FAMILIA VIBRIONACEAE. MICROBIOLOGIA ŞI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HOLEREI.

Clasificare si caractere generale ale familiei Vibrionaceae

Familia: *Vibrionaceae*

Genuri: *Vibrio*

Photobacterium

Salinivibrio

Aliivibrio (Allomonas)

Enterovibrio

Grimontia

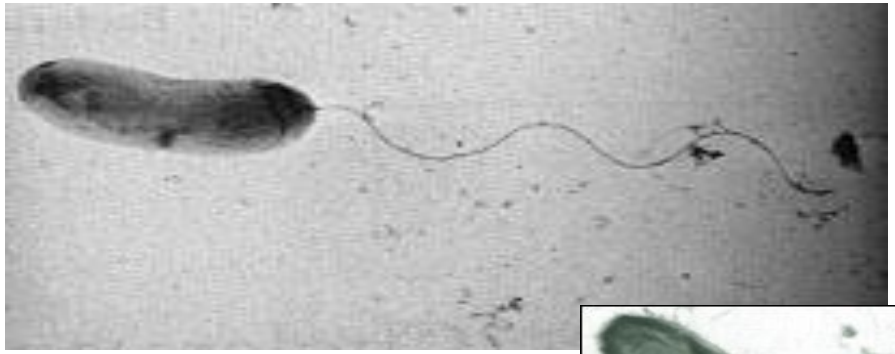
Catenococcus

Listonella

Caractere generale (cheie) ale familiei: bastonaşe G-, drepte sau încurbate, mobile, reduc nitraţii în nitriţi, fermentează glucoza, **oxidaza+,** catalaza+

GENUL VIBRIO

Bastonaşe G-, încurbate, polimorfe, 2-3 µm/0,5-0,8 µm, nesporogene, necapsulate, mobile monotriche (flagel polar unic)



- **Clasificarea:**

- **Vibrioni halotoleranţi** - *Vibrio cholerae* (agenţii holerei şi diareilor holeriforme)
- **Vibrioni halofili** – *V.parahaemolyticus, V.alginolyticus, V.anguillarum, V.vulnificus, V.metschnikovii* (oportunişti, pot cauza toxiinfecţii alimentare, septicemii, meningite, supuraţii)
- **Vibrioni *free life*** (saprofiţi)

VIBRIO CHOLERAE

- Izolat pentru prima data in 1854 de catre Filippo Pacini de la un bolnav cu holera**.**
- **Caractere morfotinctoriale** *(vezi caracteristica genului)*
- **Caractere de cultură**

Anaerob facultativ, temperatura optimă de cultivare -- 37 grade (limite 14 – 40 grade C). Creşte pe medii simple, dar preferă **pH alcalin (7,6 - 9,6)**. Halotolerant (0,5 - 7% NaCl, optimal – 3%).

Sensibil la pH acid.

Mediu de îmbogăţire – Apa peptonată alcalină (AP) - pH 8,6

Medii de izolare a culturii pure:

– Geloza alcalină (GA) - mediu selectiv

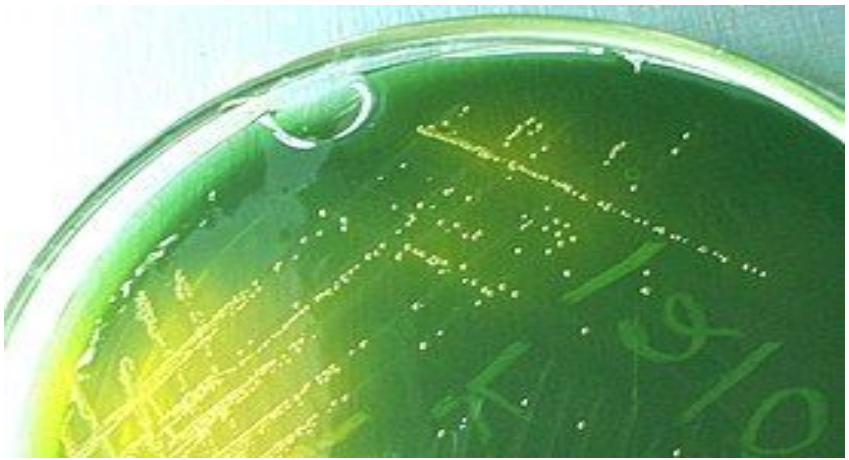
- Mediul TCBS (tiosulfat-citrat-bilă-zaharoză) – DD şi selectiv

- **Manifestarea creşterii culturii de vibrioni**

AP – peste 3-6 ore de incubare – văl fin la suprafaţa mediului

GA – peste 12 ore – colonii tipice S (R atipice), plate, transparente, cu nuanţă albăstruie

TCBS – peste 12 ore – colonii S, opace, galbene



- **Caractere biochimice**: *V.cholerae* posedă catalază şi oxidază, reduce nitraţii în nitriţi, produce indol, posedă gelatinază, lizindecarboxilază (LDC) şi ornitindecarboxilază (ODC), fermentează şi oxidează glucoza până la acid (testul Hugh-Leifson), nu scindează lactoza.
- Conform activităţii glicolitice *V.cholerae* aparţine grupului **I Heiberg** (fermentează **Z**aharoza şi **M**anoza, nu fermentează **A**rabinoza) - testul ZAM

Se disting 2 biotipuri (variante) de *V.cholerae*: **clasic** (*V.cholerae cholerae*) şi **El Tor** (*V.cholerae El Tor*), identice morfologic şi antigenic.

1. ***V.cholerae cholerae (clasic)*** – în 1883 izolat în cultură pură de către R. Koch, a cauzat 6 pandemii
2. ***V.cholerae El Tor*** – izolat în 1905 într-o staţie de carantină din El Tor (peninsula Sinai), în 1961 determină pandemia a VII

Les pandémies de choléra
1800
1850
1900
1950
2000
1817 1824
1829 1837
1840 1860
1863 1875
1881 1896
1899 1923
1960
1
2
3
4
5
6
7

Diferenţierea biovariantelor

Caractere	*V.cholerae cholerae*	*V.cholerae El Tor*
Aglutinarea eritrocitelor de găină	-	+
Hemoliza eritrocitelor de berbec	-	+
Producerea acetoinei (test VP)	-	+
Liza cu bacteriofagi	C (IV)	ET (II)
Creşterea pe mediu cu polimixină	-	+

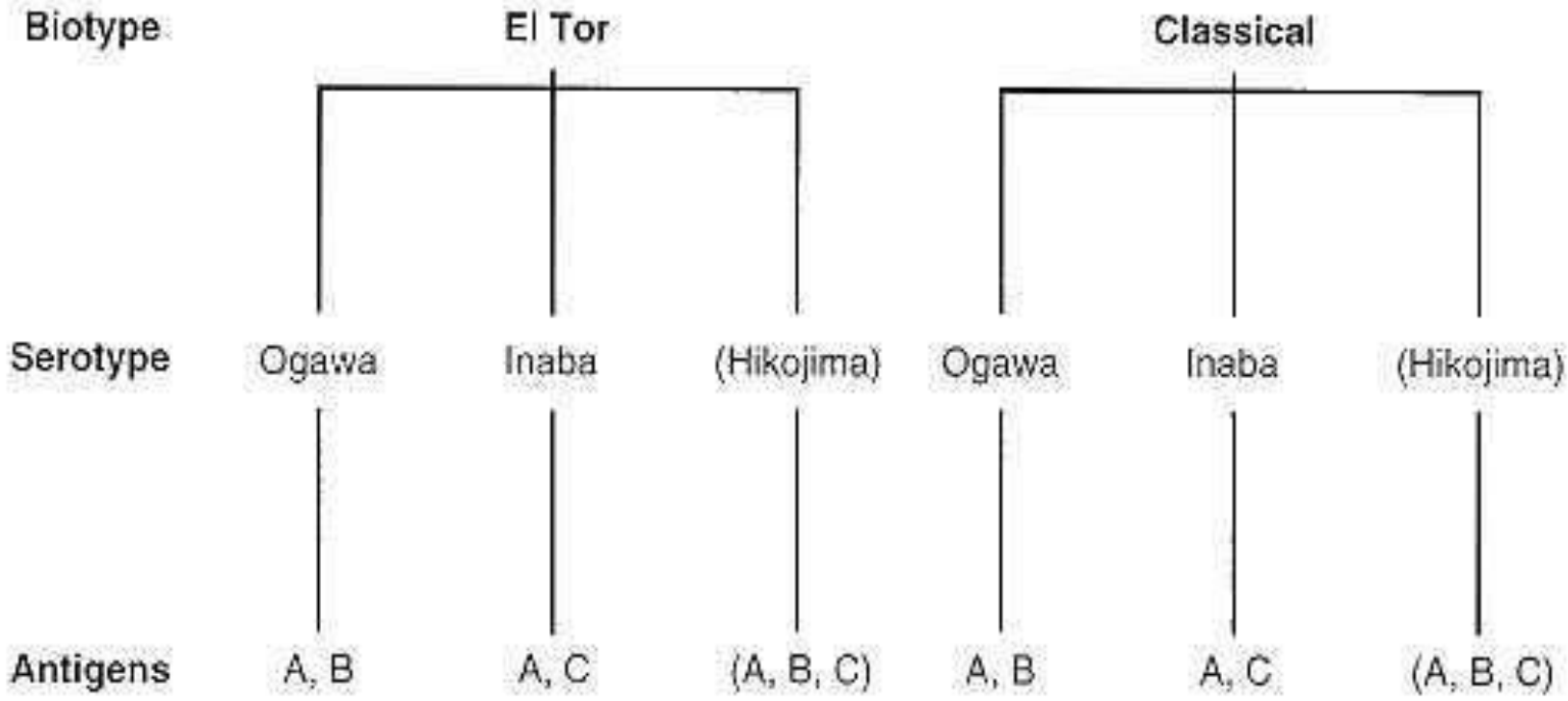
STRUCTURA ANTIGENICĂ A *VIBRIO CHOLERAE*

- Antigenul **O** somatic, LPZ, termostabil (peste 200 serogrupe - O_1, O_2....O_{200}...)

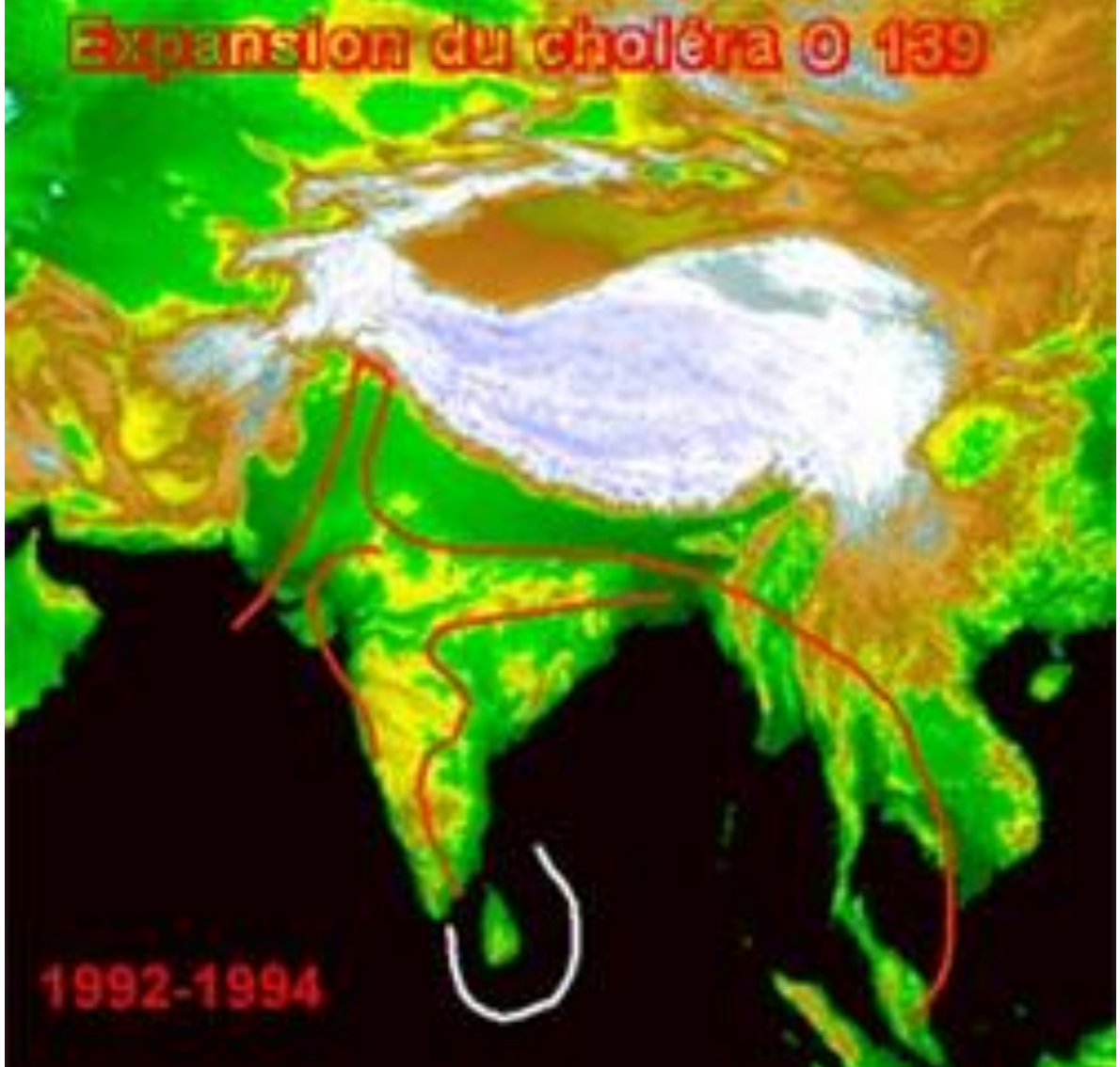
Ag **O_1** este constituit din 3 fracţii - A,B,C

