

COMUNICACIÓN PRELIMINAR

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DEL VENENO DE SERPIENTE BOTHROPS (OPHIDIA: VIPERIDAE: CROTALINAE)

Eleatrice Gatti A.¹, Néstor Stanchi G.^{1,4}, Daniel Arias R.¹, Carlos Grisolia C.², P. Martino G.^{1,3}

STUDY OF THE ANTIBIOTIC ACTIVITY OF THE SNAKE VENOMS: BOTHROPS (OPHIDIA: VIPERIDAE: CROTALINAE)

Snake venoms were collected by milking animals (B. alternatus, B. neuwiedi, B. ammodytoides, B. jararaca and B. jararacussu) on petri dish. 37 bacterial strains were obtained from clinical human isolations;

4 Acinetobacter sp. 6 Klebsiella pneumoniae, 1 Morganella morganii, 3 Pseudomonas aeruginosa, 4 Proteus mirabilis, 1 Shigella flechnerii, 5 Escherichia coli, 6 Enterococcus faecalis, 1 Enterococcus sp., 3 Staphylococcus aureus y 3 S. epidermidis. The sensibility test to the antibiotics were conducted according to the Bauer and Kirby method by commercial disks with antibiotics following conventional methodology (NCCLS). B. alternatus and B. jararacussu were found among the less active venoms with antibiotic activity while B. neuwiedi, B. ammodytoides and B. jararaca showed different activity as compared to different microorganism strains. The analysis of the data obtained allow us to assert that all the species of Bothrops of Argentina show antibiotic activity against different kinds of microorganisms.

Palabras claves: Serpiente, Bothropos, antibióticos.

Key Words: Snake, Bothrops, antibiotic activity.

INTRODUCCIÓN

En antibioticoterapia surgen constantemente nuevas drogas que, muchas veces, son derivados o modificaciones de antibióticos pre-existentes (Davis y col., 1993). Sin embargo, desde el inicio de los estudios de los antibióticos el descubrimiento de los mismos surge a partir de sustancias naturales. La investigación de venenos animales con capacidad inhibitoria del crecimiento de microorganismos no es nueva. Croce y Barrero hallaron esta capacidad en veneno de sapos (Croce y Barrero, 1992) y Wade lo encuentra a partir de veneno (melitina) de abejas (Wade, 1992).

El objetivo del presente trabajo es investigar la presencia de capacidad antibiótica en venenos de

distintas especies de serpientes del Género Bothrops que habitan la Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de veneno

La producción de veneno de las especies serpientes del género Bothrops (*B. alternatus*, *B. neuwiedi*, *B. ammodytoides*, *B. jararaca* y *B. jararacussu*) fue realizada en el Laboratorio y Museo de Animales Venenosos (LYMAV) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata. Se extrajo veneno de una especie por vez a efectos de evitar posibles contaminaciones cruzadas. Asimismo, se prestó especial atención en recabar información acerca del origen geográfico de los animales (todos los animales fueron capturados en Argentina), tiempo de permanencia en el serpentario, edad aproximada, peso, estado nutricional y salud. Se anotó además el período previo de ayuno (no menos de 1 mes) y tiempo transcurrido desde la última extracción (no menor de

¹Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias.

²Laboratorio y Museo de Animales Venenosos. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata.

³Comisión de Investigaciones Científicas.

⁴Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de La Plata, CC 296 (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina.

3 meses) (Grisolía y col., 1986). Todos los animales fueron mantenidos en cajas individuales a temperatura constante durante todo el año (20-24°C).

Los venenos se recolectaron haciendo morder placas de petri y por compresión manual suave de las glándulas de veneno. Una vez terminada la extracción se procedió a la desecación del mismo en una campana de vacío con pentóxido de fósforo, por medio de alto vacío y dejando 24 horas hasta la pérdida total de agua (Grisolía y col., 1986).

El veneno fue posteriormente fraccionado en frascos conteniendo 50-100 mg de veneno en cada uno, identificados con especie, fecha, y número de protocolo de extracción. Se almacenaron en heladera a 4°C hasta su uso (Grisolía y col., 1986).

