



Universidad del
Rosario



**CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS DEL CHIGÜIRO
COLOMBIANO (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**

Valentina Acevedo Ramírez

Universidad del Rosario

Facultad de Ciencias Naturales

Programa de Biología

Bogotá D.C., Colombia

2024

**CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS DEL CHIGÜIRO
COLOMBIANO (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**

Valentina Acevedo Ramírez

Trabajo de grado para obtener el título de:

Bióloga

Directora:

Marina Muñoz Díaz, Ph.D

Codirector:

Juan David Ramírez González, Ph.D

Universidad del Rosario

Facultad de Ciencias Naturales

Programa de Biología

Bogotá D.C., Colombia 2024

CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS DEL CHIGÜIRO COLOMBIANO (*Hydrochoerus hydrochaeris*)

Valentina Acevedo-Ramírez¹, Jorge Arturo Marín-Sánchez¹, Plutarco Urbano², Juan David Ramírez^{1,3} y Marina Muñoz^{1,4*},

¹ Centro de Investigaciones en Microbiología y Biotecnología–UR (CIMBIUR), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Rosario, Bogotá D.C., Colombia.

² Grupo de Investigaciones Biológicas de la Orinoquia, Universidad Internacional del Trópico Americano (Unitrópico), Yopal, Colombia

³ Molecular Microbiology Laboratory, Department of Pathology, Molecular and Cell-Based Medicine, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY USA

⁴ Molecular Epidemiology Laboratory, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

*Corresponding author: communozd@unal.edu.co; claudia.munoz@urosario.edu.co

RESUMEN

Los chigüiros (*Hydrochoerus hydrochaeris*) son la especie de roedores más grande del mundo, siendo nativos de Sudamérica. Esta especie exhibe una elevada importancia ecológica por sus aportes en la preservación de la biodiversidad y la salud de los ecosistemas donde habitan, además, tiene relevancia a nivel cultural y productivo (como fuente de alimento) en la región de los llanos colombianos. A pesar de esto, se desconoce la composición de las comunidades microbianas que puede transportar. El objetivo de este estudio fue caracterizar la composición de las comunidades bacterianas de chigüiros del Departamento del Casanare. Herramientas de biología molecular, como la PCR, y de secuenciación de nueva generación (NGS) como Oxford Nanopore, fueron integradas para explorar la diversidad bacteriana mediante técnicas de secuenciación profunda del gen 16S-rRNA a partir de 84 muestras pareadas de sangre, hisopados bucales e hisopados anales colectadas en dos municipios del Departamento de Casanare, Colombia (Paz de Ariporo y La Trinidad). Los resultados del estudio indican que la microbiota de los chigüiros posee una predominancia de diferentes géneros como *Lactobacillus* en hisopados bucales, *Xanthomonadales* en hisopados anales y *Bdellovibrionales* en sangre. Además, se observó la presencia de *Bacteroides* en todos los tipos de muestras, los cuales se han descrito en diferentes trabajos por cumplir funciones cruciales en la digestión y el

fortalecimiento del sistema inmunológico en mamíferos. No obstante, la detección de microorganismos patógenos con potencial zoonótico, como *Bacillus*, *Clostridium* y *Enterobacterales*, en todas las muestras y en los dos municipios, también indica que estas comunidades de bacterias representan un riesgo para la salud pública. Este estudio proporciona información acerca de la microbiota de chigüiros por primera vez en Colombia, generando una línea de base acerca del potencial impacto en salud pública. Los resultados destacan la necesidad de implementar medidas preventivas para contener la posible propagación de infecciones, asegurando tanto la salud de las poblaciones humanas como la preservación de los chigüiros.

PALABRAS CLAVE

Chigüiro; Secuenciación de nueva generación; Comunidades bacterianas; Enfermedades Infecciosas; Zoonosis

ABSTRACT

Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), the world's largest rodent species native to South America, play a vital ecological role in preserving biodiversity and ecosystem health. Additionally, they hold cultural significance and serve as a food source in the Colombian plain's region. Despite their importance, little is known about the composition of their microbiota. This study aims to characterize the bacterial communities within Capybaras from the Department of Casanare. Molecular biology tools, including PCR and next-generation sequencing (NGS), were employed to explore bacterial diversity by deep sequencing the 16S-rRNA gene in paired blood, hisopados bucales, and stool samples collected from two municipalities in Casanare, Colombia. Results reveal a diverse microbiota in Capybaras, with distinct genera dominating different samples. Notably, *Lactobacillus* prevails in hisopados bucales, Xanthomonadales in feces, and Bdellovibrionales in blood. Bacteroides, essential for digestion and immune system fortification, was consistently present across all sample types. However, the identification of potentially zoonotic pathogens—*Bacillus*, *Clostridium*, and *Enterobacterales*—in all samples from both municipalities raises concerns for public health. This study marks the first comprehensive analysis of Capybaras microbiota in Colombia, providing crucial insights into their health and implications for public health. The presence of potential pathogens underscores the importance of implementing preventive measures to mitigate infection risks, safeguarding both human populations and the Capybaras' well-being.

KEYWORDS

Capybaras; Bacterial communities; Infectious diseases; New generation sequencing; Zoonosis; Bacterial communities; Zoonosis.

1. INTRODUCCIÓN

Los chigüiros (*Hydrochoerus hydrochaerises*), también conocidos como capibaras, son los roedores más grandes del mundo (Aldana et al., 2007). Esta especie es nativa de Sudamérica y su hábitat principal lo constituyen los ambientes acuáticos, donde obtienen buena parte de su alimento, el cual consiste en una dieta herbívora a base de plantas acuáticas; (Jahan NA., et al. 2021). Estos mamíferos cumplen un rol fundamental en la estructura y diversidad de los ecosistemas (Aldana-Domínguez, J., et al 2013), debido a su comportamiento de pastoreo, fertilización del suelo por dispersión de semillas, resiliencia de los ecosistemas y creación de hábitats que benefician a otras especies (Bueno, C., et al. 2013). Si los chigüiros están saludables se promueve la biodiversidad y se conservan los ecosistemas en los que viven (Arteaga, María y Jorgenson, Jeffrey. 2007).

Estos mamíferos pueden albergar diferentes microorganismos, incluyendo procariotas (bacterias y arqueas), eucariotas (parásitos y hongos) y virus, estos pueden ser clasificados según su relación con el hospedero como comensales, mutualistas o patógenos (Alarcón et al., 2016). Las bacterias son microorganismos unicelulares ampliamente distribuidos en diferentes entornos y son esenciales en los procesos metabólicos de los seres vivos (Bueno, C., et al. 2013). Existen bacterias benéficas en la microbiota de estos mamíferos, cuya abundancia y diversidad están condicionadas por factores, como la ubicación geográfica, el entorno y la dieta (David, L., et al. 2014). Estas comunidades microbianas desempeñan un papel fundamental en la salud y funcionamiento de estos mamíferos ya que tienen un impacto en su fisiología, nutrición y respuesta inmune (Gruninger RJ., et al 2016), por lo que son de gran interés científico.