Respectiv se disting 3 serovariante ale *V.cholerae O1:* Ogawa (A,B), Inaba (A, C) şi Hikojima (A; B; C)

- Ag **H,** proteic, termolabil, comun pentru *V.cholerae*

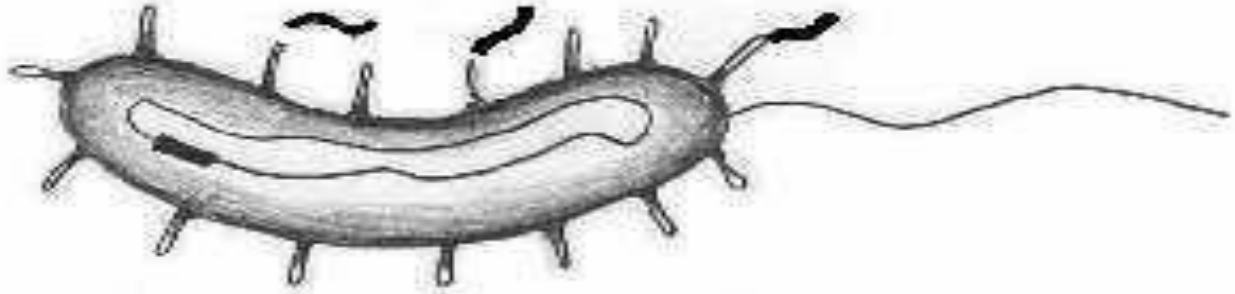

Biotype
El Tor
Classical
Serotype
Ogawa
Inaba
(Hikojima)
Ogawa
Inaba
(Hikojima)
Antigens
A, B
A, C
(A, B, C)
A, B
A, C
(A, B, C)

- *V.cholerae O1,* agent cauzal al holerei
- *V.cholerae O139* Bengal (descris in 1992)– agent cauzal al holerei; fenotipic asemănător cu biovarul El Tor, produce capsulă polizaharidica
- *V.cholerae* non O1/non O139 (O2, O3,... etc, vibrioni NAG/nonaglutinabili) – responsabili de sindrom holeriform, diaree, toxiinfecţii alimentare, gastro-enterite

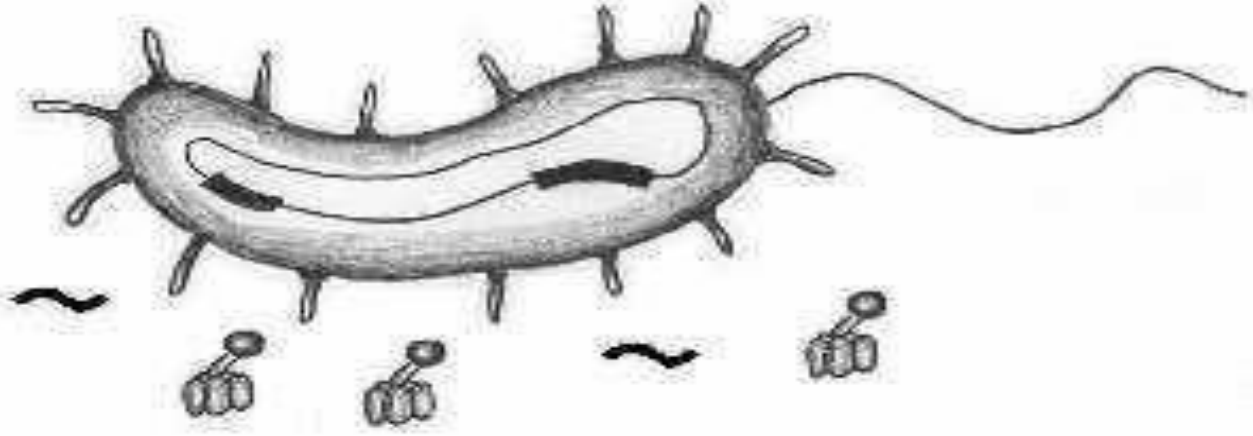

Expansion du choléra © 139
1992-1994

FACTORI DE PATOGENITATE

- **Factori de adeziune** (pili - *Toxin Coregulated Pilus* (TCP), LPZ, glicocalixul)
- **Enzime de patogenitate** (mucinaza, neuraminidaza, lecitinaza)
- **Enterotoxina** (toxina holerică, holeragen), constituită din 2 subunităţi A (A1, A2) şi 5 subunităţi B. Codificată de genele *ctxAB* ale unui bacteriofag filamentos CTXφ .
- **Endotoxina**



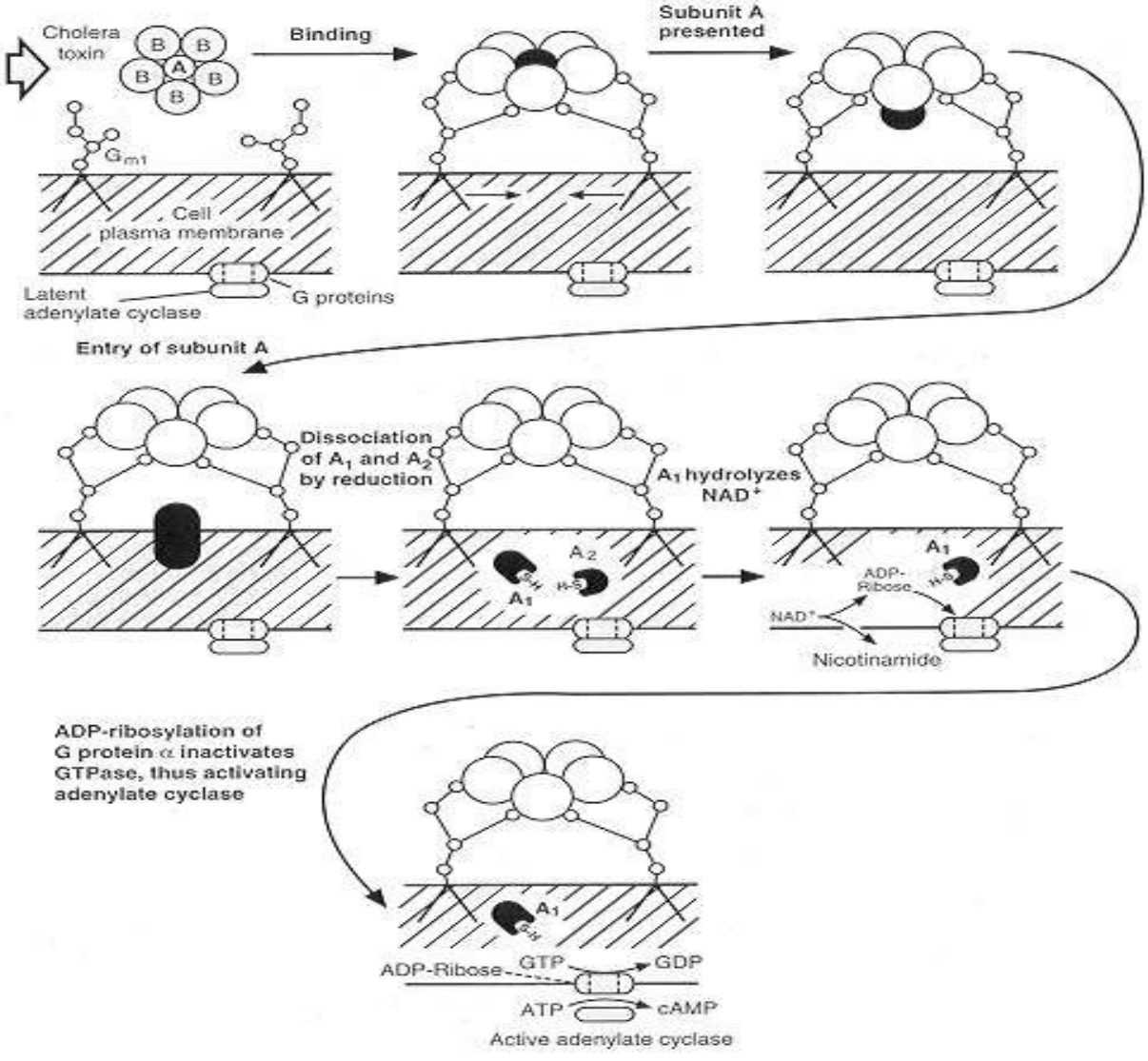
A virulent V.Cholerae
with TCP but no toxin.

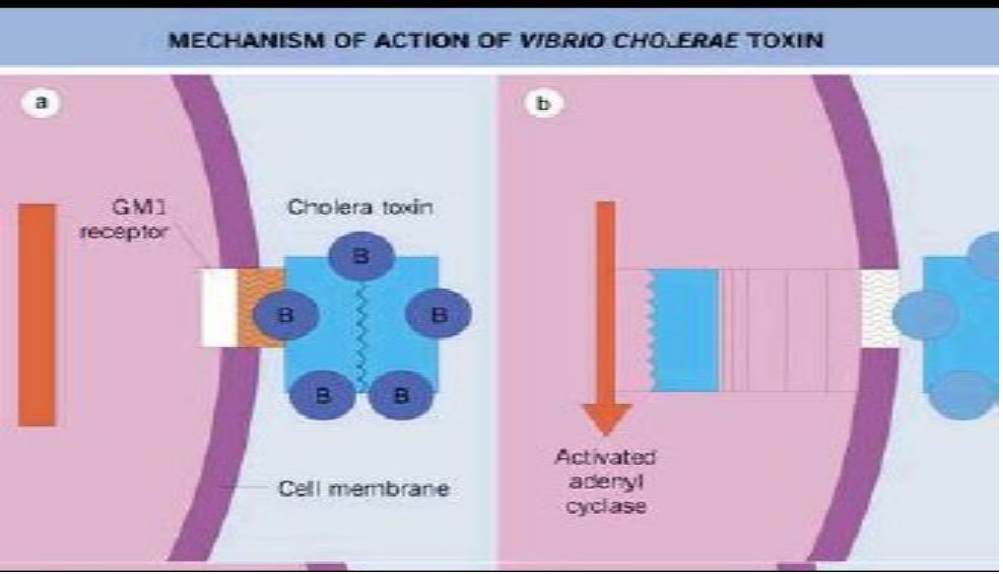


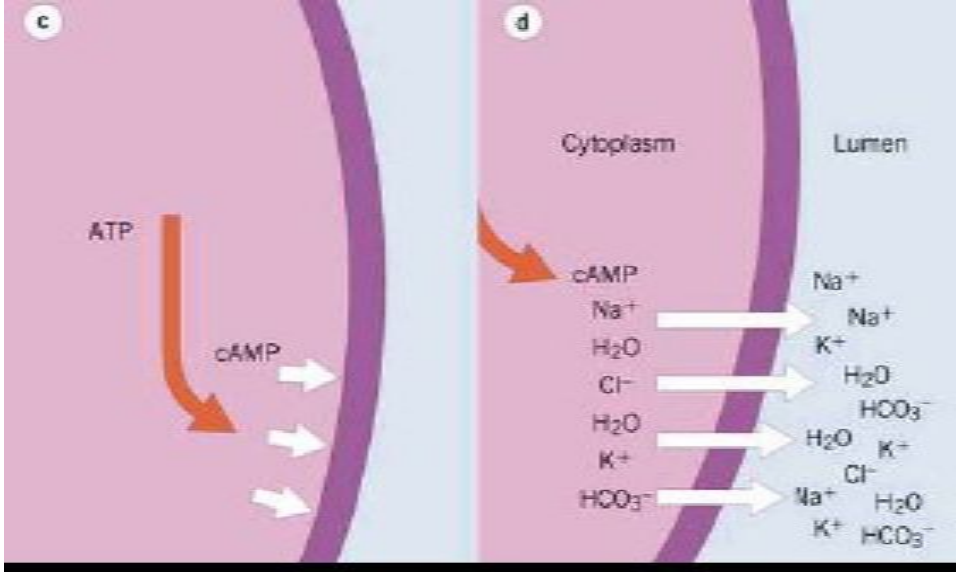
New virulent V.Cholerae
with TCP and toxin.

