

DETECCIÓN DE *Vibrio cholerae* no toxigenico EN AVES MIGRATORIAS Y RESIDENTES (CHARADRIIFORMES) EN UNA LAGUNA COSTERA DEL NORORIENTE DE VENEZUELA

DETECTION OF *Vibrio cholerae* no toxigenico IN MIGRATORY AND RESIDENT BIRDS (CHARADRIIFORMES) IN A COASTAL LAGOON FROM NORTHEASTERN VENEZUELA

JESSICA RODRÍGUEZ¹, PEDRO LÓPEZ², JORGE MUÑOZ³, NILYAN RODRÍGUEZ¹

¹Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela. ²Centro Regional de Investigaciones Ambientales, Universidad de Oriente, Núcleo Nueva Esparta, Venezuela. ³Centro de Investigaciones Ecológicas Guayaacán, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Venezuela.
E-mail: jnrmar@gmail.com

RESUMEN

La detección de microorganismos con potencial zoonótico entre animales silvestres tiene un significado importante en la salud pública. Las aves se capturaron en el complejo lagunar Bocaripo Chacopata, estado Sucre, usando redes de niebla. Para el cultivo se procedió a realizar un preenriquecimiento de la muestra con 5 ml de caldo peptona (pH=8), incubándose de 18 a 24 horas a 37°C. El aislamiento se efectuó transfiriendo el caldo peptona a placas con agar TCBS. Para la identificación preliminar se tomaron colonias puras y se les realizó la tinción de Gram, test de String, prueba de oxidasa, siembra en agar TSI, agar LIA, IMVIC, rojo de metilo(RM)/Voges Proskauer (VP), RM/VP con NaCl, urea, malonato, motilidad, hidrólisis de gelatina con y sin NaCl, caldo nutritivo a distintas concentraciones de NaCl, producción de ácido y gas a partir de glucosa, producción de ácido a partir de distintos azúcares y descarboxilación de aminoácidos. La identificación definitiva se realizó en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Higiene (Caracas, Venezuela), usando antiseros Venka-Seiken (poli "O", poli "O 139", (Inaba y Ogawa), según la metodología descrita por esta casa comercial. Las pruebas de toxigenicidad se realizaron mediante la técnica de PCR. Se analizaron 40 muestras de heces provenientes de 5 especies de aves del orden Charadriiformes, 4 migratorias y 1 residente: *Tringa melanoleuca* (n = 6), *Tringa fl avipes* (n = 6), *Actitis macularia* (n = 6), *Calidris pusilla* (n = 6) y *Charadrius wilsonia* (n = 16). Se detectó *Vibrio cholerae* en 2 especies de aves: *C. wilsonia* (residente) y *T. melanoleuca* (migratoria), lo cual representa el 40% del total de aves estudiadas y el 6% (n = 10) de las muestras. Todas las muestras de *C. wilsonia* resultaron positivas para *V. cholerae* autoaglutinable no toxigénico, mientras que el 100% de las muestras procedentes de *T. melanoleuca* se identificaron como *Vibrio cholerae* 01 Inaba El Tor no toxigénico. Se demuestra que *Vibrio cholerae* puede infectar a este grupo de aves, las cuales pueden servir como agentes de dispersión interhemisférica de este patógeno entérico humano.

PALABRAS CLAVE: Charadriiformes, *Vibrio cholerae*, aves, Venezuela.

