

# FAMILIA VIBRIONACEAE. MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HOLEREI.



# Clasificare si caractere generale ale familiei Vibrionaceae

**Familia:** *Vibrionaceae*

**Genuri:** *Vibrio*

*Photobacterium*

*Salinivibrio*

*Aliivibrio (Allomonas)*

*Enterovibrio*

*Grimontia*

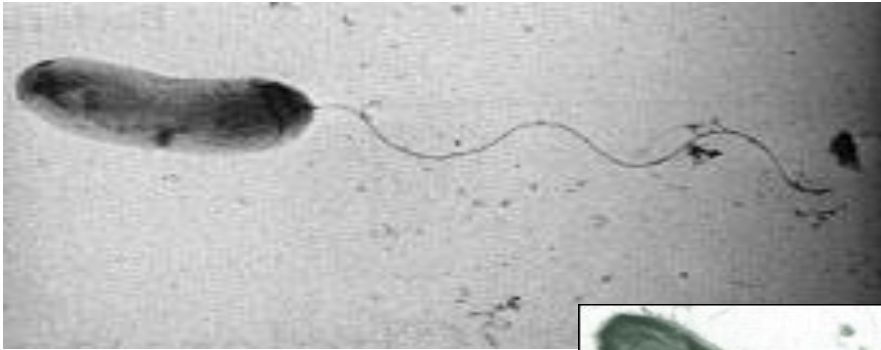
*Catenococcus*

*Listonella*

**Caractere generale (cheie) ale familiei:** bastonașe G-, drepte sau încurbate, mobile, reduc nitrații în nitriți, fermentează glucoza, **oxidaza+**, catalaza+

# GENUL VIBRIO

Bastonașe G-, încurbate, polimorfe, 2-3  $\mu\text{m}$ /0,5-0,8  $\mu\text{m}$ , nesporogene, necapsulate, mobile monotriche (flagel polar unic)





- **Clasificarea:**

- **Vibrioni halotoleranți** - *Vibrio cholerae*  
(agenții holerei și diareilor holeriforme)
- **Vibrioni halofili** – *V.parahaemolyticus*,  
*V.alginolyticus*, *V.anguillarum*, *V.vulnificus*,  
*V.metschnikovii* (oportuniști, pot cauza  
toxiinfecții alimentare, septicemii,  
meningite, supurații)
- **Vibrioni *free life*** (saprofiți)

# 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). Crește pe medii simple, dar preferă **pH alcalin (7,6 - 9,6)**. Halotolerant (0,5 - 7% NaCl, optimal – 3%).

Sensibil la pH acid.

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

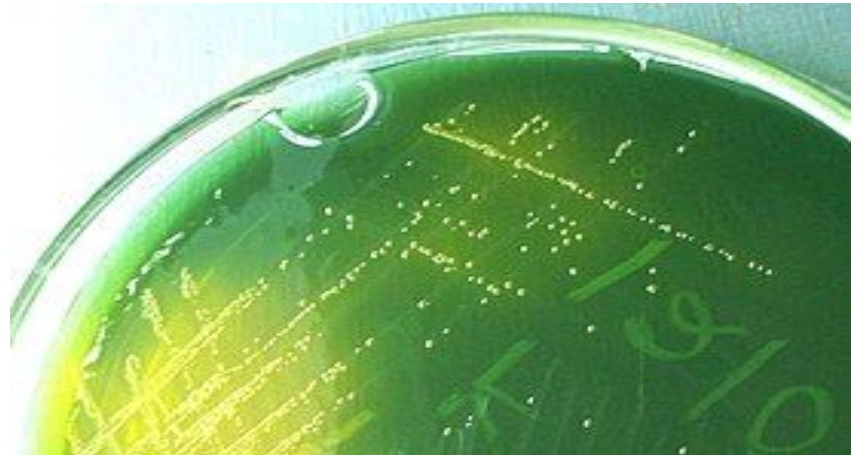
**Medii de izolare a culturii pure:**

- **Geloza alcalină (GA)** - mediu selectiv
- Mediul **TCBS** (tiosulfat-citrat-bilă-zaharoză) – DD și selectiv
- **Manifestarea creșterii culturii de vibrioni**

**AP** – peste 3-6 ore de incubare – vâl fin la suprafața mediului

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

**TCBS** – peste 12 ore – colonii S. opace. galbene





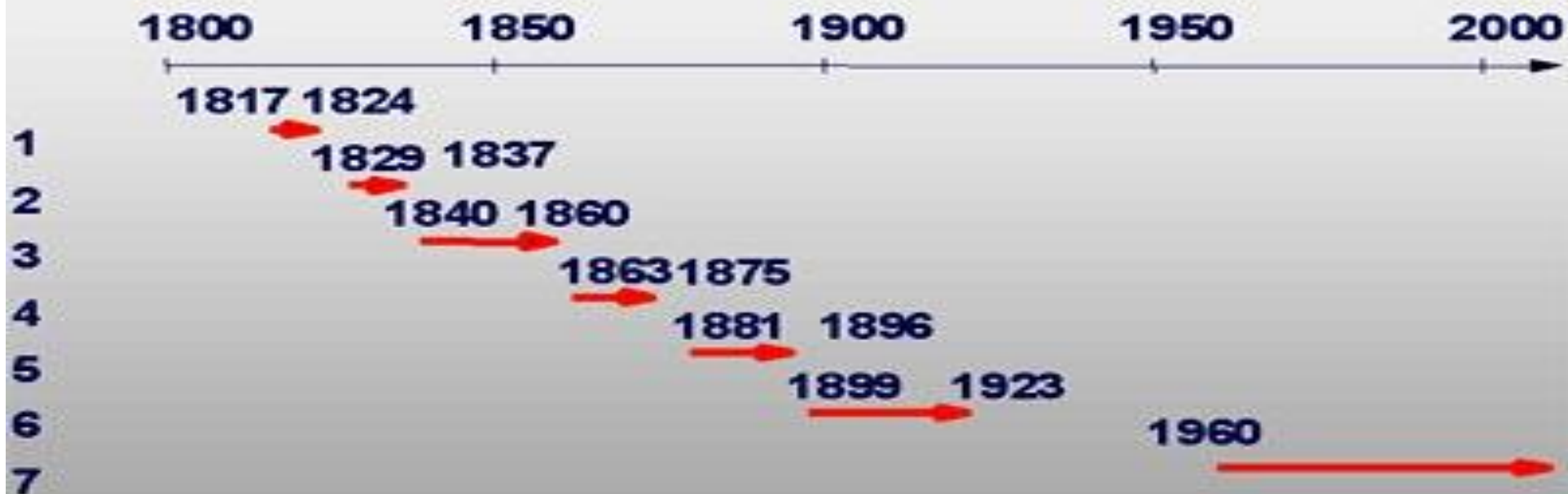
- **Caractere biochimice:** *V.cholerae* posedă catalază și oxidază, reduce nitrații în nitriți, produce indol, posedă gelatinază, lizindecarboxilază (LDC) și ornitindecarboxilază (ODC), fermentează și oxidează glucoza până la acid (testul Hugh-Leifson), nu scindează lactoza.
- Conform activității glicolitice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



Se disting 2 biotipuri (variante) de *V.cholerae*: **clasic** (*V.cholerae cholerae*) și **El Tor** (*V.cholerae El Tor*), identice morfologic și 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 stație de carantină din El Tor (peninsula Sinai), în 1961 determină pandemia a VII

## Les pandémies de choléra



# Diferențierea biovariantelor

Caractere	<i>V.cholerae cholerae</i>	<i>V.cholerae El Tor</i>
Aglutinarea eritrocitelor de găină	-	+
Hemoliza eritrocitelor de berbec	-	+
Producerea acetoiniei (test VP)	-	+
Liza cu bacteriofagi	C (IV)	ET (II)
Creșterea pe mediu cu polimixină	-	+

# STRUCTURA ANTIGENICĂ A *VIBRIO CHOLERAE*

- Antigenul **O** somatic, LPZ, termostabil (peste 200 serogrupe - O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>....O<sub>200</sub>...)

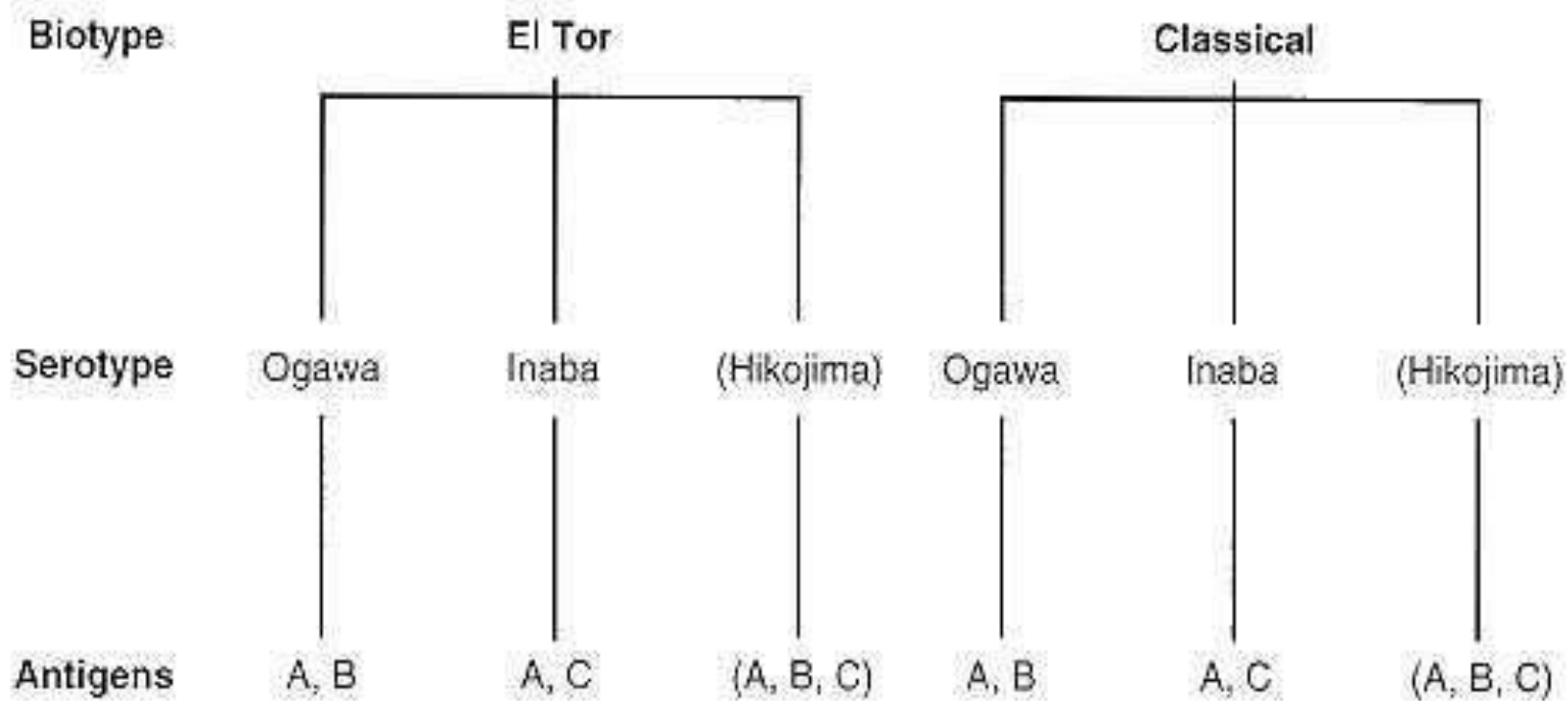
Ag **O<sub>1</sub>** este constituit din 3 fracții - **A,B,C**