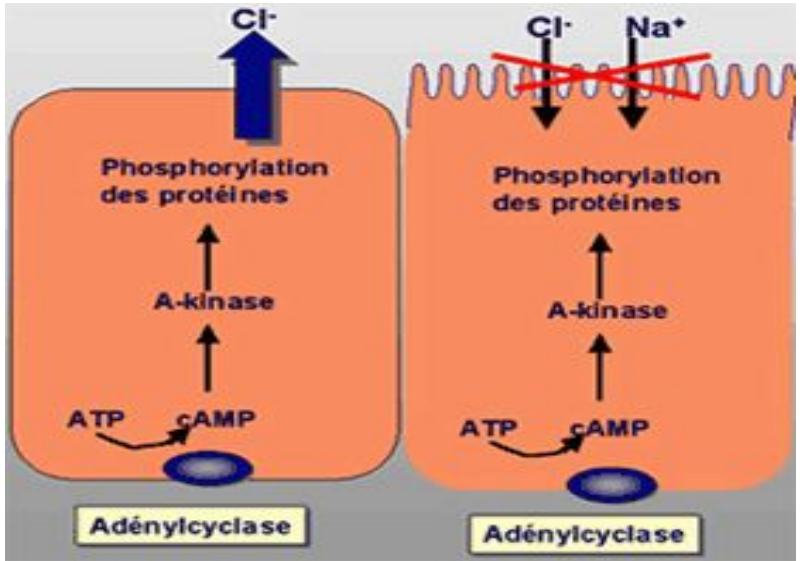
Mecanismul de acţiune al enterotoxinei:

Subunităţile B servesc la fixarea pe receptorul gangliozidic GM1 de pe membrana enterocitului. Urmează modificarea conformaţională a toxinei cu crearea unui canal hidrofil prin care subunitatea A pătrunde în celulă. Catena A1, manifestând activitate ADP - ribozilantă, activează adenilat-ciclaza membranară, ce duce la creşterea concentraţiei de cAMP intracelular. Rezultă inhibiţia absorbţiei bicarbonatului şi hipersecreţia cloridului. Apa şi electroliţii (Na^+ K^+ Cl^- $HCO3^-$) se acumulează în lumenul intestinal. Rezultă **deshidratare extracelulară intensă cu hemoconcentraţie, hipokaliemie, şoc hipovolemic şi acidoză metabolică.**


Cholera toxin
B
A
Binding
Subunit A presented
G_{m1}
Cell plasma membrane
Latent adenylate cyclase
G proteins
Entry of subunit A
Dissociation of A_1 and A_2 by reduction
A_2
A_1
S-S
A_1 hydrolyzes NAD^+
ADP-Ribose
NAD^+
Nicotinamide
ADP-ribosylation of G protein α inactivates GTPase, thus activating adenylate cyclase
ADP-Ribose
GTP
GDP
ATP
cAMP
Active adenylate cyclase


MECHANISM OF ACTION OF VIBRIO CHOLERAE TOXIN
a
GM1 receptor
Cholera toxin
B
Cell membrane
b
Activated adenyl cyclase


c
ATP
cAMP
d
Cytoplasm
Lumen
cAMP
Na+
H2O
Cl−
H2O
K+
HCO3−
Na+
K+
H2O
HCO3−
H2O
K+
Cl−
Na+
H2O
K+
HCO3−


Cl-
Phosphorylation des protéines
A-kinase
ATP
cAMP
Adénylcyclase
Cl-
Na+
Phosphorylation des protéines
A-kinase
ATP
cAMP
Adénylcyclase

PATOGENEZA HOLEREI ŞI MANIFESTĂRILE CLINICE

- HOLERA – gastroenterită acută, strict umană.
- Anual – 3-5 mln infectati, 100-130 mii decedati
- Agentul cauzal –*V.cholerae O1/O139*
- Sursa de infecţie–bolnav, convalescen

purtător sănătos

- Mecanismul de transmitere– fecal-ora

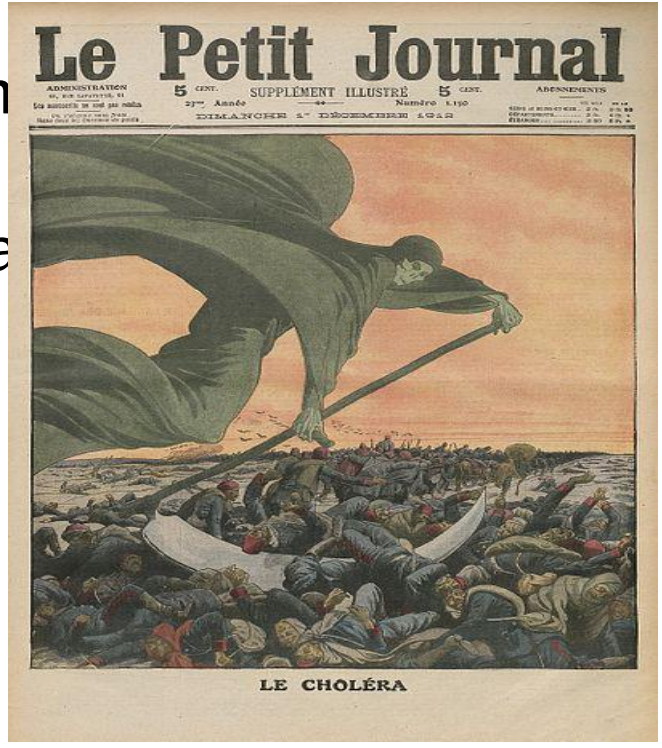
- Alimentar (apă, alimente, fructe de

mare)

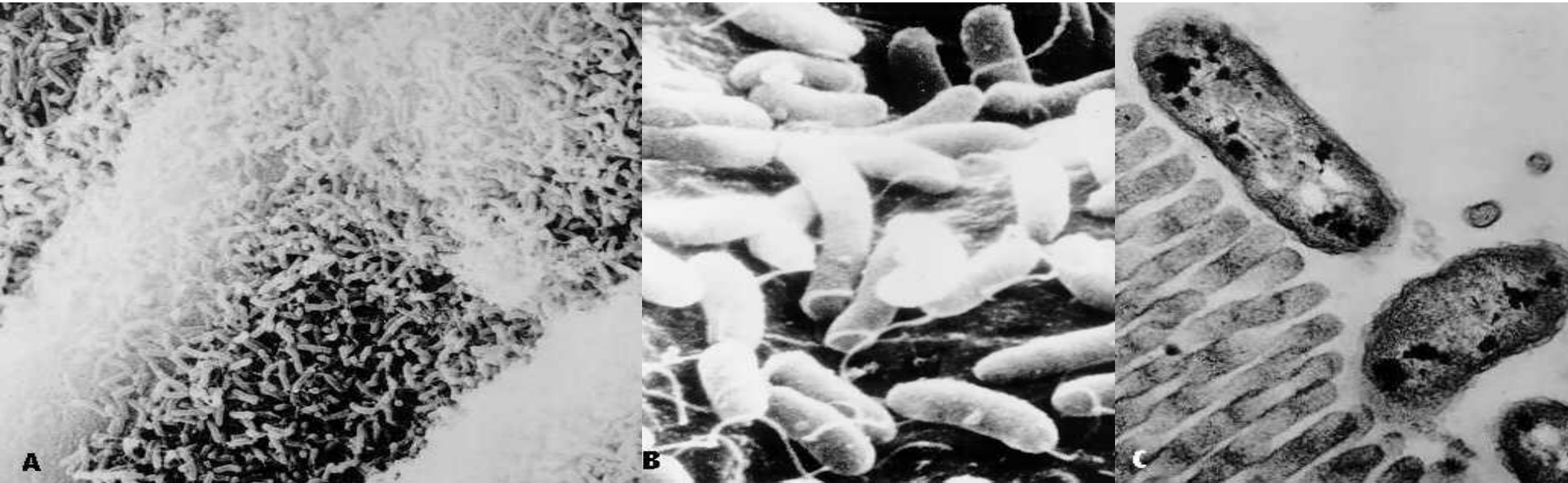
- Contact direct (manual)

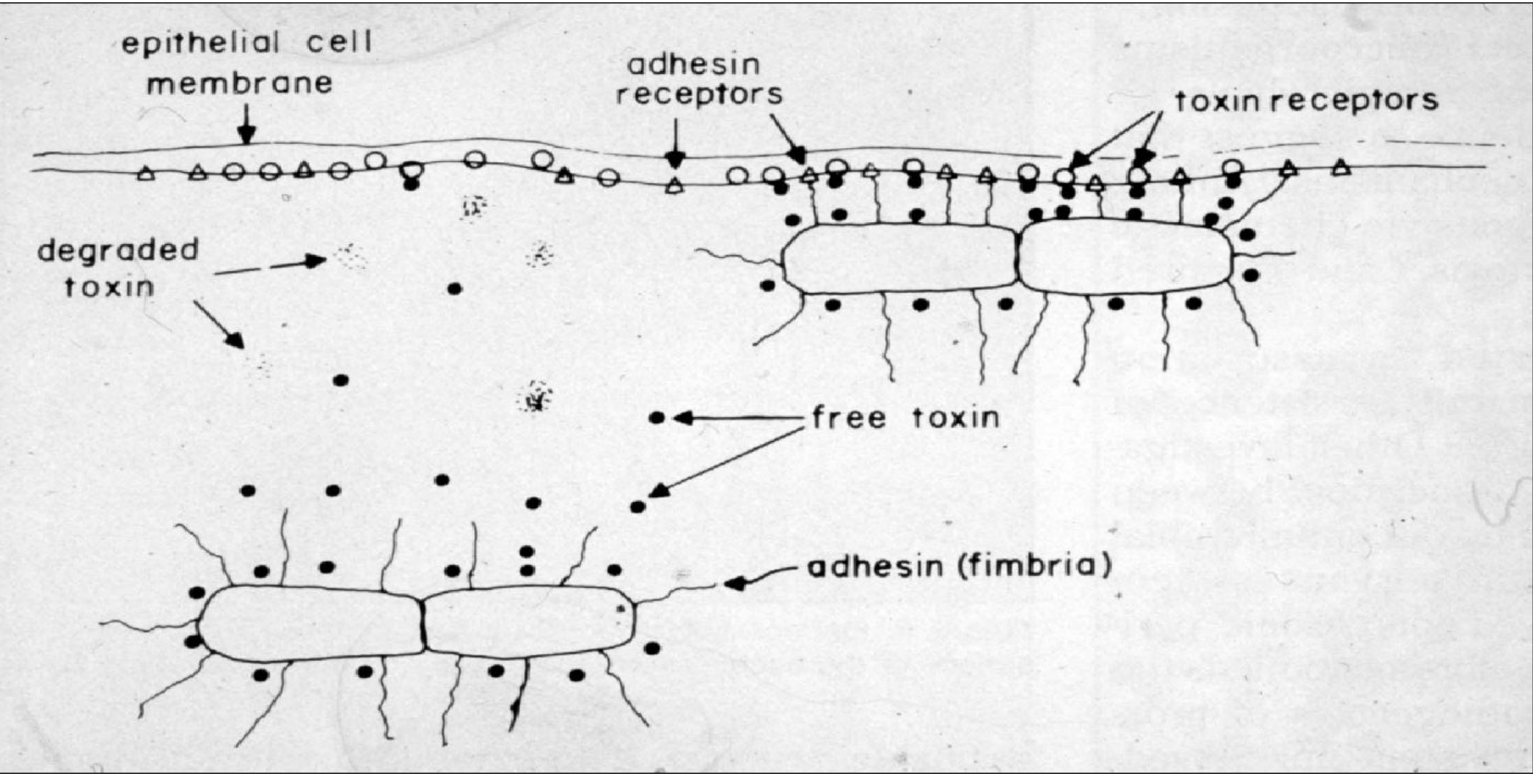
Doza infectantă – 10^9 - 10^{11} UFC

(10^4 pentru persoane cu hipoaciditate gastrică)



- Vibrionii care au trecut bariera gastrică ajung în intestinul subţire. Local mucinaza descompune mucusul, asigurând adeziunea vibrionilor la enterocite, colonizarea şi producerea toxinei. Neuraminidaza transformă di- şi tri-sialogangliozidele membranare în GM1, ce permite fixarea toxinei şi penetrarea ei.