ABSTRACT

Detection of microorganisms with zoonotic potential among wild animals has an important meaning in the public health. The birds were captured in the complex lagunar Bocaripo Chacopata, state Sucre, using nets of fog. For the cultivation you proceeded to carry out a preenrichment of the sample with 5 ml of broth peptona (pH=8), being incubated from 18 to 24 hours at 37°C. The isolation is made transferring the broth peptona to badges with agar. For the preliminary identification they took pure colonies and they were carried out the tint of Gram, test of String, oxidasa test, siembra in agar TSI, agar LIA, IMVIC, red of metilo(RM)/Voges Proskauer (VP), RM/VP with NaCl, urea, malonato, motilidad, hidrólisis of jello with and without NaCl, nutritive broth to different concentrations of NaCl, acid production and gas starting from glucose, acid production starting from different sugars and descarboxilación of amino acids. La definitive identification was carried out in the Laboratory of Bacteriology of the National Institute of Hygiene (Caracas, Venezuela), using antiseros Venka-Seiken (poli OR, poli OR 139", (Inaba and Ogawa), according to the methodology described by this commercial house. The toxigenicity tests were carried out by means of the technique of PCR. Forty fecal samples were collected from 5 species of birds of the order Charadriiformes, 4 migratory species and one resident species: *Tringa melanoleuca* (n = 6), *Tringa flavipes* (n = 6), *Actitis macularia* (n = 6), *Calidris pusilla* (n=6), and *Charadrius wilsonia* (n = 16). *Vibrio cholera* was detected in 2 species of birds: *Charadrius wilsonia* (resident) and *Tringa melanoleuca* (migratory), which represents 40% of the total birds studied and the 6% (n = 10) of the evaluated samples. All samples from *C. wilsonia* were positive to *V. cholerae* self-aglutination non-toxigenic, whereas 100% of samples from *T. melanoleuca* were identified as *Vibrio cholerae* 01 Inaba El Tor non-toxigenic. It is verified that *V. cholerae* can infect this group of birds, which can serve as interhemispheric dispersing agents of this human enteric pathogen.

KEY WORDS: Charadriiformes, *Vibrio cholerae*, Venezuela, birdse.

INTRODUCCIÓN

Conocer la existencia de microorganismos con potencial zoonótico entre animales silvestres es importante en la salud pública (Thomas *et al.* 2002). Existen factores que apoyan la hipótesis que las aves migratorias pueden ser las responsables de introducir y de difundir microorganismos patógenos entre diferentes continentes. Ellas son consideradas hospederos introductorios pues presumiblemente transportan el microorganismo hasta nuevos vectores y hospederos a lugares separados por miles de kilómetros de distancia (Rappole y Hubálek (2003). Una variedad de bacterias patógenas pueden ser transportadas asintóticamente por animales, incluyendo aves silvestres. Entre ellas se encuentran: *Salmonella* sp., *Helicobacter* sp. (Waldeström *et al.* 2003), *Mycobacterium* sp. (Bono *et al.* 2005), *Yersinia* sp. (Niskanen *et al.* 2003), *Listeria* (Quessy y Messier, 1992), *Mycoplasma* (Hartup *et al.* 2001), *Escherichia coli* (Holland *et al.* 1996), *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp. (Brittingham *et al.* 1988).

Existe evidencia que las zoonosis causadas por bacilos Gram negativos están distribuidas alrededor del mundo y han sido aislados de una gran variedad de orígenes ecológicos; ellos se encuentran frecuentemente en heces de la fauna silvestre y afecta a un gran número de animales, incluyendo aves silvestres y cautivas (Brittingham *et al.* 1986). Entre las aves de vida libre afectadas se encuentran: psitacinos (Orosz *et al.* 1992), gallináceas (Dodson *et al.* 1999), aves acuáticas (Palmgren *et al.* 1997) y rapaces (Battisti *et al.* 1998).

Las aves silvestres han sido implicadas como reservorios naturales del grupo de los vertebrados de varios patógenos entéricos de humanos incluyendo *Campylobacter* sp. (Altekruse *et al.* 1999), *Escherichia coli* (Waldenström *et al.* 2002) y *Salmonella* sp. (Palmgren *et al.* 2004). Ellas son frecuentemente mencionadas como posibles vectores para la transmisión de estas bacterias hasta los animales domésticos y humanos (Dobbin *et al.* 2005).