Respectiv se disting 3 serovariante ale

*V.cholerae* O<sub>1</sub>: **Ogawa** (**A,B**), **Inaba** (**A, C**) și

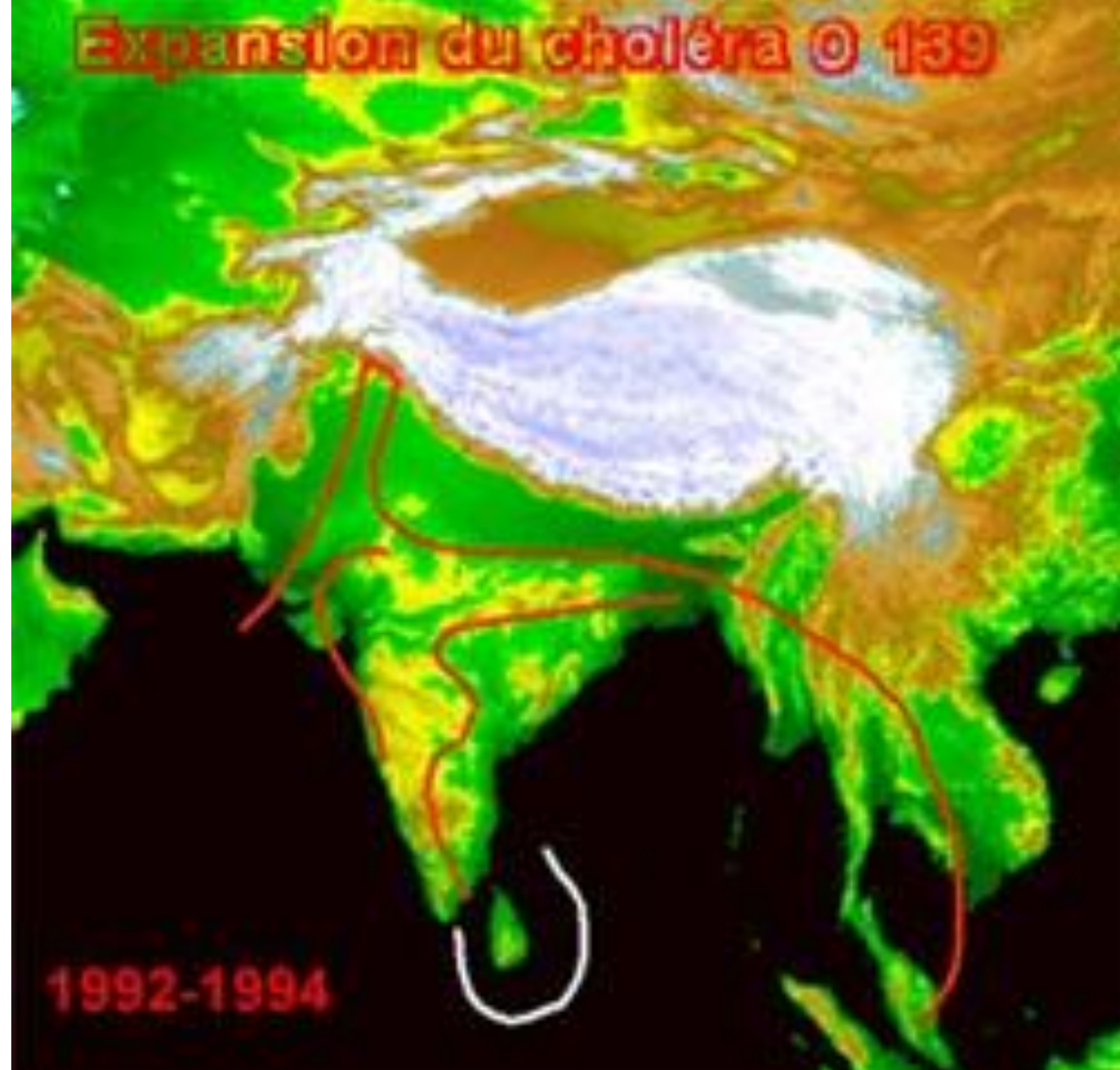
**Hikojima** (**A; B; C**)

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



- *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, toxiinfecții alimentare, gastro-enterite

# Expansion du choléra O 139

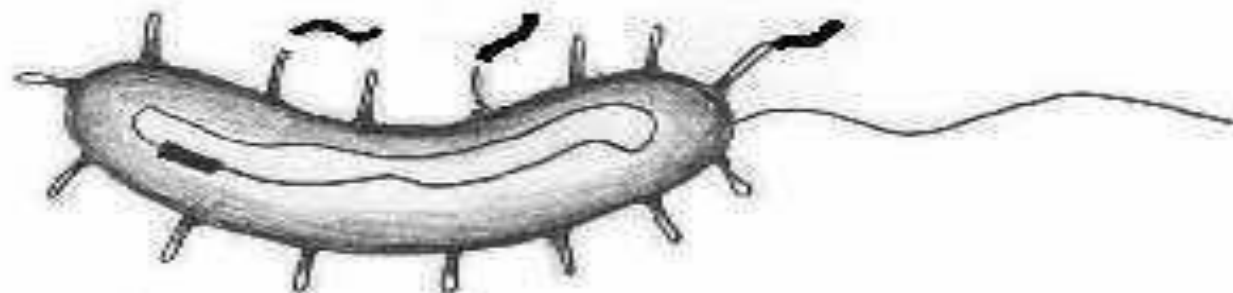


1992-1994

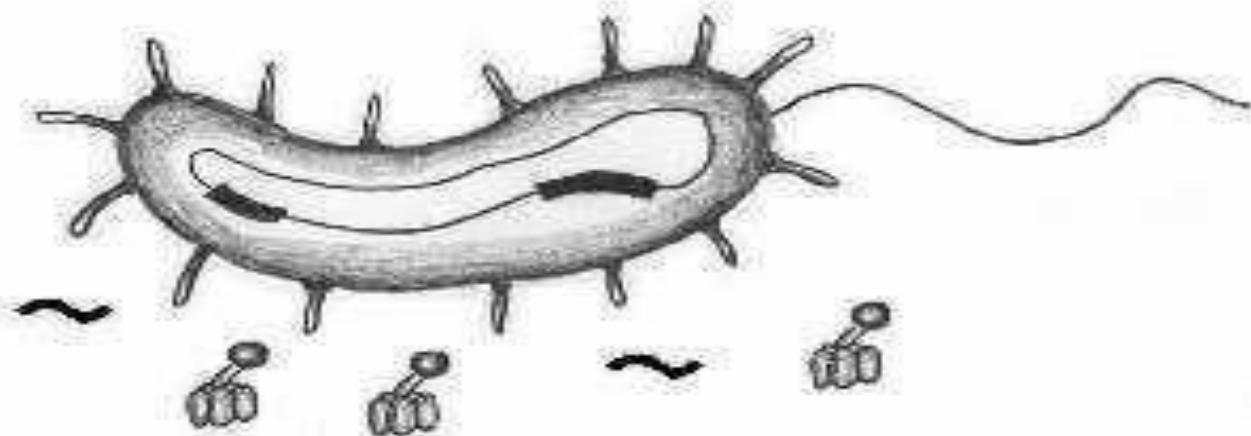


# FACTORI DE PATOGENITATE

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



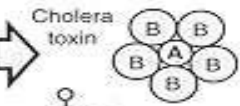
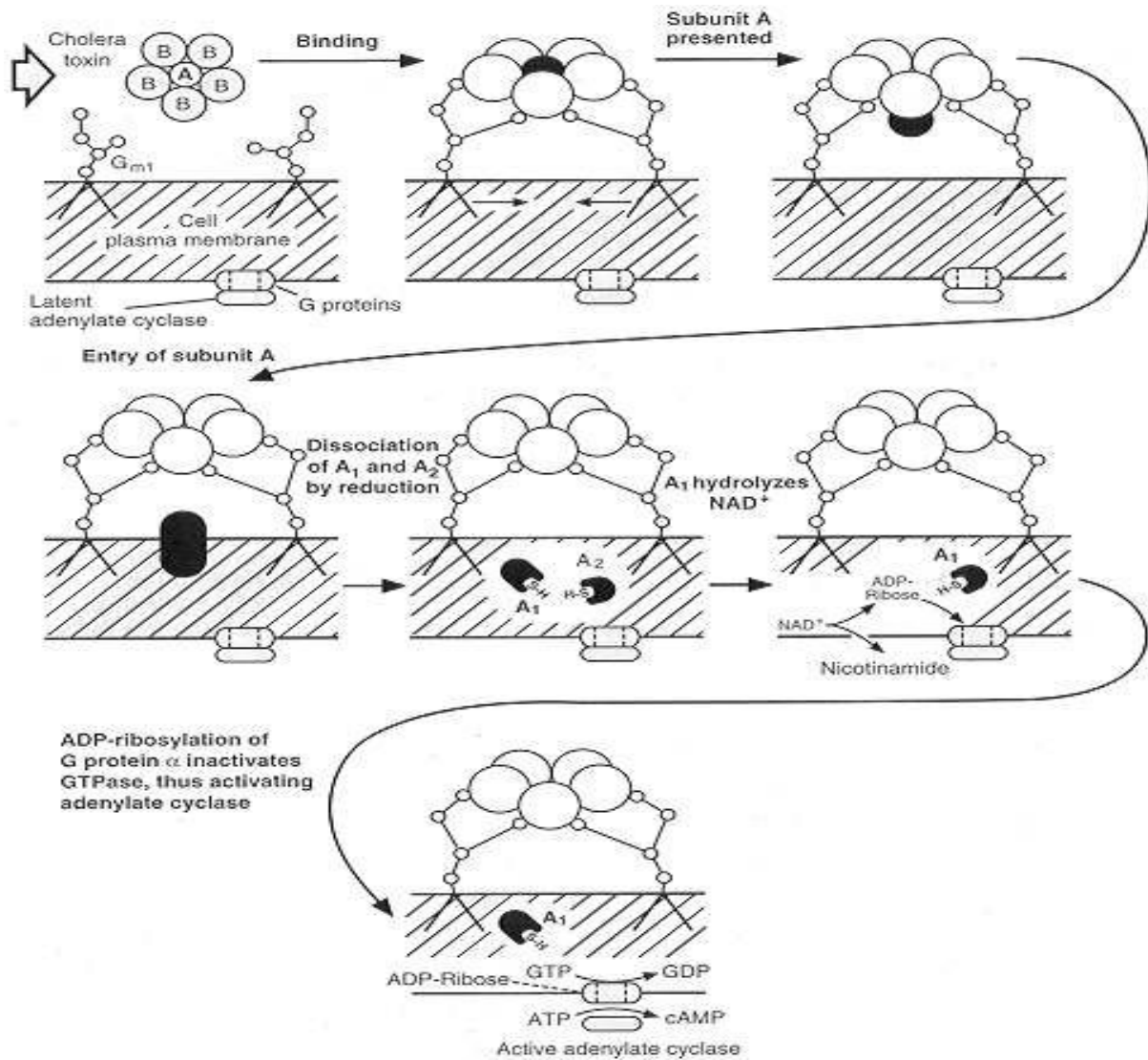
A virulent *V. Cholerae*  
with TCP but no toxin.



