

## NOTA TÉCNICA

# PENETRACIÓN DE *Vibrio mimicus* A TRAVÉS DE LA CÁSCARA DEL HUEVO DE TORTUGA LORA (*Lepidochelys olivacea*)<sup>1</sup>

Mónica Pereira-Zamora<sup>2</sup>, Francisco Hernández-Chavarría<sup>3</sup>, Eric Wong-González<sup>2\*</sup>

## RESUMEN

**Penetración de *Vibrio mimicus* a través de la cáscara del huevo de tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*).** El objetivo de esta investigación consistió en determinar la capacidad de penetración del *Vibrio mimicus* a través de la cáscara del huevo. La investigación se realizó en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos en el año 2000. Se inoculó la superficie de la cáscara con la bacteria y se procedió a incubar las muestras por 72 horas a 25°C. Después de este período se observaron las muestras bajo el microscopio electrónico. Los resultados obtenidos demuestran que el *Vibrio mimicus* se reproduce en la superficie externa de la cáscara del huevo de tortuga lora, y no es capaz de penetrarla después de las 72 horas de incubación a 25°C. Por lo tanto, cualquier tratamiento que se aplique con el fin de reducir la contaminación con el vibrio y mejorar la inocuidad de los huevos, debe aplicarse en su exterior.

**Palabras clave:** *Vibrio mimicus*, huevos de tortuga, inocuidad, cáscara, enfermedad.

## ABSTRACT

**Penetration of *Vibrio mimicus* through lora turtle (*Lepidochelys olivacea*) egg shells.** The objective of this research was to determine the capability of this vibrio to trespass the turtle egg shell; the study was conducted at Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos in year 2000. This was done by inoculating the surface of the shell with the bacteria and incubating the samples for 72 hours at 25°C. After incubation, samples were analyzed using electronic microscopy. Results show that *Vibrio mimicus* grows on the surface of the egg shell but cannot penetrate it after 72 hours of incubation at 25°C. Therefore, any treatment to reduce or eliminate the risk of *Vibrio mimicus* and improve turtle egg sanitation should be applied externally.

**Key words:** *Vibrio mimicus*, turtle eggs, safety, shell, illness.



## INTRODUCCIÓN

Los huevos de tortuga lora tienen forma entre ovalada y esférica, con un diámetro que varía entre 37,5 y 45,4 mm. El peso de los huevos varía entre 22,2 - 32,0 g con un valor promedio de 27,9 g (Mora 1995). La cáscara del huevo se clasifica como pergaminosa y se caracteriza por ser flexible y de color blanco. Según

manifiesta Acuña (1980), la cáscara es la estructura que permite los procesos de intercambio de sustancias entre el ambiente y el interior del huevo, esenciales para el desarrollo del embrión. Esta cáscara presenta una primera capa conformada por unidades de sales de calcio en forma de abanico, una segunda capa de sales de calcio compactadas e inmediatamente debajo se encuentra la membrana corioalantoidea. De acuerdo

<sup>1</sup> Recibido: 12 de abril, 2007. Aceptado: 29 de agosto, 2007. Tesis para optar por el grado de licenciada en Tecnología de Alimentos.

<sup>2</sup> Escuela de Tecnología de Alimentos, Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Correo electrónico: mpereira@griffithlaboratories.com

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Correo electrónico: hchavarr@cariari.ucr.ac.cr

\* Autor de correspondencia: ewong@cariari.ucr.ac.cr

con Acuña (1980), las unidades de sales de calcio están compuestas por carbonato de calcio, calcita y aragonita. Esta cáscara se diferencia de la del huevo de ave en que no presenta cutícula lisa. Además, las sales de calcio no forman columnas, por lo que los poros no son uniformes en toda su extensión, sino que sus paredes son irregulares y algunos se encuentran parcialmente obstruidos.

Como resultado de la flora natural de los ambientes marinos y la contaminación microbiana de la arena de la playa en la que se depositan los huevos, existe una serie de microorganismos que pueden encontrarse en ellos, convirtiéndolos en un peligro para la salud pública. Campos *et al.* (1996) señalan que los huevos de tortuga son un factor de riesgo pues su consumo cuando están crudos, puede causar la diarrea provocada por el *V. mimicus*. Esta bacteria se aisló de todos los nidos muestreados y en un 47% de los huevos de arribada analizados (Acuña *et al.* 1999).