Cepas

Se estudiaron 37 cepas bacterianas todas procedentes de aislamientos clínicos a partir de humanos provenientes del Hospital Municipal de Florencio Varela, comprendiendo: 4 *Acinetobacter* sp., 6 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Morganella morganii*, 3 *Pseudomonas aeruginosa*, 4 *Proteus mirabilis*, 1 *Shigella flechnerii*, 5 *Escherichia coli*, 6 *Enterococcus faecalis*, 1 *Enterococcus* sp., 3 *Staphylococcus aureus*, y 3 *S. epidermidis*.

Prueba de Sensibilidad a los Antibióticos

Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos fueron realizadas según el método de Bauer y Kirby (Bauer, y col., 1966) en el cual se emplearon discos comerciales embebidos con antibióticos (Britania SRL), según metodología convencional (NCCLS, 1988). Se ensayaron los siguientes antibióticos: Beta lactámicos: (Penicilina (PEN), Ampicilina (AMN), Piperacilina (PIP); Inhibidores de la Beta lactamasa: Aminopenicilina+Sulbactama (AMS), Tazobactama (TAZ); Quinolonas: Ciprofloxacina (CIP), Norfloxacina (NOR), Fleroxacina (FLE); Aminoglucósidos: Gentamicina (GEN), Amicacina (AKN), Clindamicina (CLI); Cefalosporinas: Cefalotina (CEF), Cefotaxime (CTX), Ceftazidima (CAZ); Carbapenems: Imipenem (IMP); Glicopéptidos: Vancomina (VAN); Nitrofurano: Nitrofurantoína (NIT); y Trimetropima + sulfametoxazol (TMS).

Prueba de Sensibilidad a Venenos

Se prepararon soluciones de venenos de serpientes de las especies *B. alternatus*, *B. neuwiedi*, *B. ammodytoides*, *B. jararaca* y *B. jararacussu* en agua destilada al 1% (p/v). Se preparó una suspensión de microorganismos en agua peptonada homologando al tubo 0.5 de Mac Farland. Las placas de petri fueron

sembradas con las cepas. Se embebieron discos de papel Watman N° 1 estériles con cada uno de los venenos mencionados colocándolos sobre placas petri sembradas. La lectura se realizó a las 18 horas midiéndose los halos de inhibición bacteriana en mm.

RESULTADOS

En la Tabla 1 pueden apreciarse los resultados obtenidos con las distintas cepas aisladas y la respectiva sensibilidad de las mismas a los antibióticos. En el Gráfico 1 se puede visualizar el promedio de la sensibilidad de las distintas cepas bacterianas a los venenos de serpiente del Género *Bothrops*. Se desprende de lo observado que *B. alternatus*, *B. ammodytoides* y *B. jararacussu* se encontraron entre los venenos menos activos con actividad antibiótica mientras que el resto mostró una actividad dispar frente a distintas cepas de microorganismos.

El análisis estadístico de correlación de los resultados obtenidos comparando la actividad inhibitoria de los venenos de serpientes con respecto a los distintos antibióticos evaluados mostró una falta de correlación con la mayor parte de los antibacterianos utilizados. Sólo se halló una correlación positiva baja en el caso de los microorganismos Gram positivos como *Staphylococcus* y *Streptococcus* con Trimetropina + sulfametoxazol (+0,61) y Aminopenicilina + Sulbactama (+0,63); mientras que entre los microorganismos Gram negativos la correlación positiva fue aún más baja con Imipenem (+0,47), Tazobactama (+0,51) y Piperacilina (+0,54).

DISCUSIÓN

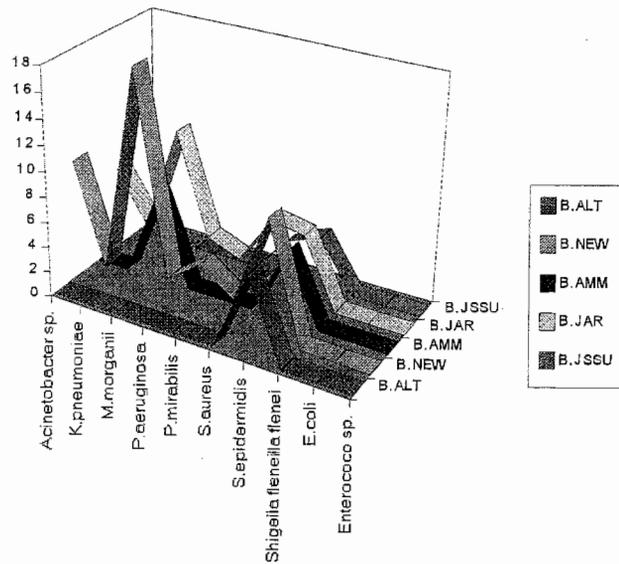
El veneno es una secreción de glándulas de origen común a las salivares, destinado en el animal a matar su presa en forma rápida y efectiva con pequeñas cantidades. Sin embargo, el mismo no es de composición simple (oxidoreductasas, endonucleasas, fosfodiesterasas, 5' nucleotidasa, hialuronidasa, NAD nucleotidasa, proteasas, fosfolipasa, acetilcolinesterasa, y péptidos entre otros componentes) con distinta actividad y potencia, que en forma aislada o conjunta, producen en definitiva la muerte de la presa (Stanchi N. 1998).