New virulent *V. Cholerae*  
with TCP and toxin.

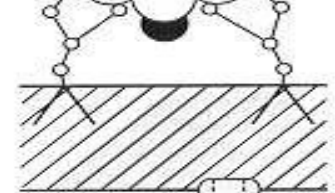
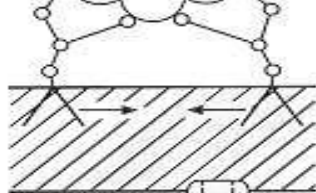
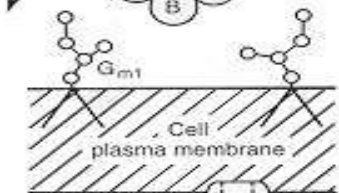
## Mecanismul de acțiune al enterotoxinei:

Subunitățile B servesc la **fixarea** pe receptorul gangliozidic **GM1** de pe membrana enterocitului. Urmează modificarea conformațională 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 **creșterea concentrației de cAMP** intracelular. Rezultă **inhibiția absorbției bicarbonatului și hipersecreția cloridului**. Apa și electroliții ( $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$   $\text{Cl}^-$   $\text{HCO}_3^-$ ) se acumulează în lumenul intestinal. Rezultă **deshidratare extracelulară intensă cu hemoconcentrație, hipokaliemie, șoc hipovolemic și acidoză metabolică**.



Binding

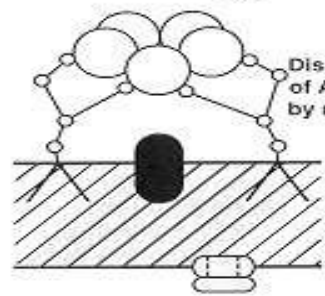
Subunit A presented



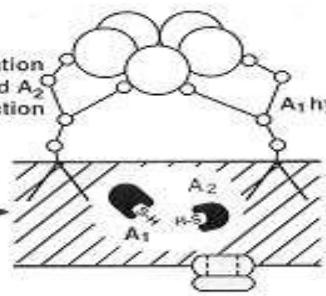
Latent adenylyl cyclase

G proteins

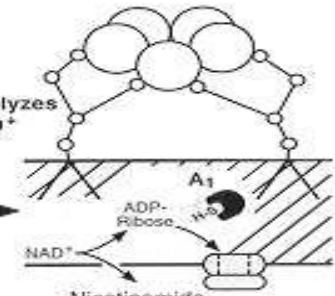
Entry of subunit A



Dissociation of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> by reduction

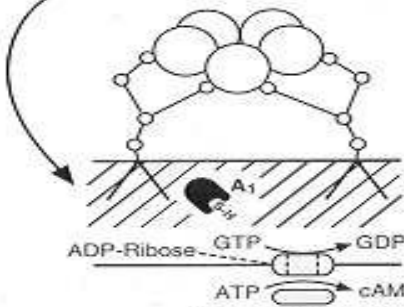


A<sub>1</sub> hydrolyzes NAD<sup>+</sup>



Nicotinamide

ADP-ribosylation of G protein α inactivates GTPase, thus activating adenylyl cyclase



Active adenylyl cyclase

ADP-Ribose

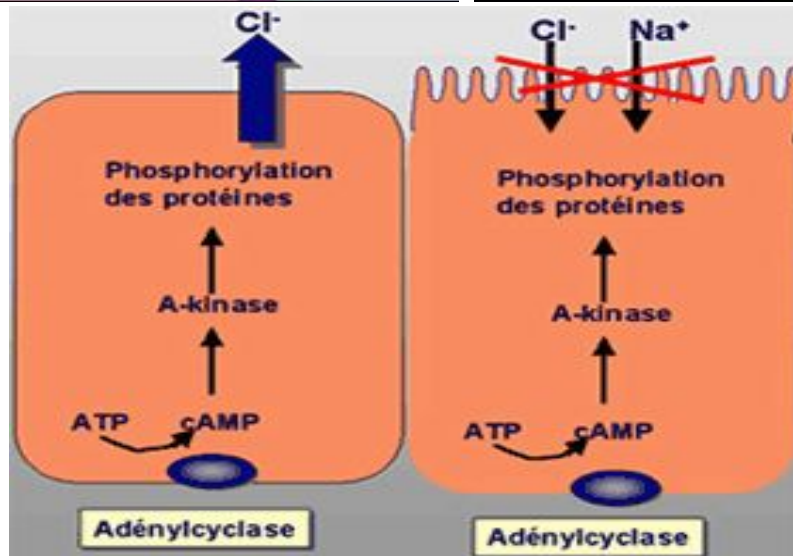
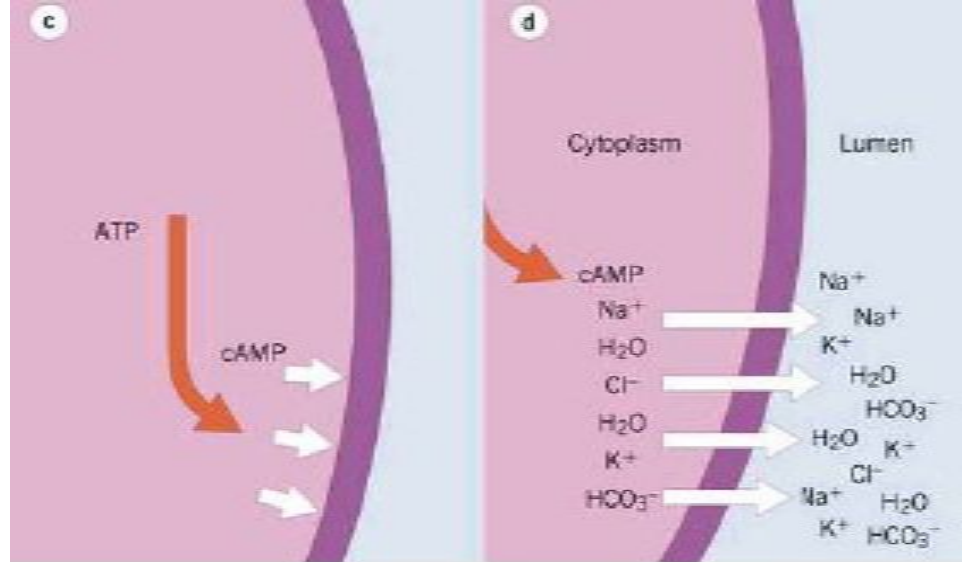
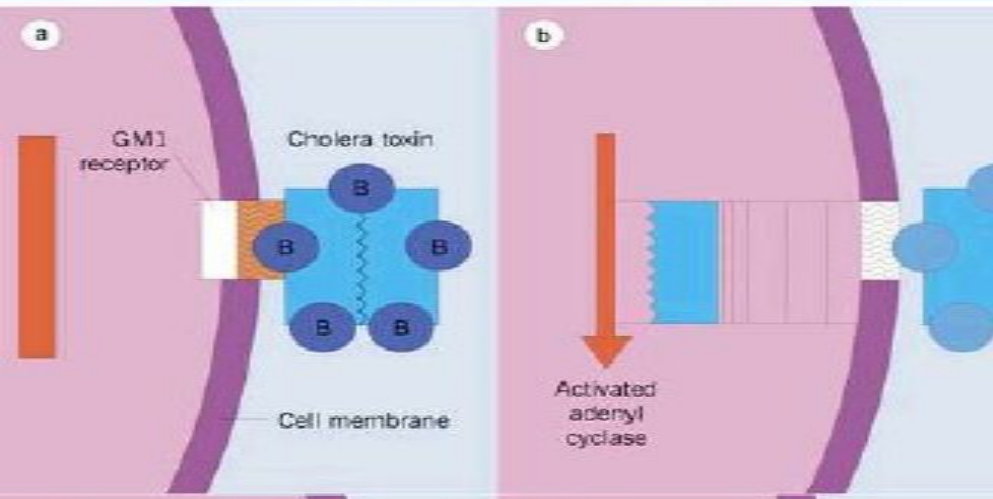
GTP

GDP

ATP

cAMP

MECHANISM OF ACTION OF *VIBRIO CHOLERAE* TOXIN



# PATOGENEZA HOLEREI ȘI MANIFESTĂRILE CLINICE

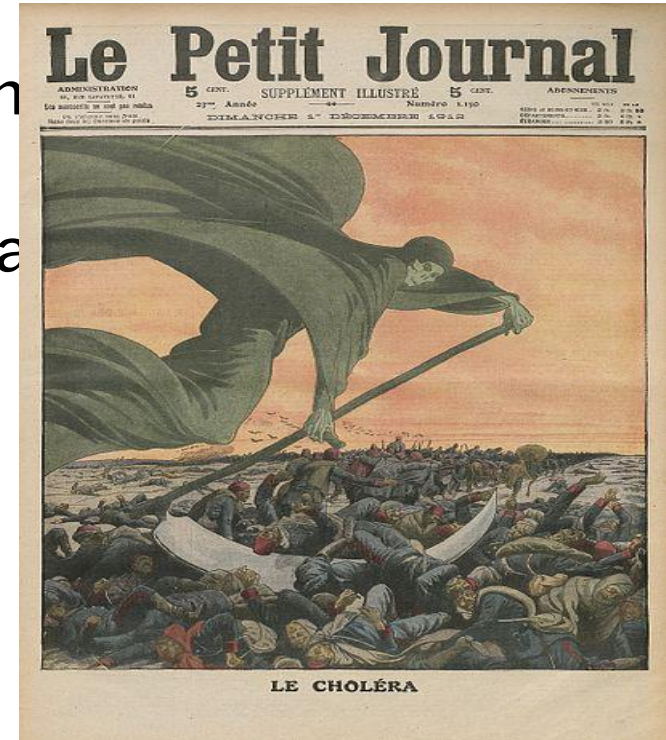
- HOLERA – gastroenterită acută, strict umană.
- Anual – 3-5 mln infectati, 100-130 mii decedati
- Agentul cauzal – *V.cholerae* O1/O139
- Sursa de infecție–bolnav, convalescen

purtător sănătos

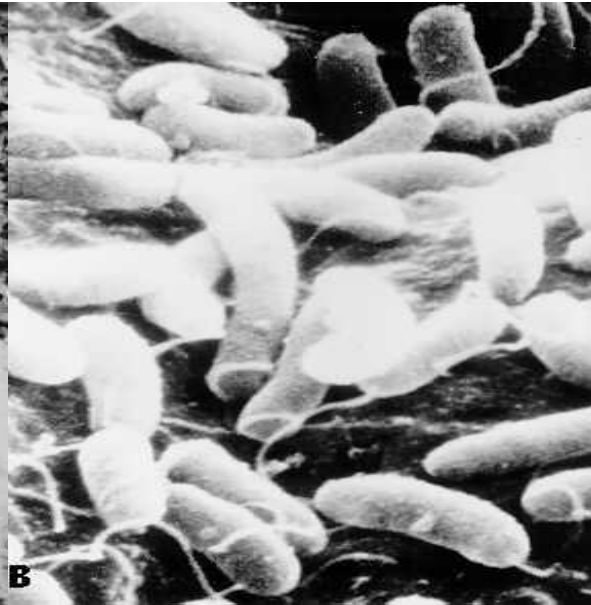
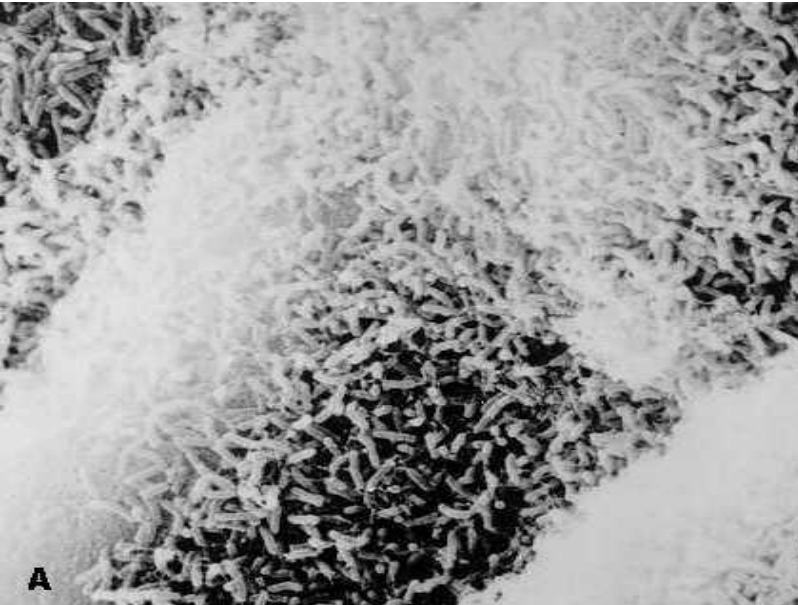
- Mecanismul de transmitere– fecal-oral
  - Alimentar (apă, alimente, fructe de mare)
  - Contact direct (manual)

