

Vibrios patógenos no coléricos

Drs. Francisco C. Herrera*, Montserrat Esteve M Sc**

RESUMEN

Actualmente se conocen 12 especies patógenas no coléricas del género *Vibrio*. Estas especies además de ser patógenas para el humano infectan peces y camarones tanto silvestres como cultivados. Tres especies tienen importancia clínica. El *Vibrio vulnificus* es el más agresivo causando gastroenteritis, infecciones invasivas de heridas contaminadas y septicemias frecuentemente mortales. El *V. parahaemolyticus* produce diarreas coleriformes autolimitadas. El *V. alginolyticus* causa conjuntivitis e invade heridas expuestas al agua de mar o especies marinas. Estas patologías afectan los bañistas y criadores y consumidores de productos alimenticios marinos. Ante cualquier paciente recientemente expuesto a agua de mar o que haya manipulado o consumido especies marinas que presente heridas con infecciones invasivas, septicemia, conjuntivitis o gastroenteritis debe tenerse en cuenta la posibilidad de la infección por vibrios no coléricos. La hematoxilina y eosina no colorea estos vibrios en los tejidos de sus reservorios naturales y animales afectados. En este trabajo se describen dos técnicas de coloración que detectan al *V. Alginolyticus*, representante de las especies patógenas, en el hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*, un camarón de importancia comercial que puede servir de reservorio natural. Las técnicas son modificaciones apropiadas de la coloración Murray-Drew y la hematoxilina férrica. En el *Litopenaeus vannamei* las dos coloraciones muestran un vibrio como cocobacilos cortos y gruesos libres en el medio intersticial o englobados dentro de macrófagos aislados o agrupados en cúmulos en el tejido conjuntivo subcapsular e intertubular edematizado del hepatopáncreas del camarón.

Palabras clave: *Vibrio*. Especies marinas. Sepsis.

*Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 21827, Caracas 1020, Venezuela.

**Universidad de Oriente, Apartado Postal 621, Porlamar 6301, Margarita, Venezuela.

Presentado en la Academia Nacional de Medicina en la Sesión del 15 de marzo de 2001.

SUMMARY

The genus *Vibrio* includes some 30 species, 12 of which are human, shrimp and fish pathogens. Three species are of clinical interest. *Vibrio vulnificus* is the most aggressive causing gastroenteritis, invasive wound infections and frequently lethal septicemia. *V. parahaemolyticus* causes self-limited choleraform diarrhea. *V. alginolyticus* may cause conjunctivitis and invades wounds exposed to seawater or marine species. Shrimp farming and seafood ingestion and exposure to contaminated seawater are potentially dangerous. The possibility of vibrio invasion should be considered in any case of gastroenteritis, conjunctivitis, invasive wound infection or septicemia in patients exposed to seawater or marine species.

The hematoxylin and eosin technique does not reveal the vibrios in infected tissues of their natural hosts. Two techniques which detect the presence of *V. alginolyticus*, a representative pathogenic species, in the hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*, a commercial shrimp and natural reservoir, are described. These techniques are modification of the Murray-Drew and ferric hematoxylin methods. In *L. vannamei* hepatopancreata stained by either method, *V. alginolyticus* appeared as cocci or short, stumpy bacilli free in the interstitial medium or in the cytoplasm of isolated or clumped macrophagic cells located in the edematous subcapsular or intertubular connective tissue.

Key words: *Vibrio*. Marine species. Sepsis.

INTRODUCCIÓN

El género *Vibrio* incluye 30 o más especies marinas o estuarinas, 12 de las cuales (*Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. hollisae*, *V. metchnikovi*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*) son potencialmente patógenas para el ser humano. El *V. cholera* pro-

duce el cólera clásico y *V. parahaemolyticus* produce gastroenteritis y posible infecciones extra-intestinales. Las otras especies causan infecciones de oídos, conjuntiva, heridas, tejidos blandos y otros sitios extraintestinales (1).

El género *Vibrio* exhibe ciertas características comunes a todos sus miembros: son bastones gramnegativos, aeróbicos y anaeróbicos facultivos, móviles mediante un flagelo polar. La mayor parte es halófila o sea que requiere NaCl para su crecimiento y muchas especies toleran concentraciones de 6-8% o más (el doble o más de la concentración de sal en el agua de mar). Todas las especies de importancia médica pueden ser cultivadas en medios con 1% o más de NaCl (2).