Ya que las aves silvestres migran y son susceptibles a infecciones, pueden funcionar como diseminadoras efectivas de enfermedades a través de la contaminación fecal de pastos y superficies de agua, lo cual está bien documentado en la literatura científica, sobre todo en aguas que no tienen fuentes directas o notables de contaminación. Debido a este hecho pueden existir distintos modos de transmisión de estos microorganismos al ser humano: a) contagio por contacto directo con

estas fuentes de agua, b) consumo de productos marinos contaminados y c) a través de aves de corral y de hospederos mamíferos (Buck 1990). En Venezuela y específicamente en el estado Sucre no existe un estudio base para describir la presencia de *Vibrio* sp. en aves. Las lagunas costeras son un rasgo fisiográfico importante de la Península de Araya, Venezuela y son consideradas como uno de los ecosistemas de mayor relevancia por sus funciones ecológicas (criaderos de peces, protección de costas, hábitat de numerosas especies de aves) donde se desarrollan diferentes actividades impulsadas por su productividad pesquera, atractivo escénico y biodiversidad. Debido a los múltiples usos de este entorno y a que una gran variedad de microorganismos son eliminados periódicamente a través de las heces de las aves, para los cuales la salinidad no es un factor limitante para su multiplicación, por lo cual representa un riesgo latente de contaminación para las aguas de este complejo lagunar así como para la fauna acuática que forma parte de este hábitat marino (peces, crustáceos, moluscos) y por ende para la población aledaña a este ecosistema. Por estas razones fue necesario detectar la presencia de *Vibrio cholerae* en heces provenientes de aves del orden Charadriiformes para determinar la presencia de este microorganismo patógeno al ser humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

El área de muestreo se localizó en el complejo lagunar Bocaripo-Chacopata (10° 40' N y 63° 48' W), ubicada al noroeste de la Península de Araya. Los muestreos se realizaron en horas de la madrugada (2:00 am a 6:00 am) con una frecuencia mensual, desde enero hasta abril de 2006, lapso de presencia de las aves en Venezuela. Las aves Charadriiformes se capturaron en las riberas de las lagunas adyacentes al Centro de Investigaciones Ecológicas Guayacán (CIEG), se colocaron redes de niebla de 9 y 12 metros con 32 mm de abertura de malla en los sitios de pernocta de las aves. Las aves se colocaron en una caja oscura, una por una con una, hoja de papel parafinado en el fondo. Luego de que el ejemplar defecó, las muestras se situaron en recolectores de heces, se almacenaron a una temperatura de $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$, se trasladaron hasta el Laboratorio de Microbiología en el Centro Regional de Investigaciones Ambientales (CRIA), en la Universidad de Oriente, estado Nueva Esparta y se procesaron el mismo día de su recolección en un lapso no mayor a siete horas. Se recogieron 40 muestras obtenidas de las siguientes aves: 6 muestras de *Tringa melanoleuca*, 6 de *Tringa flavipes*, 6 de *Actitis macularia*, 6 de *Calidris pusilla* (migratorias) y 16 muestras de *Charadrius wilsonia* (residente).

Análisis bacteriológico

Las muestras fueron sembradas en agar MacConkey (Difco) y preenriquecidas en un tubo que contenía 5 mL de caldo peptonado (pH: 8) e incubadas durante 6 horas a 37°C. El caldo inoculado previamente fue transferido a placas con agar TCBS (Difco) para ser incubadas de 18 a 24 horas a 37 °C. Al obtener las cepas puras, fueron repicadas en placas con agar nutritivo para llevar a cabo la reacción de oxidasa (MacFaddin 1990). Adicionalmente se realizó la coloración de Gram y se sembraron en agar hierro triple azúcar, para efectuar una preclasificación de las cepas.