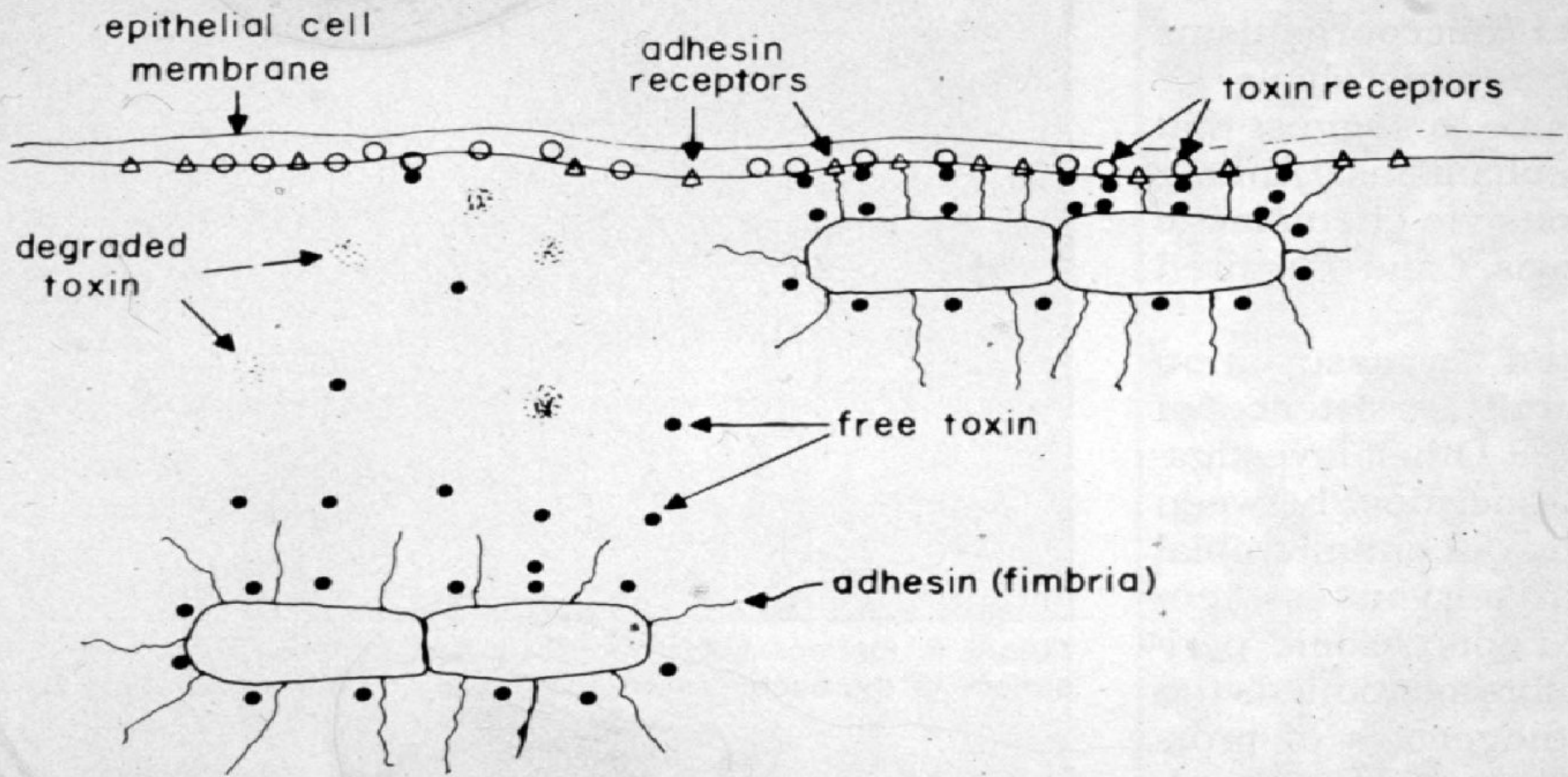
Doza infectantă –  $10^9$  -  $10^{11}$  UFC

( $10^4$  pentru persoane cu hipoaciditate gastrică)



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







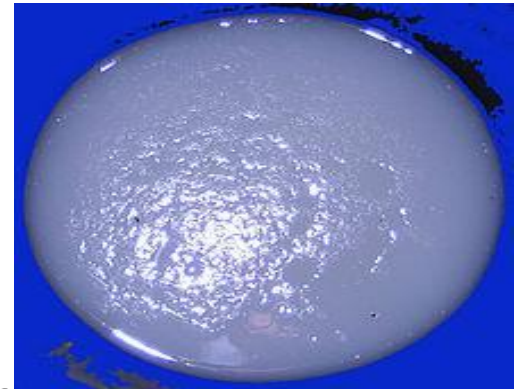
## • **Evoluția clinică a holerei:**

I - Perioada de **incubație** (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 – și vome abundente).

*Consecințe* – deshidratare (3-20 litri eliminați în 24 ore), carențe de săruri, acidoză, hipoxie tisulară, hipotensiune, contracții (crampe) musculare.