Las investigaciones sobre microorganismos evolucionaron usando metodologías en hospederos y entornos. Herramientas moleculares, como la PCR, destacan al permitir la amplificación y detección específica de agentes infecciosos. Recientemente, la secuenciación de nueva generación (NGS) ha revolucionado el campo, facilitando la identificación y seguimiento de enfermedades emergentes. El análisis del gen 16S-rRNA ofrece una asignación taxonómica detallada y permite hacer una cuantificación relativa al total de lecturas obtenidas, permitiendo describir la diversidad y abundancia microbiana (Mardis, 2011). Estas metodologías han

permitido realizar estudios epidemiológicos detallados sobre microorganismos en poblaciones específicas, con principal interés en aquellos con potencial patógeno (Morens et al., 2004) y, además, han impulsado la comprensión de la ecología microbiana en diversos hospederos y entornos (Steele & Street, 2005).

Estudios basados en herramientas moleculares y NGS realizados en América Latina han revelado que la diversidad de la microbiota de los chigüiros está dominada por género *Lactobacillus*, que mantienen un equilibrio saludable en la microbiota intestinal de los roedores (Rodríguez Claudia., et al. 2021). El género *Bacteroides*, que ayuda en la descomposición de los carbohidratos y la fermentación de la fibra (Shoemaker, N.B., et al. 2000). Así mismo, el género *Prevotella*, involucrado en la digestión de la celulosa (Andrada Estefanía 2022), y el género *Bifidobacterium*, que mejora la absorción de nutrientes y fortalece el sistema inmunológico (Pérez Indira., et al. 2012) son miembros característicos de las comunidades microbianas. Así mismo, estos mamíferos pueden albergar también otros microorganismos que pueden ser latentemente patógenos, lo cual sumado a la cercanía de sus hábitats a áreas urbanas, con presencia humana y de animales domésticos, los convierte en potenciales portadores de infecciones con potencial zoonótico (Guzmán, Miguel. 2016 y Álvarez, A., & Leguizamón, N. 2006). Entre las distintas bacterias que se han identificado en chigüiros y que tienen potencial de ser patógenas para los humanos, se ha descrito a *Rickettsia rickettsii*, que causa la fiebre manchada (Krawczak et al., 2014), *Brucella spp.* agente etiológico de la brucelosis (Barragán Karol & Álvarez- Oscar. 2014), *Leptospira* que es conocida como la causante de la leptospirosis (Viteri-Avellaneda, 2014), *Salmonella* que puede causar fiebre tifoidea (Gebreyes W y Altier C. 2002) y ciertas cepas de *Escherichia coli* asociadas a diarrea e infecciones en el torrente sanguíneo (Oscar G. 2014). Todos estos microorganismos representan un riesgo para los seres humanos ya que se sabe que estas bacterias pueden transmitirse mediante el contacto directo, con fluidos corporales como la saliva, la sangre y las heces (Bäumler y Fang, 2013), o indirecto, en forma de alimento. Debido a eso, estudiar la composición de las comunidades microbianas resulta fundamental para la investigación científica, el monitoreo de la salud y la conservación de la especie, ya que se pueden detectar vías de transmisión de patógenos (Moreno, P. G., y Kittlein, M. J. 2013).

En Colombia resalta la falta de información relacionada con las bacterias que se encuentran en los chigüiros. Debido a eso, el objetivo principal de este estudio fue describir las comunidades bacterianas en muestras emparejadas de sangre, saliva y heces de *Hydrochoerus hydrochaeris*,

colectadas en los municipios de Paz de Ariporo y Trinidad en el departamento del Casanare en Colombia donde hay una vegetación predominantemente de sabana, una altitud baja, temperaturas cálidas y el chigüiro es considerado como un ícono de la región por ser una especie autóctona. (Cristancho et al., 2017). Esto para contribuir en el conocimiento de los microorganismos de este mamífero, que permita analizar y comprender potenciales riesgos epidemiológicos asociados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio y toma de muestras

La población de estudio correspondió a chigüiros (*Hydrochoerus hydrochaeris*) que se encontraban en un entorno salvaje en los municipios de Paz de Ariporo y La Trinidad ubicados en el departamento de Casanare, Colombia, en la región de los Llanos Orientales (Figura 1). Esta región se caracteriza por su gran riqueza natural y cultural, estos municipios en especial tienen extensos pastizales, ríos y lagunas que albergan una gran diversidad de fauna y flora.

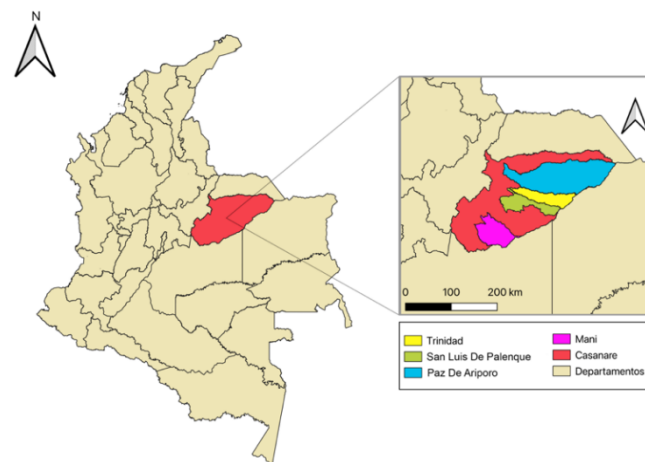


Figura 1. Mapa de Colombia con la ubicación de origen de las muestras.

Para la captura de los chigüiros, se empleó el método de enlazado a caballo, el cual consistió en enlazar al animal del cuello y atar sus cuatro patas, una vez que el animal ha perdido el equilibrio durante la persecución (Salas et al. 2004). Luego de capturados, los animales fueron sedados utilizando Ketamina (tranquilizante), lo que permitió la colecta de las diferentes muestras (sangre, saliva y heces). Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena femoral con jeringas de 5ml, extrayendo 0.5ml de sangre se conservaron a 4°C y sin medio. Las muestras de hisopados bucales fueron obtenidas a nivel del hocico del chigüiro, específicamente de la

mucosa oral, mediante el raspado con un hisopo de las células del interior de la boca del animal. En cuanto a las muestras de hisopados anales, fueron colectadas de la parte externa del ano (Méndez & Barragán, 2005; Salas et al., 2004). Posteriormente estas muestras se colocaron en un tubo eppendorf con RNAlater para su transporte al laboratorio del Centro de Investigaciones en Microbiología y Biotecnología-UR (CIMBIUR). Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Internacional del Trópico Americano y las muestras se colectaron bajo el permiso marco de la ANLA de esta institución, ajustándose a los parámetros del comité de ética de la Universidad del Rosario.