El *Vibrio mimicus* ha sido establecido como un agente causante de diarrea e infecciones en oídos (Hackney y Dicharry 1988). Los brotes de gastroenteritis asociados con el consumo de mariscos ocasionados por *V. mimicus* han llevado a considerar a este vibrio como un patógeno de interés para la salud pública (Alam *et al.* 1996). La mayoría de los pacientes con gastroenteritis presentan síntomas que incluyen diarrea, náuseas, vómitos, calambres y fiebre (Shandera *et al.* 1983), sin embargo, se han documentado otros tipos de trastornos gastrointestinales (Chowdhury *et al.* 1991; Sanyal *et al.* 1983).

Algunas cepas son capaces de producir diferentes tipos de toxinas: una enterotoxina termolábil, una enterotoxina extracelular resistente al calor (ST) y la toxina colérica, inmunológicamente idéntica a la producida por *V. cholerae* O1 (Chowdhury *et al.* 1991). Además, se ha reportado la producción de dos hemolisinas, y otros factores extracelulares como proteasas y hemaglutininas, que aumentan su virulencia y patogenicidad (Alam *et al.* 1996).

Diversos estudios de las propiedades patogénicas de cepas clínicas y cepas ambientales lograron determinar que un alto porcentaje de las cepas de *V. mimicus*, aisladas de ambientes acuáticos, juegan un papel significativo como causantes de enfermedades

intestinales. Por lo tanto, estos ambientes constituyen una fuente importante de *V. mimicus* toxigénico (Chowdhury *et al.* 1991; Alam *et al.* 1996).

En Costa Rica, y en el período comprendido entre los años de 1991 a 1994, se reportaron 33 casos de diarrea por *V. mimicus* indistinguible de la ocasionada por el *V. cholerae*, y todas las cepas clínicas produjeron la toxina colérica (Campos *et al.* 1996). Debido a lo anterior se buscaron las posibles fuentes del microorganismo y con base en diversas evidencias, se determinó que el consumo de huevos de tortuga crudos tiene un papel importante como vehículo de transmisión de la enfermedad. Se encontraron, además, cepas capaces de producir la toxina colérica en un 31% de los nidos, en un 5% de los huevos y en un 6,4% de las muestras de arena colectadas en época de arribada de la tortuga lora (Acuña *et al.* 1999). Como ha quedado demostrado que el *V. mimicus* contamina los huevos de tortuga *in situ*, éste debe ser destruido o reducido mediante tratamientos directos sobre el alimento, que permitan garantizar su calidad microbiológica.

Con el fin de orientar de una manera más adecuada la aplicación de posibles alternativas propuestas, es necesario realizar un estudio sobre la capacidad del *V. mimicus* para penetrar la cáscara del huevo. Esto permitirá conocer si los tratamientos se aplicarían en el interior o exterior del producto.

## METODOLOGÍA

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, en el año 2000, donde se prepararon las muestras. El análisis de las muestras y la preparación para utilizar las técnicas respectivas con el microscopio electrónico se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas localizado en la Ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Los huevos de tortuga lora utilizados fueron recolectados en el Refugio Nacional de Fauna Silvestre Ostional durante los tres días siguientes después de declarada la arribada, ya que éstos son los que se comercializan legalmente. La recolección de la muestra

se llevó a cabo siguiendo el procedimiento acostumbrado: se escarbaron los nidos, los huevos se colocaron en bolsas plásticas limpias y se cerraron. Para su transporte a San José, los huevos se colocaron en una hielera con una temperatura entre 5-10°C por un período de 10 h. A su llegada se refrigeraron (5-7°C) y se utilizaron en menos de 72 h.

La cepa de *Vibrio mimicus* que se usó para la inoculación artificial de los huevos fue obtenida de la bacterioteca del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) y es la cepa con código T4 no toxigénica (ctxA -) que fue aislada en Costa Rica de huevos de tortuga lora. Esta cepa fue mantenida en medio Cary-Blair durante todo el estudio. Dos días antes de realizar las pruebas, se tomó una asada de este medio y se suspendió en caldo infusión cerebro y corazón (CICC) y después de 18-24 h de incubación a 37°C se rayó uno o varios tubos con agar tripticosa y soya inclinado (ATS), los cuales se incubaron a 37°C para obtener el cultivo fresco (stock).