Familia Vibrionaceae

Para la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Vibrio* se tomó en cuenta el crecimiento de colonias sospechosas en agar TCBS (tiosulfato citrato sales biliares sacarosa), resultados de oxidasa, agar hierro triple azúcar (TSI) y agar hierro lisina (LIA). Los resultados de las combinaciones TSI/LIA obtenidas fueron comparados con los aportados en la clave de identificación para *Vibrios* descrita por López (2004). Posteriormente se llevaron a cabo pruebas bioquímicas, basadas en las técnicas descritas por MacFaddin (1990) y Murray *et al.* (2002): test de String, IMVIC (indol, citrato, rojo de metilo (RM)/Voges Proskauer (VP), RM/VP con NaCl, urea, malonato, motilidad, hidrólisis de gelatina con y sin NaCl, crecimiento en caldo nutritivo al 0%, 1%, 6%, 8%, 10% y 12% de NaCl, producción de ácido y gas a partir de glucosa, fermentación de carbohidratos (arabinosa, dulcitol, lactosa, maltosa, manitol, rafinosa, ramnosa, salicin, sorbitol, sucrosa, inositol y xilosa), descarboxilación de aminoácidos (medio descaboxilasa de Møeller, Difco; lisina-arginina y ornitina; Sigma). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas diferenciales se compararon con los aportados en la clave de identificación para *Vibrios* descrita por Murray *et al.*, 2002. La identificación definitiva se realizó en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Higiene (INH), basado en pruebas serológicas, mediante el empleo de solución salina fisiológica y antisueros Venka-Seiken (Poli "O", Poli "O139", Inaba y Ogawa) según la metodología descrita por esta casa comercial. Las pruebas de toxigenicidad se realizaron mediante la técnica de PCR.

RESULTADOS

En las 40 muestras analizadas se logró aislar un total de 161 cepas; las cuales se diferenciaron de acuerdo

a las características de las colonias, coloración de Gram, pruebas bioquímicas y oxidasa. Un total de 10 cepas resultaron sospechosas de pertenecer a la familia Vibrionaceae (colonias amarillas medianas en agar TCBS, oxidasa positiva y TSI Ac/Ac, gas variable, sin H₂S), lo cual representó una frecuencia del 6%.

En las seis muestras analizadas de *Tringa melanoleuca* se aislaron cinco cepas pertenecientes a la familia Vibrionaceae, específicamente *Vibrio cholerae* 01 Inaba El Tor no toxigénico, lo que representó el 83% (n = 5) de las muestras.

En *Charadrius wilsonia* se analizaron 16 muestras, de las cuales en el 31% (n = 5) se aislaron cepas con características morfológicas, bioquímicas y serológicas acordes con *Vibrio cholerae* autoaglutinable no toxigénico.

DISCUSIÓN

Las cepas de *V. cholerae* son divididas en dos grandes serogrupos, designados como *Vibrio cholerae* 01 y no 01. La infección en humanos atribuida a *V. cholerae* se encuentra asociada con el consumo de alimentos marinos y exposición a aguas contaminadas (salobre o residual) con este microorganismo (Ogg *et al.* 1989). *Vibrio cholerae* no 01 puede causar una enfermedad igual al cólera, así como enfermedades extraintestinales en humanos (bacteremia, infección de oídos, entre otros.). Tanto *Vibrio cholerae* 01 como no 01 han sido aislados de superficies de agua (ríos, lagos, canales de riego) y se han asociado a enfermedades en animales herbívoros (caballos, bisontes y corderos) (Ogg *et al.* 1989).

Buck (1990) recolectó muestras procedentes de aves acuáticas (*Larus delawarensis*, *Larus argentatus*, *Larus marinus*, *Branta canadensis*, *Phalacrocorax auritus*, *Egretta thula*) en Connecticut y Florida. En la localidad de Connecticut recolectaron 64 muestras fecales, de las cuales 41% resultaron positivas para *Vibrio* sp.; mientras que en la localidad de Florida el total de muestras fue de 88, con un 58% positivas para *Vibrio* sp.

V. cholerae 01, biovar Eltor subtipo Ogawa ha sido señalado en dos especies de aves acuáticas: la garza *Ardea herodias* y la gaviota *Larus delawarensis* (Ogg *et al.* 1989).

