a antibióticos para las diversas cepas aisladas. Se puede observar que todas ellas fueron sensibles a la ampicilina, a la penicilina G y a la clindamicina (Dalacin C); todas menos una, fueron sensibles también a la eritromicina. Por otra parte, todas las cepas fueron resistentes a la carbenicilina y al cloranfenicol; prácticamente todas (93%) lo fueron también a la tetraciclina y una gran proporción lo fue a la cefalosporina (64%) y a la gentamicina (36%).

La demostración de clostridios histotóxicos en algunos venenos de nuestras serpientes va en abono de la conveniencia de que el clínico solicite prontamente antibiograma de anaerobios y de que, en todo caso, administre antibióticoterapia efectiva — amén del suero antiofídico apropiado.

De igual manera parece recomendable que los venenos que se destinen a la inmunización de caballos para producir sueros antiofídicos sean esterilizados en forma apropiada con el propósito de reducir la posibilidad de complicación en el sitio en que se inyectan al equino.

AGRADECIMIENTO

Deseamos dejar constancia de nuestro sincero aprecio a la colaboración valiosa y desinteresada que nos brindaron el doctor Róger Bolaños, Director del Instituto Clodomiro Picado, y el doctor W. E. C. Moore, del Laboratorio de Anaerobios, Virginia Polytechnic Institute and State University.

R E S U M E N

Venenos cristalizados procedentes de 4 especies de *Bothrops* fueron estudiados en cuanto a la presencia de clostridios. Se aislaron y caracterizaron 14 cepas, las que quedaron distribuidas en las siguientes especies: *Clostridium bifermentans*, *C. cadaveris*, *C. glycolicum*, *C. bastiforme*, *C. putrificum* y *C. sporogenes*; a una cepa no fue posible ubicarla en especie conocida.

Cinco de las cepas mostraron gran histotoxicidad. Dos de las especies aisladas son conocidas como agentes de celulitis anaerobia y uno lo es de grangena gaseosa.

La totalidad de las cepas fue sensible a la ampicilina, la penicilina G y la clindamicina; un 93% de ellas lo fue también a la eritromicina. Todas las cepas fueron resistentes a la carbenicilina y al cloranfenicol y casi todas también a la tetraciclina.

Dada la semejanza clínica que hay entre los cuadros de necrosis debidos a los venenos en sí y aquellos causados por clostridios histotóxicos, la presencia de estos últimos en algunos venenos de culebra sugiere la conveniencia de administrar antibióticos efectivos hacia organismos anaerobios a la par del tratamiento con el suero antiofídico del caso.

SUMMARY

Crystallized snake venoms obtained from four *Bothrops* species were studied in search of clostridia. Fourteen strains were isolated, characterized, and assigned to the following species: *Clostridium bifermentans*, *C. cadaveris*, *C. glycolicum*, *C. hastiforme*, *C. putrificum*, and *C. sporogenes*; one strain could not be identified with any known species.

Five of the strains showed a considerable degree of histotoxicity. Two of the species are recognized agents of anaerobic cellulitis and one, of gas gangrene.

All of the strains were sensitive to ampicillin, penicillin G, and clindamycin (Dalacin C); thirteen (93%) were sensitive to erythromycin as well. All of the strains were resistant to carbenicillin and to chloramphenicol, and most of them to tetracycline also.

Given the clinical similarity existing between cases of necrosis attributable only to the venom and those due to histotoxic clostridia, the fact that the latter have been found in some snake venoms would make it advisable to administer effective antibiotic treatment along with the proper antivenin.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BOLAÑOS, RÓGER.
Comunicación personal. Instituto Clodomiro Picado.
- 2.—BORNSTEIN, D. L. Y OTROS.
Anaerobic Infections: Review of Current Experience.
Medicine: 43:207-232. 1964.
- 3.—FISCHER, F. J. Y OTROS.
Antivenin and Antitoxin in the Treatment of Experimental Rattlesnake Venom Intoxication. *Amer. J. Trop. Med.* 10:75179. 1961.
- 4.—HOLDEMAN, L. V. Y W. E. C. MOORE, EDITORES.
Anaerobe Laboratory Manual. The Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University. Southern Printing Co., Blacksburg, Va. 1972.
- 5.—JACKSON, D.
"Management of Snake Bite", en T. Bercovitz "Clinical Tropical Medicine", Harper & Row, New York, 1944, citado por Ledbetter y Kutscher, *op. cit.*
- 6.—LEDBETTER, E. O. Y A. E. KUTSCHER.
The Aerobic and Anaerobic Flora of Rattlesnake Fangs and Venom. *Arch. Environ. Health* 19:770-778. 1969.
- 7.—MACLENNAN, J. D.
The Histotoxic Clostridial Infections of Man. *Bact. Rev.* 26:177-276. 1962.
- 8.—PARRISH, H. M., A. W. MACLAURIN Y R. L. TUTTLE.
North American Pit Vipers: Bacterial Flora of the Mouths and Venom Glands. *Virginia Med. Monthly* 83:383-385. 1956.
- 9.—WILLIAMS, F. E., M. FREEMAN Y E. KENNEDY.
The Bacterial Flora of the Mouths of Australian Venomous Snakes in Captivity. *Med. J. Aust.* 21:190-193. 1934.

CUADRO N° 1
 TOXICIDAD DE CLOSTRIDIOS AISLADOS DE VENENOS
 DE SERPIENTES COSTARRICENSES

SERPIENTE	CLOSTRIDIO	TOXICIDAD
Bothrops atrox (Terciopelo)	C. cadaveris	Alta
	C. glycolicum	Alta
Bothrops atrox (Terciopelo)	C. putrificum	Moderada
Bothrops lateralis (Lora)	C. bifermentans	Moderada
Bothrops nummifer (Mano de Piedra)	C. bifermentans	Moderada
	C. bifermentans	Moderada
Bothrops nummifer (Mano de Piedra)	C. bifermentans	Moderada
	C. hastiforme	Moderada
Bothrops nummifer (Mano de Piedra)	C. bifermentans	Alta
	C. sporogenes	Alta
Bothrops nummifer (Mano de Piedra)	C. bifermentans	*
	Clostridium sp.	*
Bothrops ophryomegas (Toboba Gata)	C. bifermentans	Alta
	C. bifermentans	Moderada

* No se determinó su toxicidad.

CUADRO N: 2
 ANTIBIOGRAMA DE LOS CLOSTRIDIOS AISLADOS
 DE VENENOS DE CULEBRA

MICRO-ORGANISMO	ANTIBIOTICO								
	Ampicilina	Carbenicilina	Cefalosporina	Clindamicina	Clorenfinicol	Eritromicina	Gentamicina	Penicilina G	Tetraciclina
C. bifermentans	S	R	S	S	R	S	S	S	R
C. bifermentans	S	R	R	S	R	S	S	S	R
C. bifermentans	S	R	S	S	R	S	S	S	R
C. bifermentans	S	R	R	S	R	S	R	S	R
C. bifermentans	S	R	R	S	R	S	R	S	R
C. bifermentans	S	R	S	S	R	S	R	S	R
C. bifermentans	S	R	R	S	R	S	S	S	R
C. bifermentans	S	R	R	S	R	S	S	S	R
C. cadaveris	S	R	R	S	R	S	S	S	R
	S	R	R	S	R	S	S	S	R
C. hastiforme	S	R	S	S	R	S	R	S	R
C. putrificum	S	R	S	S	R	S	R	S	R
C. sporogenes	S	R	R	S	R	S	S	S	R
C. sp.	S	R	R	S	R	R	S	S	R

R = resistente

S = sensible