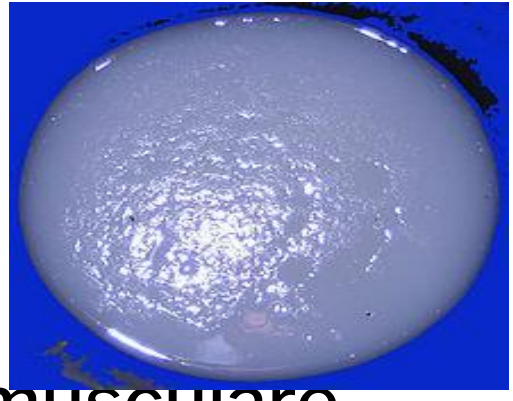

epithelial cell membrane
adhesin receptors
toxin receptors
degraded toxin
free toxin
adhesin (fimbria)

- **Evoluţia clinică a holerei:**

I - Perioada de **incubaţie** (2-5 zile)

II – **Enterita** holerică (scaune frecvente, afecale, apoase, constituite din lichid clar cu flocoane albe - aspect “zeamă de orez”)

III – **Gastro-enterita** (scaune frecvente – 10 - 50 ori pe zi – şi vome abundente).



Consecinţe – deshidratare (3-20 litri eliminaţi în 24 ore), carenţe de săruri, acidoză, hipoxie tisulară, hipotensiune, contracţii (crampe) musculare.

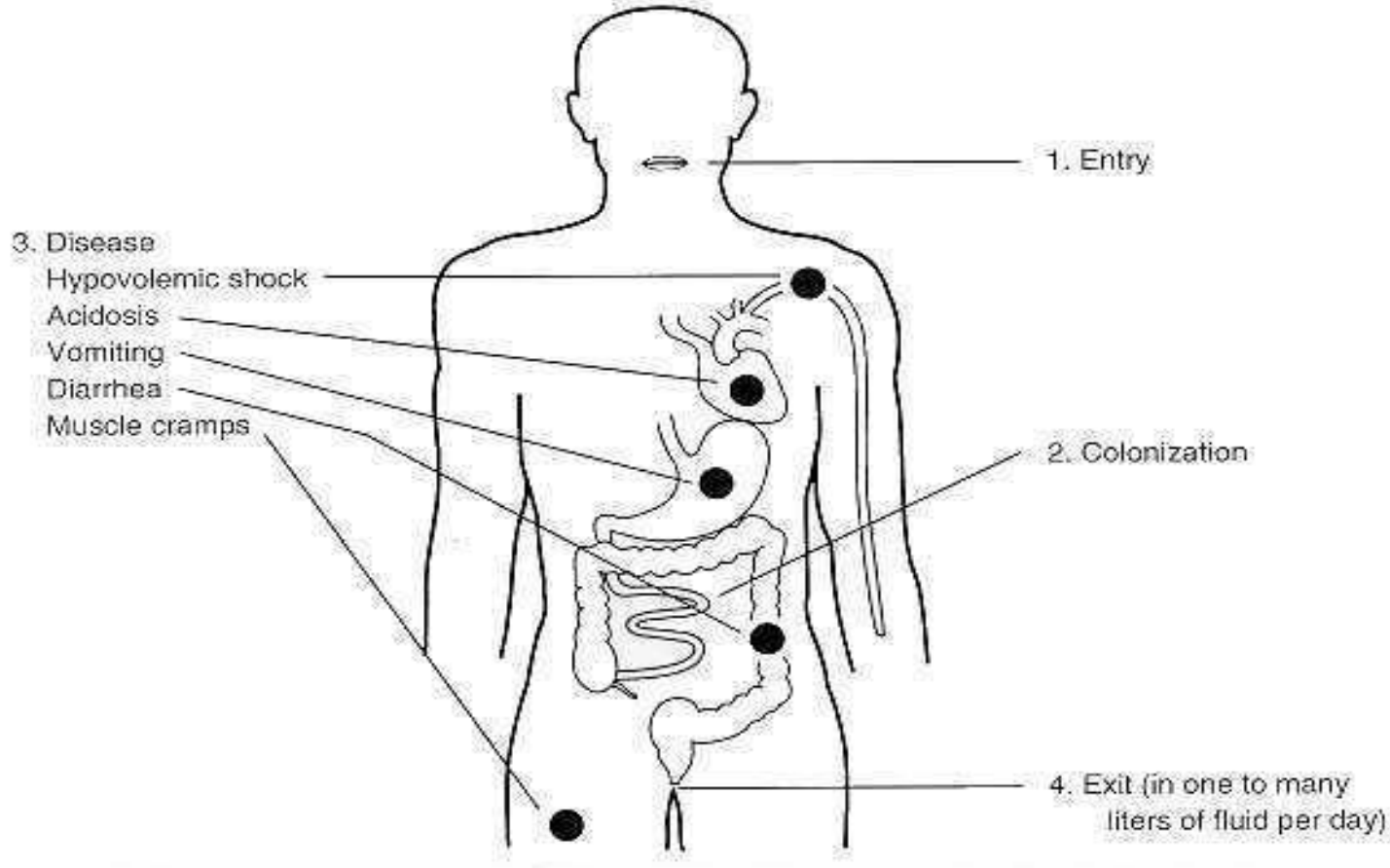
LIT DE CHOLÉRIQUE

IV - **Algida holerică** (stare extrem de gravă, hipotermie, asfixie, anurie, colaps, comă, deces)

Imunitate

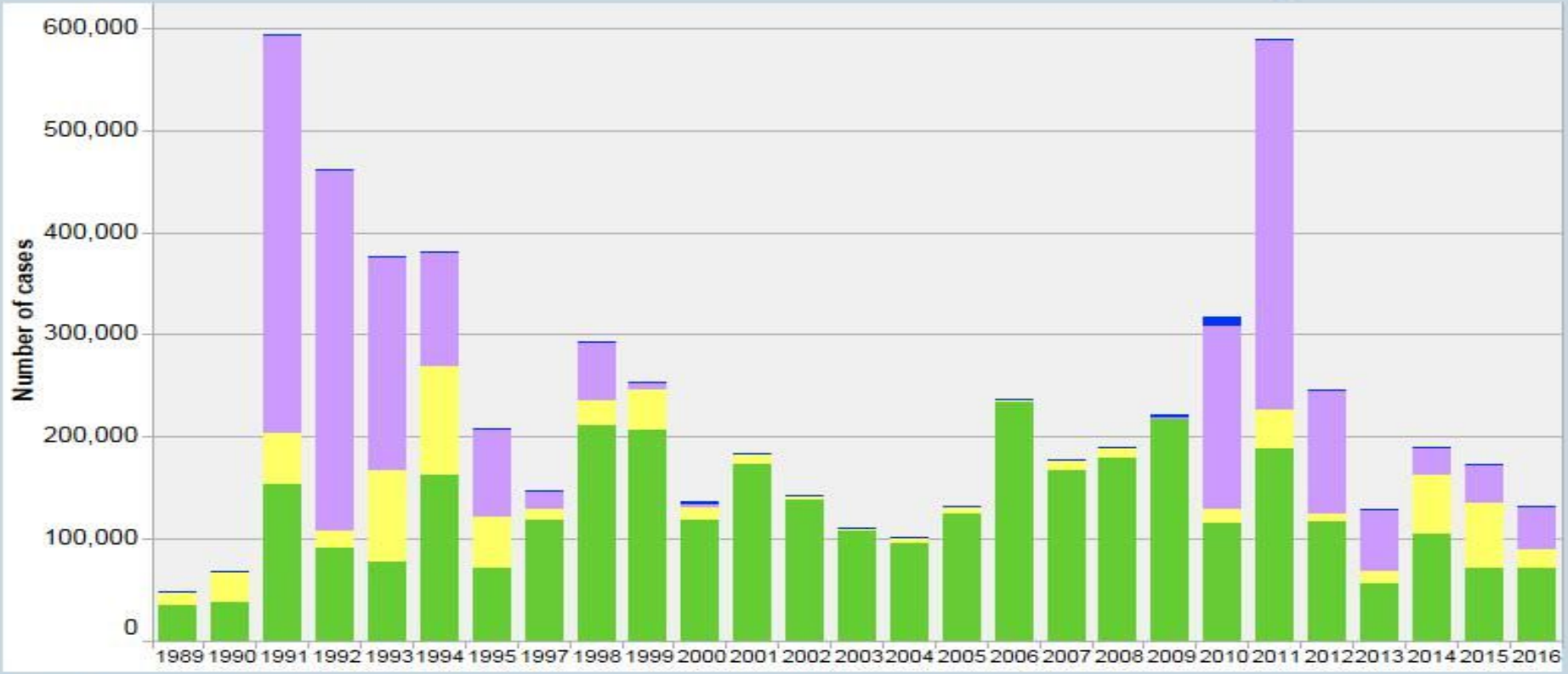
– umorală (s**IgA**, IgM, IgG),

– antibacteriană şi antitoxică, de scurtă durată (2 ani), reinfecţii sunt posibile


1. Entry
3. Disease
Hypovolemic shock
Acidosis
Vomiting
Diarrhea
Muscle cramps
2. Colonization
4. Exit (in one to many
liters of fluid per day)

Cholera cases reported to WHO by year and by continent 1989–2016

World Health Organization



Source: Weekly Epidemiological Record, 2017, 92(35)

Oceania Americas Asia Africa

©WHO. All right reserved.

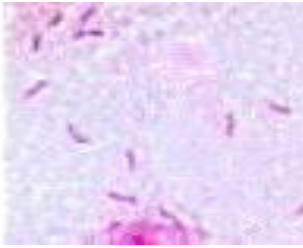
- **Cholera in Central Africa**
- 8 October 2010 -- The current wave of cholera outbreaks affecting Central Africa started a few months ago. As of 3 October, **40 468 cases** and **1 879 deaths** have been reported in four countries (**Cameroon, Chad, Niger and Nigeria**). Seasonal factors, such as the rainy season with flooding, as well as poor hygiene conditions and population movements in the area contribute to this unusually high incidence of cholera. Nevertheless this area known to be endemic for cholera is regularly affected by small outbreaks.
- The ongoing **Haiti cholera outbreak** is the worst epidemic of cholera in recent history, according to the U.S. Centers for Disease Control and Prevention After the 2010 earthquake, in little over two years, as of January 2013, it has killed more than 7,900 Haitians and hospitalized hundreds of thousands.

