



Control de Calidad SEIMC Diagnóstico de las infecciones humanas causadas por especies halófilas del género *Vibrio*

Isabel M^a García Bermejo
Servicio de Microbiología, Hospital de Getafe

INTRODUCCIÓN

La familia *Vibrionaceae* está constituida por bacilos gramnegativos móviles o inmóviles y clásicamente se incluyen en ella tres géneros de interés clínico: *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*.

Gran parte de las bacterias que componen esta familia son exigentes en cloruro sódico y, desde un punto de vista práctico, se pueden diferenciar dos grupos: especies halotolerantes capaces de crecer en agua de peptona sin adición de NaCl y especies halófilas incapaces de crecer en ausencia de sal marina.

GÉNERO *Vibrio*

El género *Vibrio* está compuesto por microorganismos cuyo hábitat natural son los ecosistemas marinos y fluviales. Son bacterias móviles, crecen en agar nutritivo incubadas a 35°C en atmósfera aerobia y anaerobia y fermentan la glucosa. Pueden presentar una morfología curvada característica, producen catalasa y son sensibles al compuesto vibriostático O/129 (2,4 diamino-6,7 diisopropilpteridina).

Una particularidad de todas las especies de este género es su dependencia del ion sodio, incluso de aquellas capaces de crecer en agua de peptona carente de sal. Este catión estimula su crecimiento y favorece la rapidez del mismo. El requerimiento de sodio es específico e independiente de una función osmótica, dado que es difícilmente reemplazado por cantidades equimoleculares de otros cationes monovalentes. El Na⁺ actúa sobre los sistemas de permeasas existentes en la bacteria permitiendo la entrada de sustratos exógenos. No obstante, se puede sustituir NaCl por KCl dentro de ciertos límites.

El género *Vibrio* contiene más de 34 especies, 12 son patógenas para el hombre o han sido aisladas en muestras clínicas y, de éstas, 10 se consideran halófilas. Las especies halófilas requieren para su crecimiento óptimo una concentración de NaCl no inferior al 1%, aunque una concentración de 0,5% permite el aislamiento de las mismas. Se aíslan con frecuencia de aguas costeras templadas y tropicales, especialmente en meses cálidos, cuando la temperatura del agua es superior a 17°C. El reservorio de estos microorganismos lo constituyen las aguas donde habitan y los alimentos de origen marino o contaminados con agua de mar.

La mayor parte de los vibrios halófilos se asocian a infecciones del tracto gastrointestinal aunque también se ha descrito su implicación en patología extraintestinal, causando bacteriemia, otitis, conjuntivitis e infecciones de tejidos blandos entre otras. En la tabla 1 se muestran las especies del género *Vibrio* asociadas a las principales muestras clínicas en donde son aisladas.

Las principales especies designadas como agentes etiológicos de gastroenteritis son *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. vulnificus*. El periodo de incubación y las manifestaciones clínicas pueden ser similares e indistinguibles de las ocasionadas por otros enteropatógenos, por lo que estos microorganismos deben ser incluidos en el diagnóstico diferencial de la diarrea aguda asociada al consumo de alimentos y de la diarrea del viajero.

V. vulnificus es la especie que causa bacteriemia con mayor frecuencia, especialmente en pacientes con enfermedades hepáticas y en inmunodeprimidos. La mortalidad en el caso de septicemia es superior al 50%. Otras especies halófilas aisladas en sangre se relacionan igualmente con una patología de base y con el consumo de alimentos de origen marino o infecciones de herida.

Las infecciones de oído debidas a *V. alginolyticus* ocurren preferentemente en pacientes con factores predisponentes, como son la existencia de perforación en la membrana timpánica o de otitis media crónica.

Tabla 1. Especies del género *Vibrio* aisladas en muestras clínicas.

Especies	Tipo de muestra ^a				
	Heces	Ex. herida	Ex. oído	Espuito	Sangre
<i>V. cholerae</i> O1 ^b	+++				
<i>V. cholerae</i> no O1 ^b	+++	++	+		+
<i>V. mimicus</i> ^b	++		+		
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	++	++		+
<i>V. alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	+
<i>V. vulnificus</i>	(+)	++		(+)	++

V. fluvialis	++				
V. hollisae	++				+
V. cincinnatiensis					+
V. furnisii	(+)				
V. damsela		++			+
V. metschnikovii	(+)				+
V. carchariae		++			

^aSimbolos: +++, descrito frecuentemente; ++, menos común; +, raro; (+), no establecido

^bEspecies no halófilas

Aislamiento de las especies halófilas del género *Vibrio*

Las especies halófilas del género *Vibrio* crecen en agar sangre, agar McConkey, caldo cerebro-corazón (BHI) y en medio de triptosa soja, pero su comportamiento en los medios utilizados habitualmente para el aislamiento de patógenos entéricos es imprevisible. Su aislamiento se facilita en medios selectivos que inhiben o retardan el crecimiento de otros microorganismos. El más empleado es el agar tiosulfato-citrato-sacarosa con sales biliares (TCBS), el cual permite diferenciar la especie que fermenta la sacarosa (amarilla) de la que no posee esta capacidad (verde). Sin embargo, *V. hollisae* crece con dificultad en este medio e incluso es inhibido en él.

