

## Aislamiento de vibrios enteropatógenos de bivalvos y cieno del Golfo de Nicoya, Costa Rica

Vera García Cortés y Florencia Antillón G.

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

(Rec. 5-III-1990. Acep. 17-VII-1990)

**Abstract:** The presence of enteropathogenic *Vibrio* was evaluated in 36 sediment samples and 41 bivalve samples obtained from 3 collecting sites in the Golfo de Nicoya, Costa Rica. Isolation methods for halophilic and non halophilic *Vibrio* were used. The biochemical profiles of the strains obtained revealed the presence of the following isolates: 224 *Vibrio parahaemolyticus*, 3 *V. furnissii*, 1 *V. damsela* and 3 *V. fluvialis*. *V. cholerae* was not isolated, due principally to the use of TCBS agar

**Key words:** enteropathogenic *Vibrio*, bivalves, sediment,

Cuando en 1961 se presentó la séptima pandemia de cólera, todavía el estudio de los vibrios patógenos se centraba en el *Vibrio cholerae*, causante del cólera asiático. Todos los demás miembros de este género eran considerados como "vibrios no cólera" y, por lo tanto, de escasa importancia médica (Blake, Weaver & Hollis 1980). Posteriormente, el aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* en Japón a partir de casos de gastroenteritis (Sakazaki, Iwanami & Fukumi 1963), estimuló el interés por el estudio de estos organismos.

Recientemente se ha acumulado evidencia que indica que varias especies de *Vibrio* pueden ser responsables de casos esporádicos y de brotes de enteritis, por ejemplo *Vibrio vulnificus*, *V. hollisae*, *V. fluvialis*, *V. damsela*, *V. furnissii*, *V. mimicus* y *V. cholerae* no-01 (Blake, Weaver & Hollis 1980, Morris *et al.* 1982, Organización Mundial de la Salud 1980, Brenner *et al.* 1983 & Black 1985, Bradford, Smith & Brenner 1981, Huq 1986, Shandera *et al.* 1983).

Estos organismos se encuentran generalmente en ambientes marinos y en esteros, lo que puede afectar la calidad sanitaria de productos de este origen, que son consumidos por el hombre. Los alimentos más frecuentemente incrimi-

nados en este caso son los bivalvos debido a su mecanismo de alimentación, caracterizado por la filtración y captura de nutrimentos del agua, lo que propicia la retención de microorganismos en sus cuerpos. Existen pocos datos en Costa Rica de la presencia de *Vibrio* en las aguas costeras (García, Antillón & González 1986, Araya & García 1988), por lo que el propósito de este trabajo fue recabar información sobre la incidencia de vibrios enteropatógenos en bivalvos y cieno del Golfo de Nicoya.

### MATERIAL Y METODOS

**Muestreo:** Las muestras se obtuvieron durante los meses comprendidos entre noviembre de 1985 y octubre de 1987, de tres estaciones de muestreo localizadas en el Golfo de Nicoya, Costa Rica: Jicaral (85° 7.1' W; 9° 58.5' N), Lepanto (85° 2.1' W; 9° 57.7' N) y Puntarenas (84° 50.6' W; 9° 59.4' N).

Cada punto se muestreó en 12 oportunidades. Se obtuvo un total de 36 muestras de cieno y 41 de bivalvos, desglosadas por especie, así: 14 muestras de *Anadara tuberculosa*, ocho de *Tagellus peruvianus*, ocho de *Dosinia dunkeri* y 11 de *Anadara similis*.

Las muestras de cieno de aproximadamente 500 g cada una, se recogieron en recipientes de vidrio estériles. Las muestras de bivalvos consistieron en alrededor de 25 ejemplares vivos (todos de una misma especie), los cuales fueron depositados en bolsas plásticas estériles. Todo el mate-

rial se colocó de inmediato sobre hielo y no más de ocho horas después se le comenzó a procesar.

