

ESTUDIO PILOTO PARA EL AISLAMIENTO DE *VIBRIO* SPP EN OSTRAS (*CRASSOSTREA RHIZOPHORAE*) CAPTURADAS EN LA CIÉNAGA DE LA VIRGEN, CARTAGENA, COLOMBIA

Lersy López, Ganiveth Manjarrez, Lilibeth Herrera, Ana Montes, Yuranis Olascuaga y Rolando Ortega

Grupo de Investigaciones Biomédicas

Instituto de Investigaciones Alberto Montealegre (IDIBAM)

Universidad de San Buenaventura (Cartagena, Colombia)

E-mail: rjortega@enred.com



Introducción

La costa caribe colombiana es una de las regiones en que la vida de sus habitantes está estrechamente ligada al mar, al turismo y a la explotación de distintos rubros pesqueros. Al Nor – Oriente de Cartagena de Indias se encuentra la Ciénaga de la Virgen, la cual cuenta con un área de 22 Km². La pesca artesanal de Ostras en esta región constituye hoy en día un ingreso económico importante, ocupando el tercer lugar luego de la actividad industrial y agropecuaria (1). Las Ostras, además de

formar parte de la cadena trófica, están siendo utilizadas como recurso alimenticio, indicadores de contaminación y de estrés funcional en ecosistemas costeros (2).

Las Ostras son uno de los organismos marinos más impactados por la contaminación, por su condición de organismos filtradores que bioacumulan a través del bombeo del agua gran cantidad de bacterias patógenas, toxinas marinas y trazas de metales (3). Su flora bacteriana guarda relación con la calidad del medio donde se encuentran, por lo que son considerados vehículos en la transmisión de toxiinfecciones alimentarias (4). Las bacterias del género *Vibrio* son autóctonas de la biota bacteriana de mares y estuarios, constituyendo desde el 0,1 al 60% del total de las bacterias heterotróficas (5). Muchas especies de este género son patógenas al hombre, están involucradas en afecciones de animales y al deterioro de las aguas. La mayoría de las infecciones adquiridas por *Vibrio* son debidas al contacto con este o a la ingesta de alimentos del mar (6,7).

En el caso específico del hombre las infecciones por *Vibrio* ocasionan diarreas, infecciones en la piel e infecciones generalizadas graves, como la sepsis. La patogenicidad relativa de cada especie difiere considerablemente, siendo moderada para el caso de *V. parahaemolyticus*, mientras que para *V. cholerae* y *V. vulnificus* es severa (8). Dada la importancia económica y alimenticia de las ostras, fue pertinente determinar los niveles de contaminación por *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, en ostras de la especie *Crassostrea rhizophorae*, extraídas de la Ciénaga de la Virgen, con el fin de suministrar una información veraz y actualizada a las entidades encargadas de proteger la salud del consumidor sobre el estado de estos productos marinos de consumo masivo.

Materiales y Métodos

Para la realización del presente estudio se recolectaron 67 muestras de Ostras (*Crassostrea rhizophorae*) procedentes de la Ciénaga de la Virgen, en Cartagena de Indias, entre los meses de Febrero y Abril del año 2006.

Cinco estaciones conformaron el área de muestreo: Pantalla metálica (13 muestras), Mangles sector cielo mar (14 muestras), Espolones (13 muestras), Mangles sector aeropuerto (14 muestras) y Mangles sector oriental (13 muestras).

Toma y procesamiento de la muestra. La toma y preparación de las muestras se realizó bajo estrictas condiciones de asepsia, utilizándose los procedimientos y técnicas recomendadas (9). Las muestras fueron depositadas en bolsas de nylon estériles y almacenadas en neveras con hielo, para su transporte inmediato al laboratorio de control de calidad de alimentos de la Universidad de San Buenaventura para su procesamiento. En el laboratorio las pulpas de las Ostras fueron extraídas y depositadas en bolsas de polietileno estéril, pesadas y rotuladas

Análisis Microbiológicos. Previo pre-enriquecimiento en agua peptonada alcalina, las muestras fueron sembradas en agar TCBS (tiosulfato – citrato – sales biliares – sacarosa, Merck) y repicadas en agar nutritivo TSA (agar Trypticase de Soya) para su purificación. La caracterización bioquímica de las distintas cepas aisladas se llevó a cabo mediante las pruebas de OF, oxidasa, Manitol, descarboxilación de la lisina; arginina, ornitina, fermentación de carbohidratos, Indol, prueba de Voges – Proskauer (Vp) y nitratos.