La utilización del agar TCBS puede presentar algún problema, debido a las variaciones de calidad encontradas entre los diferentes medios comercializados y entre lotes distintos del mismo fabricante. Algunos de ellos pueden ser muy inhibidores, por lo que es importante realizar un control de calidad de cada lote.

Respecto a los medios de enriquecimiento, el más asequible es el agua de peptona alcalina (pH 8,5) con adición de 1% de NaCl, pudiendo ser utilizada igualmente como medio de transporte.

Las muestras de heces deben recogerse al comienzo del cuadro clínico y antes de instaurar el tratamiento antibiótico. Si requieren ser transportadas o si el tiempo transcurrido entre su recogida y procesamiento es superior al establecido, se puede utilizar el medio de Cary-Blair porque la solución de glicerol tamponado no es adecuada, debido a que el glicerol es tóxico para los vibrios. Las muestras rectales recogidas con hisopo son válidas en la fase aguda de la enfermedad, pero carecen de utilidad en personas convalecientes, portadores o en pacientes que han recibido tratamiento antimicrobiano correcto, ya que en estos casos el número de vibrios es escaso. En las situaciones anteriores puede ser recomendable la utilización de medios de enriquecimiento. La muestra se inoculará en un volumen no inferior a 20 ml de agua de peptona alcalina con 1% de NaCl, con incubación durante 5-6 horas a 35°C y subcultivo posterior en agar TCBS.

Dada la baja incidencia de gastroenteritis por vibrios halófilos en nuestro medio, no parece necesario incluir sistemáticamente una placa de agar TCBS en el protocolo de siembra de las muestras fecales. Las especies patógenas del género *Vibrio* crecen bien en agar McConkey con excepción de *V. hollisae* y, excluyendo a *V. vulnificus* y algunas cepas de *V. metschnikovii*, ninguna fermenta la lactosa. Por tanto, como en el caso de otros enteropatógenos, las colonias incoloras en este medio deberían ser objeto de una identificación presuntiva, complementando el estudio con la prueba de la oxidasa. No obstante, si la historia clínica indica que ha existido consumo de mariscos o pescados semicrudos es recomendable incluir una placa de agar TCBS.

El comportamiento de estas bacterias en otros medios selectivos utilizados en el aislamiento de patógenos entéricos es impredecible; generalmente crecen con dificultad (48 h) o no es posible su aislamiento. En los medios que poseen sacarosa, como el agar Hektoen o el agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), la concentración de azúcar presente en los mismos no permite detectar las especies fermentadoras de dicho azúcar.

Las muestras de localización extraintestinal, heridas, sangre y otros materiales biológicos, pueden ser recogidas y procesadas por los procedimientos habituales. El 0,5% de NaCl presente en la sangre y en el agar nutritivo comúnmente utilizados en los laboratorios de microbiología clínica, permiten el crecimiento de estas bacterias. Ninguna de las especies de vibrios es hemolítica, con excepción de algunas cepas de *V. damsela* y *V. cholerae* O1.

La temperatura óptima de crecimiento es de 35°C (25°C para *V. damsela*) incubadas durante 18-24 h.

De lo anteriormente expuesto se deduce, que el conocimiento de la historia clínica y los antecedentes epidemiológicos permitirán a cada laboratorio adecuar sus recursos a las necesidades. Otra posibilidad es adaptar sus protocolos de trabajo según la localización geográfica del laboratorio.

Identificación de las especies halófilas del género *Vibrio*

Los vibrios son bacilos cortos, rectos o curvados, con tendencia al pleomorfismo, pudiendo observarse formas cocobacilares e incluso cocoides. Por esta razón, la forma curva no es diagnóstica al carecer el microorganismo de una morfología uniforme, particularmente si su crecimiento se ha efectuado en condiciones subóptimas.