La actividad antibiótica de los venenos ha sido pobremente estudiada tanto en las especies de nuestro país, como con especies de otros países. Sin embargo, en los escasos estudios realizados todos muestran algún tipo de actividad en alguno de los componentes de los venenos (Barreiro, 1987; Croce, 1973; Wade, 1992). Ante el continuo desarrollo de resistencia de las bacterias a los fármacos, el desarrollo de nuevas drogas

TABLA I

DIÁMETROS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE DISTINTOS ANTIBIÓTICOS Y DE VENENOS SERPIENTES (BOTHROPS SP.)
(Referencias en el texto)

CEPAS	X	Nº	B.alt.	B.new	B.amm	B.jar	B.Jssu	PEN	CIP	GEN	TMS	CEF	AMS	NOR	AMN	FLE	NIT	CTX	IMP	TAZ	PIP	CAZ	AKN	VAN	CLI
Acinetobacter sp.	3,2	5	0	8	0	8	0	0	6	0	0	0	21	0	0	0	0	0	30	21	16	8	19		
Acinetobacter sp.	3,8	940	0	11	0	8	0	0	18	0	0	0	24	0	0	0	0	22	30	28	18	18			
Acinetobacter sp.	4,2	756	0	10	0	11	0	0	0	10	0	0	16	0	0	0	0	0	28	17	0	0	20		
Acinetobacter sp.	1,8	505	0	9	0	0	0	30	0	0	0	0	13	0	0	0	0	22	20	20	12	12			
K. pneumoniae	0	6411	0	0	0	0	0	0	30	16	24	0	12	0	0	0	18	30	16	0	12	18			
K. pneumoniae	5	6413	0	10	0	15	0	0	30	16	24	0	8	0	0	0	0	0	24	14	0	12	17		
K. pneumoniae	0	420	0	0	0	0	0	0	27	25	0	0	0	23	0	0	23	0	24	0	0	30	22		
K. pneumoniae	0	49	0	0	0	0	0	0	0	22	30	20	0	0	0	20	30	0	0	0	0	0	0		
K. pneumoniae	0	930	0	0	0	0	0	0	30	20	24	22	12	26	0	26	14	0	0	0	0	0	0		
K. pneumoniae	0	929	0	0	0	0	0	26	30	22	0	20	20	26	0	24	14	0	0	0	0	0	0		
M. morganii	7,2	500	0	18	7	11	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	22	22	14	12	14			
P. aeruginosa	3,2	777	0	7	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	20	0	22	10		
P. aeruginosa	0	618	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	19	0	0	0		
P. aeruginosa	0	803	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	12	0	8	18	0	10			
P. mirabilis	3,6	339	0	10	0	8	0	10	28	18	26	19	21	30	19	19	12	0	20	20	30	22			
P. mirabilis	0	925	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	12	12	8	8	0	30	19	0	0			
P. mirabilis	0	765	0	0	0	0	0	0	30	19	24	12	20	30	21	30	8	0	0	18	0	0			
P. mirabilis	1,4	949	0	7	0	0	0	0	20	19	26	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Shigella flexnei	0	670	0	0	0	0	0	0	30	24	20	30	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
E. coli	0	492	0	0	0	0	0	0	30	20	26	20	22	30	20	30	20	0	0	0	0	0	0		
E. coli	0	497	0	0	0	0	0	0	22	26	26	22	22	22	22	30	20	30	0	0	0	0	0		
E. coli	0	226	0	0	0	0	0	0	30	21	26	20	22	30	0	30	19	0	0	0	0	0	0		
E. coli	0	217	0	0	0	0	0	0	20	30	30	20	8	30	0	30	19	0	0	0	0	0	0		
E. coli	0	406	0	0	0	0	0	0	30	20	26	20	20	30	20	30	19	0	0	0	0	0	0		
E. faecalis	0	931	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	21		
E. faecalis	0	933	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	0	0	20		
E. faecalis	0	953	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0	18		
E. faecalis	0	901	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	18		
E. faecalis	0	587	0	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	22		
E. faecalis	0	777	0	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	19		
Enterococo sp.	0	460	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	19		
S. aureus	2,6	6736	0	7	0	6	9	18	8	28	0	12	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	24	
S. aureus	2,4	74	0	0	0	12	0	18	0	0	21	24	24	24	0	0	0	0	0	0	0	0	22	20	
S. aureus	0	799	0	0	0	0	0	0	20	20	21	18	18	18	0	0	0	0	0	0	0	0	17	30	
S. epidermidis	1,8	6515	0	7	0	2	0	19	24	30	30	30	30	30	24	0	0	0	0	0	0	24	30		
S. epidermidis	9	805	13	12	11	9	8	25	26	20	25	26	26	26	20	25	26	0	0	0	0	0	24	30	