El *V. vulnificus* un agente patógeno oportunista (3) causa cuadros extraintestinales especialmente graves y causa tres formas de enfermedad humana:

Diarrea aguda autolimitada que sigue a la ingestión de ostras crudas.

Infección de heridas con eritema, tumefacción y ampollas de contenido hemorrágico (4). Las personas afectadas han tenido contacto con agua de mar o han manipulado mariscos.

Septicemia primaria con malestar general, fiebre, escalofríos y postración. Esta forma está asociada a la ingestión de ostras crudas. Estos pacientes pueden presentar lesiones metastásicas cutáneas que evolucionan hacia la celulitis necrosante con extensas lesiones que pueden exigir la amputación y pueden terminar en la muerte (5).

El período de incubación de todas las formas es de aproximadamente 18 horas.

Los mariscos son susceptibles a infecciones por estas especies de modo que constituyen reservorios naturales y agentes vectores (1).

El *Vibrio parahaemolyticus* es el causante más frecuente de diarreas estivales en Japón. Están asociadas a la ingestión de alimentos marinos crudos o cocidos pero contaminados posteriormente por algas usadas para su adorno (como el sushi que se ha popularizado en nuestro país). El cuadro clínico está caracterizado por una diarrea explosiva y acuosa que puede persistir durante 10 días.

El *Vibrio alginolyticus* (6) y el *V. anguillarum* (7) son dos especies altamente patógenas para peces y camarones. El primero es muy común en los cultivos de camarones y es patógeno para el ser humano (8). Ha sido implicado como agente

etiológico de conjuntivitis (9). Es posible que con la extensión de los cultivos de camarones aparezcan, con cierta frecuencia, casos humanos (8). El *V. anguillarum* no se ha incluido entre los vibrios considerados patógenos para el ser humano. Sin embargo, no debe descartarse *a priori* por ser frecuentes las infecciones causadas por este vibrio en peces cultivados. Debido a la ubicuidad de estas especies de *Vibrio* en animales con potencial económico y su posible transmisión al hombre, sería útil su demostración en tejidos de los posibles reservorios y vectores. Por tanto, es importante detectar la presencia de estos vibrios en especies marinas, tanto cultivadas como silvestres, empleadas en la alimentación humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon especímenes machos de la especie *Litopenaeus vannamei* obtenidos de los estanques de una camaronera comercial. Se aclimataron a las condiciones de laboratorio (35‰S, 25 ± 1°C, pH= 8,2) durante 3 días. Se les infectó mediante la técnica de inmersión (10) exponiéndolos a una concentración de 5,2x10⁷ bacterias/ml. Al presentar síntomas agónicos, se separó el cefalotórax del abdomen y por compresión del primero, se extrajo el hepatopáncreas. Basados en métodos publicados anteriormente (11), desarrollaron dos métodos de coloración: una modificación de la técnica Murray-Drew y una técnica de hematoxilina férrica apropiada para vibrios en tejidos.

La técnica de Murray-Drew modificada se presenta a continuación:

Se fijan los hepatopáncreas en Bouin. Se enjuagan en etanol al 70%, se deshidratan en una serie creciente de alcoholes, se aclaran en xilol y se incluyen en parafina. Se cortan a 3µ y se procede a su coloración.

1. Desparafinar con xilol.
2. Lavar en isopropanol 100% (puede ser con frasco gotero).
3. Agua destilada.
4. Colorear en sulfato de Azul de Nilo 1% en agua destilada de 4-24h.
5. Lavar en agua destilada con frasco lavador hasta que el agua de los lavados tenga un color azul claro. Escurrir exceso de agua y secar cuidadosamente con papel de filtro.
6. Lavar en isopropanol 100% con frasco gotero.

7. Xilol (frasco gotero).
8. Dejar caer sobre los cortes, mediante un gotero, suficiente esencia de clavos para cubrirlos. Dejar la esencia de clavos en contacto con los cortes durante 2 min. Enjuagar con xilol (frasco gotero).
9. Isopropanol 100% (frasco gotero).
10. Picrofucsina de Van Gieson 15 min.
11. Isopropanol 100% (frasco gotero).
12. Orange G saturado en etanol 2 min.
13. Isopropanol (frasco gotero).
14. Xilol
15. Montar en Permout o resina similar.