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico de los datos se aplicó la hipótesis Chi cuadrado, la cual permitió correlacionar la frecuencia de aparición de *Vibrios sp* en los cinco puntos de muestreo estudiados. Se consideró un efecto significativo entre las variables de clasificación y su frecuencia de aparición, cuando el estadístico Chi-cuadrado fuera una p menor de 0,05. Es importante aclarar que este artículo obtuvo aprobación ética por parte del Comité Científico del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Montealegre (IDIBAM) de la Universidad de San Buenaventura Seccional Cartagena.

Resultados

En el curso de la investigación se analizaron un total de 67 muestras de Ostras, de las cuales 30 presentaron positividad para *Vibrio* (45%). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de aparición de *Vibrios* ($p= 0,3924$). La Tabla 1 muestra la prevalencia de contaminación de Ostras por las diferentes especies de *Vibrios*, mediante identificación por pruebas bioquímicas.

La especie prevalente fue *V. alginolyticus* (23%), seguido del *V. fluvialis* (20%), *V. carchariae* y *V. mimicus* (13%), *V. parahaemolyticus* (10%), *V. cincinnatiensis*, *V. Vulnificus* con un 7% y *V. campbelli* (7%). Existen diferencias estadísticamente significativas en la aparición de estos *Vibrios* ($p < 0,0001$). La ausencia de *V. cholerae* podría estar relacionado con la falta de serotipos halófilos, siendo de ésta manera inhibido su crecimiento por la alta salinidad de los lugares de captura.

Tabla 1. Prevalencia de contaminación de Ostras por *Vibrio*.

<i>Vibrio sp.</i>	PREVALENCIA (%)
<i>V. alginolyticus</i>	23
<i>V. fluvialis</i>	20
<i>V. mimicus</i>	13
<i>V. carchariae</i>	13
<i>V. Parahaemolyticus</i>	10
<i>V. Vulnificus</i>	7
<i>V. cincinnatiensis</i>	7
<i>V. campbelli</i>	7
<i>V. Cholerae</i>	0
Total	100

La Prevalencia de especies de *Vibrio* en los diferentes puntos de muestreo fue hallada con el objeto de determinar el mayor foco de contaminación por estos microorganismos. En la Tabla 2 se presenta el número de Ostras contaminadas en cada punto de muestreo.

Tabla 2. Número de Ostras contaminadas por punto de muestreo

<i>Vibrios sp.</i>	Pantalla Metálica	Mangles sector cielo mar	Espolones	Mangle sector aeropuerto	Manglesector oriental
<i>V. cincinnatiensis</i>	4 (13,3%)	3 (10%)	2(6,6%)	0	0
<i>V. campbelli</i>	1(3,3%)	1(3,3%)	0	1(3,3%)	1(3,3%)
<i>V. carchariae</i>	0	2 (6,6%)	0	2(6,6%)	0
<i>V. alginolyticus</i>	0	0	2(6,6%)	1(3,3%)	1(3,3%)
<i>V. parahaemolyticus</i>	1 (3,3%)	1(3,3%)	1(3,3%)	0	0
<i>V. vulnificus</i>	0	1(3,3%)	1(3,3%)	0	0
<i>V. mimicus</i>	1(3,3%)	0	0	1(3,3%)	0
<i>V. fluvialis</i>	0	1(3,3%)	0	0	1(3,3%)
Nº de Ostras Contaminadas	7 (23,3%)	9 (30%)	6 (20%)	5 (16,6%)	3(3,3%)

Mangles Sector cielo Mar y Pantalla metálica fueron los puntos con más alto porcentaje de *Vibrios* aislados (30 y 23 %, respectivamente). Sin embargo, los hallazgos en Espolones, Mangle sector Aeropuerto y Mangle sector oriental podrían considerarse significativos, y alertan sobre la presencia de Ostras contaminadas a lo largo de la Ciénaga.

