

## Ojedinelý prípad infekcie spôsobenej *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 v klinickej praxi na Slovensku

Daniela Lacková<sup>1</sup>, Martin Sojka<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Medirex, a. s., Levice

<sup>2</sup>NRC pre *Vibrionaceae*, Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Komárne

<sup>3</sup>Ústav mikrobiológie, Lekárska fakulta, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

Baktéria *V. cholerae* je ľudským patogénom, ale aj prirodzeným obyvateľom vodného prostredia. V posledných rokoch sú čoraz častejšie zaznamenané infekcie spôsobené *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 (NOVC) s intestinálnymi alebo extraintestinálnymi klinickými prejavmi. U imunokompetentných jedincov sa prejavujú infekcie ako self-limited gastroenteritída alebo ako infekcie uší a rán. Predkladaný článok prezentuje prípad gastroenteritídy u 44-ročnej ženy s akútnou hnačkou, s abdominálnymi bolesťami, horúčkou a prejavmi dehydratácie. Z výteru z rekta bol izolovaný kmeň *V. cholerae* non-O1, non-O139, ktorého prítomnosť potvrdila infekčnú príčinu klinických príznakov u pacientky. Na základe výsledkov mikrobiologickej analýzy bola odporučená terapia antibiotikami: perorálny ciprofloxacín v dávke 500 mg 2x d á 12 h a vhodná rehydratačná terapia. Po počiatočnom zlepšení sa vodnatá hnačka opäť objavila a s menšími prestávkami trvala niekoľko týždňov. Pacientka sa úplne vyliečila až po 2 mesiacoch. Infekcia bola získaná v domácom prostredí, pacientka konzumovala kontaminovanú vodu zo studne. Analýza vzorky vody v Národnom referenčnom centre (NRC) pre *Vibrionaceae* potvrdila zdroj infekcie. NOVC sa môžu vyskytovať aj vo vodách s nízkou salinitou, ako sú alkalické jazerá, odtoky vody a kanalizácie. Hoci všetky infekcie spôsobené *Vibrio* spp. podliehajú povinnému hláseniu, mnoho prípadov nie je odhalených aj z dôvodu, že kmene vibrií nie je jednoduché identifikovať na bežných kultivačných pôdach.

**Kľúčové slová:** akútna gastroenteritída, *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139, prvý potvrdený prípad na Slovensku, klinický význam, kontaminovaná voda

### *The rare case of infection caused by Vibrio cholerae non-O1, non-O139 in clinical practice in Slovakia*

*V. cholerae* is both a human pathogen and a natural inhabitant of aquatic environments. *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 (NOVC) are increasingly frequently observed ubiquitous microorganisms occasionally responsible for intestinal and extra-intestinal infections. Most cases involve self-limiting gastroenteritis or ear and wound infections in immunocompetent patients. We describe a case of NOVC severe gastroenteritis in 44 year old female subject suffering from acute diarrhea, abdominal pain, fever and dehydration. Strains *V. cholerae* non-O1, non-O139 have been isolated from rectal swab and confirmed infectious causality of the clinical symptoms. In published case of NOVC gastroenteritis antimicrobial therapy was recommended, the optimal treatment strategy was oral ciprofloxacin (500 mg every 12h) and appropriate oral fluid rehydration. There was initial improvement, but the watery diarrhoea recurred and had been lasting for a few weeks. The patient recovered fully after 2 months. This infection was defined as domestically acquired, patient was exposed to the contaminated water from water well. The analysis of the water by National reference centre for *Vibrionaceae* confirmed the source of infection. NOVC may occur also in water with low salinity such as alkaline lakes, artificial waterways and sewers. Although all *Vibrio* infections are nationally notifiable, many cases are likely not recognized because *Vibrios* are not easily identified on routine enteric cultivation media.

**Keywords:** acute gastroenteritis, *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139, clinical significance, first confirmed case in Slovakia, contaminated water

NewsLab, 2018; roč. 9 (1): 50 – 53

### Úvod

Predkladaný článok opisuje prípad pacientky s akútnou gastroenteritídou, keď pôvodcom ochorenia bol potvrdený raritný patogénny mikroorganizmus *V. cholerae* non-O1, non-O139. Bola to prvá laboratórne potvrdená identifikácia tejto baktérie v klinickej vzorke na našom pracovisku a podľa našich informácií aj na Slovensku. Infekcia sa prejavila u zdravej imunokompetentnej ženy po konzumácii vody zo studne a mala ťažší a dlhotrvajúci priebeh.