2.2 Extracción de ADN y amplificación del gen ribosomal 16S-rRNA

Para los hisopados bucales se usó el kit Quick Extract DNA Solution (Lucigen[®]), para sangre se usó del kit extracción DNA Isolation Kit for Cells and Tissues (Roche[®]), y para los hisopados anales se empleó el kit Genomic DNA Isolation (Norgene[®]). Todas las extracciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de ADN se evaluaron por medio del espectrofotómetro NanoDrop/2000/2000c (productos Thermo Fisher Scientific).

Se procedió a la detección de las bacterias presentes, la cual se realizó mediante PCR utilizando los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Estos cebadores se utilizaron debido a que conducen a una amplia cobertura del gen 16S-ARNr permitiendo un análisis preciso de las comunidades de bacterias presentes en las muestras (Jovel J, et al. 2016). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 13 μ L que contenía (6,25 μ l de LongAmp Taq Master Mix [New England Biolabs] a concentración final de 1X, solución 1 μ M [1,25 μ l] de cada cebador, 2,25 μ L de agua y 2 μ L de muestra (ADN genómico). El perfil térmico consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 30 seg, 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 47,9°C durante 1 min, 65°C durante 1,15 min y, por último, un ciclo de extensión final de 65°C durante 10 min. Como control positivo se utilizó ADN de un aislamiento de una especie de enterobacteria, mientras que como control negativo de PCR se usó agua.

Por último, los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón 1x TBE y como agente intercálate 1 μ L de SYBR[®] Safe (Invitrogen[®], Carlsbad,

CA, EE. UU.), visualizándose a continuación bajo luz UV para observar una banda de ~1.400 pares de bases (pb).

2.3 Secuenciación de muestras con oxford nanopore technologies (ONT)

Los productos amplificados fueron secuenciados por ONT, se asignó un código de barras por muestra usando ONT Barcode Kit (SQK-NBD196). Posteriormente, la biblioteca se construyó uniendo adaptador utilizando el kit ONT SQK-LSK109. La librería construida fue secuenciada en ONT MinION utilizando celdas de flujo R.9.4 y el software MinKnow V.23.07.15. Esta innovadora técnica proporciona de manera rápida y portátil un análisis genético detallado de las regiones de interés, generando lecturas de longitud larga (Laver T., et al. 2015).

2.4 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático se realizó a partir de los archivos Fast5 realizando un basecalling Super Accuracy base-calling (SUP) ($Q > 10$) (Jain et al., 2016). para obtener los archivos Fastq, a partir de los cuales se calcularon los estadísticos de calidad usando NanoStat v1.5.0 (Callahan et al., 2016). A continuación, se realizó la asignación taxonómica de las lecturas usando la herramienta Kraken2 v2.0.7-beta (Lu et al., 2022). y la base de datos del gen 16S-ARNr SILVA v138. Después, con la interfaz de Pavian en RStudio v4.2.3 (Breitwieser & Salzberg, 2020), se diseñaron las gráficas de abundancia relativa, donde se representaron los géneros presentes en las muestras y así se pudo comprender la composición de la comunidad microbiana e identificar las posibles diferencias entre ellas.

2.5 Análisis Descriptivos y Estadísticos: Diversidad y Abundancia de la comunidad bacteriana

Primero, se realizó una curva de rarefacción y se normalizaron los datos para hacer una gráfica de la abundancia relativa con el top 10 de los géneros presentes con mayor cantidad de reads en las diferentes muestras. En el segundo paso, se llevaron a cabo análisis de diversidad alfa a nivel local, empleando los índices de Shannon y Simpson para estimar la diversidad bacteriana en las muestras. Estos índices son métricas comúnmente utilizadas para cuantificar la riqueza y la equitatividad de las comunidades microbianas. Para los análisis de diversidad beta, se ejecutó un análisis de coordenadas principales utilizando distancias calculadas por Bray-Curtis. Este enfoque permite evaluar las diferencias en la composición microbiana entre las muestras, proporcionando una perspectiva de la variabilidad global en la estructura de la comunidad microbiana. Todos estos análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software R en su

versión 4.3.0, y se utilizaron dos paquetes específicos de R: "phyloseq" y "microbiome". El paquete "phyloseq" facilita la manipulación, análisis y visualización de datos de microbiomas, mientras que el paquete "microbiome" ofrece herramientas específicas para análisis estadísticos relacionados con microbiomas y después los resultados obtenidos se representaron gráficamente con ggplot2.

3. RESULTADOS

La población de estudio fue de 28 chigüiros (*Hydrochoerus hydrochaeris*) 14 que se encontraban en el municipio de La Trinidad y 14 en Paz de Ariporo. La calidad de las muestras fue en promedio del 98,6%, superando el umbral de Q7 (en una escala de 0 a 15, donde 15 representa la mejor calidad), mientras que la cantidad de reads para las muestras de este estudio fue buena en la mayoría de ellas con un promedio de 15,195 oscilando en valores entre 1,000 y 284,747 por muestra. La curva de rarefacción se estabilizó alrededor de 3.500, es decir, que las muestras son representativas de la diversidad total, por lo que se decidió normalizar los datos.

Como primera aproximación al análisis de la composición de las comunidades de bacterias de estos roedores se analizaron las abundancias relativas de los miembros predominantes (Figura 2), el cual reveló la presencia de *Bacillales*, *Bacteroides*, *Burkholderiales*, *Enterobacterales*, *Pasteurellales*, *Pseudomocales*, *Clostridiales*, *Erysipelotrichales* y *Micrococcales*. Muchas de estas especies son catalogadas benéficas, mientras otras han sido objeto de estudio por su potencial como patógenas, lo cual representa un riesgo latente tanto para los chigüiros, como para la salud humana y de otros animales (Reid, F. 2016). La discriminación de los resultados en las muestras de hisopados bucales, sangre e hisopados anales mostró la presencia de géneros específicos para cada una de ellas como: *Lactobacillales* que están presentes en las muestras de hisopados bucales y se sabe hacen parte de la microbiota del chigüiro ya que desempeñan funciones clave en la digestión, los *Xanthomonadales* que son fitopatógenos y se encuentran en las muestras de hisopados anales y los *Bdellovibrionales* que son bacterias depredadoras que se encuentran en las muestras de sangre.