Ogg *et al.* (1989) detectaron *V. cholerae* en heces de 20 especies de aves acuáticas en Utah y Colorado, con una positividad de 17% (198 de 1131 muestras fecales

colectadas), identificándose ambos serotipos (01 y no 01); se recolectaron muestras fecales de dos miembros del orden Charadriiformes: 15 muestras del playero *Charadrius vociferus* y una muestra de *Actitis macularia*, reportándose un 100% de positividad para *V. cholerae* (serovariedades: 22, 106 y 999) y 100% de negatividad para este microorganismo respectivamente.

Estos resultados concuerdan con nuestro reporte, ya que se señala una prevalencia nula para *V. cholerae* en *A. macularia* y un 31% de las muestras fecales procedentes de *C. wilsonia* resultaron positivas para este microorganismo. En Venezuela, este es el primer reporte tanto de *V. cholerae* 01 Inaba El Tor no toxigénico en *T. melanoleuca* como de *V. cholerae* autoaglutinable no toxigénico en *C. wilsonia*. Los resultados aquí presentados indican que las aves pueden servir como vectores de *V. cholerae*; este organismo fue aislado de heces frescas colectadas de 2 especies de aves (*T. melanoleuca* y *C. wilsonia*), lo que ratifica con la primera especie que las aves migratorias pueden convertirse en vectores de esta bacteria.

La fuente de infección de las aves con *V. cholerae* es desconocida, existiendo varias proposiciones que tratan de explicar el origen del contagio: 1) las aves pueden quedar infectadas en el cuerpo de agua donde se efectuó la investigación, el cual pudiera estar contaminado con *V. cholerae* proveniente de materia fecal de humanos. 2) las aves migratorias pueden transportar este microorganismo hasta nuestras costas de algún lugar donde el foco de *V. cholerae* sea persistente, por ejemplo, ambientes estuarinos y/o 3) que el *V. cholerae* realice cambios antigénicos y pueda convertirse a la serovariedad 01 en los intestinos de las aves; hay reportes de *V. cholerae* no 01 con habilidad para aglutinar en grupo "0" antisuero 1 y cepas 1 cuyos cambios antigénicos afectan su reacción de aglutinación en grupo "0" antisuero 1 (Ogg *et al.* 1989). Cabe señalar que no existen descargas de aguas servidas en el complejo lagunar Chacopata-Bocaripo, sin embargo se pueden observar deposiciones de materia fecal tanto de humanos como de perros en los alrededores de la zona en estudio.

Las distintas especies de aves que visitan este ecosistema tienen hábitos y estrategias alimentarias que varían en diferentes aspectos, unas son de hábitos diurnos y otras nocturnos, además consumen presas distintas (Robert *et al.* 1989). Estas diferencias en la alimentación así como los factores estacionales que influyen en la variedad y cantidad de presas pueden explicar de alguna manera la variación de los resultados obtenidos en esta

investigación.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio han demostrado la presencia *Vibrio cholerae* no toxigénico como parte de la flora intestinal en las especies de aves estudiadas. Es desconocido si estas especies causan alguna patología en este grupo de vertebrados, sin embargo queda establecida la capacidad de estas aves para funcionar como reservorios y vectores interhemisféricos de este microorganismo.

AGRADECIMIENTO

Al Centro Regional de Investigaciones Ambientales de la Universidad de Oriente Núcleo de Nueva Esparta. Al personal del Centro de Investigaciones Ecológicas Guayacán, nos apoyó en las salidas de campo y en la captura de las aves. A las Lcda. Anitza Narváez y al Lcdo. Javier Santiago por su asistencia en la identificación de las cepas. Al Instituto Nacional de Higiene, especialmente a las Lcdas. Damaris y Sandra por su colaboración con las pruebas serológicas y de toxigenicidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTEKRUSE S., STERN N., FIELDS P., SWERDLOW. D. 1999. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 28–35.
- BATTISTI A., DI GUARDO G., AGRIMI U., BOZZANO A. 1998. Embryonic and neonatal mortality from salmonellosis in captive bred raptors. *J. Wildl. Dis.*, 34: 64–72.
- BONO M., JEMMI T., BERNASCONI C., BURKI D., TELENTI A., BODMER T. 1995. Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 371–373.
- BRITTINGHAM M., TEMPLE S. 1986. A survey of avian mortality at winter feeders. *Wild. Soc. Bull.* 14: 445–450.
- BRITTINGHAM M., TEMPLE S., DUNCAN R. 1988. A survey of selected bacteria in wild birds. *J. Wildl. Dis.* 2: 299–307.
- BUCK J. 1990. Isolation of *Candida albicans* and halophilic *Vibrio* spp. from aquatic birds in Connecticut and