Nota: el colágeno de crustáceos no toma la fucsina ácida del van Gieson.

El método de hematoxilina férrica modificado para vibrios en hepatopáncreas se presenta a continuación:

La fijación, deshidratación e inclusión en parafina es igual al método anterior.

1. Cortes de 3 micras.
2. Desparafinar en xilol.
3. Alcohol isopropílico 100%.
4. Agua destilada.
5. Alumbre férrico 2% en agua destilada varias horas (6-8h); mientras más tiempo en el alumbre, más negra la coloración; a menor tiempo, más azul.
6. Agua destilada, 5 minutos.
7. Hematoxilina:
Disolver 250 mg de hematoxilina en 5 ml de etanol. Añadir 45 ml de agua destilada. Para maduración instantánea de la hematoxilina, añadir 10 mg de iodato de sodio.
8. Colorear varias horas (igual o más que la duración de la inmersión en alumbre de hierro al 2%).
9. Enjuagar en agua destilada.
10. Decolorar en ácido pícrico saturado en agua destilada (minutos). Controlar al microscopio previo enjuague la lámina en agua destilada. En general los cortes se ven muy oscuros al microscopio por el bajo índice de refracción del agua y hay que tener cuidado de no extraer demasiado la hematoxilina. Ensayar con 15-30 min. Si muy oscura la coloración, regresar al ácido pícrico (segundos).

11. Enjuagar en agua destilada.
12. Enjuagar en agua de chorro corriente durante 5 minutos.
13. Alcohol isopropílico 100%
14. Orange G saturado en etanol (minutos). El Orange G no sobrecolorea (ventaja sobre la eosina).
15. Alcohol isopropílico 100%. Xilol. Permout.

RESULTADOS

La estructura normal del hepatopáncreas en tejidos control ya ha sido descrita anteriormente (6). En el presente trabajo se procederá a describir los resultados de la coloración, demostrar la presencia de los vibrios en el tejido hepatopancreático y los trastornos histopatológicos que causan.

Mediante los métodos de coloración presentados se observan claramente los vibrios como cocos o bacilos cortos en su mayoría englobados por células macrofágicas o libres en el medio intersticial. Las células macrofágicas repletas de vibrios, aisladas o agrupadas en cúmulos, están localizadas preferentemente en el tejido conjuntivo subcapsular (Figura 1) o en las zonas más periféricas del conjuntivo intertubular (Figura 2). El tejido conjuntivo se observa edematizado. Las células macrofágicas parecen digerir los vibrios ya que se encuentran bacterias en diversos estados de degradación. En unos macrófagos los vibrios se observan bien coloreados con su forma cocobacilar (Figura 2) y en otros se ven poco coloreados y de talla menor (Figura 3). En esta Figura se observan vibrios libres en el medio intersticial. En la Figura 4 se observan numerosos vibrios en el medio intersticial y dos macrófagos adosados, individualizables por sus núcleos, repletos de bacterias. Los túbulos pierden sus células parietales las cuales se observan edematizadas con núcleos picnóticos. Las proporciones proximales de los túbulos muestran mayores alteraciones que las regiones distales, próximas a la cápsula, cuyas células conservaban su forma cilíndrica y menos vacuolizadas que las de la zona central donde predominaba la citólisis (6). La luz tubular pierde su forma estrellada normal y la luz tubular se llena de restos celulares. Los cortes de las Figuras 1-3 han sido coloreados mediante el Murray-Drew modificado; el corte de la Figura 4 ha sido coloreado con hematoxilina férrica. Ambos métodos revelan claramente los vibrios.