Se utilizó el microscopio electrónico de barrido Hitachi S-570 para determinar la capacidad del *Vibrio mimicus* de penetrar la cáscara del huevo, para lo cual se marcó un área de 1 cm<sup>2</sup> (cuadrado de 1x1) en la cáscara del huevo entero y se colocaron 30 µL de un inóculo de *V. mimicus* con una concentración aproximada de 6,0 x 10<sup>8</sup> UFC/ml (cerca de 1,8 x 10<sup>7</sup> UFC/cm<sup>2</sup>). Se analizaron dos huevos para cada una de dos tortugas diferentes, con el fin de establecer posible variabilidad entre tortugas y entre huevos de una tortuga. Las muestras se incubaron a una temperatura de 25 ± 3°C durante 72 h. Además se prepararon diferentes controles: control negativo al tiempo cero, control positivo al tiempo cero y control negativo a las 72 h, para un total de siete muestras.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación (0 ó 72 h), se fijó "in situ" con solución Karnovsky (glutaraldehído 2,5% y paraformaldehído 2%) y se recortó el área inoculada con un bisturí estéril. El cuadrado se cortó a la mitad, una se utilizó para estudiar la superficie externa e interna y la otra para criofractura. Todos los fragmentos se mantuvieron en solución de Karnovsky a 4°C hasta su procesamiento.

Para analizar la superficie externa e interna se aplicó el procesamiento rápido (calentamiento en

microondas a 0°C) que consiste en lavados con búffer de fosfatos 0.1M, postfijación con tetraóxido de osmio 1%, lavados con agua destilada, deshidratación con series de etanol (30-100%) y secado por sublimación en terbutanol. Las muestras desecadas se prepararon para su observación al microscopio electrónico de barrido usando cinta adhesiva, pintura conductora de plata y cobertura iónica de platino-paladio.

El procedimiento de criofractura es similar al anterior, la diferencia consiste en congelar la muestra utilizando nitrógeno líquido y luego quebrarla con un pequeño golpe, lo que se realiza después de la postfijación y previo a la deshidratación con etanol.

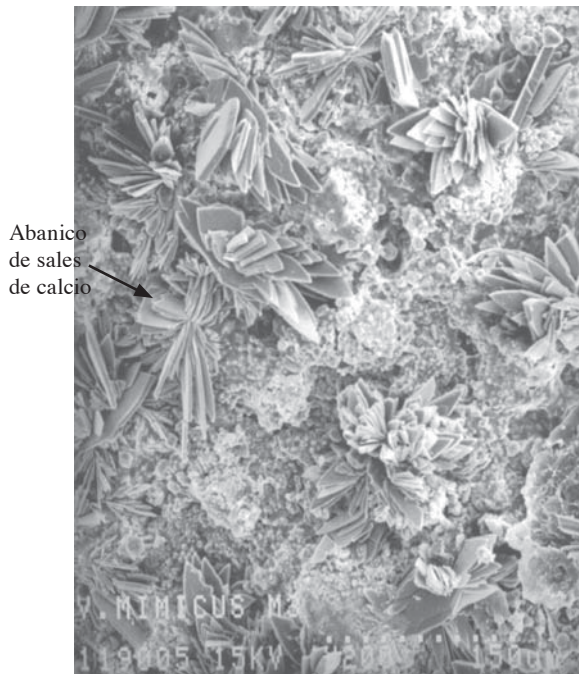
El análisis de las muestras se realizó por observación al microscopio. La búsqueda de bacterias en la superficie de la cáscara y en los cortes transversales fue exhaustiva (en el área inoculada) para todos los controles y muestras. A pesar de que se tomaron fotos de las observaciones más importantes y representativas, es importante considerar que éstas tienen fines ilustrativos y aunque reflejan los resultados obtenidos, no muestran la totalidad y grado de profundidad del estudio realizado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