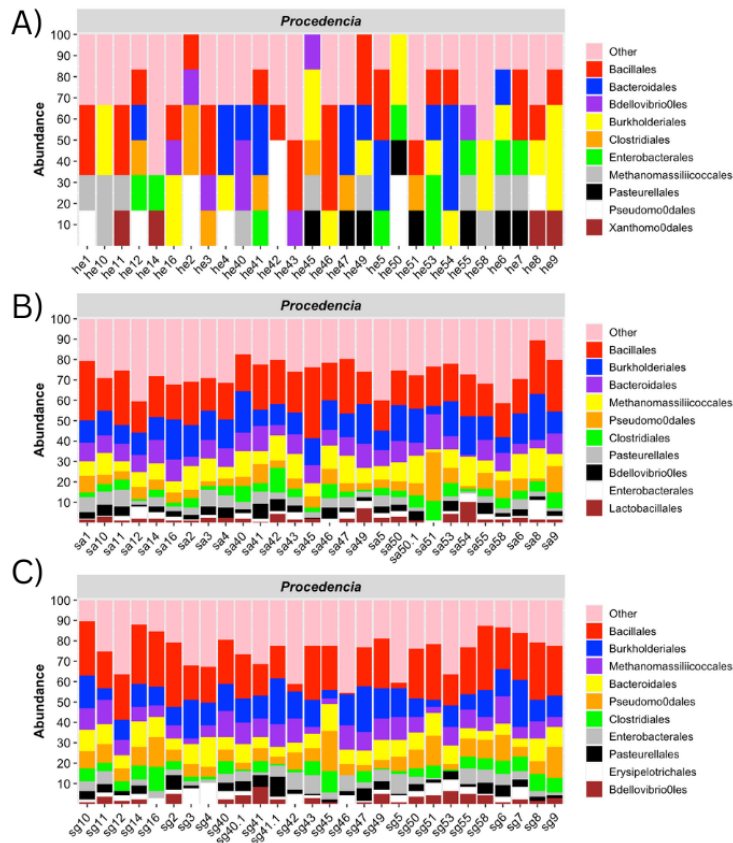


Figura 2. Abundancia relativa de los géneros de bacterias presentes en los chigiüros para las muestras de hisopados anales (A), hisopados bucales (B) y sangre (C).

El análisis de diversidad alfa de especies en función a la abundancia de procariontas según el tipo de muestra (Figura 3) reveló que las muestras de hisopados anales exhiben un índice de Shannon ligeramente bajo, variando entre 0.5 y 1.7, lo cual sugiere una menor diversidad bacteriana. Este hallazgo podría sugerir la existencia de condiciones que limitan la variedad de especies en ese tipo de muestra. Para el caso de las muestras de hisopados bucales, los índices de Shannon y Simpson oscilan en los mismos valores, pero la presencia de varios datos atípicos señala una limitada variabilidad en las comunidades microbianas en el set de datos analizados. Estos resultados sugieren una probable alta diversidad en este tipo de muestra, ya que pueden existir condiciones que favorecen una amplia variedad de especies. Contrastando con las anteriores, las muestras de sangre presentan un índice de Shannon elevado, indicando una mayor diversidad de especies en la comunidad. El índice de Simpson más bajo respalda la teoría de que este tipo de muestra exhibe una diversidad más marcada en comparación con las otras.



Figura 3. Índice de Shannon y Simpson para la comunidad procariota en las muestras de hisopados anales, hisopados bucales y sangre.

El análisis de diversidad Beta por tipo de muestras utilizando Bray Curtis (Figura 4) mostró que no se observa una diferencia significativa entre las comunidades bacterianas identificadas en saliva, sangre y heces de los chigüiros, con distancia de Bray-Curtis que varía entre 0 y 0.4, señalando que las comunidades son mayormente idénticas en los tres tipos de muestra.

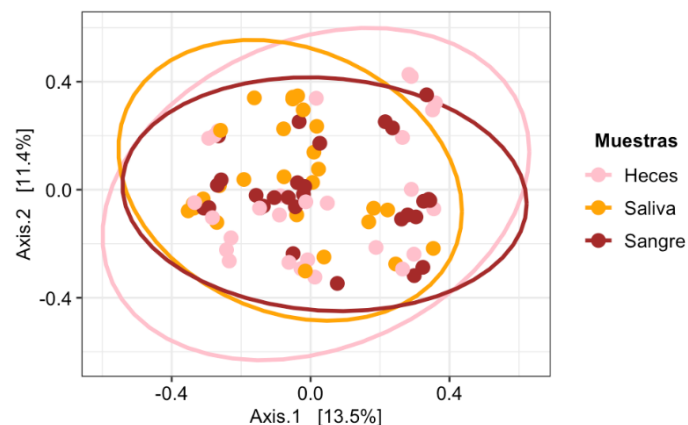


Figura 4. Bray Curtis para las muestras de hisopados anales (A), hisopados bucales (B) y sangre (C) divididas según el origen de procedencia.

Paralelamente, se realizó el análisis de la composición de las comunidades de bacterias de acuerdo con el municipio de procedencia de las muestras (Figura 5) en el cual se encontró que en las muestras de Paz de Aripuro (Figura 5A) la mayor abundancia fue de bacterias incluidas dentro de la categoría “Others” en la cual se incluyen grupos de menor representación (fuera del top 10), mientras que para las muestras de La Trinidad (Figura 5B) exhiben mayor abundancia de Bacillales y Burkholderales, sugiriendo patrones de composición dependientes de la ubicación geográfica.

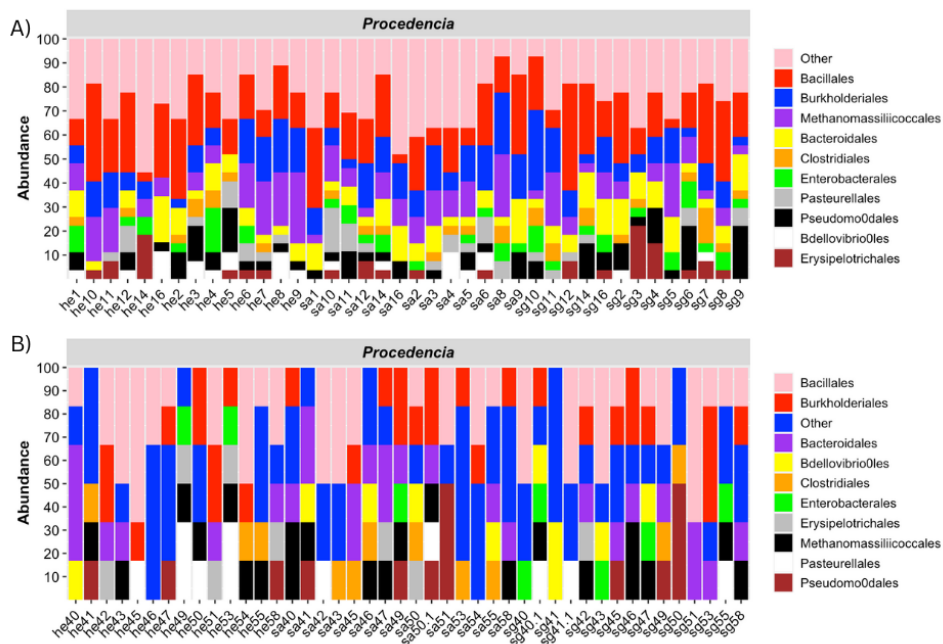


Figura 5: Abundancia relativa de los géneros de bacterias presentes en los chigüiros en Paz de Ariporo (A) y La Trinidad (B)

El análisis de diversidad alfa de especies de cada fuente de muestra en función de la procedencia (Figura 6) reveló que las muestras de hisopados anales (Figura 6A) mostraron una baja diversidad microbiana, con un índice de Shannon entre 1 y 1.8, indicando una limitada variedad en la comunidad microbiana entre municipios. El índice de Simpson sugiere una tendencia hacia la dominancia de especies. En contraste, las muestras de hisopados bucales (Figura 6B) exhibieron una significativa diversidad microbiana (índice de Shannon entre 2.5 y 3.5), con posiblemente una mayor dominancia en el municipio de Paz de Ariporo. Por último, las muestras de sangre (Figura 6C) también mostraron una alta diversidad (índice de Shannon entre 2.5 y 3.4), con una mayor dominancia en el municipio de La Trinidad.