**Análisis bacteriológico:** Siguiendo las indicaciones de Hunt *et al.* (1984), los bivalvos se lavaron escrupulosamente con agua y cepillo, se pusieron a secar sobre toallas de papel, se abrieron con ayuda de un cuchillo estéril y el contenido de cada uno se vertió en una jarra de licuadora estéril hasta alcanzar un peso entre 100 y 200 g. A esta muestra, se adicionó agua peptonada al 0.5% para obtener una dilución 1:4 al homogenizarlo durante 70 segundos.

Del cieno sin diluir y de la dilución 1:4 de los bivalvos, se rayaron directamente platos de agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) y de agar gelatina (AG) y ambos se incubaron a 37°C por 24 horas.

Las muestras, además, se sometieron a enriquecimiento para vibrios halofílicos y no halofílicos de la siguiente manera:

- 225 ml de agua peptonada alcalina pH 8.4 + 25 g de cieno.
- 225 ml de agua peptonada alcalina pH 8.4 con 3% NaCl + 25 g de cieno.
- 150 ml de agua peptonada alcalina ajustada para dar una concentración final de 1% de NaCl + 100 ml de la dilución 1:4 de bivalvos; el pH se llevó a 8.4 con NaOH 0.1 N estéril.
- 150 ml de agua peptonada alcalina ajustada para dar una concentración final de 3% de NaCl + 100 ml de la dilución 1:4 bivalvos; el pH se llevó a 8.4 con NaOH 0.1 N estéril.

Después de una incubación de estos medios a 37°C por 10-12 horas se procedió así:

- A partir de la película formada en los medios de enriquecimiento para no halofílicos se rayó un plato de agar TCBS y otro de AG los cuales se incubaron a 37°C por 24 horas.
- De los medios de enriquecimiento con 3% de sal se pasaron 10 ml de la parte superior a 100 ml de caldo glucosa-sal-teepol (GSTB) y simultáneamente se rayó un plato de agar marino. Todo se incubó a 37°C por 24 horas.
- Se rayó del GSTB a un plato de TCBS el cual se incubó a 37°C por 24 horas.

Después de la incubación de los platos de los diferentes medios de cultivo, se seleccionaron aquellas colonias que por sus características parecieran ser del género *Vibrio* y se sembraron en agar Kligler (AK). Posteriormente, y previo a la identificación, se purificaron en agar tripticosa soya con 0.5% de extracto de levadura.

Para la identificación se procedió a realizar primeramente la prueba de oxidasa (Kovacs). Los organismos oxidasa negativos se descartaron y el resto se identificaron utilizando las siguientes pruebas: tinción de Gram, catalasa, movilidad, descarboxilasas de lisina y ornitina, dihidrolasa de arginina, hidrólisis de la esulina y de la gelatina, fermentación de la glucosa, inositol, manitol, salicina, arabinosa, lactosa, sacarosa, manosa y celobiosa, producción de indol, reducción de nitratos, reacciones de Voges Proskauer y rojo de metilo y crecimiento en 0, 3, 6 y 10 g % de NaCl (Farmer *et al.* 1985, Bauman *et al.* 1984, Twedt 1984). Todas las pruebas para los vibrios halofílicos se hicieron en medios de cultivo a los que se les agregó 3% de NaCl.

A las cepas sospechosas de ser *Vibrio cholerae* se les realizó pruebas de aglutinación con los antiseros polivalente (Hikojima, Inaba, Ogawa) y Ogawa e Inaba de la casa Difco. Como control para la identificación de *V. cholerae* se utilizó una cepa tipo enviada por J. Vandepite de la Universidad de Ziekenhuis, Bélgica.

## RESULTADOS Y DISCUSION

De las 77 muestras de cieno y bivalvos se obtuvo, en la primera etapa, 341 cepas sospechosas de ser *Vibrio*, aisladas de los medios para halofílicos (3% NaCl). De estas cepas se logró identificar 231, de las cuales 224 eran *V. parahaemolyticus*, y provenían de 15 muestras de bivalvos y de 22 de cieno; tres resultaron ser *V. furnissii*, provenientes de una muestra de bivalvos y dos de cieno; tres eran *V. fluvialis* provenientes de dos muestras de bivalvos y una de cieno. *V. damsela* se identificó a partir de 1 muestra de cieno (Cuadro 1).