Discusión

Durante mucho tiempo el *V. cholerae* se consideró la única especie de *Vibrio* de interés clínico, especialmente en países en vías de desarrollo (10). La ausencia de *V. cholerae* en este estudio, podría estar asociada con la falta de serotipos halófilos, por lo que su crecimiento sería inhibido por la alta salinidad en los lugares de captura. A pesar de éste resultado, en la última década han emergido otros *Vibrios* productores de enfermedades que, aunque de menor severidad, tienen la capacidad de producir importantes brotes epidémicos, como el *Vibrio parahaemolyticus* (11).

Actualmente *V. parahaemolyticus* ha adquirido un rol protagónico como agente causal de infección gastrointestinal relacionada al consumo de mariscos crudos o insuficientemente cocidos (12, 13, 14), también se ha aislado a partir de infección de heridas y en pacientes con sepsis de curso muy agresivo. Este microorganismo también ha sido reportado como una de las principales causas de pérdidas en las explotaciones piscícolas, por lo que constituye un peligro potencial para la industria pesquera de la región Caribe colombiana, pues son reconocidos como agentes etiológicos de sepsis hemorrágica y ulceraciones en la piel de peces y crustáceos (15).

La presencia de *V. vulnificus* en el presente estudio, puede estar relacionada con los vertidos fecales que llegan a la Ciénaga, los cuales son reservorios de patógenos potencialmente peligrosos. *V. vulnificus* es considerado como la especie halófila más virulenta para el ser humano (16) y es el único asociado a cuadros sépticos, con alta mortalidad. En general aparece en regiones de aguas cálidas, donde este *Vibrio* encuentra óptimas condiciones para su desarrollo (17). El aislamiento de *V. alginolyticus* y *V. fluvialis*, fue relevante para la investigación, pues son

consideradas autóctonas de hábitat marinos debido a que las condiciones físico-químicas del agua como pH, temperatura y oxígeno disuelto están altamente relacionadas con su aparición. (18, 19). *V. alginolyticus* es considerada la especie de *Vibrio* más halotolerante, pues soporta una concentración del 10% de CINA. Su presencia en el área de estudio representa un riesgo potencial para la salud del consumidor, ya que aunque posee escasa virulencia, bajo poder invasivo y generalmente origina enfermedades benignas y autolimitadas (20, 21), puede causar infecciones gastrointestinales y, ocasionalmente, extraintestinales, como infecciones de tejidos blandos, abscesos, bacteriemia, peritonitis, otitis y conjuntivitis (22).

V. fluvialis, otro de las especies altamente prevalente en nuestro estudio, es considerado agente causal de infección óptica, con transmisión por exposición al medio o por contacto con productos derivados de éste (23), lo que resulta de importancia en esta investigación, pues la población de los alrededores de la Ciénaga de la Virgen frecuentan el uso de estas agua no aptas para contacto primario. *V. fluvialis* también ha sido asociado con diarrea aguda en humanos (24). En peces *V. fluvialis* es capaz de producir sepsis hemorrágica generalizada, por lo que puede ser considerado como patógeno muy agresivo (25).

Los resultados obtenidos en este estudio son de importancia para la salud pública, y coinciden con los de otros autores (26,27,28); en cuanto a que muchas especies de *Vibrios* son miembros naturales del ambiente acuático, entre los que se incluyen las Ostras, Camarones marinos y su entorno (agua y sedimento), constituyéndose en un reservorio de bacterias potencialmente patógenas para el humano (como *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*). Por esta razón es necesario hacer énfasis que este estudio evaluó el comportamiento de estos microorganismos durante el año 2006 en la Ciénaga de la Virgen de Cartagena Colombia, y sus resultados permiten alertar a las autoridades competentes sobre el control de calidad que actualmente se lleva a cabo durante la captura procesamiento y comercialización de ostras.

