

FAMILIA VIBRIONACEAE. MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HOLEREI

Familia: *Vibrionaceae*

Genuri: *Vibrio*

Photobacterium

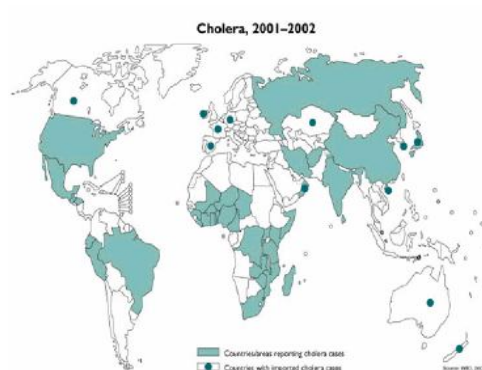
Salinivibrio

Aliivibrio (*Allomonas*)

Enterovibrio

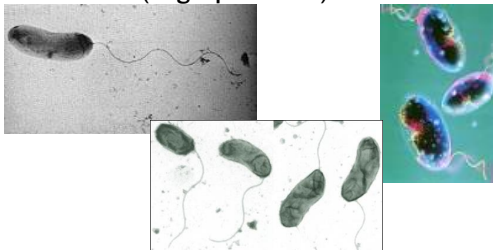
Grimontia

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



GENUL VIBRIO

Bastonașe G-, încurbate, polimorfe, 2-3 μm / 0,5-0,8 μm, 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 CHOLERAЕ

• Clasificare :

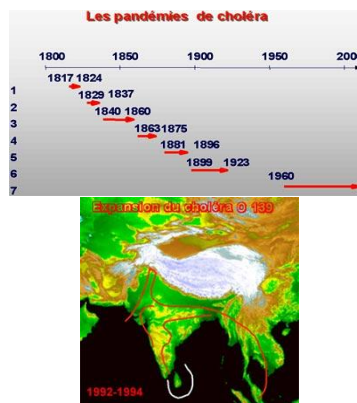
Serogrupuri: *Vibrio cholerae* O1, O2, ... O155

- ***V.cholerae* O1**, agent cauzal al holerei
- ***V.cholerae* O139 Bengal** (descriș în 1992, mutant al Ag O, biovarul El Tor)- agent cauzal al holerei
- ***V.cholerae* non O1/non O139** (O2, O3,... etc, vibrioni NAG) - responsabili de sindrom holeriform, diaree, toxiinfecții alimentare, gastro-enterite

Serovariante ale *V.cholerae* O1 - **Ogawa, Inaba, Hikojima**

Biovariante ale *V.cholerae* O1 :

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



- **Caractere morfotinctoriale** (vezi caracteristica genului)
- **Caractere de cultură**

Anaerob facultativ, temperatura optimă de cultivare – 37 grade. 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 1%** (AP)

Medii de izolare a culturii pure:

- **Geloză alcalină** (GA) - mediu electiv-selectiv
- **Mediul TCBS** (tiosulfat-citrat-bilă-zaharoză) – DD și selectiv

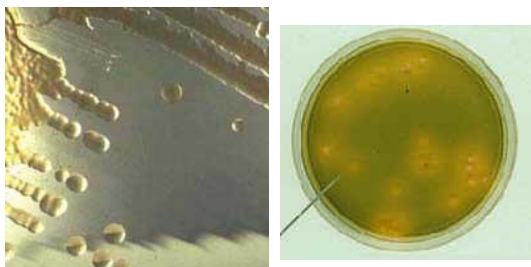
- **Manifestarea creșterii**

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

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

TCBS – peste 12 ore – colonii S, opace, galbene (fermentarea zaharozei)

- **Caractere biochimice:** *V.cholerae* este catalaza+ și oxidaza+, reduce nitrații în nitriți, produce indol, posedă gelatinază, LCD și ODC, fermentează și oxidează glucoza până la acid (testul Hugh-Leifson), lactoza -.