Un dato que puede hacer sospechar la presencia de una bacteria halófila, es la ausencia de crecimiento en los medios de identificación utilizados de rutina. En la práctica, la identificación presuntiva de los vibrios halófilos puede efectuarse con los medios convencionales empleados para la identificación de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, previa adición de 1% de NaCl en todos los que carecen de sal en su composición: Clark-Lubs (Voges-Proskauer), reducción de nitratos, hidrólisis de la gelatina, decarboxilasas de Moeller, producción de indol, etc.

Existen sistemas comerciales, tanto manuales miniaturizados como semiautomáticos, que pueden emplearse para la identificación de las especies más comunes del género *Vibrio*, pero pueden presentar problemas con las especies menos frecuentes de los vibrios halófilos. Asimismo, la base de datos de algunos de estos equipos no es idónea para identificar dichas especies, pudiendo inducir a errores.

Otro aspecto a tener en cuenta, es el diluyente utilizado en cada uno de estos sistemas, ya que algunos carecen de NaCl y otros lo poseen en cantidad insuficiente. Los sistemas o equipos que incluyen una concentración de NaCl superior a 0,5% pero inferior a 1% permiten el crecimiento de los vibrios halófilos, aunque conviene recordar que el estudio de los caracteres bioquímicos debe realizarse en condiciones de crecimiento óptimas para que las reacciones puedan ser debidamente expresadas y evitar falsos resultados negativos. Por tanto, ante la sospecha de un vibrio halófilo, se debe revisar la composición iónica del diluyente empleado en cada caso para incorporar cloruro sódico en aquellos que lo necesiten.

Los caracteres bioquímicos más útiles para establecer una clave sencilla de identificación de las especies halófilas y no halófilas del género *Vibrio* son:

- Reacción de la oxidasa. Positiva en todos los casos, excepto en *V. metschnikovii*. La prueba no debe realizarse directamente de cultivos procedentes de medios que contengan carbohidratos fermentables, porque se pueden obtener falsos resultados negativos.
- Reducción de nitratos. *V. metschnikovii* es la única especie carente de nitrato-reductasa.
- Sensibilidad al agente vibriostático O/129. Utilizada para separar el género *Vibrio* de *Aeromonas* spp y diferenciar las distintas especies de vibrios entre sí. Su estudio se debe efectuar en medios con baja concentración de sal porque el NaCl y el MgCl₂ pueden disminuir su acción. Un halo de inhibición alrededor del disco de 150 mg es característico del género *Vibrio*, aunque se ha observado este mismo efecto en los géneros *Plesiomonas*, *Pasteurella* y *Actinobacillus*. No obstante, se ha descrito la resistencia a O/129 en algunos aislados clínicos de *V. cholerae* O1 y no O1. La sensibilidad a 10 mg de O/129 es característica de *V. cholerae* O1 y no O1, *V. mimicus*, *V. damsela* y *V. metschnikovii*.
- Estudio de las decarboxilasas de Möller. La actividad de la lisina y ornitina decarboxilasa y de la arginina dehidrolasa, permiten separar a las especies halófilas en 4 grupos.
- Reacciones bioquímicas diversas. Prueba de Voges-Proskauer, producción de gas en la fermentación de la glucosa y el metabolismo de distintos azúcares, entre los que se encuentran, sacarosa, lactosa, arabinosa, manitol, inositol, celobiosa y salicina. Existen cepas salvajes de *V. vulnificus*, que en principio no utilizan la lactosa y en las cuales sólo es posible detectar la fermentación de este azúcar después de 48-72 h de incubación, debido a la aparición de mutantes espontáneos capaces de fermentarla.

La lectura final de los caracteres bioquímicos debe realizarse a las 48 horas de incubación. La identificación definitiva de las especies halófilas se completa con el estudio de la halotolerancia, efectuado en caldo de triptona con diferentes concentraciones de NaCl (0, 6, 8 y 10%).

Las principales características bioquímicas diferenciales de las especies del género *Vibrio* aisladas en muestras clínicas, se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Claves bioquímicas de identificación de las especies del género *Vibrio* de interés clínico.