El análisis de diversidad beta por municipio para cada tipo de muestra mostró la existencia de subgrupos para caso de las muestras de hisopados anales (Figura 7A), indicando cambios en las comunidades bacterianas de esta fuente de muestras dependientes de su procedencia. En cuanto a las muestras de hisopados bucales (Figura 7B), se encontró una composición heterogénea, especialmente en Paz de Ariporo. Sin embargo, el índice fue muy cercano a 0, sugiriendo similitud entre dichas procedencias. Consistentemente, en las muestras de sangre (Figura 7C), se observó un índice cercano a 0, indicando una alta similitud entre las comunidades; sin embargo, para el caso de La Trinidad se observó la presencia de muestras atípicas en términos de composición de la comunidad, lo cual contrasta con el perfil de las

muestras del municipio de Paz de Ariporo, las cuales están bien agrupadas, siendo un indicador de mayor homogeneidad en la estructura de las comunidades

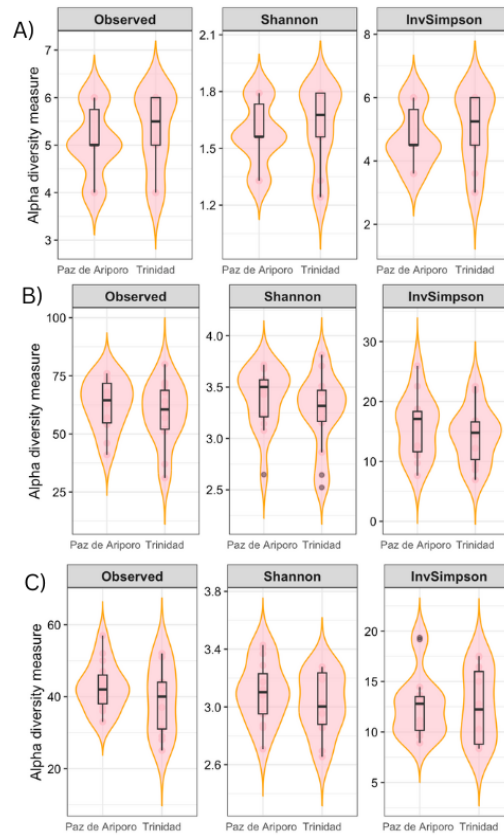


Figura 6. Índice de Shannon y Simpson para la comunidad procariota en las muestras de hisopados anales (A), hisopados bucales (B) y sangre (C) según el origen de procedencia.

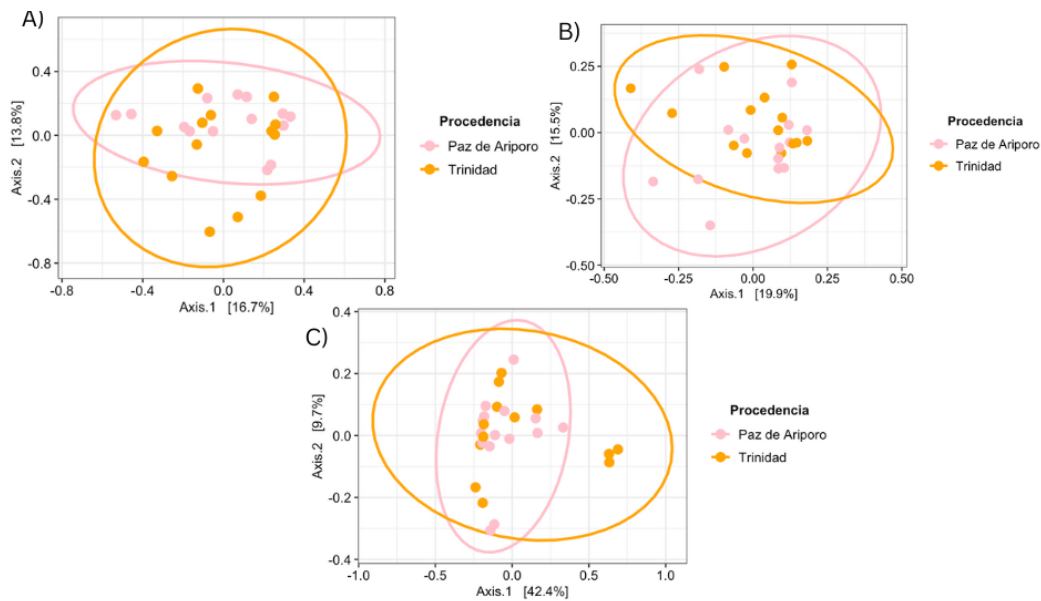


Figura 7: Bray Curtis para las muestras de hisopados anales (A), Hisopados bucales (B) y sangre (C) según el origen de procedencia.

4. DISCUSIÓN

La conservación de los chigüiros y sus hábitats naturales contribuyen a mantener un equilibrio en la fauna silvestre y a controlar la propagación de enfermedades zoonóticas, puesto que estos son un reservorio natural (Jahan NA., et al. 2021). En este estudio se determinó la composición de las comunidades de bacterias de estos mamíferos para comprender y analizar potenciales riesgos epidemiológicos. Los chigüiros desempeñan un papel crucial en la ecología microbiana debido a su capacidad para llevar a cabo procesos metabólicos particulares que tienen un impacto significativo en los ecosistemas (Falkowski PG., et al. 2008) por lo que identificarlos ayuda a entender y prevenir enfermedades infecciosas.

El género *Bacteroides* presente en todos los tipos de muestras, ayuda en la descomposición de los carbohidratos, la fermentación de la fibra y a la producción de ácidos grasos de cadena corta que proporcionan energía (Shoemaker, N.B., et al. 2000). También se identificaron *Burkholderiales* en todas las muestras que son proteobacterias que se encuentran en el suelo y en el agua que intervienen en los ciclos del Carbono y del Nitrógeno (Cardozo, Carolina; et al, 2010). Por lo que no representan un riesgo para la salud humana. Estos resultados se consideran géneros benéficos para el hospedador y medio ambiente ya que son interacciones ecológicas positivas. En general la presencia de estas bacterias en las muestras se puede deber a la dieta alimenticia local que tiene el chigüiro ya que se basa en plantas acuáticas, hierbas, hojas,

cortezas y pastos, así mismo pueden estar asociadas con las características del entorno de los municipios de Paz de Ariporo y La Trinidad.