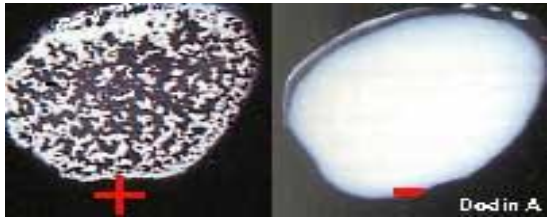
DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HOLEREI

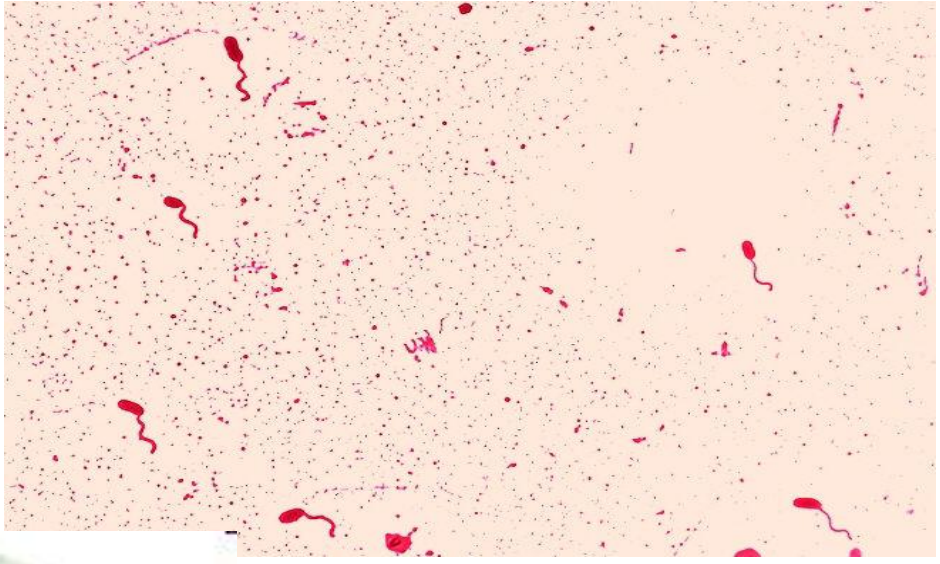
- **Prelevate**: mase vomitive, materii fecale, bilă (purtători), de la cadavru – 3 fragmente din intestinul subţire şi vezica biliară, prelevate din mediul extern (apa, alimente)
- **Metode de diagnostic**

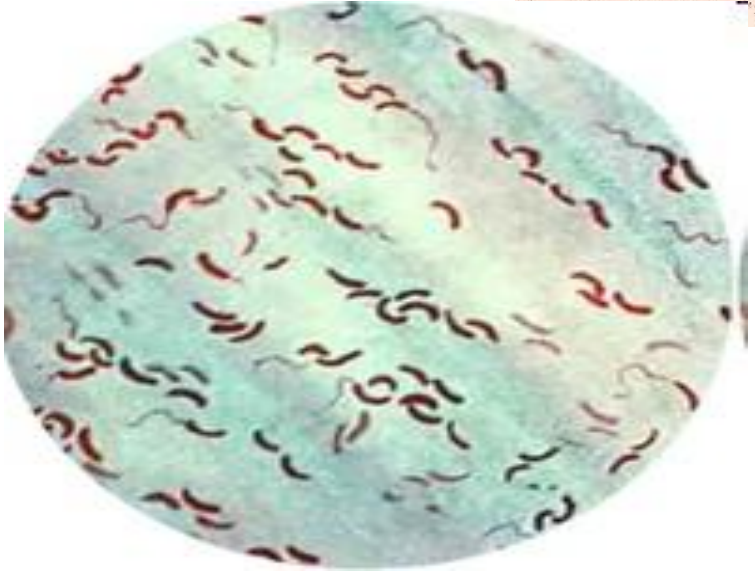
1. Diagnosticul rapid

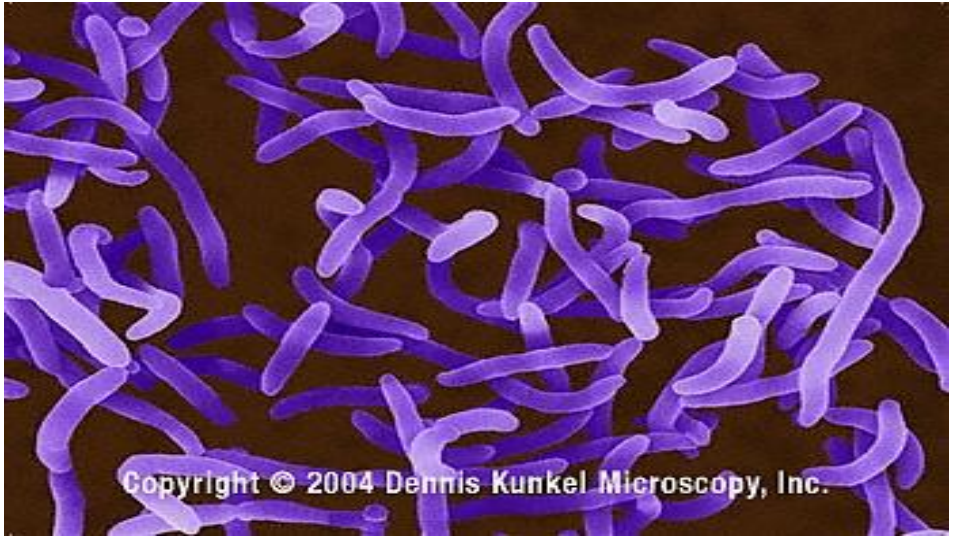
- Frotiu Gram (bacterii G-, încurbate)
- Studierea mobilităţii (preparate native – bacterii mobile, grupate în "bancuri de peşti")
- Imobilizarea şi aglutinarea vibrionilor cu serul anti-O1
- Imobilizarea vibrionilor cu bacteriofagi "C" şi "ET"





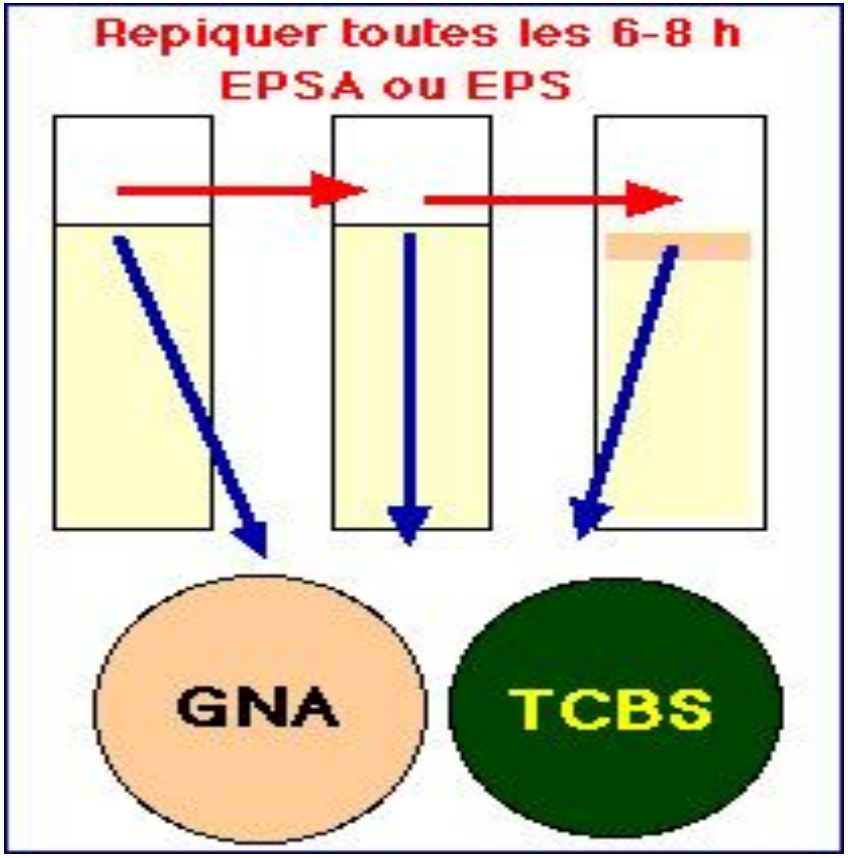




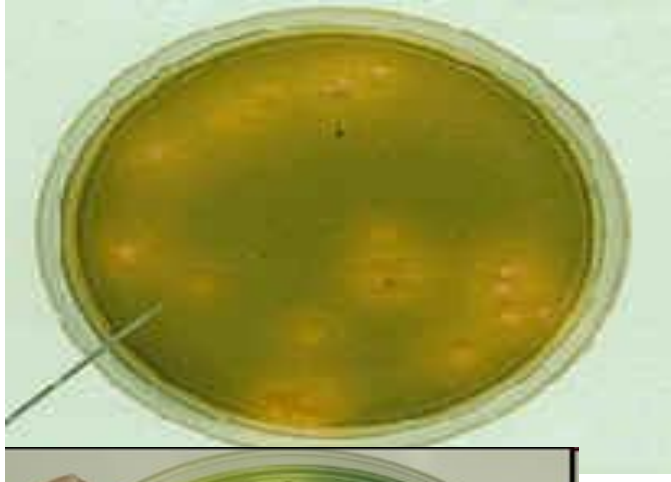

Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

2. Examenul bacteriologic (de bază)

- Prelevatele se însămânţează în AP I (îmbogăţire) şi GA I / TCBS (izolarea culturii pure) – termostat, 37 grade C
- Peste 6 ore se examinează cultura din AP (văl la suprafaţă?), utilizată pentru diagnosticul rapid, apoi se reînsămânţează pe AP II şi GA II.



- Peste 12 ore se examinează coloniile de pe GA I sau TCBS. Coloniile suspecte (plate şi transparente cu nuanţă albăstruie pe GA, galbene pe TCBS) sunt expuse diagnosticului rapid (5 teste), apoi repicate pe mediul cu lactoză şi zaharoză pentru acumularea culturii pure şi diferenţiere primară. AP II poate fi utilizată pentru efectuarea testelor rapide şi însămânţare pe GA III.
- Culturile lactoza-/zaharoza+ sunt identificate morfologic, cultural, biochimic, serologic (cu ser O1 sau RO (colonii atipice), apoi cu seruri monospecifice Ogawa şi Inaba). Se efectuează fagoidentificarea şi diferenţierea biovariantelor.



api 20 E
+
-
+
+
+
-
-
-
+
+
ONPG
ADH
LDC
ODC
[CIT]
H2S
URE
TDA
IND
[VP]

+
+
+
+
[GEL]
GLU
MAN
INO
SOR
RHA
SAC
MEL
AMY
ARA

3. **Depistarea toxinei**

- *In vivo* (ansa ligaturată la iepure, culturi de celule)
- *In vitro* (ELISA, cu utilizarea gangliozidului GM1; latexaglutinarea)
- Tehnici de biologie moleculara (PCR, etc)

4. Serodiagnostic (retrospectiv)

Anticorpii (aglutinine, vibriocine, antitoxine) apar după 10-15 zile de boală

- RA (serul bolnavului + diagnostic din *V.cholerae* O1 (titrul diagnostic 1/80)
- RHAI (serul bolnavului + diagnostic eritrocitar)
- Dozarea antitoxinelor (ELISA, RHAI)

TRATAMENTUL ŞI PROFILAXIA HOLEREI

- Tratament

- Rehidratare
- Antibiotice (azitromicina, tetraciclină, sulfanilamide, doxiciclină)
- Tratament simptomatic

Profilaxie

- Igiena individuală şi colectivă
- Vaccinarea (vaccin viu, vaccin inactivat, vaccin subunitar, holeragen-anatoxină)

VIBRIONII HALOFILI

- *V. parahaemolyticus* – toxiinfecţii alimentare, consecutive utilizării fructelor de mare, provoaca gastro-enterite
- *V. vulnificus, V. alginolyticus* – procese supurative (otite, conjunctivite, infecţii de plagă, celulita, etc), toxi-infecţii alimentare, septicemii