- Conform activității glicolitice *V.cholerae* aparține **grupului I Helberg** (fermentează zaharoza și manoză, nu fermentează arabinoza)- 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.

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 155 serogrupe - O1, O2...O155...)

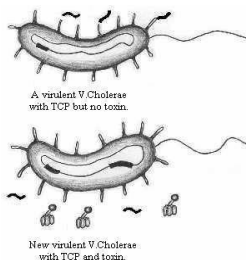
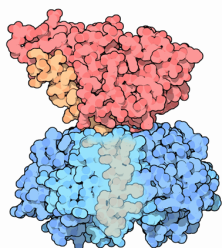
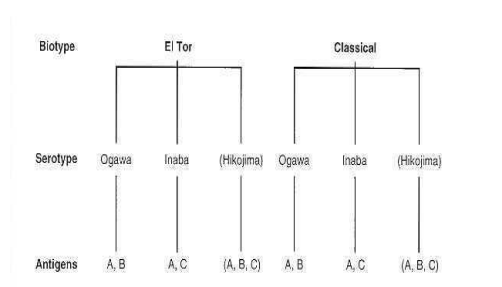
Ag O1 este constituit din 3 fracții - A, B, C

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

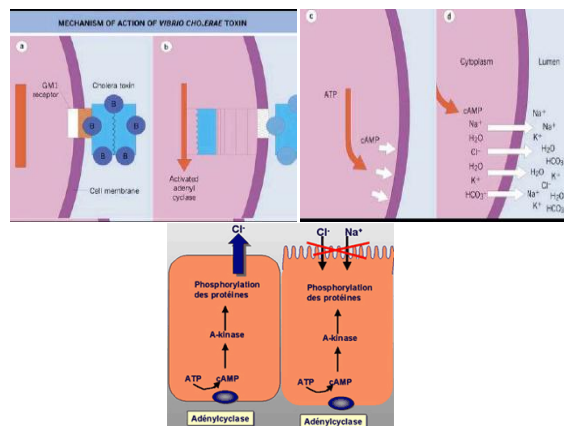
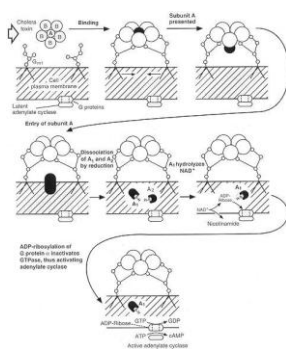
- Ag H, proteic, termolabil, comun pentru *V.cholerae*

FACTORI DE PATOGENITATE

- Factori de adeziune (pili - Toxin Coregulated [Pilus](#) (TCP), LPZ, glicocalixul)
- Enzime de patogenitate (mucinaza, neuraminidaza, LDC, lecitinaza)
- Enterotoxina (toxina holerică, holeragen), constituită dintr-o subunitate A (A1, A2) și 5 subunități B. Codată de genele *ctxAB* ale unui bacteriofag filamentos.
- Endotoxina

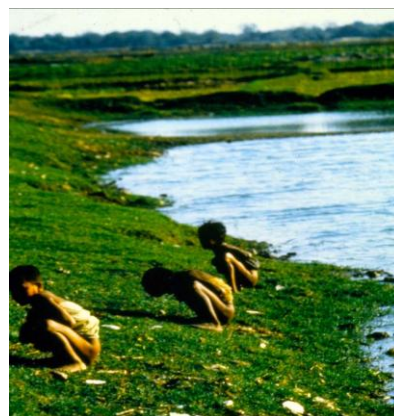
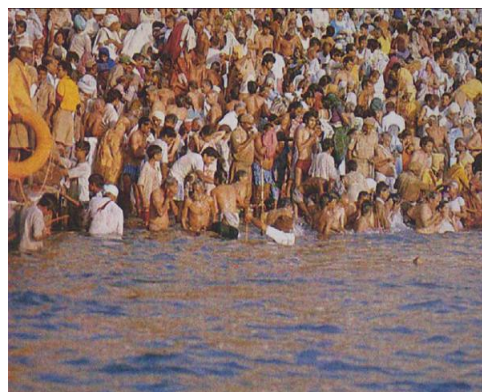