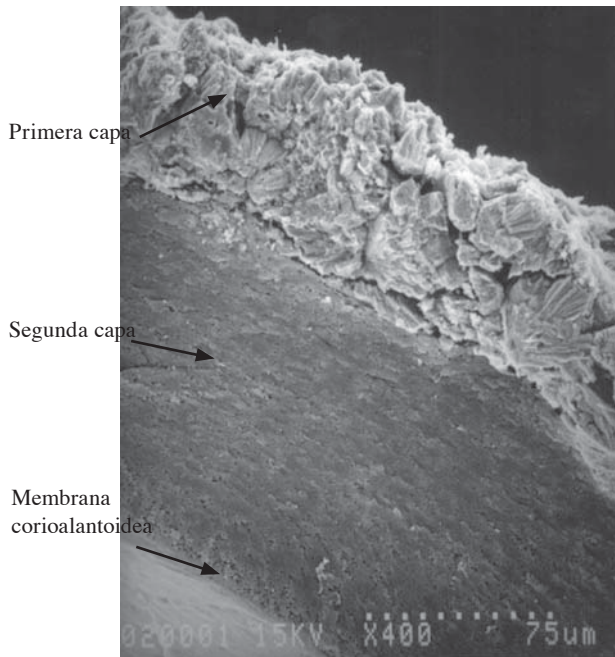
En la Figura 1 se observa la superficie externa de la cáscara del huevo de tortuga (*L. olivacea*), la cual es muy irregular y presenta abanicos de sales de calcio, como los descritos por Acuña (1980). Este mismo autor, señala que la cáscara del huevo de tortuga se asemeja a una coliflor, mientras que la del huevo de ave presenta una cutícula lisa. Otra diferencia importante es la morfología de los poros, ya que en el huevo de tortuga no son uniformes, sino más bien irregulares.

Mediante el proceso de criofractura se obtiene un corte transversal liso que permite observar las secciones que constituyen la cáscara del huevo. La Figura 2, muestra una primera capa de sales de calcio dispuestas en forma de abanico, una segunda capa compacta de sales de calcio y la membrana corioalantoidea (Acuña, 1980).

Se preparó un control positivo colocando el inóculo e inmediatamente fijando la muestra para conocer como



**Figura 1.** Superficie externa de la cáscara del huevo de tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2000.

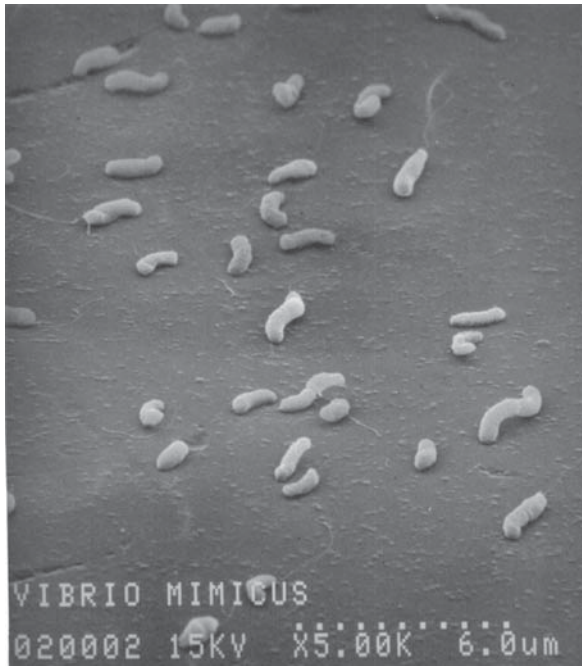


**Figura 2.** Capas de la cáscara del huevo de tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2000.

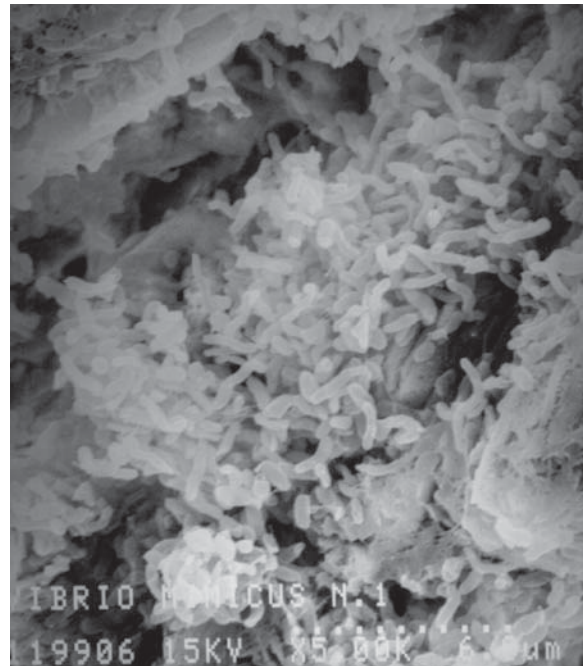
se observaba la bacteria en la superficie y tener una referencia para comparar con lo observado en las muestras. También se preparó un control negativo al tiempo cero y a las 72 h de incubación, que consistió en fijar un trozo de la cáscara en iguales condiciones que para las muestras, solo que sin inóculo. La Figura 3 muestra una fotografía al microscopio electrónico de barrido de la cepa del *Vibrio mimicus* donde se puede observar su morfología: un bacilo curvo con un único flagelo polar, como lo describe Davis *et al.* (1981). Esto permite su comparación con otras bacterias presentes en las muestras para asegurar que se trata de *V. mimicus*.