# LIT DE CHOLÉRIQUE



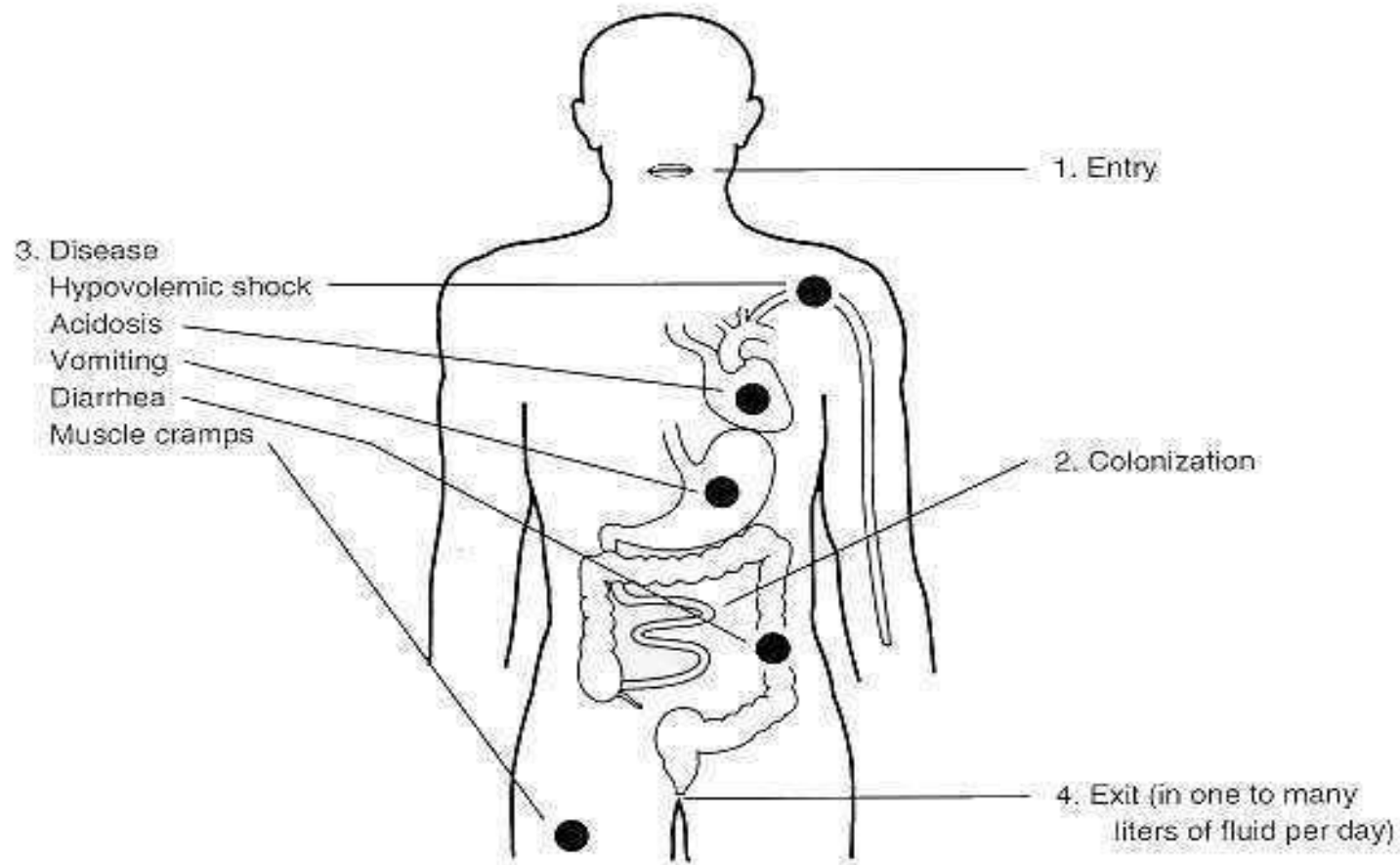


**IV - Algida holerică (stare extrem de gravă, hipotermie, asfixie, anurie, colaps, comă, deces)**

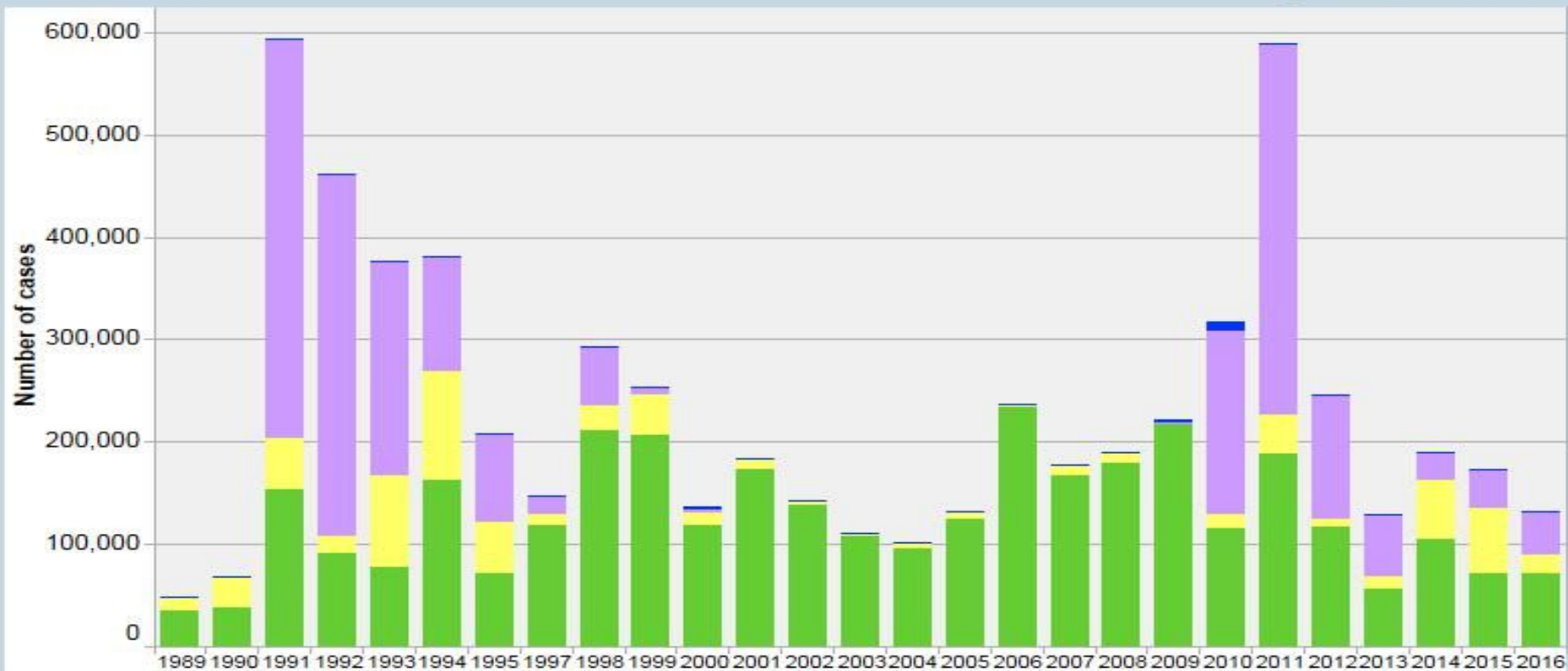


# Imunitate

- umorală (sIgA, IgM, IgG),
- antibacteriană și antitoxică, de scurtă durată (2 ani), reinfecții sunt posibile



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



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

■ Oceania    
 ■ Americas    
 ■ Asia    
 ■ Africa

- **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.



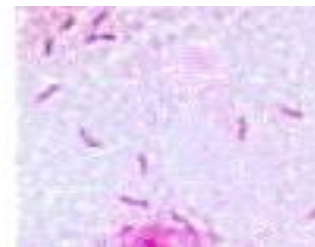
# DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HOLEREI

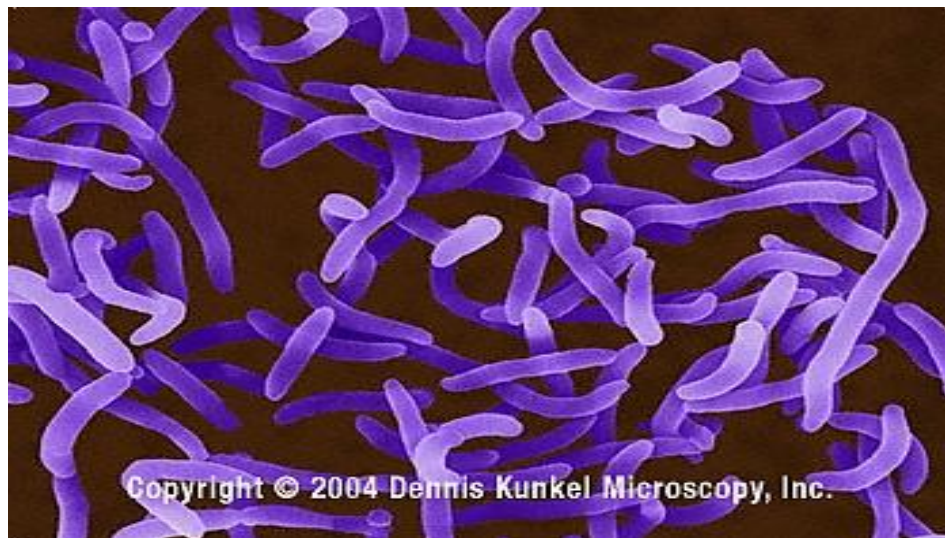
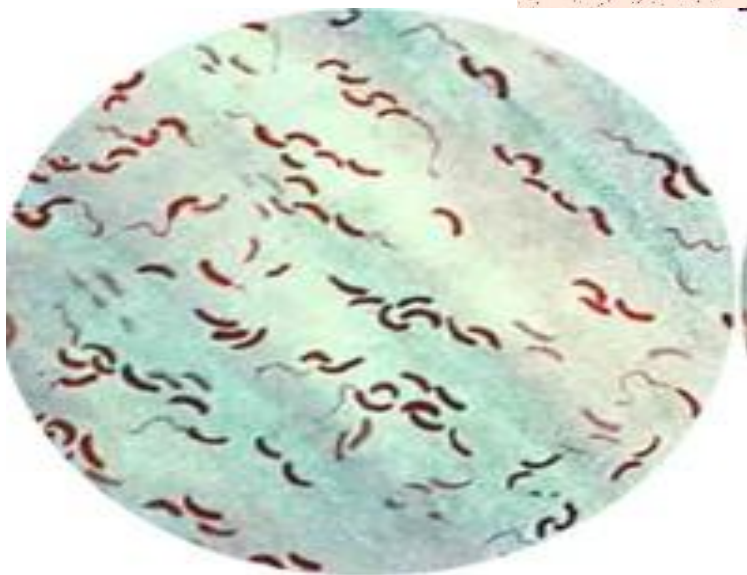
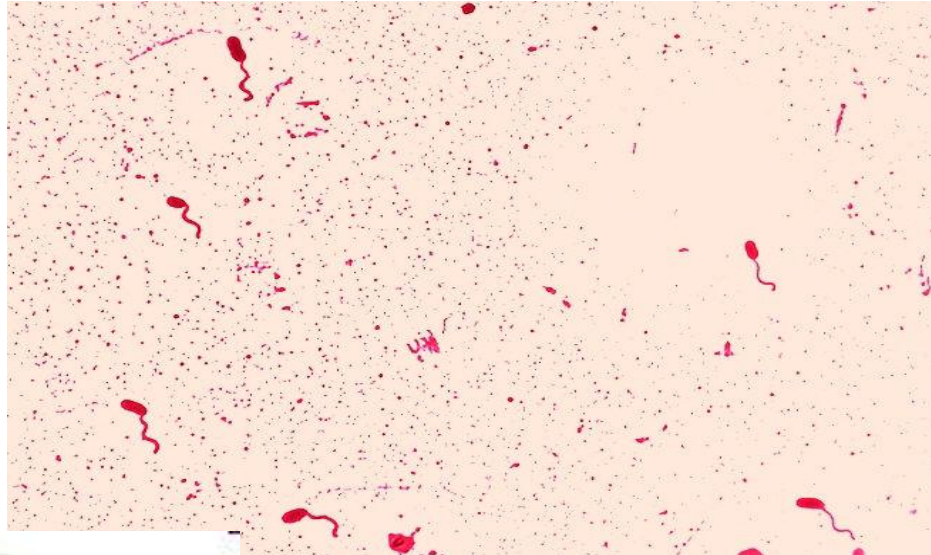
- **Prelevate:** mase vomitive, materii fecale, bilă (purători), de la cadavru – 3 fragmente din intestinul subțire și vezica biliară, prelevate din mediul extern (apa, alimente)

- **Metode de diagnostic**

## 1. Diagnosticul rapid

- Frotiu Gram (bacterii G-, încurbate)
- Studierea mobilității (preparate native – bacterii mobile, grupate în “bancuri de pești”)
- Imobilizarea și aglutinarea vibrionilor cu serul anti-O1
- Imobilizarea vibrionilor cu bacteriofagi “C” și “ET”



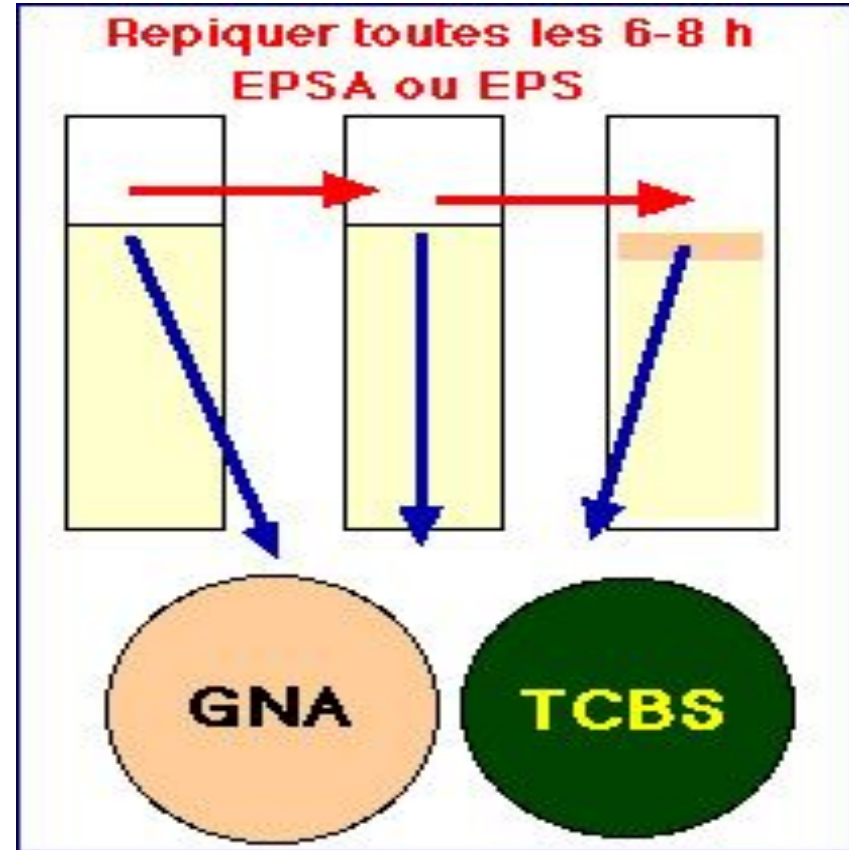


Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

## 2. Examenul

### bacteriologic (de bază)

- Prelevatele se însămânțează în AP I (îmbogățire) și GA I / TCBS (izolarea culturii pure) – termostat, 37 grade C
- Peste 6 ore se examinează cultura din AP (văl la suprafață?), utilizată pentru diagnosticul rapid, apoi se reînsămânțează pe AP II și GA II.