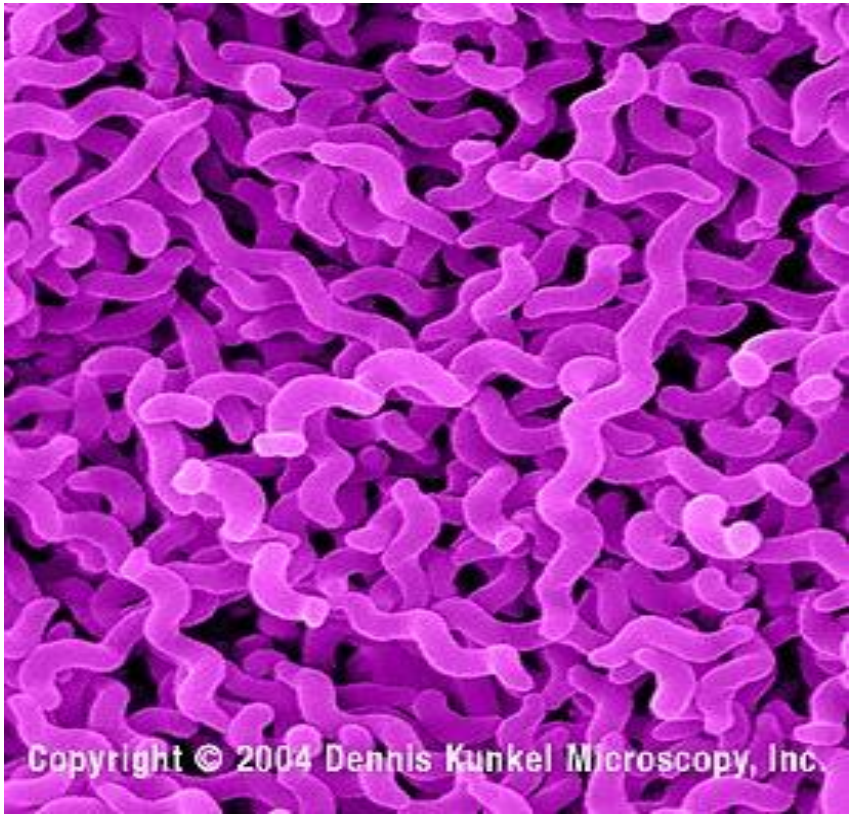
CAMPYLOBACTER

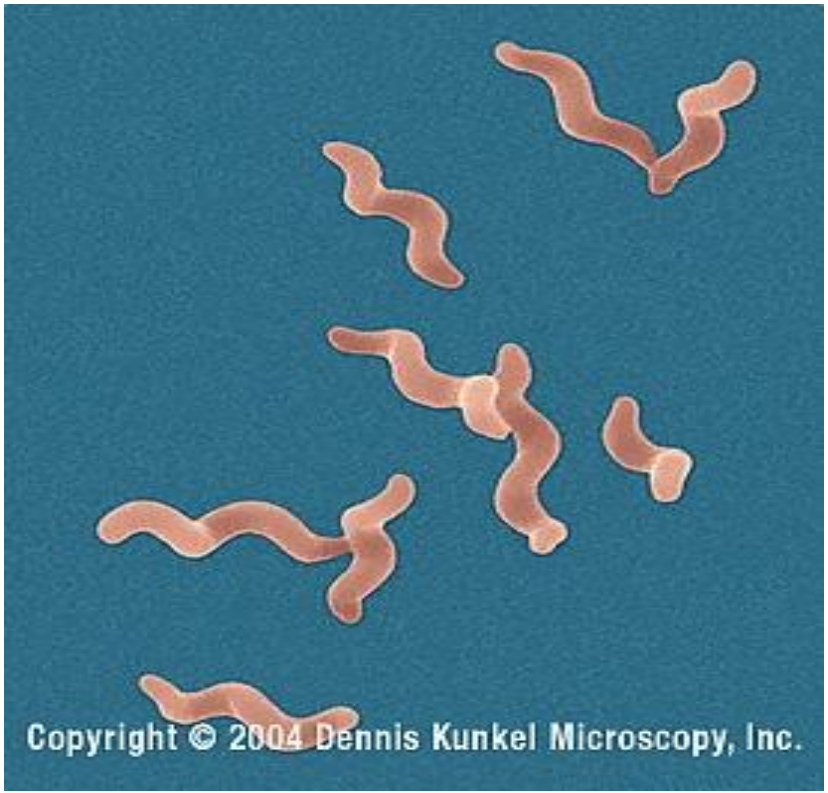
Familia Campylobacteriaceae

Genul *Campylobacter*

Caractere morfobiologice

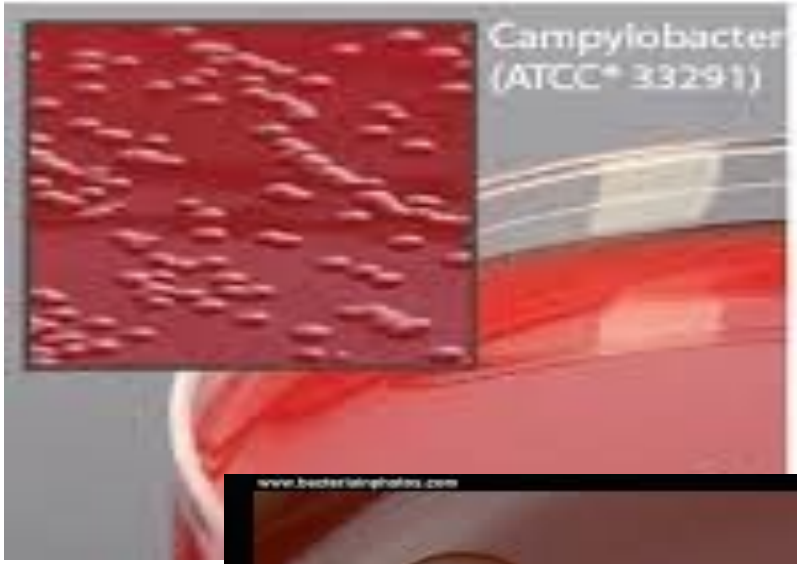
Reprezentanţii genului *Campylobacter* sunt bastonaşe Gram -, încurbate în virgula, în S sau “pescăruş in zbor”, mobili monotrichi. Trei specii de *Campylobacter* sunt patogene pentru om : *C. fetus, C. jejuni, C. coli*

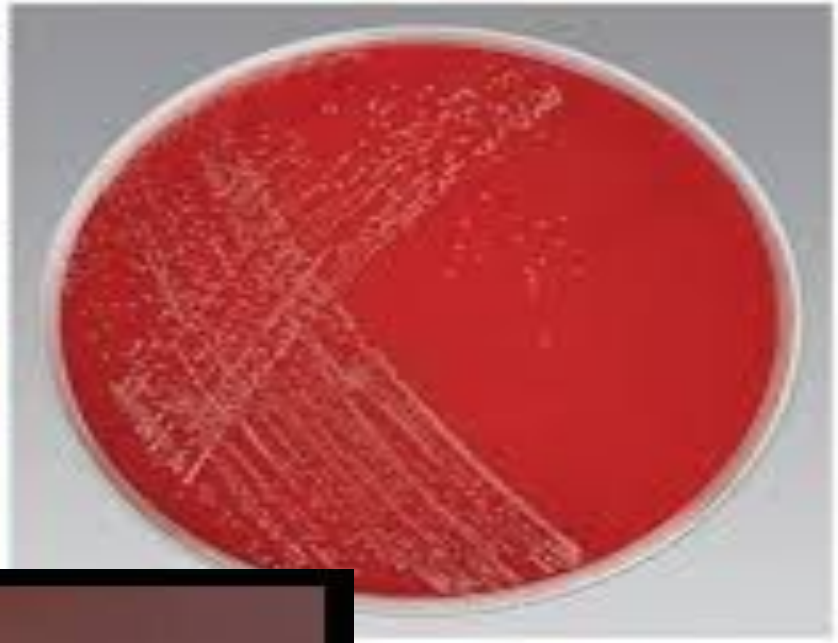

Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

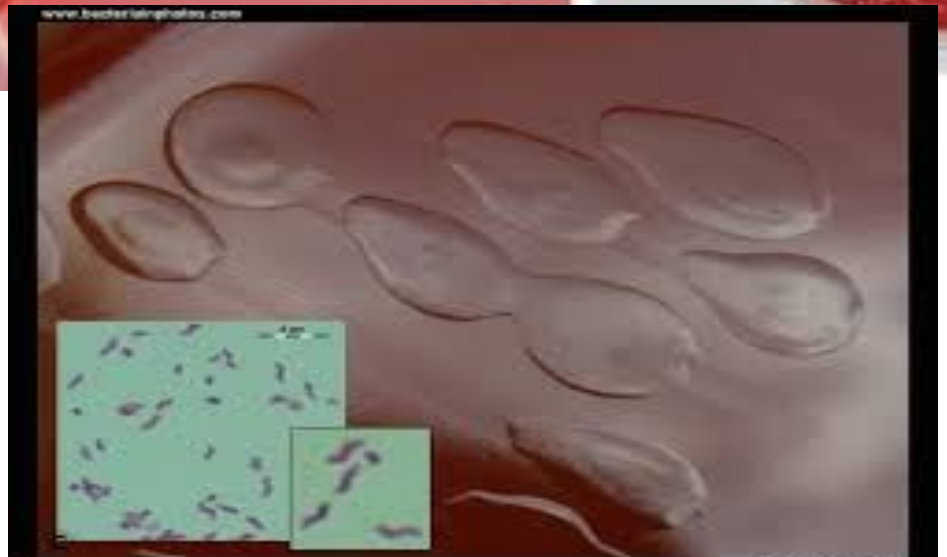

Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

- *Campylobacteriile* au metabolism respirator microaerofil.
- Pot fi izolate pe medii selective imbogăţite cu sânge conţinând numeroase antibiotice (bacitracină, novobiocină, vancomicină, polimixină, etc)
- Temperatura optima – 37 grade C.
- Colonii S, plate, cenuşii, translucide, 1-2 mm diametru, apar peste 2-4 zile de cultivare.

Campylobacter Blood Agar







• HABITAT

Campylobacteriile se intâlnesc în tubul digestiv al animalelor, în special ovine, porcine şi la păsări.

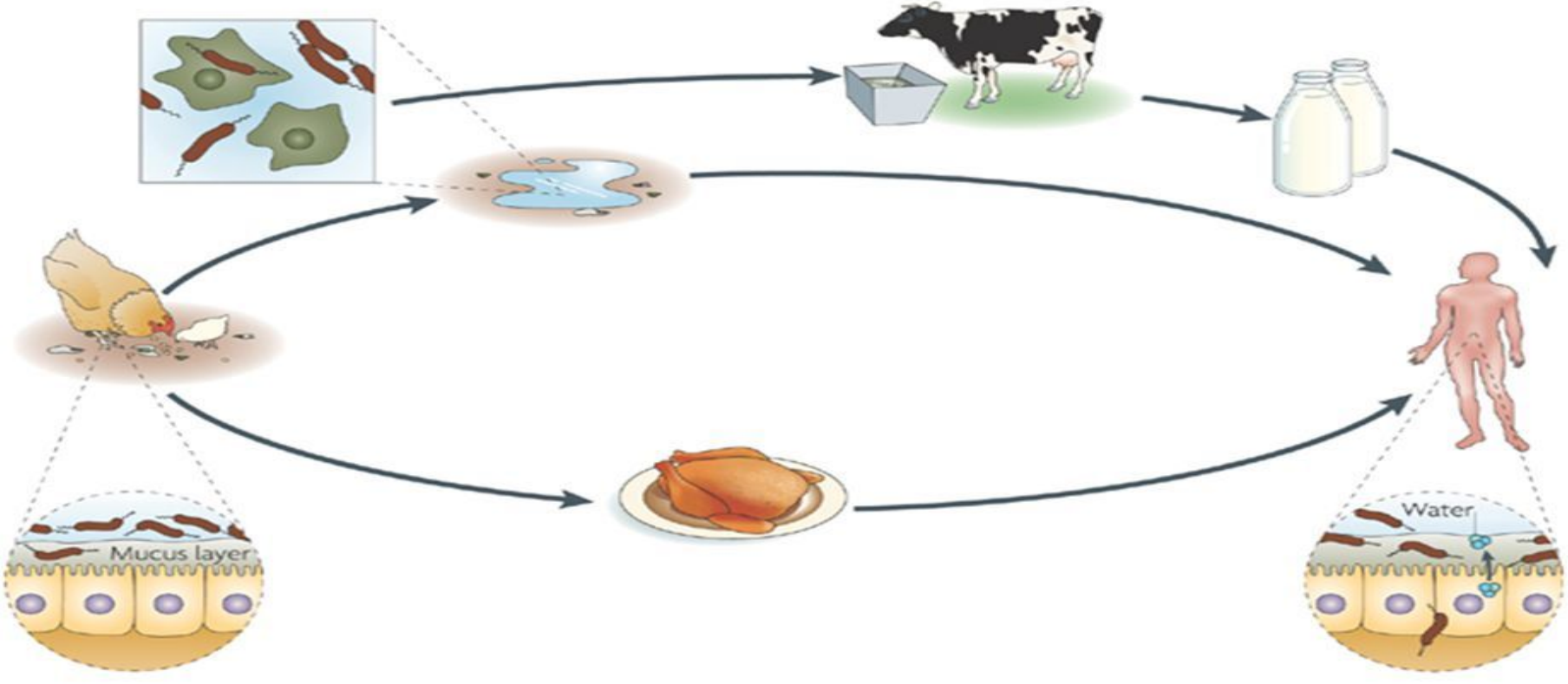
Contaminarea omului are loc pe cale alimentară (apă, lapte, carne).

Afecteaza toate vârstele, dar mai frecvent copiii, în condiţii de igienă precară.

Conform OMS campylobacterioza afecteaza anual 500 mln de persoane, inclusiv 200 mln copii sub 5 ani.