### Kazuistika pacientky

Štyridsaťštyriročná pacientka navštívila koncom júna 2017 svoju obvodnú lekárku s príznakmi silnej hnačky, s abdominálnymi bolesťami sprevádzaným tenezmami a vysokými teplotami okolo 38,5 °C. Pacientka bola dehydratovaná, pochudnutá, príznaky vracania sa nevyskytovali. V ambulancii boli urobené odbery biologických vzoriek vrátane výteru z rekta. Štandardné biochemické analýzy aj krvný obraz boli u pacientky v norme, avšak kultivačná analýza výteru

z rekta potvrdila infekčnú príčinu jej klinických prejavov. Vo vzorke boli identifikované baktérie druhu *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139. Keďže ide o patogénny mikroorganizmus, ktorý sa v našom regióne v klinických vzorkách ešte nevykytol a jeho identifikácia je z nášho pohľadu raritná, upovedomili sme o tejto skutočnosti ošetrojúceho lekára, infektológa a príslušného epidemiológa. Pacientka bola liečená ambulantne, nebola hospitalizovaná. Naordinovaná jej bola symptomatická liečba Smecta, Hylak Forte a rehydratačný nápoj Fluidex. Vzhľadom na pretrvávajúce ťažkosti, ku ktorým sa pridalo aj vracanie, bola v polovici júla 2017 naordinovaná cieleňá antibiotická terapia podľa stanovenej citlivosti – ciprofloxacín 500 mg 2x d á 12 h počas 10 dní. Po počiatočnej úľave sa jej klinický stav opäť zhoršil, trpela nechutenstvom, problémami s trávením, občasnými hnačkami. Liečbu antibiotikami prerušila a pokračovala v symptomatickej liečbe. Prítomnosť patogénnej baktérie *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 bola potvrdená v stolici pacientky ešte aj v septembri 2017. Po trojnásobnom selektívnom namnožení v alkalickkej peptónovej vode bola kultivačne dokázaná aj prítomnosť *V. metschnikovii*, čo je blízky príbuzný *V. cholerae* s negatívnou cytochrómoxidázovou aktivitou. Klinický stav pacientky sa zlepšoval veľmi pomaly, dlhodobo pretrvávalo nechutenstvo, abdominálne bolesti, hnačky, ktoré sa striedali s obdobiami relatívnej úľavy od ťažkostí. Od októbra 2017 je pacientka bez klinických príznakov infekcie. Zdroj infekcie bol potvrdený epidemiologickým vyšetrením, bola ním voda zo studne, ktorú v domácnosti z dôvodu absencie vodovodu používali.

### Epidemiologické vyšetrenie zdroja infekcie

Na základe odporúčania pracovníkov odboru epidemiológia RÚVZ so sídlom v Leviciach boli vykonané kontrolné odbory vzoriek od ostatných členov rodiny, u ktorých neboli prítomné žiadne klinické príznaky ani ťažkosti. Výsledky kontrolných odberov biologických vzoriek zostali negatívne. Keďže najčastejším faktorom prenosu infekcie je voda alebo potraviny, na objasnenie bolo nutné došetriť riziko konzumácie infikovaného jedla alebo vody v priebehu 7 dní pred objavením klinických príznakov. Pacientka neabsolvovala pobyt v zahraničí, vylúčila konzumáciu morských živočíchov, ako sú mušle, ustrice, kraby a pod., nekúpala sa v prírodnom jazere. Jediným rizikovým faktorom bola používaná voda, keďže v domácnosti nebol zavedený vodovodný systém a rodina používala vodu zo svojej studne. Vzorky vody boli odobraté podľa platných noriem a zaslané na cieleňé vyšetrenie do NRC pre *Vibrionaceae* so sídlom v Komárne. NRC potvrdilo vo vzorkách vody prítomnosť baktérie *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139. Všetky prípady infekcií spôsobených séro skupinami *V. cholerae* a ďalšími patogénnymi druhmi rodu *Vibrio* spp. podliehajú povinnému systému hlásenia u nás aj celosvetovo (CDC).