En el control positivo (Figura 4), se observan varias células de *V. mimicus* en la superficie. En las Figuras 5, 6, 7 y 8 se observa como el *V. mimicus* logró reproducirse en la cáscara, por lo que el número de bacterias observadas es mucho mayor al encontrado en el control positivo. El *V. mimicus* presenta crecimiento en la superficie externa de la cáscara del huevo de tortuga *L. olivacea* después de 72 h de incubación a 25°C. El crecimiento de bacterias en la superficie del huevo de tortuga se ve favorecido por factores propios de la cáscara. Esta presenta un mayor contenido de humedad y proteína, 37% y 28,2% respectivamente, en comparación con un 1,6% y 3,3% para el huevo de gallina (Mora 1995). Durante la ovoposición se secreta una gran cantidad de mucosidad que cubre los huevos y brinda un ambiente húmedo apropiado, el cual se mantiene por acción de la arena con la que se coleccionan y empaquetan los huevos.

La superficie interna del huevo de tortuga es lisa y está cubierta por una membrana delgada. En ninguna de las muestras se encontraron bacterias en esta superficie, lo que evidencia la incapacidad del *V. mimicus* para penetrar la cáscara. Los cortes transversales procesados con la técnica de criofractura (Figura 9) muestran al *V. mimicus* en la primera capa. Lo más profundo que se encontró la bacteria fue al final de esta capa, por lo que se concluye que ésta no es capaz de penetrar la cáscara en el período de 72 h. La segunda capa (Figura 10) es una estructura muy compacta que al parecer funciona como una membrana selectiva permitiendo la difusión de algunas sustancias y gases necesarios para el desarrollo embrionario pero impidiendo la entrada de los microorganismos. Al respecto, Acuña (1980) señala que el intercambio de sustancias entre el exterior e interior del huevo de tortuga se lleva



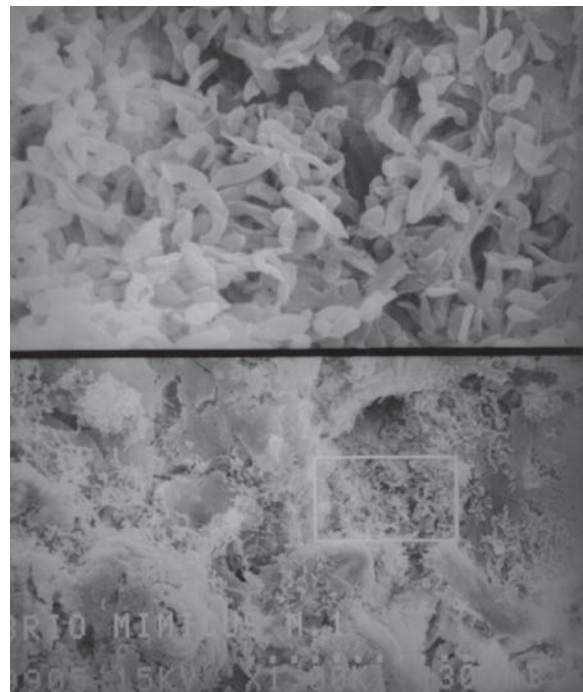
**Figura 3.** Micrografía de barrido de la cepa de *V. mimicus* utilizada. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2000.