Resumen

En Cartagena de Indias, las ostras son consideradas productos marinos de gran importancia económica y social, por el impacto que representan en el sector turístico y hotelero. Sin embargo, han sido señalados como posibles vectores significativos de toxo - infecciones alimentarias. Determinar la contaminación por *Vibrio* en Ostras (*Crassostrea rhizophorae*) capturadas en la Ciénaga de la Virgen, con el fin de alertar a las entidades encargadas de proteger la salud del consumidor en Cartagena. Entre Febrero y Abril del 2006, fueron analizadas 67 Ostras pertenecientes a los 5 puntos estratégicos a lo largo de la Ciénaga de la Virgen: Pantalla metálica, Mangles sector cielo mar, Espolones, Mangles sector aeropuerto y Mangles sector oriental. El aislamiento e identificación de *Vibrio* se realizó mediante cultivo y pruebas bioquímicas. Las especies de *Vibrios* predominantes fueron *V. alginolyticus* (23%), *V. fluvialis* (20%), *V. parahaemolyticus* (10%), *V. carchariae* y *V. mimicus* (13%), *V. vulnificus*, *cincinnatiensis* y *V. campbelli* (7%). El punto de muestreo con mayor número de *Vibrios* aislados fue Mangles sector cielo mar con un 30% del total de especies encontradas. Estadísticamente no hubo diferencias significativas entre los puntos, debido a su distribución porcentual homogénea. La ausencia de *Vibrio cholerae* en este estudio, podría estar asociada con la falta de serotipos halófilos, por lo que su crecimiento sería inhibido por la alta salinidad en los lugares de captura. Los factores que influyen en la proliferación de otras especies de *Vibrios* en Ostras, pueden estar relacionados con las características de la Ciénaga.

Palabras clave: Ostras, *Vibrio*, Patógenos, Especies, Bacteria, Colombia.

Abstract

Oysters are considered a sea fruit of major economical and social importance in Cartagena de Indias, due to the impact that they have in the hotel and tourism industry. However, oysters have been held responsible as possible significant vectors for food poisoning. To test oysters (*Crassostrea rhizophorae*) captured in the Ciénaga de la Virgen for contamination with *Vibrio*, in order to put the appropriated local consumer health care authorities, under alert. 67 Oysters, belonging to 5 strategic points through the Ciénaga de la Virgen (Pantalla metálica, Mangles cielo mar sector,

Espolones, Mangles airport sector y Mangles oriental sector) were analyzed, between February and April 2006. Culture mediums and Biochemical test was used for *Vibrio*'s isolation and identification. the predominant *Vibrio*'s species were *V. alginolyticus* (23%), *V. fluvialis* (20%), *V. parahaemolyticus* (10%), *V. carchariae* and *V. mimicus* (13%), *V. vulnificus*, *cincimatiensis* and *V. campbelli* (7%). The sampling point with the highest number of *Vibrio* isolation was Mangles, cielo mar sector, which also contributed with 30% of the total of all species isolated although the difference was of no statistical significance due to their homogenous distribution. 100% of the sampling points showed cloudy water due to the presence of organic matter in suspension and visible solid waste, Thus, Factors influencing *Vibrios* proliferation on oysters maybe related with the Ciénaga characteristics.

Keywords: Oysters, *Vibrio*, pathogens, species, bacteria, Colombia

Agradecimientos

Laboratorio de control de calidad de alimentos de la Universidad de San Buenaventura; CENIAQUA.

Fuente de financiación

El presente trabajo pudo realizarse gracias al apoyo recibido de la Universidad de San Buenaventura Cartagena, especialmente del Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Montealegre (IDIBAM).