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



### 3. Depistarea toxinei

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

### 4. Serodiagnostic (retrospectiv)

Anticorpilor (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 ȘI PROFILAXIA HOLEREI

## • Tratament

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

## Profilaxie

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





# VIBRIONII HALOFILI

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

# CAMPYLOBACTER

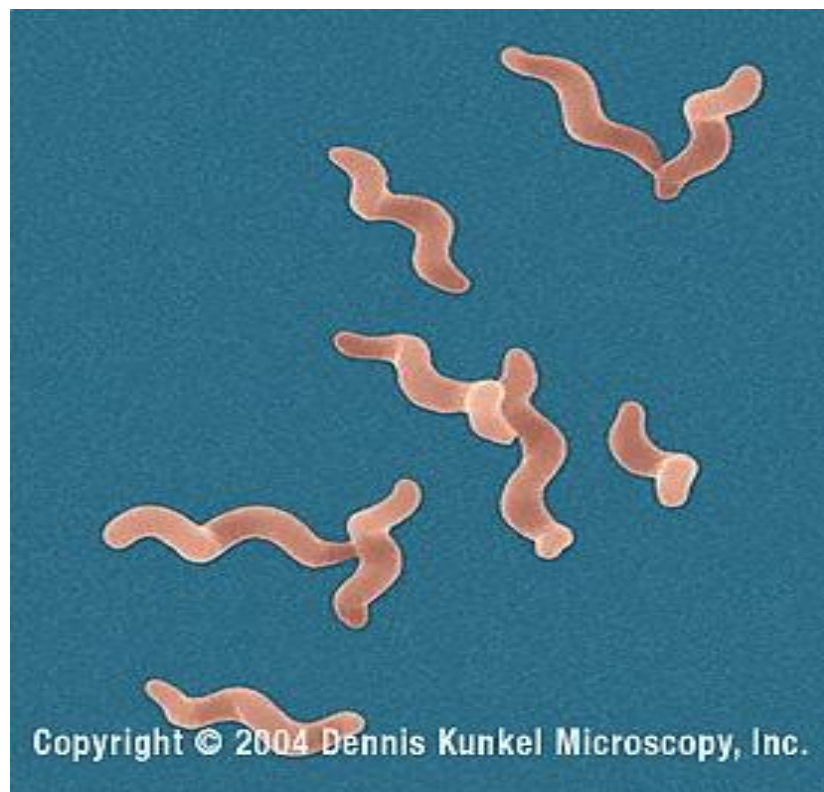
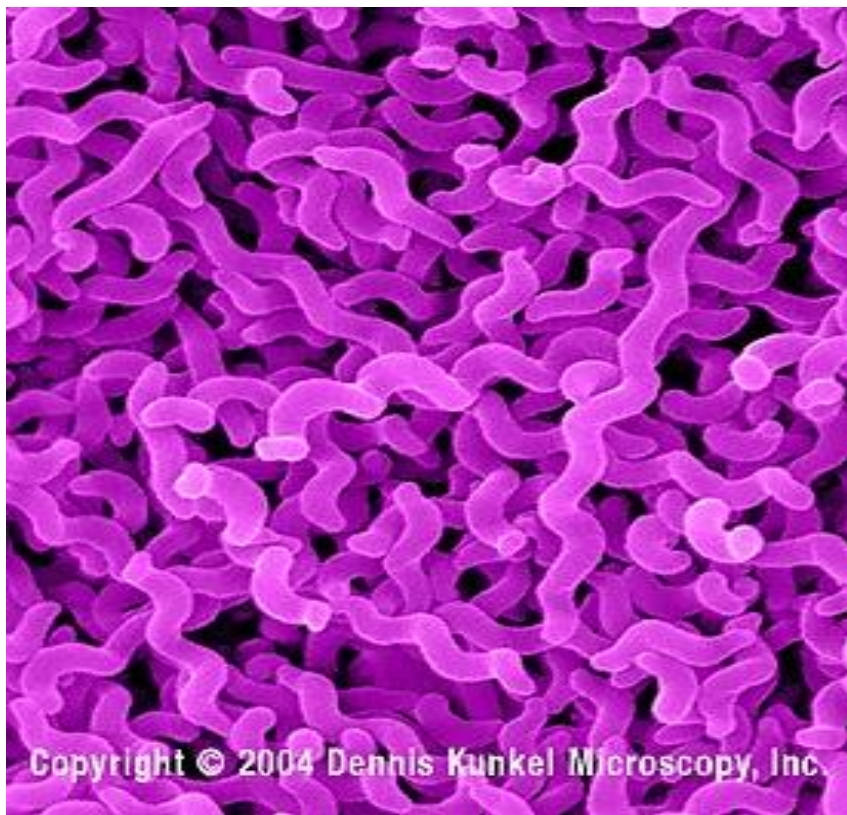
**Familia** Campylobacteriaceae

**Genul** *Campylobacter*

## **Caractere morfobiologice**

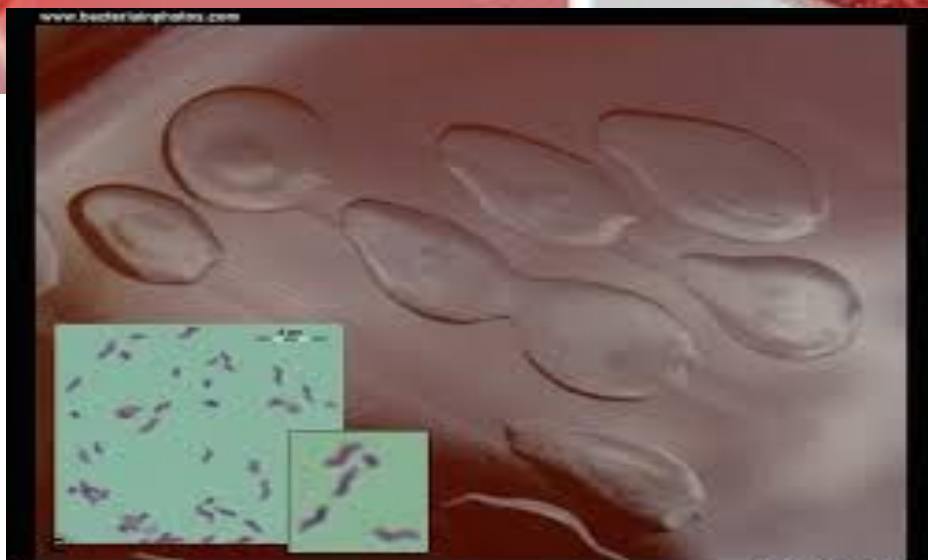
Reprezentanții genului *Campylobacter* sunt bastonașe Gram -, încurbate în virgula, în S sau “pescăruș in zbor”, mobili monotrichi. Trei specii de *Campylobacter* sunt patogene pentru om : *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*





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

# Campylobacter Blood Agar



- **HABITAT**

*Campylobacteriile* se întâlnesc în tubul digestiv al animalelor, în special ovine, porcine și la păsări.

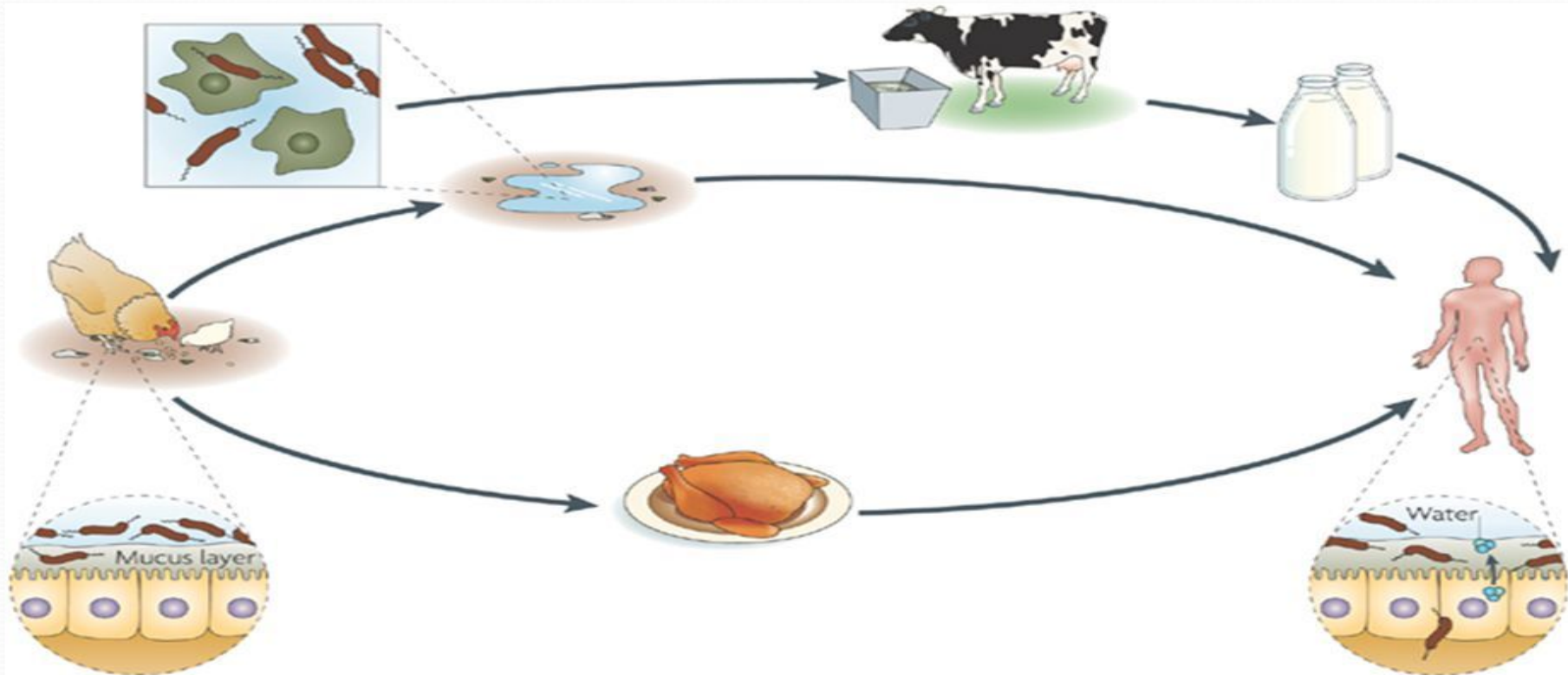
Contaminarea omului are loc pe cale alimentară (apă, lapte, carne).

Afectează toate vârstele, dar mai frecvent copiii, în condiții de igienă precară.