Desde el punto de vista sanitario estos resultados son importantes, puesto que se demuestra el papel de "reservorio natural" que juegan los bivalvos, lo que favorece la diseminación de estos microorganismos capaces de producir enfermedad en el hombre (Blake *et al.* 1980, Huq 1986). En el aspecto ecológico, se confirma una vez más que los vibrios son miembros autóctonos del ambiente marino y se informan por primera vez en el Golfo de Nicoya, *V. furnissii*, *V. fluvialis* y *V. damsela*.

La búsqueda de *Vibrio cholerae* 01 y no -01 fue intensa, sin embargo, no se les logró aislar. Originalmente se aislaron 465 cepas sospechosas de ser vibrios no halofílicos, de las cuales ninguna confirmó como *V. cholerae* o *V. mimicus*. La mayoría de las cepas, especialmente las provenientes del medio de enriquecimiento, resultaron ser halofílicas por lo que se descartaron. En las placas que se rayaron directamente se presentaron colonias sospechosas (con halo de precipitado en el agar AG, y sacarosa positivas en el TCBS); sin embargo, las pruebas bioquímicas y serológicas no confirmaron la presencia de *V. cholerae*. Un porcentaje alto de las cepas fue identificado como *Aeromonas* sp.

El problema fundamental por el cual fue difícil aislar los *Vibrio* enteropatógenos no halofílicos fue el comportamiento del agar TCBS, el cual permitió el sobrecrecimiento de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*. Al respecto, Kaysner *et al.* (1987) notaron que al usar agar

## CUADRO I

*Especies de Vibrio enteropatógenos aislados de 77 muestras de bivalvos y cieno del Golfo de Nicoya, Costa Rica*

Estación de Muestreo	Origen	No. de Muestras	Especie de Vibrio							
			V. parahaemolyticus		V. furnissii		V. damsela		V. fluvialis	
			No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Lepanto	Cieno	12	10	83.3	1	8.3	1	8.3	-	-
	Bivalvos	14	7	50.0	-	-	-	-	-	-
Jicaral	Cieno	12	6	50.0	1	8.3	-	-	1	8.3
	Bivalvos	11	3	27.3	1	9.1	-	-	2	18.2
Puntarenas	Cieno	12	6	50.0	-	-	-	-	-	-
	Bivalvos	16	5	31.3	-	-	-	-	-	-
TOTAL		77	37	48.1	3	3.9	1	1.3	3	3.9

TCBS para aislar *V. cholerae* de muestras provenientes de zonas donde la temperatura del agua era alta (*i.e.* el sur de California), el número de contaminantes era mayor, así como también era más diversa la microflora de la familia Vibrionaceae. De lo anterior concluyeron que estas especies pueden haber enmascarado la presencia de *V. cholerae* debido a su abundancia y similitud en morfología colonial. Recientemente Massad & Oliver (1987) establecieron que el TCBS no es un medio adecuado para el aislamiento de *V. cholerae* y proponen un nuevo medio para este fin (agar celobiosa-polimixina B-colistina). Por lo anterior, no se descarta la posibilidad de aislamiento de *V. cholerae* del Golfo de Nicoya y se recomienda realizar otro estudio tomando en cuenta el desarrollo de nuevos medios de cultivo.

## AGRADECIMIENTO

Las muestras que se utilizaron en este estudio fueron colectadas como parte de las actividades del proyecto "Estudio de la Contaminación Microbiana e Infección Parasitaria de Interés Sanitario en Moluscos Bivalvos de Importancia Comercial", ejecutado por personal del Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad de Costa Rica y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas.

El proyecto específico fue financiado por la

Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (N° 430-87-038).