Mecanismul de acțiune al enterotoxinei: Subunitățile B servesc la fixarea pe receptorul ganglioizidic GM1 de pe membrana enterocitului. Urmează modificarea conformațională a toxinei cu crearea unui canal hidrofil prin care subunitatea A pătrunde în celulă. Catena A1, manifestând activitate ADP-ribozilantă, activează adenilat-ciclaza membranară, ce duce la creșterea concentrației de AMPc intracelular. Rezultă inhibiția absorbției bicarbonatului și secreția exagerată a cloridului. Apa și electroliții (Na^+ K^+ Cl^- HCO_3^-) se acumulează în lumenul intestinal. Rezultă deshidratare extracelulară intensă cu hemoconcentrație, șoc hipovolemic și acidoză metabolică.



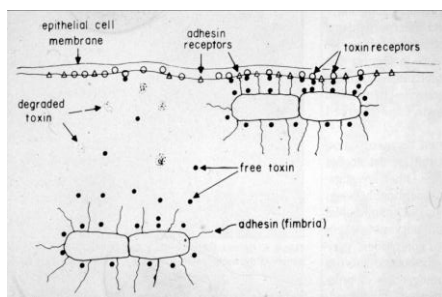
PATOGENEZA HOLEREI ȘI MANIFESTĂRILE CLINICE

- **HOLERA** – gastroenterită acută, strict umană.
 - Agentul cauzal – *V.cholerae* O1/O139
 - Sursa de infecție – bolnav, convalescent, 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)





- Vibrii care au supraviețuit ajung în intestinul subțire. Local mucinaza descompune mucusul, asigurând adeziunea vibriunilor la enterocite, colonizarea și producerea toxinei. Neuraminidaza transformă di și trisialogangliozele membranare în GM1, ce permite fixarea toxinei și penetrarea ei.



• Evoluția clinică a holerei:

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

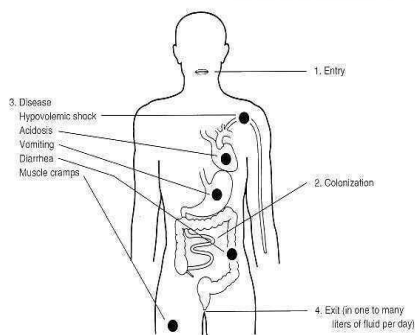
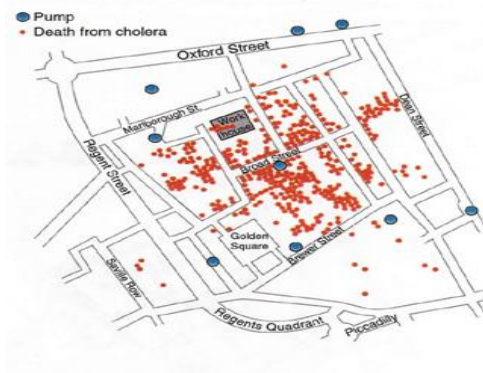
II - **Enterita holerică** (scaune frecvente, afecale, apoase, constituite din lichid clar cu flocoane albe - aspect "zeamă de orez")

III - **Gastro-enterita** (scaune frecvente - 10 - 50 ori pe zi - și vomă abundente).
Consecințe - deshidratare (3-20 litri eliminați în 24 ore), carențe de săruri, acidoză, hipoxie tisulară, hipotensiune, contracții (crampe) musculare.