VIBRIOS PATÓGENOS

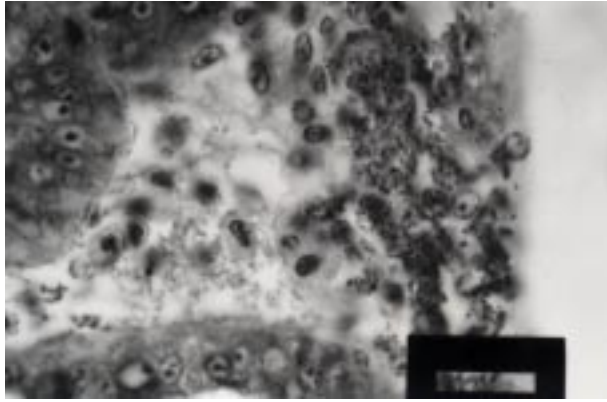


Figura 1. Cápsula y tejido conjuntivo subcapsular del hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio alginolyticus*. Se observa el tejido conjuntivo edematizado, abundantes células mononucleadas posibles precursoras de los macrófagos llenos de bacterias que se observan en la zona subcapsular del conjuntivo. En la parte superior izquierda y en el borde inferior se observan parte de tres acinos o túbulos glandulares. Coloración Murray-Drew modificada. La longitud del segmento claro dentro del recuadro negro corresponde a 20 μm .

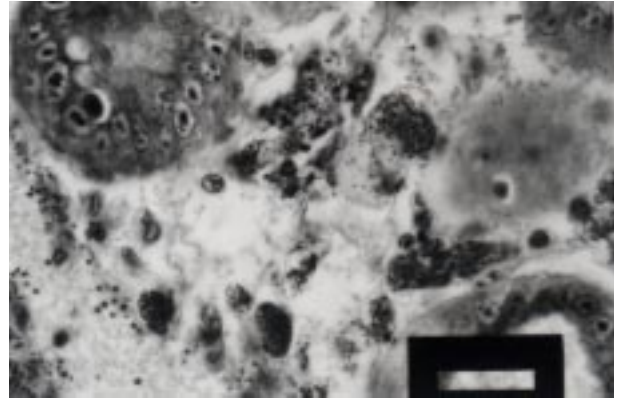


Figura 3. Abundantes vibrios libres en el tejido conjuntivo intertubular el cual está edematoso. Numerosos macrófagos repletos de vibrios. Los acinos han perdido su estructura normal. En la esquina superior izquierda se observa un acino que muestra dos núcleos aparentemente picnóticos. A la derecha se observan restos de un acino que exhibe una célula edematosa con un núcleo picnótico. Coloración Murray-Drew modificada. La longitud del segmento claro dentro del recuadro equivale a 20 μm .

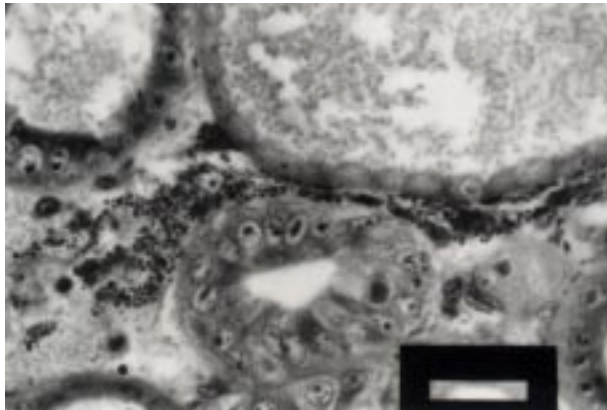


Figura 2. Conjuntivo intertubular invadido por vibrios aparentemente libres o englobados en macrófagos. Los acinos están bastante bien conservados. Hacia la parte superior de la fotografía se observan dos acinos distendidos por su contenido intratubular. Coloración de Murray-Drew modificada. La longitud del segmento claro dentro del recuadro corresponde a 20 μm .

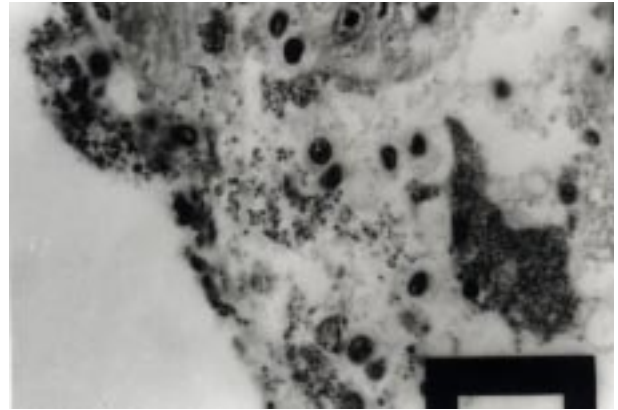


Figura 4. Corte coloreado con hematoxilina férrica-Orange G. Se observan vibrios libres en el medio intersticial y dos macrófagos adosados que se individualizan por sus dos núcleos rechazados hacia la periferia por la presencia de gran cantidad de vibrios intracelulares. Este método no parece colorear los vibrios tan intensamente como el Murray-Drew modificada. La longitud el segmento claro dentro del recuadro equivale a 20 μm .