Las *Pasteurellales* presente en todos los tipos de muestra, son proteobacterias comensales que viven en el medio ambiente en general, pero que son más frecuentemente en las superficies mucosas de los mamíferos, especialmente en el tracto superior respiratorio (Bretón Martínez JR, et al. 2000). Estas bacterias se han relacionado con una interacción biológica en la que obtienen un beneficio de su hospedador sin causarle perjuicio ni proporcionarle beneficio directo. Del mismo modo las *Pseudomonas* se caracterizan por ser organismos ubicuos, que se encuentran en la microbiota de la rizosfera de las plantas y en agua dulce como ríos (Anzai Y, et al. 2000), en su mayoría, estas bacterias son inofensivas para los seres humanos, aunque también se encuentran patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, que puede afectar tanto a animales como a humanos, causando infecciones en los pulmones y vías respiratorias (Iglewski BH 1996). Estos resultados se pueden deber al comportamiento de pastoreo de los chigüiros ya que estos modulan el paisaje removiendo la vegetación al alimentarse, por lo que afectan la estructura, abundancia, diversidad y composición de la vegetación en sus hábitats y pueden así consumir este tipo de bacterias.

Las diferencias entre los tipos de muestras pueden tener un impacto significativo en la dispersión de microorganismos por su fisiología, en las muestras de hisopados bucales se encontraron *Lactobacillus*, que son aquellas bacterias benéficas ácido-lácticas que contribuyen a mantener un equilibrio saludable en la microbiota de los roedores, ya que promueven la digestión de la fibra, la síntesis de diferentes nutrientes y regulan el sistema inmunológico de los chigüiros para prevenir enfermedades relacionadas con la inflamación (Rodríguez Claudia., et al. 2021 y Liu Y., et al. 2022). Estudios previos han revelado que la diversidad de la microbiota de los chigüiros está dominada por dicho género, aunque pueden variar según la alimentación de los mamíferos y algunos factores ambientales. En las muestras de sangre se evidenció *Erysipelotrichales*, que son bacterias comensales que se encuentran en la microbiota bacteriana de seres humanos y animales (Il Han, et al; 2011). Estas bacterias no suelen ser un riesgo para los hospedadores en los que habitan.

El hallazgo en todos los tipos de muestra del género *Bacillus* es significativo puesto que algunas especies pertenecientes a este género son importantes patógenos para el hombre como *Bacillus anthracis*, agente causante del ántrax y *Bacillus cereus*, que produce dos tipos de intoxicaciones alimentarias: la forma diarreica y la forma emética por la formación de toxinas, se obtiene

principalmente por el consumo de carnes contaminadas (Asaeda Glenn; et al. 2005). Así mismo, los *Clostridiales* también presentes en las muestras son bacterias que incluyen al género *Clostridium* el cual es muy importante ya que incluye especies muy relevantes para la investigación y la medicina como son *Clostridium botulinum* causante del botulismo, *Clostridium perfringens* causantes de la gangrena gaseosa y *Clostridium tetani*, del tétanos (Ryan KJ y Ray CG 2004). La presencia de estos géneros en las muestras puede deberse a que se encuentra en su mayoría en el suelo y las plantas, y una vía de transmisión de las bacterias en los chigüiros es el contacto directo con el medio ambiente contaminado. Además, al ser herbívoros y pasar gran parte de su tiempo en el agua, los chigüiros están expuestos a una variedad de bacterias patógenas presentes en estos ambientes.

También se evidenció la presencia de *Enterobacterales* en cada tipo de muestra, que son llamadas así porque habitan el tracto digestivo de los animales y humanos (Adeolu Mobolaji; et al, 2016). Aquí es importante mencionar al género *Salmonella*, un grupo de patógenos que representan un gran riesgo para animales y humanos (Eng, Shu-Kee; et al, 2014). Está compuesto por dos especies: *S. enterica* y *S. Bongori* que son agentes productores de zoonosis de distribución universal como fiebre tifoidea, una enfermedad mortal y común en los países en desarrollo como Colombia (Gebreyes W y Altier C. 2002), y se transmiten por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación (Barreto, Marlen; et al, 2016). Estos resultados respaldan la teoría de que los chigüiros pueden ser portadores de diversas bacterias patógenas, representando un riesgo para la salud pública. Además, existe una amenaza latente de zoonosis, ya que estos animales desempeñan un papel crucial en la cadena de transmisión de enfermedades infecciosas (Bäumler, A. et al., 2013).

La identificación de factores de riesgo como la exposición a estos agentes patógenos o ambientes contaminados fortalece la necesidad de diseñar estrategias efectivas de control y prevención, así como el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y tratamientos adaptados a la complejidad de estas interacciones. Existen muchas vías de transmisión de las bacterias que son patógenas para los chigüiros y los humanos como el contacto directo con otros animales infectados, con el mismo capibara o con el ambiente, así mismo por contacto indirecto con carne contaminada. Para prevenir la propagación de infecciones en las poblaciones de chigüiros y salvaguardar la salud pública, se pueden implementar varias medidas preventivas, como la implementación de programas de control de insectos vectores de enfermedades, la implementación de medidas de bioseguridad en granjas o áreas de cría de

chigüiros que consideren el acceso a fuentes de alimentación de bebida que cumpla con criterios de calidad e inocuidad, la desinfección regular de instalaciones y manejo adecuado de desechos, así como el control de acceso de personas y otros animales.

Una limitación potencial de este estudio radica en la calidad de las lecturas, ya que se esperaba una mayor cantidad de lecturas por muestra. Sería benéfico realizar investigaciones similares en diversas regiones geográficas, ampliando tanto el tipo como la cantidad de muestras, para garantizar una concentración adecuada de ADN y obtener resultados de secuenciación más precisos. Es decir, tomar una mayor cantidad de sangre o que las muestras de hisopados bucales y anales sean reemplazadas por muestras puras de heces y saliva. Este enfoque permitiría obtener una visión más completa de la diversidad procariota en chigüiros y su posible relación con la salud humana. Además, sería recomendable explorar el uso de otras técnicas de secuenciación de nueva generación, ya que esto podría ampliar la perspectiva y reducir posibles errores para lograr una identificación más precisa de las especies presentes puesto que aquí se hablaba de géneros. Estas mejoras podrían contribuir a realizar un análisis más detallado de la comunidad procariota y ofrecer una visión más detallada de los posibles riesgos asociados con su presencia.