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

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

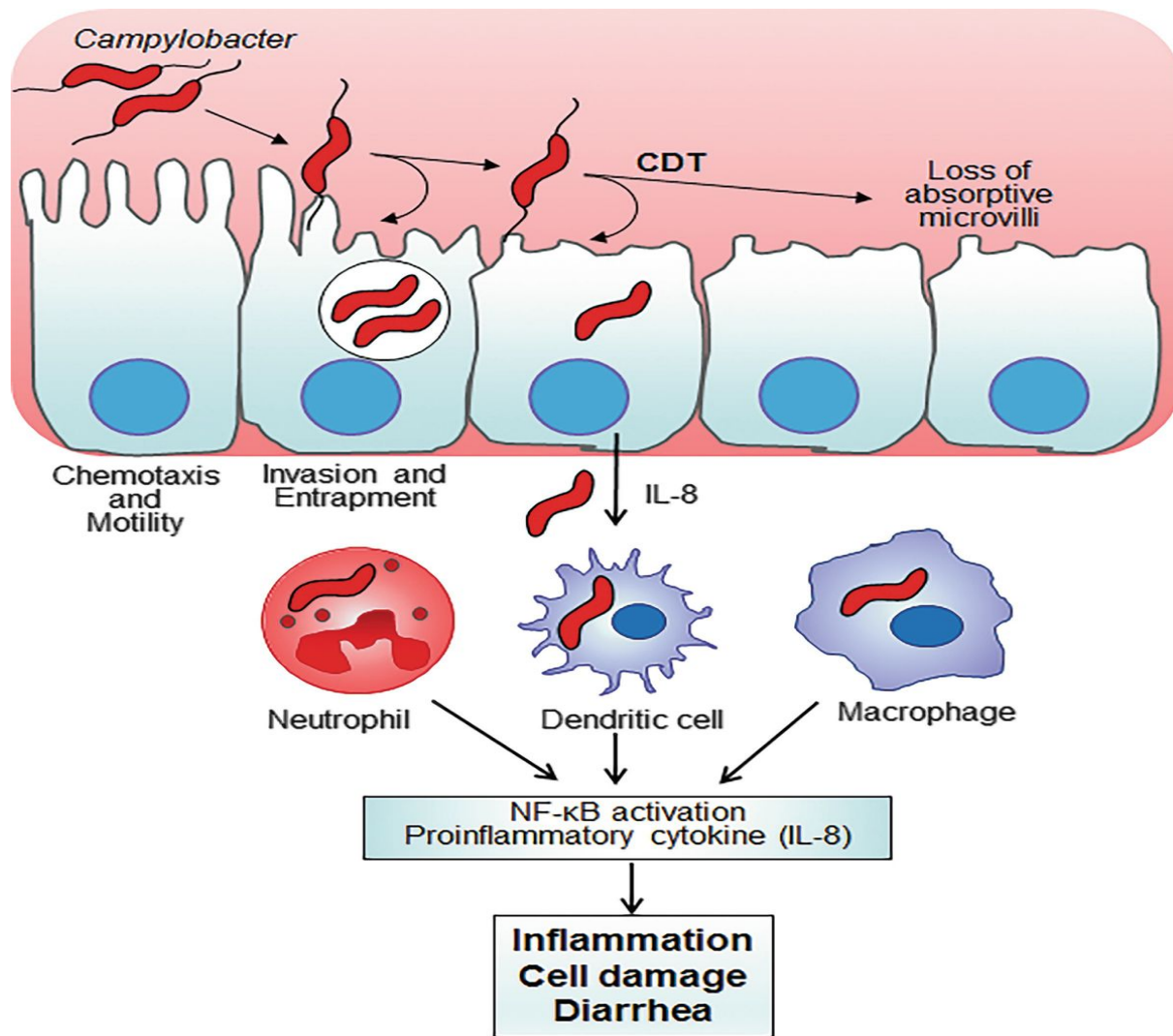
# CAMPYLOBACTER LIFECYCLE



## 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.





## SENSIBILITATE LA AB

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

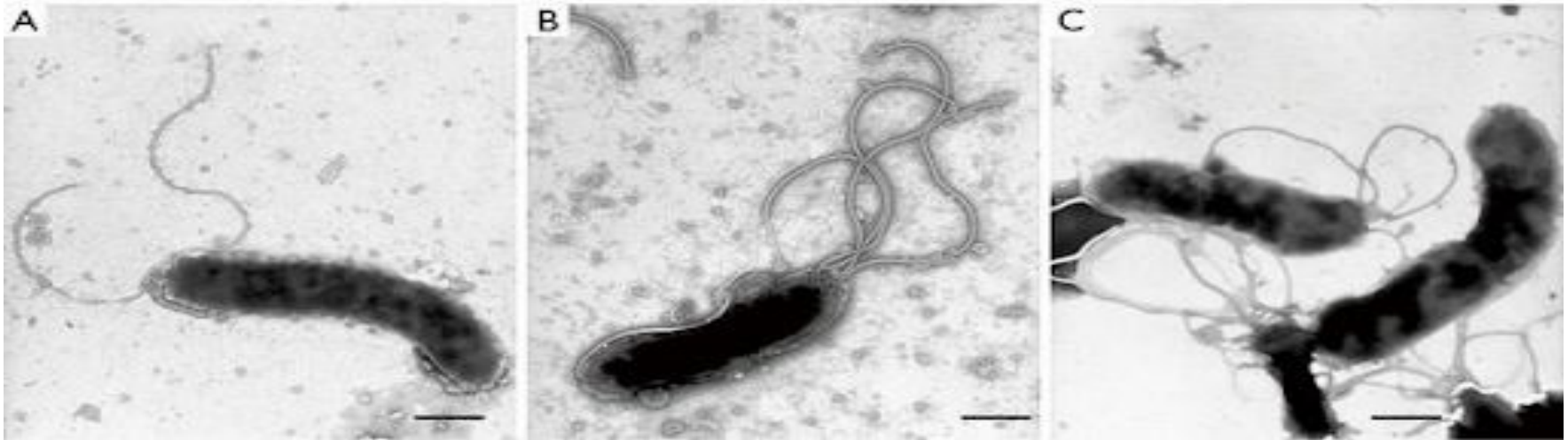
# Familia Helicobacteriaceae

- 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.

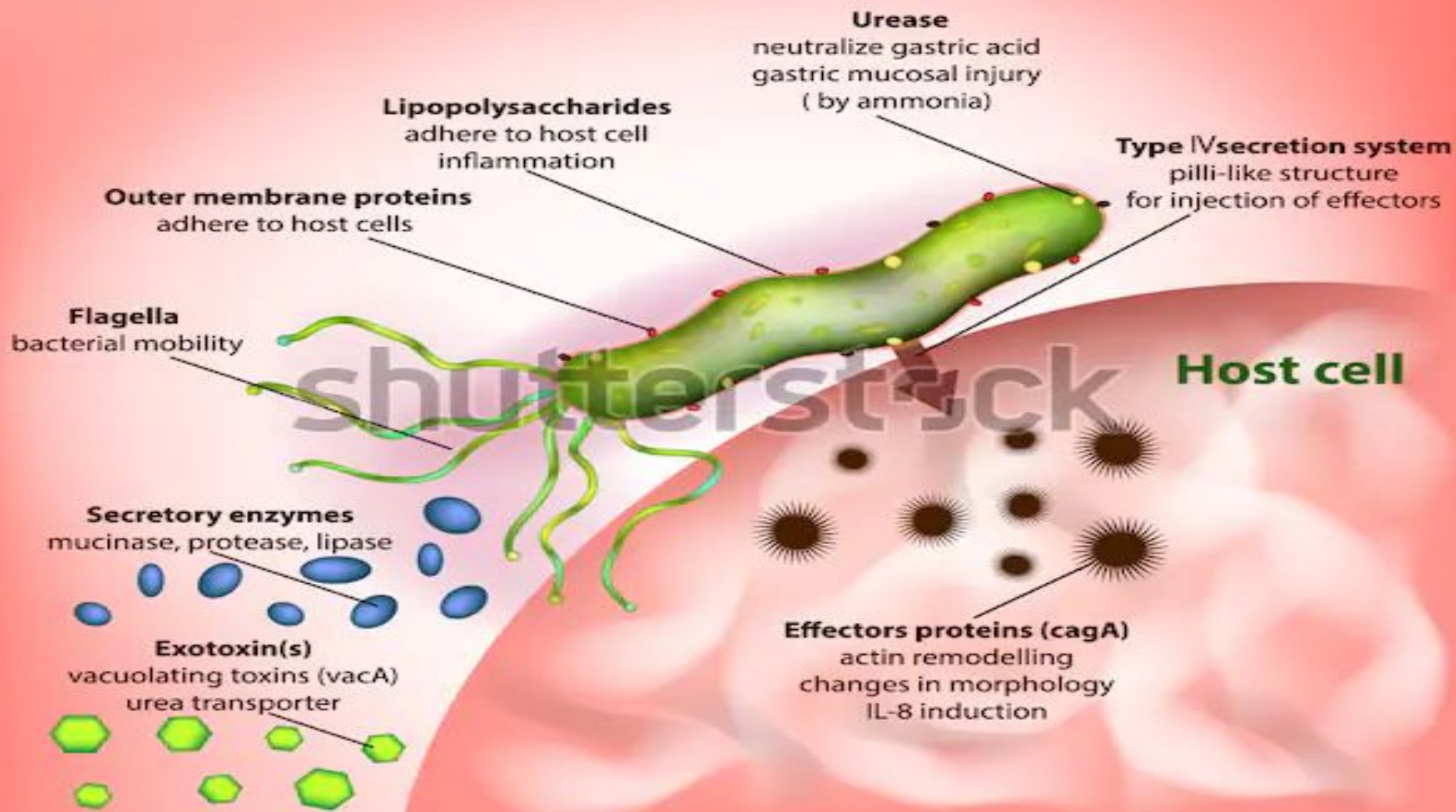


# Caractere de cultura si biochimice

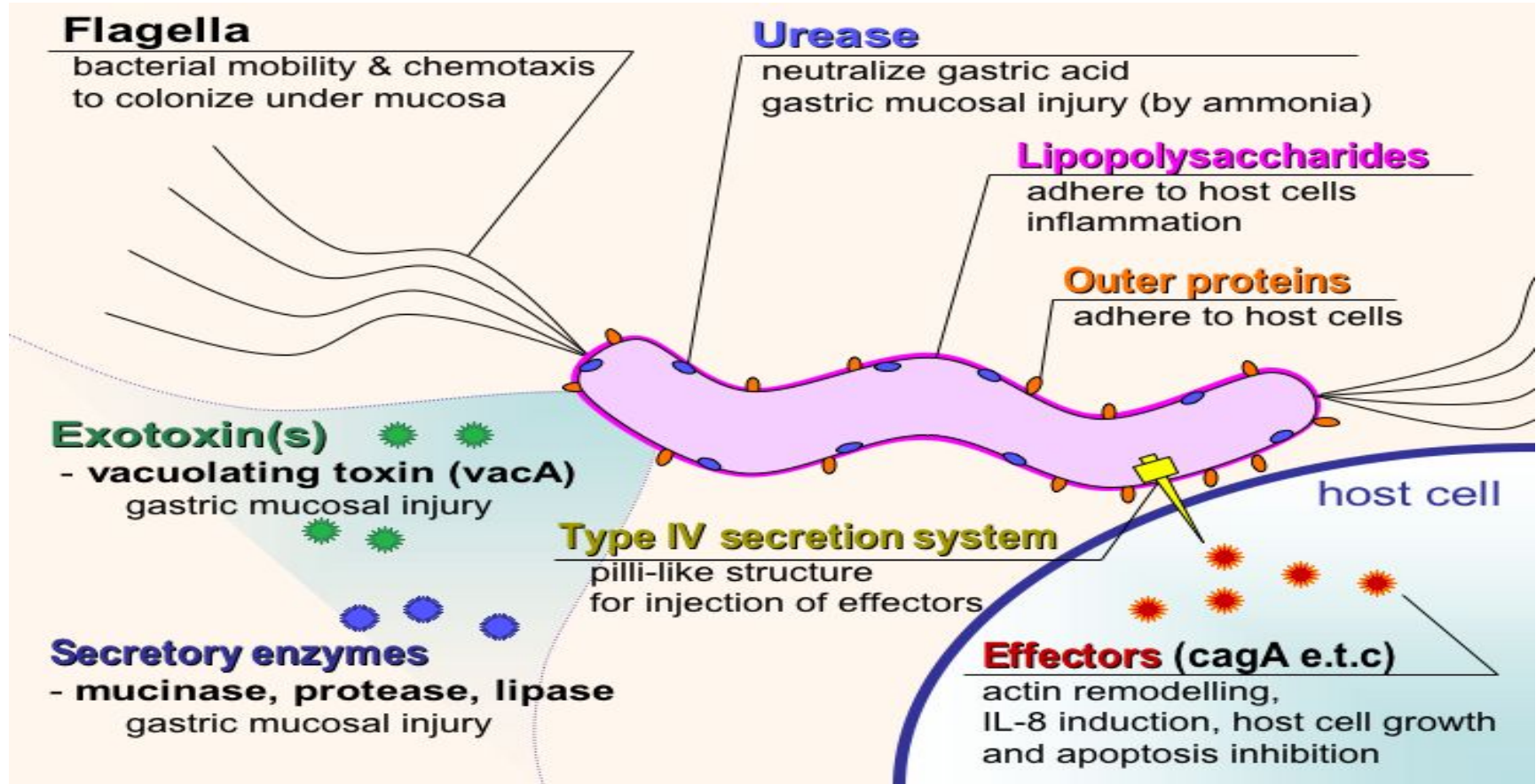
- *H.pylori* poate fi cultivat pe medii speciale, imbogatite cu sange, ser, galbenus de ou, in conditii de microaerofilie, la temperaturi intre 30 – 37 grade C.
- *H.pylori* produce abundant ureaza, ceea ce-i permite sa supravietuiasca in stomac.
- Catalazo si oxidazo-negativ, nu scindeaza carbohidratii