C. fetus determină septicemii la persoane fragilizate: cirotici, diabetici, cardiaci, gravide...

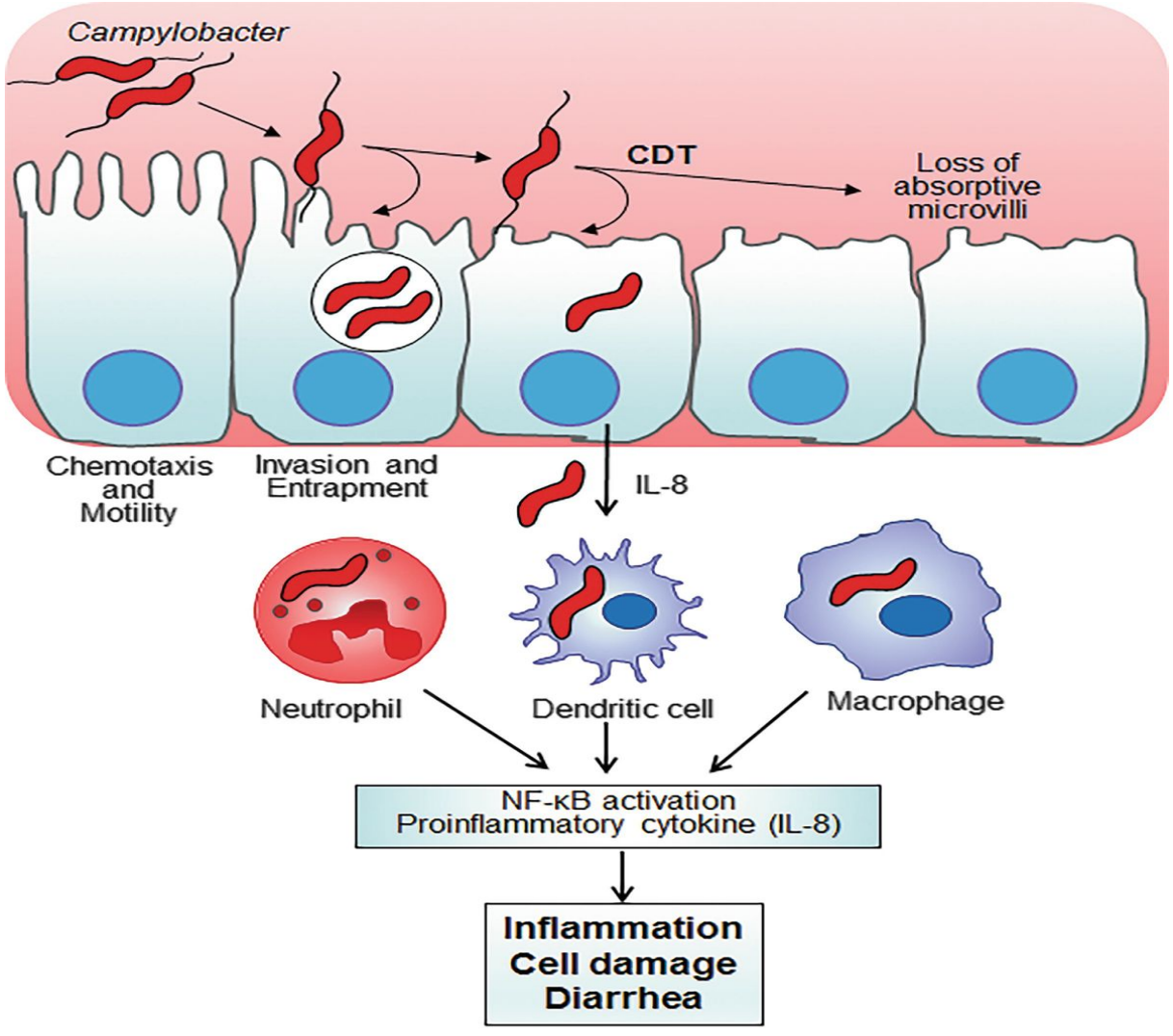
CAMPYLOBACTER LIFECYCLE



Nature Reviews | Microbiology

PATOGENEZA SI FORME CLINICE

- *C. jejuni/coli* au o putere enteropatogenă importantă, invazive, capabile să provoace un răspuns inflamator puternic, fiind responsabile de enterite.
- Citotoxina de tip A- B (CDT), legată de membrana externa, determină stoparea ciclului celular.
- Maladia evoluează cu durere abdominală, diaree apoasă sau cu sânge și puroi, posibil febră, cu vindecare spontană în câteva zile.


Campylobacter
CDT
Loss of absorptive microvilli
Chemotaxis and Motility
Invasion and Entrapment
IL-8
Neutrophil
Dendritic cell
Macrophage
NF-κB activation
Proinflammatory cytokine (IL-8)
Inflammation
Cell damage
Diarrhea

SENSIBILITATE LA AB

- Eritromicina si azitromicina sunt antibioticele de elecţie în tratamentul campilobacteriozelor digestive.
- Alte antibiotice: tetraciclina, fluorochinolone, aminoside, cloramfenicol, ampicilina

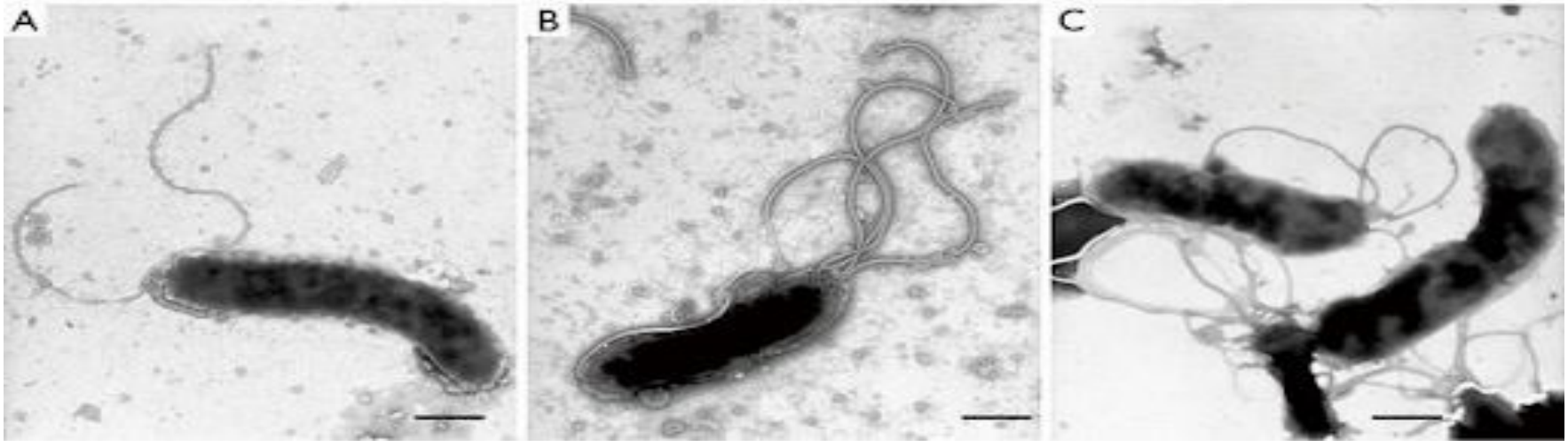
Familia Helicobacteriaceae

- **Genul** *Helicobacter*
- **32 specii**: *H.pylori* (gastric), *H.cinaedi, H.fennelliae* (intestinali)

H. pylori este agentul cauzal al gastritelor acute si cronice, ulcerului gastric, adenocarcinomei gastrice si a limfomei tesutului limfoid asociat mucoasei

- **Morfologia:**

- Bastonase gramnegative spiralate, cu flageli polari. Nu formeaza spori, nici capsule.



Caractere de cultura si biochimice

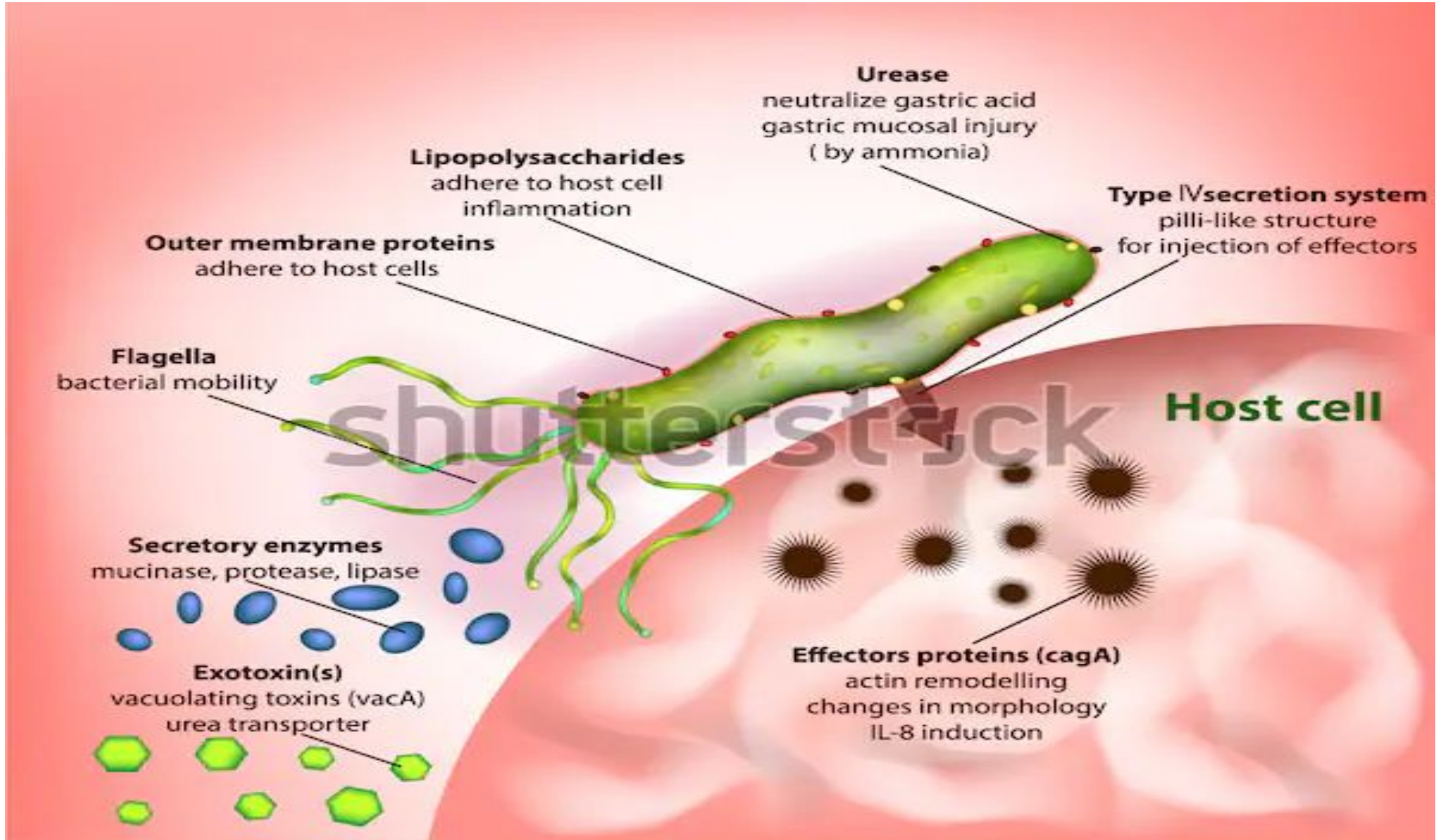
- *H.pylori* poate fi cultivat pe medii speciale, imbogatite cu sange, ser, galbenus de ou, in conditii de microaerofilie, la temperaturi intre 30 – 37 grade C.
- *H.pylori* produce abundent ureaza, ceea ce-i permite sa supravietuiasca in stomac.
- Catalazo si oxidazo-negativ, nu scindeaza carbohidratii