Pruebas bioquímicas ^{a, b}	Especie
1. Oxidasa – , reducción de nitratos –	<i>V. metschnikovii</i>
2. Oxidasa +, reducción de nitratos.+	
A. Crecimiento en agua de peptona sin NaCl	
A1. Sacarosa +	<i>V. cholerae</i>
A2. Sacarosa –	<i>V. mimicus</i>
B. Ausencia de crecimiento en agua de peptona sin NaCl	
B1. ADH +, manitol +	
B1a. Ácido de glucosa +, gas de glucosa –	<i>V. fluvialis</i>
B1b. Ácido de glucosa +, gas de glucosa +	<i>V. furnisii</i>
B2. ADH +, manitol – , urea +	<i>V. damsela</i>
B3. ADH – , LDC – , ODC –	<i>V. hollisae</i>
B4. ADH – . LDC +	

B4a. VP +, sacarosa +, crece en NaCl al 10%	V. alginolyticus
B4b. VP +/-, sacarosa -, arabinosa -	V. carchariae
B4c. VP -, celobiosa -, salicina -, arabinosa +	V. parahaemolyticus
B4d. VP -, celobiosa +, salicina +	V. vulnificus ^c
B5. Inositol +	V. cincinnatiensis

^aSignos: +, reacción positiva; -, reacción negativa; +/-, reacción positiva en el 50% de los aislados

^bAbreviaturas: ADH, arginina dehidrolasa; LDC, lisina descarboxilasa; ODC, ornitina descarboxilasa; VP, reacción Voges-Proskauer

^c85% de las cepas fermentan la lactosa

V. metschnikovii es la única especie con reacciones negativas para las pruebas de la oxidasa y nitrato reductasa. Solamente, *V. metschnikovii* y *V. cincinnatiensis* fermentan el inositol. *V. furnissii* y *V. damsela* (10% de los aislados) son los únicos vibrios de interés clínico que fermentan la glucosa con producción de gas. *V. alginolyticus* es la única especie que tolera el 10% de NaCl.

V. damsela es la única especie que posee ureasa, aunque algunas cepas de *V. parahaemolyticus* también la poseen. Recientemente, se ha descrito el incremento de este fenotipo en muestras clínicas. Asimismo, se ha comprobado que las cepas de *V. parahaemolyticus* productoras de ureasa, poseen el gen *trh* ligado a la producción de hemolisina relacionada con la hemolisina directa termoestable (TRH), por lo que se ha sugerido que esta característica bioquímica puede ser un marcador de virulencia en esta especie. En este sentido, recientes investigaciones epidemiológicas han documentado que el biotipo ureasa positiva- Kanagawa negativo, es el responsable de la mayor parte de gastroenteritis en la zona Noroeste del Pacífico.

La hemolisina termoestable de Kanagawa o hemolisina directa termoestable (TDH) es producida por más del 90% de las cepas patógenas para el hombre. Sin embargo, la mayoría de las cepas ambientales carecen de ella. Su detección se efectúa en el medio de agar Wagatsuma con 5% de eritrocitos humanos o de conejo.

Sensibilidad a los antimicrobianos

Los vibrios halófilos crecen bien en medio de Mueller-Hinton sin adición de NaCl. El exceso de sal puede alterar la actividad de ciertos antibióticos (gentamicina y colimicina). Los estudios de sensibilidad pueden efectuarse por las técnicas habituales y por métodos automáticos o semiautomáticos. Algunas publicaciones hacen referencia a la utilización del test de Epsilon (E-test)

El tratamiento de elección es la tetraciclina. La mayor parte de las especies son sensibles a los aminoglucósidos, cloranfenicol, ácido nalidixico y a las fluoroquinolonas. *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. damsela* y *V. furnissii* son resistentes a ampicilina y cefalosporinas de primera generación. La sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol es variable.

V. vulnificus y *V. hollisae* son generalmente sensibles a ampicilina, aunque se ha descrito la existencia de cepas de *V. vulnificus* productoras de β -lactamasa, no siempre detectable por el método de la cefalosporina cromogénica.

BIBLIOGRAFÍA SELECCIONADA

Anonymous. *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters. Los Angeles, 1996. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1996; 45:29621-4.

Abbott SL, Janda JM. Severe gastroenteritis associated with *Vibrio hollisae* infection: report of two cases and review. Clin Infect Dis 1994; 3:310-312.

von Graevenitz A. Clinical microbiology of *Vibrio* Species. Clin Microbiol Newsl 1983; 5:41-42

Janda JM, Powers C, Bryant RG, Abbott SL. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. Clin Microbiol Rev 1988; 1: 245-267.

McLaughlin JC. *Vibrio*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC eds. Manual of Clinical Microbiology. 6^a ed. Washington DC, ASM, 1995; pp 465-476.

Okuda J, Ishibashi M, Abbott SL, Janda JM, Nishibuchi M. Analysis of the Thermostable direct hemolysin (tdh) gene and the tdh-related hemolysin (trh) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the west coast of the United States. J Clin Microbiol 1997; 35:1965-1971.

Veron M, Popoff M. *Vibrionaceae*. En: Le Minor L, Veron M, eds. Bactériologie Médicale. 2^a ed. Médecine-Sciences Flammarion, 1989; cap 18.