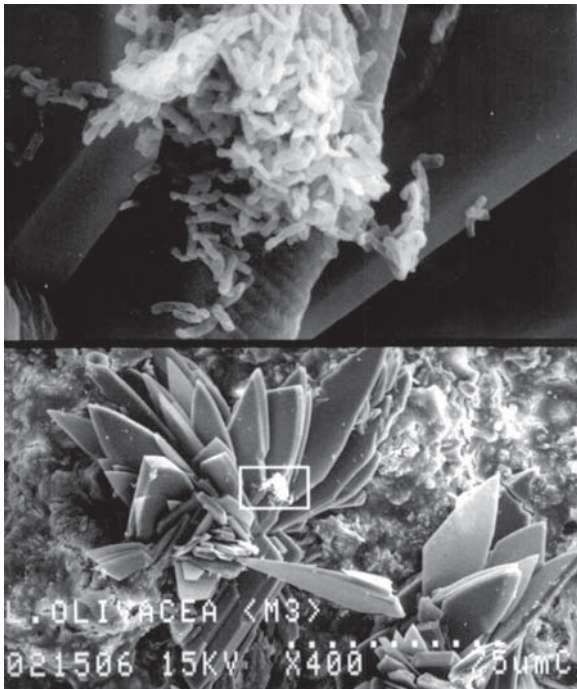
**Figura 5.** Células de *V. mimicus* en la superficie externa de la cáscara del huevo de tortuga lora (muestra #1). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2000.



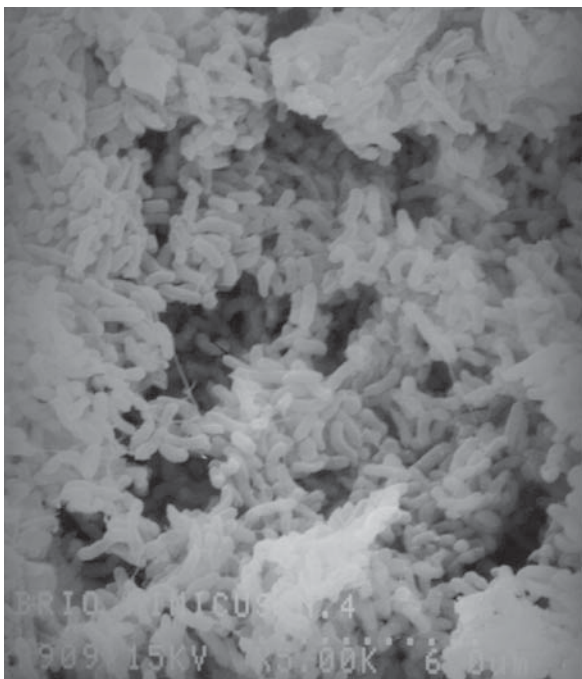
**Figura 4.** Superficie externa de la cáscara del huevo de tortuga lora en el control positivo. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2000.



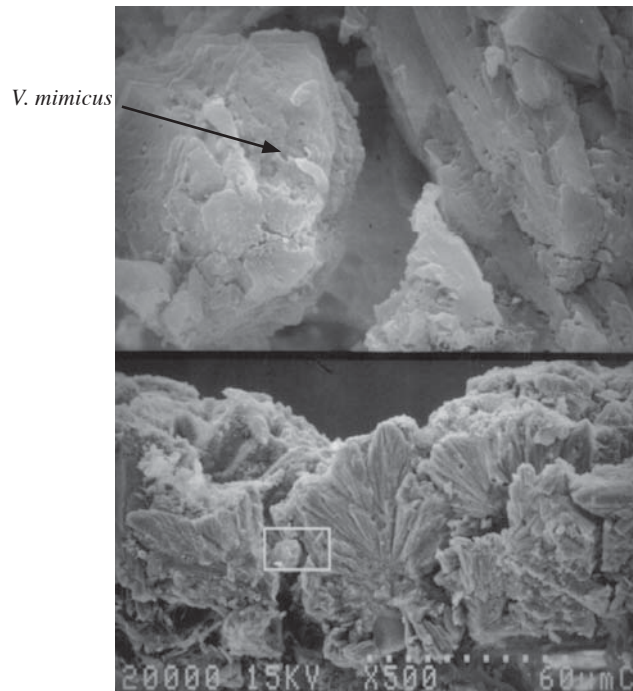
**Figura 6.** Células de *V. mimicus* en la superficie externa de la cáscara del huevo de tortuga lora (muestra #2). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2000.