Factori de patogenitate

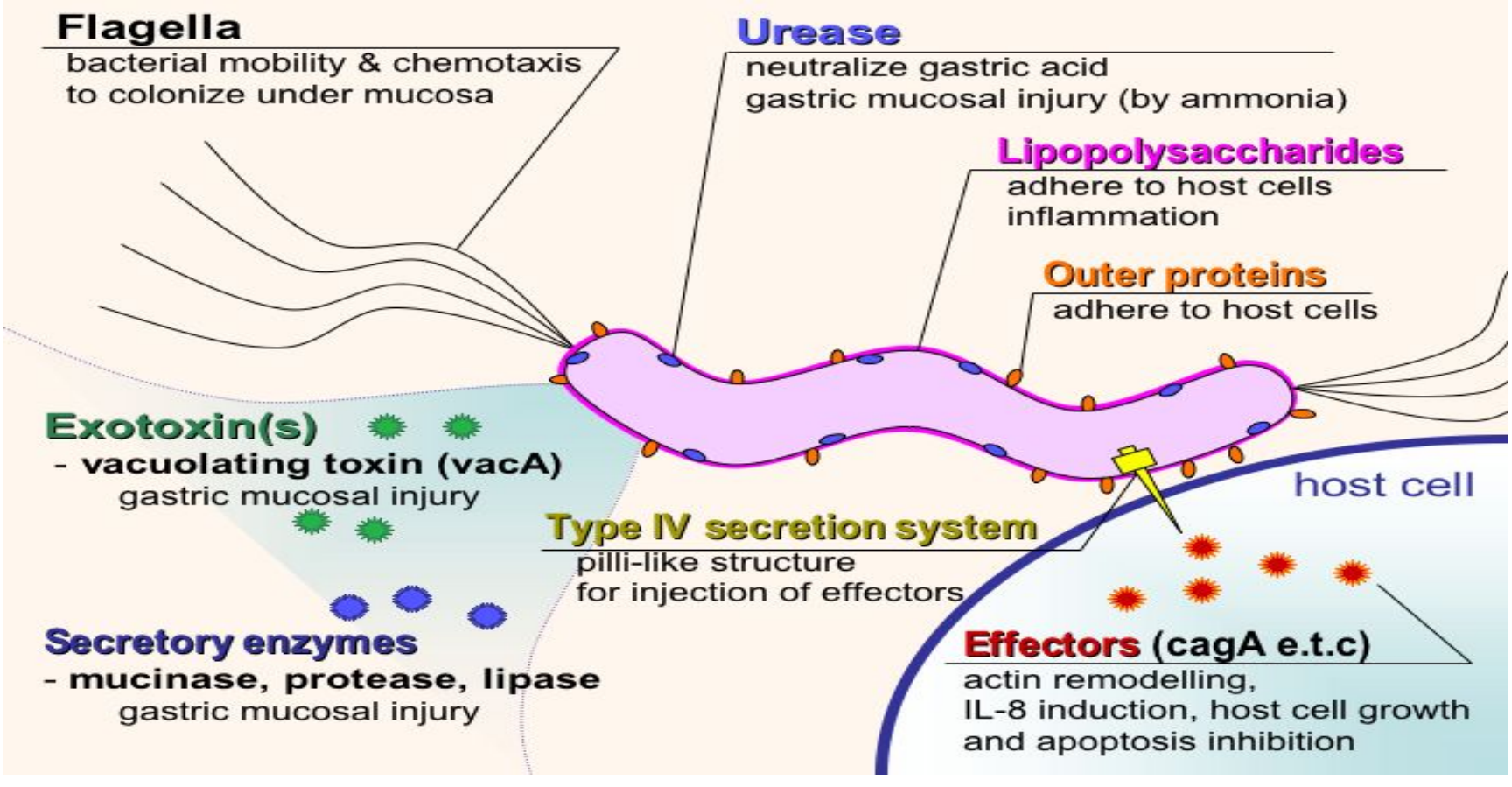
- **Adezine** (proteine din membrana externa, LPZ)
- **Enzime:** ureaza, mucinaza, fosfolipaze
- **Toxine:**

- *Toxina VacA* (determina apoptoza celulelor eukariote prin generarea de vacuole citoplasmatice mari)
- *Toxina CagA* (provoaca modificarea proteinelor celulare)

- **Sisteme de secretie**


Urease
neutralize gastric acid
gastric mucosal injury
(by ammonia)
Lipopolysaccharides
adhere to host cell
inflammation
Type IVsecretion system
pilli-like structure
for injection of effectors
Outer membrane proteins
adhere to host cells
Flagella
bacterial mobility
Host cell
Secretory enzymes
mucinase, protease, lipase
Exotoxin(s)
vacuolating toxins (vacA)
urea transporter
Effectors proteins (cagA)
actin remodelling
changes in morphology
IL-8 induction

Factorii de patogenitate



Epidemiologie

- Infectiile sunt comune, in special in tarile in curs de dezvoltare sau cu nivel socio-economic scazut
- Sursa de infectie - omul
- Mecanismul de transmitere - fecal-oral

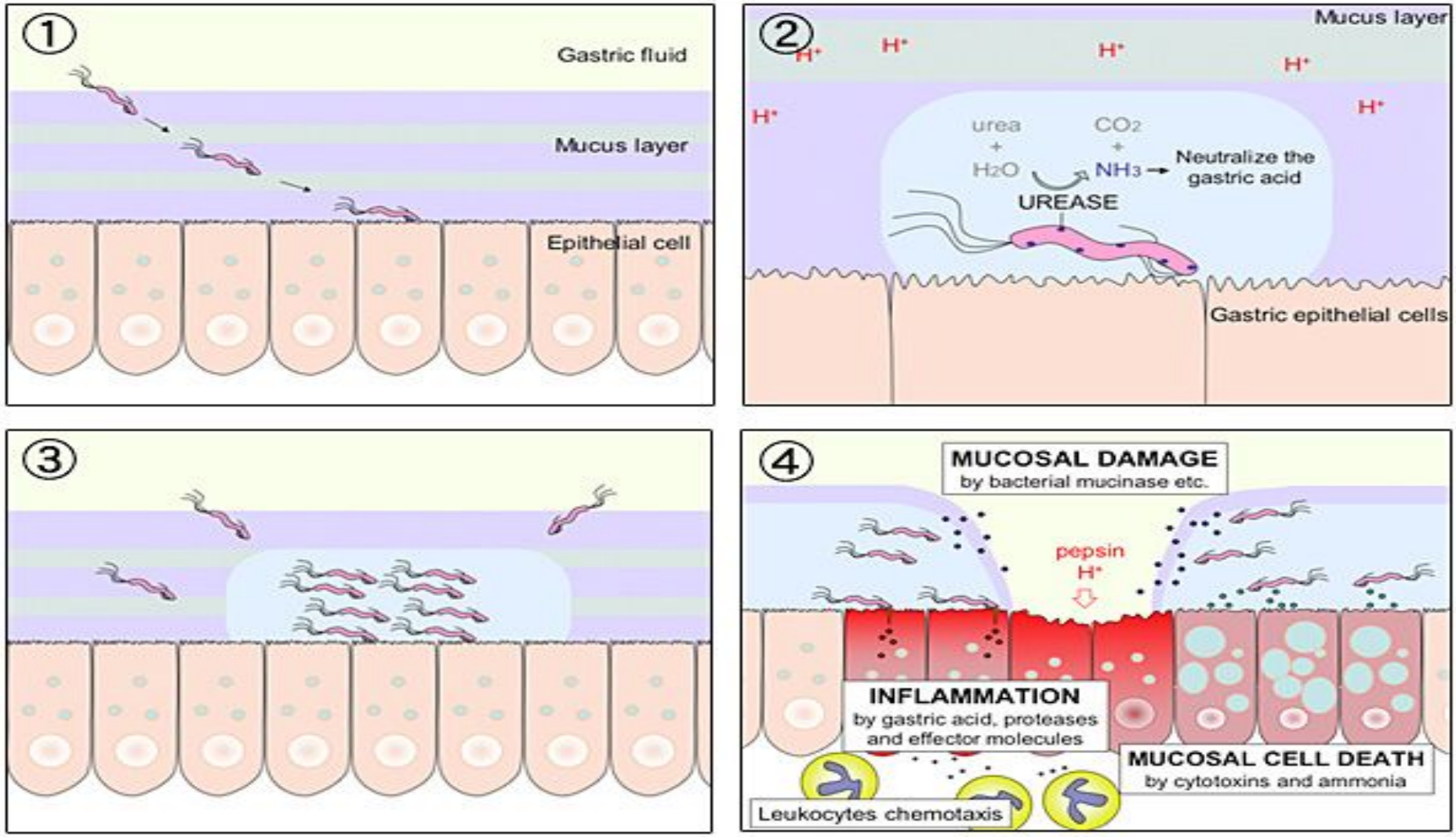
Patogeneza

- Colonizarea initiala este facilitata de:

(1) blocarea producerii de acid de catre o proteina bacteriana

(2) neutralizarea acizilor gastrici prin producerea de amoniac (activitatea ureazei)

- Helicobacter ulterior datorita mobilitatii active poate traversa mucusul gastric si adera la celulele gastrice epiteliale prin multiple proteine de adeziune de suprafata. Aceleasi proteine pot de asemenea sa se lege de proteinele gazdei si sa ajute bacteria sa evite detectia imuna.
- Leziunea tisulara localizata este mediata de **ureaza, mucinaza, fosfolipaze** si activitatea **citotoxinei A (VacA),** o proteina care, in urma endocitozei de catre celulele epiteliale, distruge celulele prin producerea vacuolelor.
- Proteina **CagA,** injectata in celulele epiteliale prin sistemul de secretie IV (tip seringa), interfereaza cu structura normala a citoscheletului celular.
- Colonizarea cu *H.pylori* este insotita de infiltratia celulara a lamina propria cu neutrofile si limfocite, urmata de inflamatie progresiva si formarea abceselor.


①
Gastric fluid
Mucus layer
Epithelial cell
②
Mucus layer
H+
urea
+
H2O
CO2
+
NH3
Neutralize the gastric acid
UREASE
Gastric epithelial cells
③
④
MUCOSAL DAMAGE
by bacterial mucinase etc.
pepsin
H+
INFLAMMATION
by gastric acid, proteases and effector molecules
MUCOSAL CELL DEATH
by cytotoxins and ammonia
Leukocytes chemotaxis

Manifestarile clinice

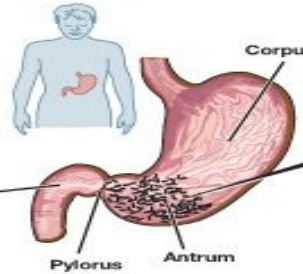
- Infectia primara este asimptomatica sau se manifesta prin nausee si dureri gastrice.
- Dupa o perioada de latenta de mai multi ani, simptomele de gastrita sau ulcer peptic includ nausee, anorexie, voma, dureri in epigastru.
- Multi pacienti raman asimptomatici decade, chiar pana la perforarea ulcerului
- Complicatii – hemoragie si peritonita

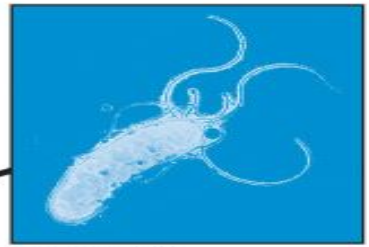
Helicobacter pylori

— the bacterium causing peptic ulcer disease

Infection

Helicobacter pylori infects the lower part of the stomach, antrum.

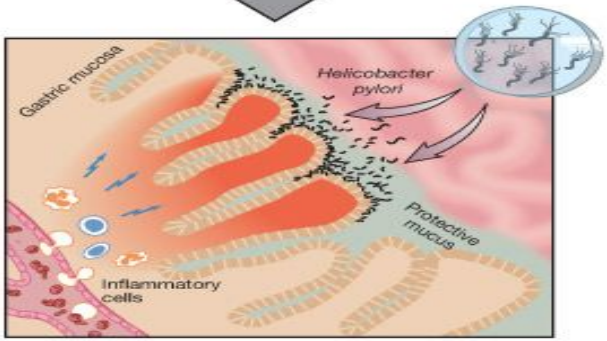




Helicobacter pylori

Inflammation

Helicobacter pylori causes inflammation of the gastric mucosa (gastritis). This is often asymptomatic.



Ulcer

Gastric inflammation may lead to duodenal or gastric ulcer. Severe complications include bleeding ulcer and perforated ulcer.

© The Nobel Committee for Physiology or Medicine

Diagnostic de laborator

- **Microscopic**: examinarea histologica a bioptatelor
- **Testul ureazei** - relativ sensibil si specific
- **Detectarea antigenului *H. pylori*** in materii fecale (ELISA)
- **Examenul bacteriologic**
- **Examenul serologic** demonstreaza expunerea la *H. pylori*

Tratament si profilaxie

- Terapie combinata cu un inhibitor al pompei protonice (ex., omeprazol), macrolide (ex., claritromicina) si β-lactamice (ex., amoxicilin) sau metronidazol pentru 2 saptamani.

- Nu exista vaccinuri umane la momentul actual.