# Factori de patogenitate

- **Adezine** (proteine din membrana externa, LPZ)
- **Enzime:** ureaza, mucinaza, fosfolipaze
- **Toxine:**
  - *Toxina VacA* (determina apoptoza celulelor eukariote prin generarea de vacuole citoplasmatiche mari)
  - *Toxina CagA* (provoaca modificarea proteinelor celulare)
- **Sisteme de secretie**



# Factorii de patogenitate



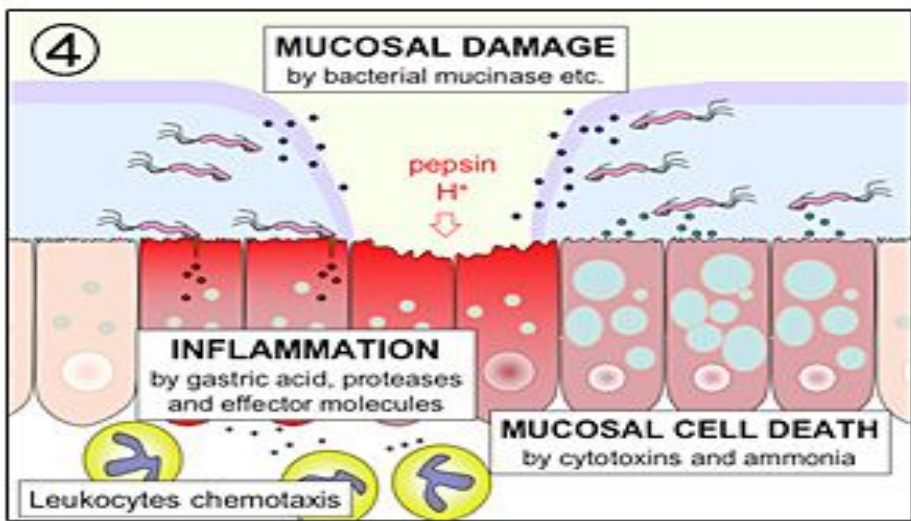
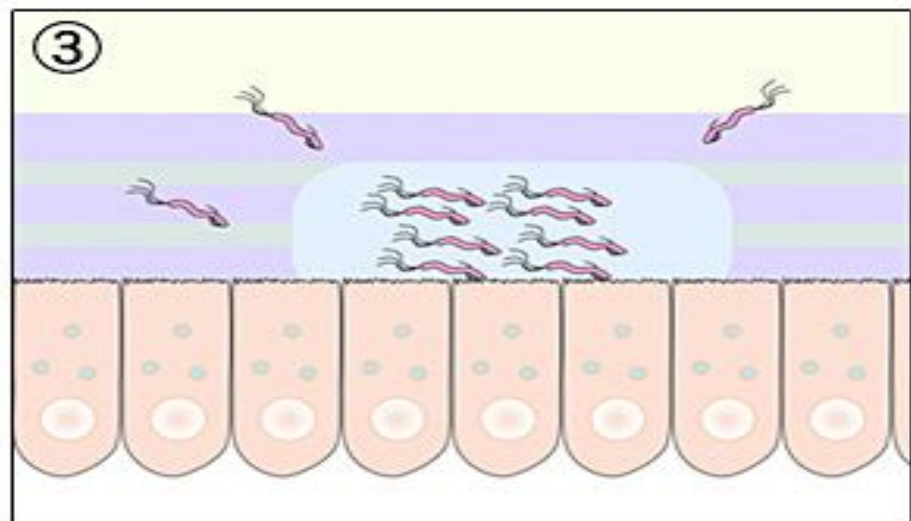
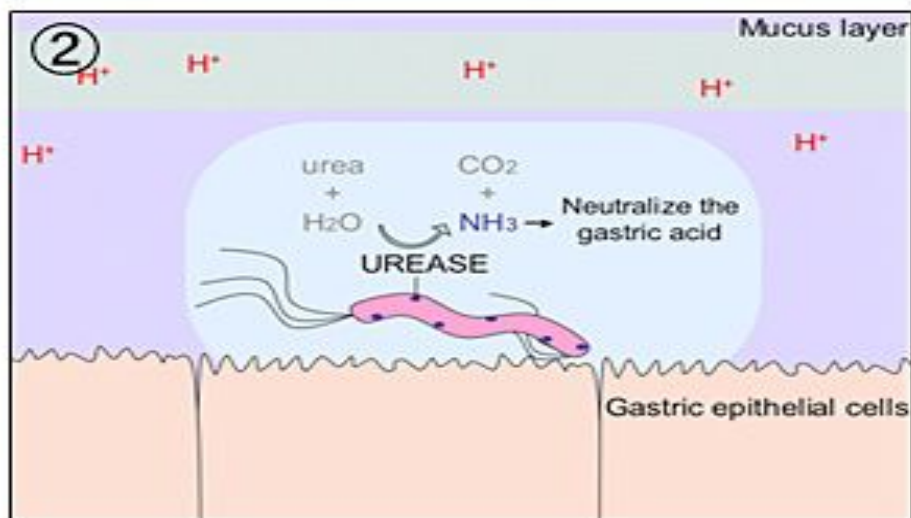
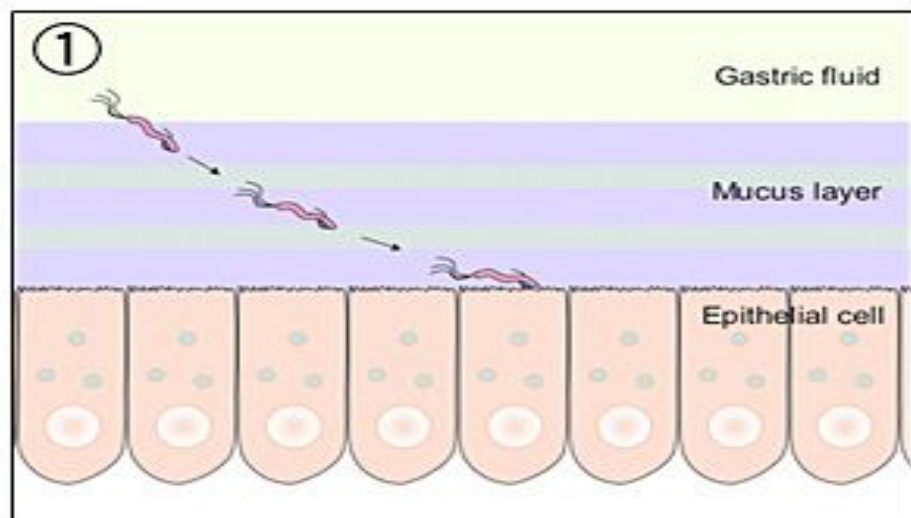


# Epidemiologie

- 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.



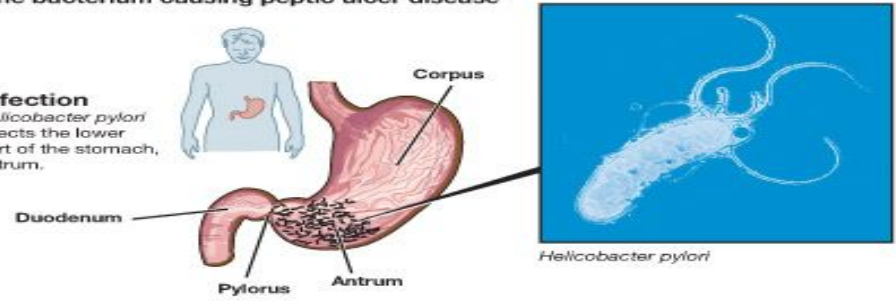
# Manifestarile clinice

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

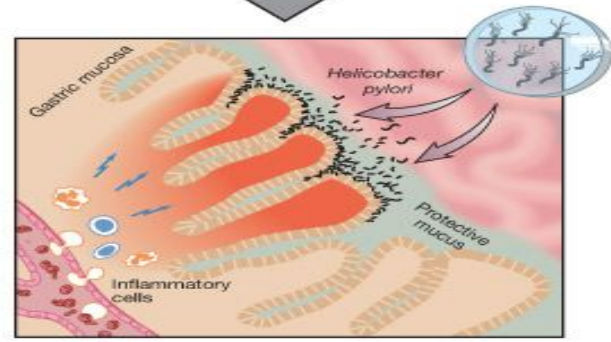
# Helicobacter pylori

— the bacterium causing peptic ulcer disease

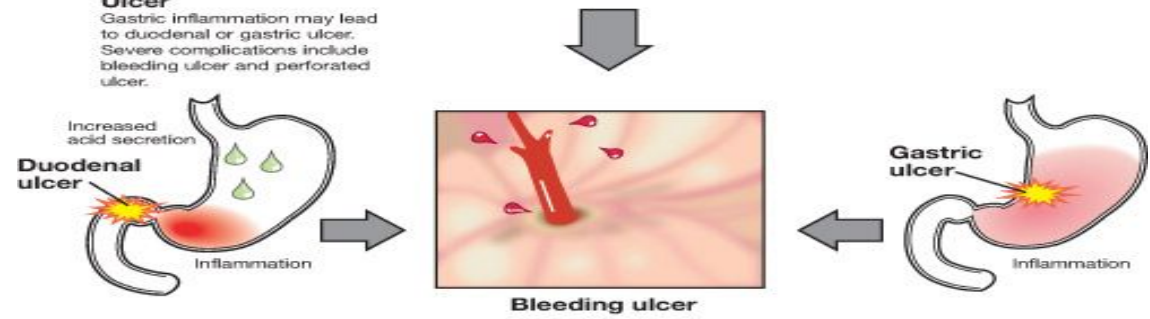
**Infection**  
*Helicobacter pylori* infects the lower part of the stomach, antrum.



**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.



# Diagnostic de laborator

- **Microscopic:** examinarea histologica a biopsatelor
- **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  $\beta$ -lactamice (ex., amoxicilin) sau metronidazol pentru 2 saptamani.
- Nu exista vaccinuri umane la momentul actual.