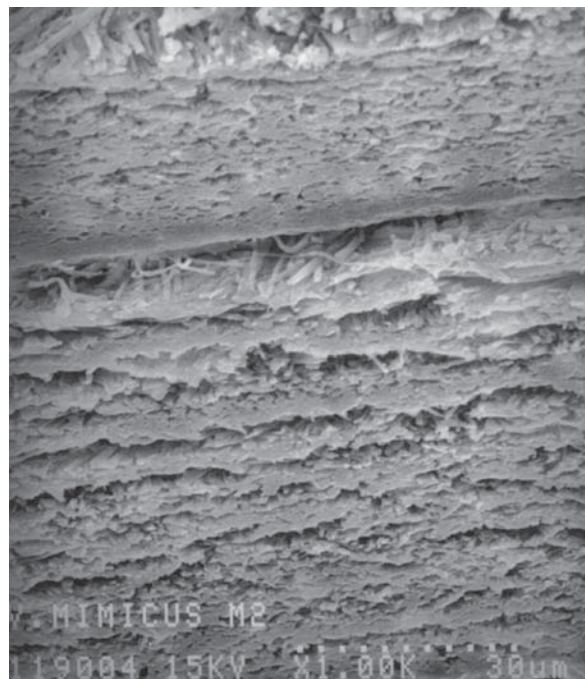
**Figura 7.** Superficie externa de la cáscara del huevo de tortuga lora en la muestra #3. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2000.



**Figura 8.** Superficie externa de la cáscara del huevo de tortuga lora en la muestra #4. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2000.



**Figura 9.** *V. mimicus* en la primera capa de la cáscara del huevo (corte transversal). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2000.

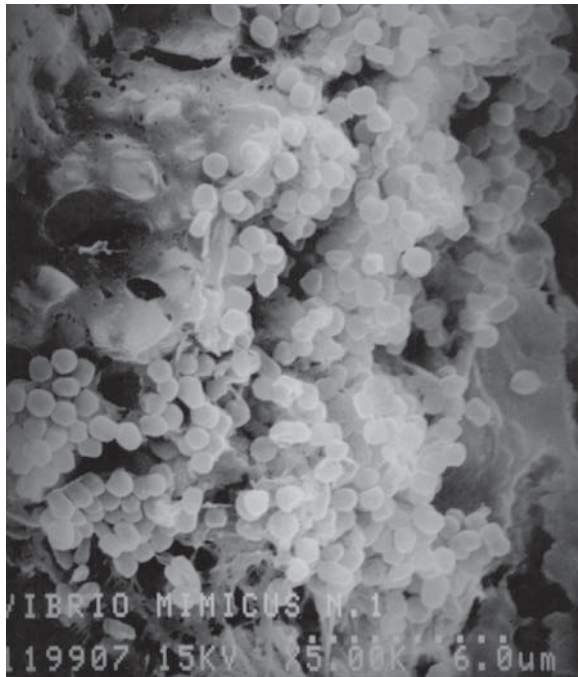


**Figura 10.** Vista de la segunda capa de la cáscara del huevo de tortuga lora. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2000.

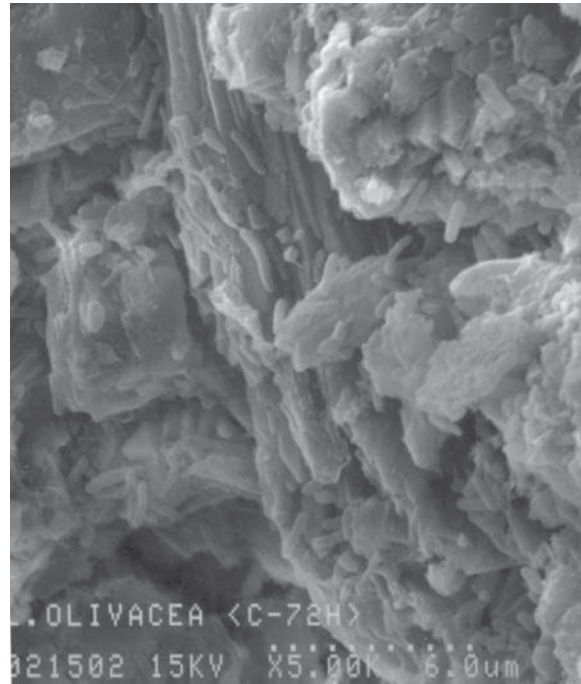
a cabo por medio de la difusión, y la porosidad de la cáscara favorece tanto el intercambio de líquido como de gases, lo que refleja su actividad metabólica.