es de fundamental importancia. La droga resistencia es un fenómeno mundial que inquieta a científicos que tratan la emergencia de patógenos resistentes (Hospital infection control practices advisory committee, 1995).

El análisis de los datos obtenidos en este estudio permite sostener que todas las especies de *Bothrops* de Argentina muestran actividad antibiótica contra distintos tipos de microorganismos.

El halo de inhibición *in vitro* sólo sugiere que el veneno podría también poseer actividad *in vivo*. Por otro lado, analizando 20 años de accidentes ofídicos con 240 casos de ofidismo producidos en la Provincia de Buenos Aires, sólo el 27% fue tratado con antibióticos, generalmente como medida preventiva, no habiéndose producido infecciones a partir de la herida producida por el ofidio al morder (Grisolía y col., 1996). Sin embargo, Jorge y col., (1990) relacionan la posible presencia de infección en los pacientes "picados" por víboras con las bacterias aisladas de la boca de los ofidios, siendo las bacterias halladas similares a aquéllas observadas en los abscesos producidos a partir de mordeduras de serpientes del Género *Bothrops*. Por otro lado, si se analizan los informes producidos por diferentes investigadores sobre los microorganismos aislados de la boca de ofidios, éstos representan a numerosos géneros y especies bacterianas (*Streptococcus* grupo D, *Enterobacter* sp., *Providencia rettgeri*, *Providencia* sp., *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Clostridium* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Proteus* sp., *Aeromonas hydrophyla* y *A. salmonicida*,

Staphylococcus coagulasa negativo, *Corynebacterium* sp., *Streptococcus* sp., *Vibrio* sp., *Enterobacter* sp., y *Achromobacter* sp., entre otras) (Mauridis S., y col., 1993; García Lima E. y col., 1987; Ledbetter E. y col., 1969; Jorge M. y col., 1990). Pensamos que muchas de las infecciones producidas por mordeduras de serpientes se deben no a contaminación de la herida por el veneno o las bacterias presentes en la boca, sino a los métodos que pueden utilizarse para extraer el veneno del paciente (Grisolía y col., 1996).

Cabe destacar la importancia que puede presentar el encontrar actividad antibiótica para las especies de *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, y *S. aureus* ya que estos microorganismos suelen generar fácilmente resistencia a distintos antibióticos.

La capacidad de inhibición para las distintas cepas de microorganismos podría deberse tanto a la presencia de un solo tipo de componente; en cantidad variable en cada especie; de varios componentes con acción sinérgica compartidos por todos los venenos, también en cantidad variable en todos ellos; o por último de distintos componentes en cada veneno. Esto último quizá sea menos probable, mientras que el mecanismo de inhibición de crecimiento bacteriano parece ser aún más oscuro al no encontrarse una correlación con prácticamente ningún tipo de antibiótico utilizado en este ensayo.

Son necesarios futuros estudios que permitan dar respuesta a las interrogantes planteadas sobre cuál o cuáles componentes son realmente activos contra los microorganismos *in vitro*, y así poder continuar los estudios hacia un potencial nuevo agente terapéutico.