En conclusión, la conservación de los chigüiros es fundamental no solo para preservar la biodiversidad y el equilibrio de los ecosistemas en los que habitan, sino también para contribuir a la vigilancia y control de enfermedades infecciosas. Debido a eso, es importante considerar la conservación de los hábitats naturales del chigüiro y promover programas de protección de la fauna silvestre, como la creación de áreas protegidas y corredores ecológicos, que permitan generar las condiciones para su supervivencia a largo plazo. Asimismo, este trabajo deja en evidencia la necesidad de diseñar y aplicar programas de investigación en ciencias básicas y aplicadas, que aporten conocimiento acerca de las variables involucradas en la salud de los chigüiros, así como las características etiológicas y ecológicas de su población con el fin de tomar medidas preventivas y correctivas oportunas”.

Al proteger a estos mamíferos, se minimiza el riesgo de transmisión de enfermedades dentro de la misma especie y se reduce la posibilidad de que patógenos se transmitan a los humanos. Esta conservación no solo beneficia directamente a la salud de los chigüiros, sino que también tiene implicaciones positivas en la salud pública al prevenir la propagación de posibles enfermedades zoonóticas, fortaleciendo así la vigilancia epidemiológica y el control de enfermedades infecciosas entre la fauna silvestre y las poblaciones humanas.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a mi directora de trabajo de grado Marina Muñoz por las enseñanzas y generar el entusiasmo hacia la investigación en microbiología, específicamente en las comunidades bacterias. Agradezco el acompañamiento de mi codirector Juan David Ramírez y al grupo de investigación GIMUR de la universidad del Rosario, a mi familia y amigos por aportar a lo largo de la carrera universitaria, gracias a todos esto fue posible.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Naturales y al Centro de Investigaciones en Microbiología y Biotecnología–UR (CIMBIUR) de la Universidad del Rosario, por el apoyo financiero a las diferentes actividades de este proyecto.

REFERENCIAS

- Ala'Aldeen, D. A. A. (2007). "Neisseria and moraxella". In Greenwood, David; Slack, Richard; Peitherer, John; & Barer, Mike (Eds.), *Medical Microbiology* (17th ed.), p. 258. Elsevier.
- Alarcón Cavero, T., D'Auria, G., Delgado Palacio, S., Del Campo Moreno, R., & Ferrer Martínez, M. (2016). Microbiota. In R. Del Campo Moreno (coordinadora), *Procedimientos en Microbiología Clínica* (pp. 59). E. Cercenado Mansilla & R. Cantón Moreno (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Recuperado de: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia59mod.pdf>
- Adeolu, Mobolaji; Alnajjar, Seema; Naushad, Sohail; S. Gupta, Radhey (1 de diciembre de 2016). «Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov.». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (en inglés) 66 (12): 5575-559
- Aldana-Domínguez, J., Vieira-Muñoz, M., & Ángel-Escobar, D. C. (2007). Estudios sobre la ecología del chigüiro (*Hydrochoerus hydrochaeris*): enfocados a su manejo y uso sostenible en Colombia (No. Doc. 22775) CO-BAC, Bogotá). Instituto Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

- Aldana-Domínguez, J., Vieira-Muñoz, M. I., & Bejarano, P. (2013). Conservation and use of the capybara and the lesser capybara in Colombia. In *Capybara* (pp. 321-332). Springer, New York, NY
- Álvarez, A., & Leguizamón, N. (2006). Consideraciones generales sobre el manejo de fauna silvestre en áreas urbanas, experiencia en Bogotá, D.C. Colombia. *Conservación ex situ: investigación para el manejo en cautiverio y conservación de la fauna silvestre*, 2, 7-10.
- Andrada Estefanía, médica veterinaria, San Antonio Biotics. 7 julio, 2022. “Especies del género *Prevotella* y su importancia en la microbiota” Instituto central lechera Austurina.
- Anzai Y, Kim H, Park, JY, Wakabayashi H (2000). «Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence :»). *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1563-89. PMID 10939664
- Arteaga, María C., & Jorgenson, Jeffrey P. (2007). Hábitos de desplazamiento y dieta del capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) en la Amazonia colombiana. *Mastozoología neotropical*, 14(1), 11-17. Recuperado en 23 de mayo de 2023, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0327-93832007000100002&lng=es&tlng=es.
- Asaeda, Glenn; Caicedo, Gilbert; Swanson, Christopher (diciembre de 2005). «Fried Rice Syndrome». *Journal of Emergency Medical Services* 30 (12): 30-32.
- Bäumler, A. J., & Fang, F. C. (2013). Host-microbe interactions: bacteria. In J. J. Brooker, J. L. Parish, & J. Tucker (Eds.), *Principles of microbial pathogenesis* (pp. 187-202). ASM Press
- Barragán Fonseca, Karol & Álvarez-Méndez, Oscar. (2014). Estudios serológicos de *Brucella abortus* y *Leptospira interrogans* en poblaciones silvestres de chigüiros (*Hydrochoerus hydrochaeris*) en el departamento de Casanare.
- Barreto, Marlen, Castillo-Ruiz, Mario, & Retamal, Patricio. (2016). *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista chilena de infectología*, 33(5), 547-557. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000500010>
- BRETÓN MARTÍNEZ JR, SALAVERT LLETI M, VIUDES FUSTER C, PÉREZ BELLES C, GOBERNADO SERRANO M. Infección abdominal por *Pasteurella* spp. Presentación de tres casos. *Rev Clin Esp* 2000; 200:139-142.

- Bueno, C., Faustino, M. T., & Freitas, S. (2013). Influence of landscape characteristics on capybara road-kill on highway BR-040, southeastern Brazil. *Oecologia Australis*, 17(2), 320-327
- Buermans HP, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta*. 2014 oct;1842(10):1932-1941. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.015. Epub 2014 Jul 1. PMID: 24995601.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583.
- Cardozo, Carolina, Rodríguez, Paola, Cotes, José Miguel, & Marín, Mauricio. (2010). Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burholderiaceae) en la zona bananera de Urabá (Colombia). *Revista de Biología Tropical*, 58(1), 31-44. Retrieved January 03, 2024, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442010000100003&lng=en&tlng=es.
- Cristancho, S., Vanegas, L., & Alvarado, L. (2017). Análisis de la diversidad vegetal en tres ecosistemas de la cuenca del río Cravo Sur, Yopal, Colombia. *Luna Azul*, (44), 105-127.
- David, L., Maurice, C., Carmody, R. et al. La dieta altera rápida y reproduciblemente el microbioma intestinal humano. *Naturaleza* 505, 559–563 (2014). <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- Eng, Shu-Kee; Pusparajah, Priyia; Ab Mutalib, Nurul-Syakima; Ser, Hooi-Leng; Chan, Kok-Gan; Lee, Learn-Han (octubre de 2014). «Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance» [Salmonella: una revisión acerca de la patogenia, epidemiología y resistencia antibiótica]. *Frontiers in Life Science (en inglés) (Informa UK Limited)* 8 (3): 284-293
- Falkowski PG, Fenchel T, DeLong EF. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*. 2008 May 23; 320 5879: 1034-9. doi: 10.1126/science.1153213. PMID: 18497287.
- Fatme Mawas, Mei Mei Ho & Michael J Corbel (2009) Current progress with *Moraxella catarrhalis* antigens as vaccine candidates, *Expert Review of Vaccines*, 8:1, 77-90, DOI: 10.1586/14760584.8.1.77