- Florida. Appl. Environ. Microbiol. 56: 826-828.
- DOBBIN G., HARIHARAN H., YVES P., HARIHARANA S., HEANEY S., COLESA M., PRICEB L., MUCKLE A. 2005. Bacterial flora of free-living Double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*) chicks on Prince Edward Island, Canada, with reference to enteric bacteria and antibiotic resistance. Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis. 28: 71-82.
- DODSON S., MAURER J., HOLT P., LEE M. 1999. Temporal changes in the population genetics of *Salmonella pullorum*. Avian Dis. 43: 685-695.
- HARTUP B., DHONDT A., SYDENSTRICKER K., HOCHACHKA W., KOLLIAS G. 2001. Host range and dynamics of mycoplasmal conjunctivitis among birds in North America J. Wild. Dis. 37: 72-81.
- HOLLAND R., SCHMIDT A., SRIRANGANATHAN N. 1996. Characterization of *Escherichia coli* isolated from fowls. Vet. Microbiol. 48: 243-255.
- LOPÉZ M. 2004. Manual de aislamiento e identificación de la familia Vibrionaceae. Centro de Referencia Bacteriológica SAHUM. 25 pp.
- NISKANEN T., WALDENSTRÖM J., FREDRIKSSON M. OLSEN B., KORKEALA H. 2003. *virF*-positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in migratory birds in Sweeden. Appl. Environ. Microbiol., 69: 4670-4675.
- OGG J., RYDER R., SMITH H. 1989. Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah. . Appl. Environ. Microbiol. 55: 95-99.
- OROSZ S., CHENGAPPA M., OYSTER R., MORRIS P., TROCK, S., ALTEKRUSE S. 1992. *Salmonella enteritidis* infection in two species of psittaciformes. Avian Dis. 36: 766-769.
- PALMGREN H., SELLIN M., BERGSTROM S., OLSEN B. 1997. Enteropathogenic bacteria in migrating birds arriving in Sweden. Scand. J. Infect. Dis., 29: 565-568.
- PALMGREN H., BROMAN T., WÄLDESTROM J., LINDBERG P., ASPAN A., OLSEN B. 2004. *Salmonella amager*, *Campylobacter jejuni*, and urease-positive thermophilic *Campylobacter* found in free-flying Peregrine Falcons (*Falco peregrinus*) in Sweeden. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 3: 583-587.
- QUESSY S., MESSIER S. 1992. Prevalence of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. in Ring-billed Gulls (*Larus delawarensis*). J. Wildl. Dis. 28: 526-531.
- Rappole J., Hubálek Z. 2003. Migratory birds and West Nile virus. J. Appl. Microbiol. 94: 47S-58S
- ROBERT M., MACNEIL R., LIDUE A. 1989. Conditions and significance of night feeding in shorebirds and other waters birds in a tropical lagoon. Auk. 106: 94-101.
- THOMAS N., BUNIKIS J., BARBOUR A., WOLCOTT M. 2002. Fatal spirochetosis due to a relapsing fever-like *Borrelia* sp. in a Northern Spotted Owl. J. Wild. Dis. 38: 187-193.
- WALDENSTRÖM J., STEPHEN L., ON L., OTTVALL R., HASSELQUIST D., HARRINGTON C., OLSEN B. 2003. Avian reservoirs and zoonotic potential of the emerging human pathogen *Helicobacter canadensis*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7523-7526.