## RESUMEN

Se evaluó la presencia de vibrios enteropatógenos en 36 muestras de cieno y 41 de bivalvos procedentes de tres estaciones de muestreo localizadas en el Golfo de Nicoya, Costa Rica, durante los meses comprendidos entre noviembre de 1985 y octubre de 1987. Se utilizaron métodos de aislamiento para vibrios halofílicos y no halofílicos. Se identificaron 224 *Vibrio parahaemolyticus*, provenientes de 15 muestras de bivalvos y 22 de cieno. *V. furnissii* se aisló de una muestra de bivalvos y dos de cieno; *V. damsela* de una muestra de cieno y *V. fluvialis* de dos muestras de bivalvos y una de cieno. No se logró identificar *V. cholerae*.

## REFERENCIAS

- Araya, G. & V. García. 1988. Estudio bacteriológico del bivalvo *Anadara tuberculosa* del estero de Puntarenas, Costa Rica. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 30(3).
- Baumann, P., A. L. Furniss & J. V. Lee. 1984. Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411AL, p. 518-538. In N. R. Krieg & J. G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Blake, P. A., R. E. Weaver & D. C. Hollis. 1980. Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:341-367.

- Bradford, H. B. Jr. H. L. Smith Jr., & D. J. Brenner. 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. J. Clin. Microbiol. 14:631-639.
- Brenner, D. J., F. W. Hickman-Brenner, J. V. Lee, A. G. Steigerwalt, G. R. Fanning, D. G. Hollis, J. J. Farmer III, R. E. Weaver, S. W. Joseph & R. J. Seidler. 1983. *Vibrio furnissii* formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*, a new species isolated from human feces and the environment. J. Clin. Microbiol. Vol. 18 (4):816-824.
- Farmer, J. J. III, F. W. Hickman-Brenner & M. T. Kelly. 1985. *Vibrio*. p. 282-301. In E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler Jr. & H. J. Shadomy (eds.). Manual of Clinical Microbiology. Fourth ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- García, V., F. Antillón & L. González. 1986. Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* en Corvina (*Cynoscion squamipennis*) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. Rev. Latinoamer. Microbiol. 28:85-88.
- Hunt, D., J. Miescier, J. Redman, A. Salinger & J. Lucas. 1984. Molluscan shellfish, fresh or freshfrozen oysters, mussels, or clams, p. 590-607. In M. Speck (ed.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Second ed. American Public Health Association, Washington, D. C.
- Huq, A. 1986. Vibrios in abundance: a growing genus. J. Diarrhoeal Dis. Res 4 (4):209-210.
- Kaysner, C. A., C. Abeyta Jr., M. M. Wekell, A. De la Paola Jr., P. F. Stott & J. M. Leitch. 1987. Incidence of *Vibrio cholerae* from estuaries of the United States West Coast. Appl. Environ. Microb. Vol. 53 (6):1344-1348.
- Massad, G. & J. D. Oliver. 1987. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microb. Vol. 53 (9):2262-2264.
- Morris, J. G. Jr. & R. E. Black. 1985. Cholera and other vibrios in the United States. N. Engl. J. Med. 312:343-350.
- Morris, J. G., R. Wilson, D. G. Hollis, R. E. Weaver, H. G. Miller, C. O. Tacket, F. W. Hickman & P. A. Blake. Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. Lancet, 8284:1294-1297.
- Sakazaki, R., S. Iwanami & H. Fukumi. 1963. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position. Jap. J. Med. Sci. Biol. 16:161-168.
- Shandera, W. X., J. M. Johnston, B. R. Davis & P. A. Blake. 1983. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. Ann. Intern. Med. 99:161-171.
- Twedt, R. M. 1984. Recovery of *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios p. 12.01-12.08 In Bacteriological Analytical Manual. Sixth ed. Food and Drug Administration, Washington, D. C.
- World Health Organization. Cholera and other *Vibrio* associated diarrhoeas: report of a sub-group of the Scientific Working Group on epidemiology and etiology. Geneva, 24-24 September 1979, 1980.