DISCUSIÓN

Ha sido necesario desarrollar estos métodos de coloración ya que con la coloración ordinaria de hematoxilina y eosina no se puede discernir las bacterias en el tejido hepatopancreático debido a que no toman la coloración.

Aunque los dos métodos demuestran la presencia de vibriones en el tejido, la modificación del Murray-Drew parece ser más fácil de manejar porque no requiere la delicada diferenciación de la hematoxilina férrica. No obstante debe tomarse en cuenta el costo de la esencia de clavos que encarecería el procedimiento.

Con la popularización del consumo de mariscos poco cocidos y provenientes de cultivos de camarones donde es común el *vibrio*, es necesario detectar la presencia de las cepas patógenas para controlar las posibles manifestaciones patológicas en manipuladores y criadores de camarones. Aunque hasta el presente no parece haberse desarrollado un problema sanitario, es posible que así ocurra en el futuro.

La especie de *vibrio* estudiada en el presente trabajo, el *Vibrio alginolyticus*, no parece ser de la patogenicidad del *V. vulnificus*. Sin embargo, es muy posible que esta última ya exista o sea introducida al país. Por otra parte el *V. parahaemolyticus* causa diarreas explosivas que se originan por infecciones de los mariscos. Estas coloraciones permitirían detectar la presencia de estos agentes patógenos en los cultivos comerciales antes de que causen una epizootia grave con su consecuente transmisión al ser humano.

En conclusión, el facultativo debe tener en cuenta estos agentes patógenos ante cualquier paciente expuesto al agua de mar o que haya manipulado o consumido especies marinas que presente heridas con manifestaciones de infecciones invasivas con sepsis generalizada o sin ella, conjuntivitis o gastroenteritis.

REFERENCIAS

1. Horr  R, Marklein G, Schaal KP. *Vibrio vulnificus*, an emerging human pathogen. *Zbl Bakt* 1996;284:273-284.
2. Zwadyk P. Vibrionaceae. En: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM, editores. *Zinsser Microbiolog a*. Buenos Aires: Editorial M dica Panamericana; 1994.p.772-784.
3. Amaro C, Biosca EG. *Vibro vulnificus* Biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:1454-1457.
4. Miyoshi S-I, Nakazawa H, Kawamata K, Tomochika K-I, Kazuo T, Shinoda S. Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. *Infect Immun* 1998;66:4851-4855.
5. Lamaury I, Bouregba M, Mahe A, Jarrige B, Perez JM, Daijardin JB, Strobel M. Septic mie primitive   *Vibrio vulnificus*. *Presse Med* 1997;26:316-318.
6. Esteve M, Herrera FC. Hepatopancreatic alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1939) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) experimentally infected with a *Vibrio alginolyticus* strain. *J Invertebr Pathol* 2000;76:1-5.
7. O'Toole R, Milton DL, Wolf-Watz H. Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Mol Microbiol* 1996;19:625-637.
8. Blake PA, Weaver RE, Hollis DG. Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Ann Rev Microbiol* 1980;34:341-367.
9. Penland RL, Boniuk M, Wilhelmus KR. *Vibrio* ocular infections on the U.S. Gulf Coast. *Cornea* 2000;19:26-29.
10. Esteve M, Quijada R. Evaluation of three experimental infection techniques with *Vibrio anguillarum* in *Penaeus brasiliensis* Latreille, 1817. En: Calder n J, Sorgeloos P, editores. *Memorias II Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*; Guayaquil; 1995.p.205-208.
11. Gurr E. *Stainig Animal tissues: Practical and theoretical*. London: Leonard Hill; 1962.
12. Fern ndez CR, Pankey GA. Tissue invasion by unnamed marine vibrios. *JAMA* 1975;233:1173-1176.