Referencias

1. Observatorio del Caribe Colombiano 2006. Indicadores Económicos Sociales de la Región Caribe Colombiana. Informe Ejecutivo.
2. Graü C, A La Barbera, A Zerpa, S S ilva y O Gallardo 2004. Aislamiento de *Vibrio* spp. y evaluación de la condición sanitaria de los moluscos bivalvos arca zebra y perna perna procedentes de la costa nororiental del e do. sucre. Venezuela. Veterinaria completa; 13:4.
3. Lee R and O Morgan 2003. Environmental Factors Influencing the Microbiological Contamination of Commercially Harvested Shellfish. Water Scien and Techn; 47(3):65-70.
4. Martínez R y L Villalobos 2005. Escherichia coli entero patógena en moluscos crudos y cocidos. RC; 15:(2)163-167.
5. Bitton G and R Harvey 1992. Transport of pathogens through soils and aquifers In: Environ Microb; Wiley - Lies. New York. 103- 124.
6. Nelly I, C Rivera and P Sánchez 1995. Detection of Cholera (Ctx) Toxin And Zonula Occludens (Zot) Toxin Genes In *Vibrio Cholerae* O1, O139 And Non-O1 Strains. World Journal Microbiology and Biotechnology; 11:5 p. 572-577.
7. Scott, R 1994. Infection diseases associated with molluscan shellfish consumption. Clin Microbiol Rev; 34(4):419-25.
8. Rodríguez, R 2000. Cólera: ¿a las puertas de una crisis mundial? Reporte Técnico de vigilancia. Ministerio de Salud Pública – Cuba; 5:1
9. Ortega V y F Quevedo, 1991. Garantía de calidad de los laboratorios de microbiología alimentaria. De Andrómeda. S.A. México.. P. 152.
10. Morris, J 2003. Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. Clin Infect Dis; 37: 272-80.

11. Tantillo G, M Fontanarosa, A Di Pinto, and M Musti, 2004. Updated perspectives on emerging *vibrios* associated with human infections. Lett Appl Microbiol; 39: 117-26.
12. Martínez-Urtaza J, A Lozano-León, A De Paola, M Ishibashi, K Shimada and M Nishibuchi,. 2004. Characterization of pathogenic *Vibrio* parahaemolyticus isolated from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. J Clin Microbiol 42: 4672-4678.
13. Daniels A, L Mackinnon, R Bishop, S Altekruze, B Ray and R Hammond. 2000. *Vibrio* parahaemolyticus infections in the United States, 1973-1998. J Infect Dis. 181: 1661-1666.
14. Alam M, S Miyoshi and S Shinoda. 2003. Studies on pathogenic *Vibrio* parahaemolyticus during a warm weather season in the Seto Island Sea, Japan. Environ Microbiol. 5: 706-710.
15. Arevalo Z, A Clavijo and D Rolo. 2003. Implementación de un protocolo para la identificación de *Vibrio* parahaemolyticus a través de PCR. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 23: (2)124-126.
16. De Paola A, J Ulaszek, C Kaysner, B Tenge, J Nordstrom and J Wells 2003. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio* parahaemolyticus isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. Appl Environ Microbiol. 69: 3999-4005.
17. Poblete R, H Andresen y C Pérez 2002. *Vibrio* vulnificus: una causa infrecuente de shock séptico. Rev. méd. Chile. 130:(7):787-791
18. Kelly M, F Hickman and J Farmer 1991. Manual of clinical microbiology. 5 ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 384-895.
19. Prazeres D and E Hofer 1986. *Vibrio* species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State. Brazil. Rev Microbiol. 17:332-8.
20. West, P. 1989. The humans pathogenic *vibrios*. A public health update with environmental perspectives. Epidem Infect. 103:1-34.
21. Hoge P, D Watsky, R Peeler, J Lubonati, E Israel and J Morris. 1989. Epidemiology and spectrum of *vibrio* infections in a chesapeake bay community. J Infect Dis.160:985-993.
22. Penland R, M Boniuk and K Wilhelmus. 2000. *Vibrio* ocular infections on the U.S. Gulf Coast. Cornea. 19:26- 29.
23. Cabrera L, S Palma, M Ramírez, G Castro, R Cabrera and L Bravo 2005. Severe otitis due to *Vibrio* fluvialis in a patient with AIDS: first report in the world. Rev Cubana Med Trop. 57: 154-155.
24. Hodge T, S Charles, L Smith and M Smith. 1995. Diarrhea associated with *Vibrio* fluvialis infection in a patient with AIDS. Clin. Infect. Dis 21: 237- 238.
25. Hjeltnes B and J Roberts 1993. Vibriosis in bacterial diseases of fish. New York: Ed. Inglis W, Roberts RJ, Bromage.
26. Tantillo G, *et al*, *Op.cit*.
27. Poblete R. *et al*, *Op.cit*.
28. Pérez E, M Urbieto, I Passer y F Fernández. 1983. *Vibrio* alginolyticus. Estudio comparativo entre cepas de procedencia humana y aislada del medio ambiente. Clin; 1:102-106.