En la Figura 11 se observan otras bacterias que no son *V. mimicus* y se comprueba la presencia de una flora mixta natural presente en la cáscara del huevo de tortuga, la cual logra también reproducirse y alcanzar altas concentraciones. Por último, la Figura 12 muestra la superficie externa del control negativo después de las 72 h de incubación, donde se puede notar una gran cantidad de bacterias de diferente morfología: bacilos largos, cortos y cocos, lo que representa la flora natural de la cáscara del huevo de tortuga.

De los resultados anteriores se puede considerar que la infección causada por el *V. mimicus* no se transmite por la presencia de bacterias en el interior del huevo, sino por una inadecuada manipulación que permite la contaminación cruzada al abrir el huevo para su consumo. De hecho, Campos *et al.* (1996)



**Figura 11.** Flora microbiana mixta (flora natural) en la superficie externa de la cáscara del huevo de tortuga lora (muestra #1). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2000.



**Figura 12.** Flora microbiana mixta (flora natural) en la superficie externa de la cáscara del huevo de tortuga lora (control negativo, 72 h). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2000.

mencionan el caso de una niña que presentó la diarrea por *V. mimicus* sin consumir huevos de tortuga, pero que sí jugó con un huevo entero. La cáscara del huevo de tortuga permite el desarrollo y crecimiento de bacterias bajo condiciones normales, lo que la convierte en un foco de contaminación y de riesgo.

Este estudio evidencia la necesidad de aplicar tratamientos que actúen en el exterior del huevo de tortuga, con el fin de determinar su efecto sobre la reducción del *V. mimicus* en la superficie de la cáscara.

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la M.Sc. Elena Campos del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) por su aporte en la realización de esta investigación y por suministrar la cepa de *Vibrio mimicus* que fue utilizada.

## LITERATURA CITADA

- ACUÑA, M.; DÍAZ, G.; BOLAÑOS, H.; BARQUERO, C.; SÁNCHEZ, O.; SÁNCHEZ, L.; MORA, G.; CHAVÉS, A.; CAMPOS, E. 1999. Sources of *Vibrio mimicus* contamination of turtle eggs. Applied and Environmental Microbiology 65(1):1-3.
- ACUÑA, R. 1980. Aspectos de la fase terrestre de la tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*). Tesis M.Sc. en Biología. San José, Costa Rica. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. p. 115
- ALAM, M.; MIYOSHI, S.; YAMAMOTO, S.; TOMOCHIKA, K.; SHINODA, S. 1996. Expression of virulence-related properties by, and intestinal adhesiveness of, *Vibrio mimicus* strains isolates from aquatic environments. Applied and Environmental Microbiology 62(10):3871-3874.
- CAMPOS, E.; BOLAÑOS, H.; ACUÑA, M.T.; DÍAZ, G.; MATAMOROS, M.C.; RAVENTÓS, H.; SÁNCHEZ, L.; SÁNCHEZ, O.; BARQUERO, C.; RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA CÓLERA, COSTA RICA. 1996. *Vibrio mimicus* diarrhea following ingestion of raw turtle eggs. Applied and Environmental Microbiology 62(4):1141-1144.
- CHOWDHURY, M.; YAMANAKA, H.; MIYOSHI, S.; AZIZ, K.; SHINODA, S. 1991. Ecology of *Vibrio mimicus* in aquatic environments. Applied and Environmental Microbiology 55(8):2073-2078.
- DAVIS, B.; FANNING, R.; MADDEN, J.; STEIGERWALT, A.; BRADFORD, H.; SMITH, J.R.; BRENNER, D. 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. Journal of Clinical Microbiology 14(6):631-639.
- HACKNEY, C.; DICHARRY, A. 1988. Seafood-borne bacterial pathogens of marine origin. Food Technology 42(3):84-90.
- MORA, R. 1995. Composición química del huevo de tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*) y evaluación de su calidad física y microbiológica durante su almacenamiento. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica. Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica. p. 69.
- SANYAL, S.; HUQ, M.; NEOGI, P.; ALAM, M.; KABIR, M.; RAHAMAN, A. 1983. *Vibrio mimicus* as an aetiologic agent of diarrhoea and its pathogenesis. Indian Journal of Medical Microbiology 1:1-12.
- SHANDERA, W.; JOHNSTON, J.; DAVIS, B.; BLAKE, P. 1983. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. Annals of Internal Medicine 99:169-171.