- Florian P Breitwieser, Steven L Salzberg, Pavian: interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification, *Bioinformatics*, Volume 36, Issue 4, February 2020, Pages 1303–1304, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz715>
- Gebreyes W, Altier C. Molecular characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:2813-22
- Guzmán, Miguel. (2016). La microbiología médica, columna vertebral de la infectología. *Biomédica*, 36(Suppl. 1), 5-8. Retrieved May 23, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572016000500001&lng=en&tlng=es.
- Gruninger RJ, McAllister TA, Forster RJ. Bacterial and Archaeal Diversity in the Gastrointestinal Tract of the North American Beaver (*Castor canadensis*). *PLoS One.* 2016 May 26;11(5): e0156457. doi: 10.1371/journal.pone.0156457. PMID: 27227334; PMCID: PMC4881982.
- Iglewski BH (1996). *Pseudomonas*. In: *Baron's Medical Microbiology* (Barron S et al, eds.) (4th ed. edición). Univ of Texas Medical Branch. (via NCBI Bookshelf)
- Il Han, Shankar Congeevaram, Dong-Won Ki, Byoung-Taek Oh & Joonhong Park 2011. Bacterial community analysis of swine manure treated with autothermal thermophilic aerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology* February 2011, Volume 89, Issue 3, pp 835-842
- Jahan NA, Lindsey LL, Larsen PA. The Role of Peridomestic Rodents as Reservoirs for Zoonotic Foodborne Pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2021 Mar;21(3):133-148. doi: 10.1089/vbz.2020.2640. Epub 2020 Dec 22. PMID: 33351736.
- Jain S, Wheeler JR, Walters RW, Agrawal A, Barsic A, Parker R. ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell.* 2016 Jan 28; 164 (3): 487-98. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.038. Epub 2016 Jan 14. PMID: 26777405; PMCID: PMC4733397.
- Jovel J, Patterson J, Wang W, Hotte N, O'Keefe S, Mitchel T, Perry T, Kao D, Mason AL, Madsen KL, Wong GK (2016). Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 7, 459.
- Kepler, F., Hamilton, J., Braß, M. et al. Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. *Nature* 439, 187–191 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature04420>
- Krawczak, F. S., Nieri-Bastos, F. A., Nunes, F. P., Soares, J. F., Moraes-Filho, J., & Labruna, M. B. (2014). Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras

- (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. *Parasites & Vectors*, 7(1), 7.
- Laver T, Harrison J, O'Neill PA, Moore K, Farbos A, Paszkiewicz K, Studholme DJ. Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomol Detect Quantif*. 2015 Mar; 3:1-8. doi: 10.1016/j.bdq.2015.02.001. PMID: 26753127; PMCID: PMC4691839.
- Liu Y, Wang J, Wu C. Modulation of Gut Microbiota and Immune System by Probiotics, Prebiotics, and post-biotics. *Front Nutr*. 2022 Jan 3; 8:634897. doi: 10.3389/fnut.2021.634897. PMID: 35047537; PMCID: PMC8761849.
- Lu, J., Rincon, N., Wood, D.E. et al. Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nat Protoc* 17, 2815–2839 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00738-y>
- Mardis, E. R. (2011). Next-generation sequencing platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6, 287-303. doi: 10.1146/annurev-anchem-061010-114057
- Méndez, O. Á., & Barragán, K. B. (2005). Determinación de parámetros fisiológicos, hematológicos y de química sanguínea en chigüiros silvestres (*Hydrochoerus hydrochaeris*) en el departamento de Casanare (Issue 25).
- Moreno, P. G., & Kittlein, M. J. (2013). Intestinal parasites of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a wetland of northeastern Argentina. *Research and Reviews: Journal of Zoological Sciences*, 2(4), 1-5.
- Morens, D. M., Folkers, G. K., & Fauci, A. S. (2004). The Challenge of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases. *Nature*, 430(6996), 242-249. doi: 10.1038/nature02759
- Oscar G. Gómez-Duarte. 2014. “Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia” Division of Pediatric Infectious Diseases Department of Pediatrics Vanderbilt University School of Medicine Nashville, Tennessee U.S.A
- Pérez Indira, Falco, Aura, Tapia, María Soledad, & Alonso, Guillermina. (2012). Aislamiento e identificación de cepas del género *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos fermentados tipo yogur. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(1), 29-36. Recuperado en 10 de mayo de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000100007&lng=es&tlng=es.
- Reid, F. (2016). «*Hydrochoerus hydrochaeris*». Lista Roja de especies amenazadas de la UICN 2020.3 (en inglés). ISSN 2307-8235.
- Ryan KJ, Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed. edición). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.

- RODRÍGUEZ-LÓPEZ, Claudia Milena, GUZMÁN-BELTRÁN, Ana María, LARA-MORALES, Maria Camila, CASTILLO, Elianna, & BRANDÃO, Pedro F. B. (2021). AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Lactobacillus* spp. (LACTOBACILLACEAE) RESISTENTES A Cd (II) Y As (III) RECUPERADOS DE FERMENTO DE CACAO. *Acta Biológica Colombiana*, 26(1), 19-29. Epub March 16, 2021. <https://doi.org/10.15446/abc.v26n1.83677>
- Salas, V., Pannier, E., Galíndez-Silva, C., Gols-Ripoll, A., & Herrera, E. A. (2004). Methods for Capturing and Marking Wild Capybaras in Venezuela. *Wildlife Society Bulletin (1973-2006)*, 32(1), 202–208.
- Shoemaker, N.B., Wang, G.R., Salyers, A.A. Multiple gene products and sequences needed for excision of the mobilizable integrated *Bacteroides* element NBU1. *J Bacteriol* 2000; 182: 928-936.
- Steele HL, Streit WR. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Jun 15; 247 (2): 105-11. doi: 10.1016/j.femsle.2005.05.011. PMID: 15936897.
- Stein, D.J., Phillips, K.A., Bolton, D., Fulford, K.W.M., Sadler, J.Z., & Kendler, K.S. (2010). What is a mental/psychiatric disorder? From DSM-IV to DSM-V. *Psychological Medicine*, 40(11), 1759-1765.
- Viteri Avellaneda, E. L. (2014). Incidencia de la leptospirosis en pacientes atendidos en el hospital de infectología de Guayaquil, periodo 2008-2011, y medidas preventivas (Master's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad Piloto de Odontología. Escuela de Postgrado" Dr. José Apolo Pineda").
- Weinberg A N. Zoonoses. En Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell GL. Bennett JE. Dolin R, editors. Fifth edition 2000, Churchill Livingstone, Philadelphia. pp 3229-45.