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

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





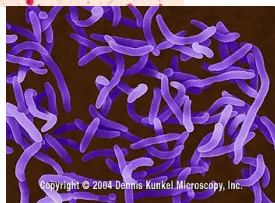
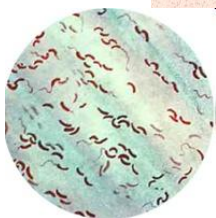
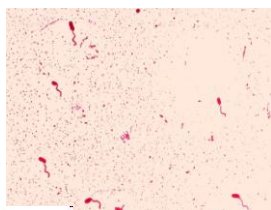
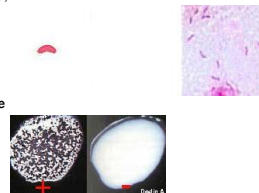
DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HOLEREI

- **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

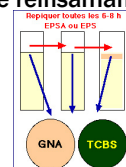
1. Diagnosticul rapid

- Frotiu Gram (bacterii G-, incurbate)
- Studierea mobilității (preparate native – bacterii mobile, grupate în "bancuri de pești")
- Imobilizarea și aglutinarea vibriunilor cu serul anti-O1
- Imobilizarea vibriunilor cu bacteriofagi "C" și "ET"
- RIF

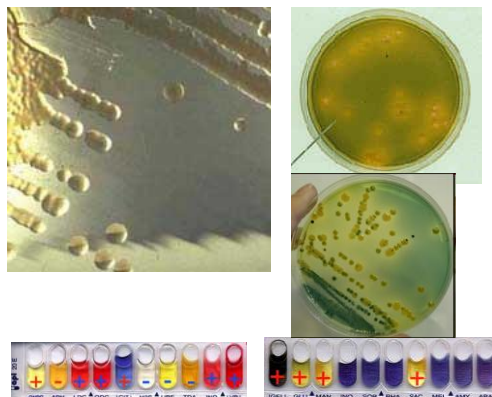


2. Examenul bacteriologic (de bază)

- 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 albăstrui 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-/zaharoză+** 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. Deplstarea toxinel

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

4. Serodlagnostlc (retrospectiv)

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

- RA (serul bolnavului + diagnostic din *V.cholerae* O1 (titrul diagnostic 1/80)
- RHA1 (serul bolnavului + diagnostic eritrocitar)
- Reacția de vibrioliză (serul bolnavului + cultură de vibrioni + complement). Titrul diagnostic - 10^4
- Dozarea antitoxinelor (ELISA, RHA1)

VIBRIONII HALOFILI

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

TRATAMENTUL ȘI PROFILAXIA HOLEREI

• Tratament

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

Profilaxie

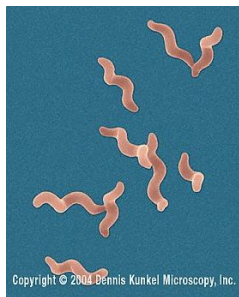
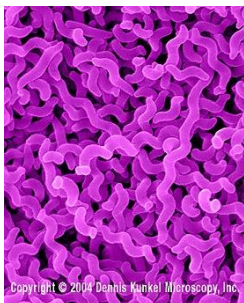
- Igiena individuală și colectivă
- Vaccinarea (vaccin inactivat, vaccin subunitar, holeragen-anatoxină)

Imunitatea –până la 6 luni

Vaccinul viu este în proces de studiu

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* .



• HABITAT

- *Campylobacter* se întâlnesc în tubul digestiv al animalelor, în special ovine, porcine și la păsări

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

SENSIBILITATE LA AB

- Eritromicina este antibioticul de elecție în tratamentul campilobacteriozelor digestive.
- Alte antibiotice: tetraciclina, aminoside, cloramfenicol, ampicilina

- *Campylobacter* au metabolism respirator microaerofil. Pot fi izolate pe medii selective îmbogățite cu sînge 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.

PATOGENEZA SI FORME CLINICE

- *C. jejuni/coll* au o putere enteropatogenă importantă, fiind responsabile de enterite. Afectează toate vârstele, dar mai frecvent copiii, în condiții de igienă precară. Maladia evoluează benign cu vindecare spontană în câteva zile.
- *C. fetus* determină septicemii la persoane fragilizate: cirofici, diabetici, cardiaci, gravide...