RESUMEN

La investigación de venenos animales con capacidad inhibitoria del crecimiento de microorganismos es un fenómeno estudiado por algunos autores. El objetivo del presente trabajo es investigar la presencia de capacidad antibiótica en venenos de distintas especies de serpientes del Género *Bothrops* que habitan la Argentina. Los venenos se recolectaron haciendo morder a los ofidios (*B. alternatus*, *B. neuwiedi*, *B. ammodytoides*, *B. jararaca* y *B. jararacussu*) placas de petri. Se obtuvieron 37 cepas bacterianas todas procedentes de aislamientos clínicos a partir de humanos, comprendiendo: 4 *Acinetobacter* sp., 6 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Morganella morganii*, 3 *Pseudomonas aeruginosa*, 4 *Proteus mirabilis*, 1 *Shigella flechnerii*, 5 *Escherichia coli*, 6 *Enterococcus faecalis*, 1 *Enterococcus* sp., 3 *Staphylococcus aureus*, y 3 *S. epidermidis*. Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos fueron realizadas según el método de Bauer y Kirby en el cual se emplearon discos comerciales embebidos con antibióticos según metodología convencional (NCCLS). Se desprende de lo observado que *B. alternatus* y *B. ammjararacussu* se encontraron entre los venenos con menor actividad antibiótica mientras que *B. neuwiedi* y *B. jararaca* mostraron una actividad dispar frente a distintas cepas de microorganismos. El análisis de los datos obtenidos en este estudio permite sugerir que los venenos de las especies de *Bothrops* de Argentina muestran algún grado de actividad antibiótica contra distintos tipos de microorganismos.

REFERENCIAS

BARREIRO C. A low molecular weight protein with antimicrobial activity in the cutaneous venom of the yellow-bellied toad (*Bombina variegata pachypus*) *Toxicom* 25, 8: 899-909, 1987.

BAUER A., KIRBY W., SHERRIS J., TURK M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493, 1966.

CROCE G., BARREIRO C. Antimicrobial activity in the skin secretions of *Bombina variegata pachypus*, *Toxicom*, 11, 99, 1973.

DAVIS B., DULBECCO R., EISEN H., GINSBERG H., WOOD W., MCCARTY M. Tratado de Microbiología 2ª edición en Español, Salvat Editores, 1993.

GARCÍA LIMA E., LAURE C.J. A study of bacterial contaminants of rattlesnake venom. *Rev. Soc. Bras. Med. trop.* 20: 19-21, 1987.

GRISOLÍA C., PELUSO F., STANCHI N. Informe sobre la actividad del Laboratorio y Museo de Animales Venenosos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 6: 7/8: 517-519, 1986.

GRISOLÍA C., STANCHI N., PELUSO F. Relación entre el período de ayuno y la cantidad de veneno extraído de ofidios en cautiverio. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 6, 7/8: 513-516, 1986.

GRISOLÍA C., STANCHI N.O., FRANCINI F., CASTRO E.S. Actividad de los Centros Antiponzoñosos. Primeros 20 años: 1975-1995. Ministerio de Salud. Provincia de Buenos Aires. 66 páginas. 1996.

HOSPITAL INFECTION CONTROL PRACTICES ADVISORY COMMITTEE. Recommendations for Preventing the Spread of Vancomycin Resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 1; 2: 66-67, 1995.

JORGE M.T., MEMDOCA J., RIBEIRO L., SILVA M., KUSANO E., SANTOS C. Flora bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 32: 6-10, 1990.

LEDBETTER E., KUTSCHER A. The aerobic flora of rattlesnake fauces and venom. *Arch. Environ. Health* 19: 770-778, 1969.

MAURIDIS S.C., HIPÓLITO M., BALDASSI L., CALIL E., MOULIN A., BARBOSA M. Inquérito bacteriológico de serpentes e mortas mantenidas em cautiverio. *Mem. Inst. Butantan.* 55, sup. 1: 55-62, 1993.

MAURIDIS S.C., HIPÓLITO M., BALDASSI L., CALIL E., MOULIN A., BARBOSA M. Estudo da microbiota aeróbica de serpentes *Bothrops* sp. (Serpente, Viperidae), Recém-capturadas. *Mem. Inst. Butantan* 55, 2: 59-64, 1993.

NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1988.

STANCHI N. Optimización de la Calidad de Antígenos. Venenos de *Bothrops* y purificación de inmunoglobulinas de origen equino. Tesis de Bacteriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 1998.

WADE D. Antibacterial peptides designed as analogs or hybrids of cecropins and melittin. *Int. J. Peptide Protein Res.* 40: 429-436, 1992.