### Klinický význam infekcií spôsobených *Vibrio cholerae*

Infekcie spôsobené rôznymi séro skupinami *Vibrio cholerae* sa vo vyspelých krajinách, napr. v EÚ, vyskytujú veľmi zriedka. V súčasnosti je známych viac ako 200 séro skupín druhu *V. cholerae*, ktoré sa líšia somatickým O antigénom<sup>(2)</sup>. Klinický priebeh ochorenia závisí z veľkej miery od séro skupiny, ktorou je pacient infikovaný. *V. cholerae* toxigénna

séro skupina O1 alebo O139 (endemicky sa vyskytuje v Ázii, vyskytli sa viaceré importované prípady aj vo svete) je vyvolávateľom prudkého a závažného ochorenia – cholery, ktorá prebieha vo forme epidémie. Cholera sa vyskytuje v menej rozvinutých krajinách, ako je Ghana, India, Pakistan, Haiti a podľa WHO každoročne spôsobuje 28 000 – 142 000 úmrtí. Do Európy ju importujú v ojedinelých prípadoch cestovatelia vracajúci sa z rizikových oblastí. Podľa Európskeho centra na prevenciu a kontrolu chorôb (ECDC) bolo v roku 2014 v krajinách EÚ potvrdených len 16 prípadov cholery. Menej závažné ochorenia, tzv. vibriózy, sú spôsobené inými séro skupinami *V. cholerae*, ktoré sú označované ako *V. cholerae* non-O1 a non-O139, alebo inými patogénnymi druhmi: *V. parahemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*. Vibriózy sa prejavujú intestinálnou (gastroenteritídou) alebo extraintestinálnou (infekcie uší a rán) manifestáciou. Infekcie vznikajú primárne po konzumácii tepelne neupravených morských živočíchov, po požití kontaminovanej vody alebo po kúpaní v kontaminovanej vode. Vznik ochorenia je závislý od virulentnosti kmeňa aj od zdravotného stavu pacienta. Gastrointestinálne ochorenia spôsobené *V. cholerae* non-O1, non-O139 na rozdiel od cholery prebiehajú menej prudko a nemajú epidemický potenciál. Klinické príznaky týchto infekcií môžu byť menej závažné: od asymptomatickej formy cez miernu hnačku až po závažné ochorenie podobné cholere. Prítomná je aj silná dehydratácia a vysoké horúčky, ale ochorenie má dobrú prognózu. U pacientov s predispozíciou na bakteriémiu, ako sú imunokompromitovaní pacienti s ochoreniami pečene, alkoholi, diabetici a onkologickí pacienti, sa infekcia môže prejavovať aj vo forme sepsy s vysokou mortalitou. Pacienti by nemali konzumovať tepelne neupravené morské živočíchov ani kúpať sa v potenciálne kontaminovaných vodách v letných mesiacoch<sup>(6)</sup>. Vysoká mortalita pri sepse je pravdepodobne spôsobená oneskorenou diagnostikou, neadekvátnou terapiou antibiotikami aj dĺžkou terapie<sup>(4)</sup>. V odbornej literatúre je zaznamenaný narastajúci trend potvrdených infekcií spôsobených *V. cholerae* non-O1, non-O139, pričom ich celkový počet vo vyspelých krajinách napr. Európskej únie zostáva stále nízky a infekcie sú ojedinelé<sup>(1)</sup>.

### Materiál a metódy

#### Laboratórna identifikácia baktérií rodu *Vibrio* spp.

Rod *Vibrio* patrí do čeľade *Vibrionaceae*. Sú to halofilné fakultatívne anaeróbne gramnegatívne paličky zakrivené na pozdĺžnej osi. Ochorenia spôsobené vibriami sú v súčasnosti poddiagnostikované, jednak zo strany ošetrojúcich lekárov, ktorí na takúto etiológiu nemyslia, a jednak zo strany laboratórií, ktoré bežne nepoužívajú selektívne pôdy na izoláciu baktérií rodu *Vibrio*<sup>(6)</sup>. Pri odbere biologického materiálu od pacienta je potrebný odber z charakteristického miesta v počiatočnom alebo rozvinutom štádiu príznakov ochorenia ešte pred začatím ATB terapie. Vhodné biologické vzorky pri podozrení na infekciu sú stolica, výter z rekta, vývratky, výter z rany; v prípade sepsy (spôsobovanej hlavne *V. vulnificus*) aj krv na hemokultiváciu. V prípade vyšetrovanej pacientky nebola stanovená jasná diagnóza, preto bol použitý rutinný postup spracovania biologickej vzorky bez použitia selektívnej pôdy pre vibriá (napr. tiosíran – citran – žlč – sacharózový agar – TCBS). Suspektný kmeň bol izolovaný len

na selektívnej pôde pre *Yersinia* spp. Identifikácia izolovaného kmeňa prebehla na základe hlavných biochemických vlastností (napr. oxidáza) komerčne dodávanou súpravou Enterotest a pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF. Vzhľadom na raritný nález patogénneho mikroorganizmu *Vibrio* spp. vo vzorke bol kmeň zaslaný na definitívnu identifikáciu na špecializované pracovisko NRC pre *Vibrionaceae*.

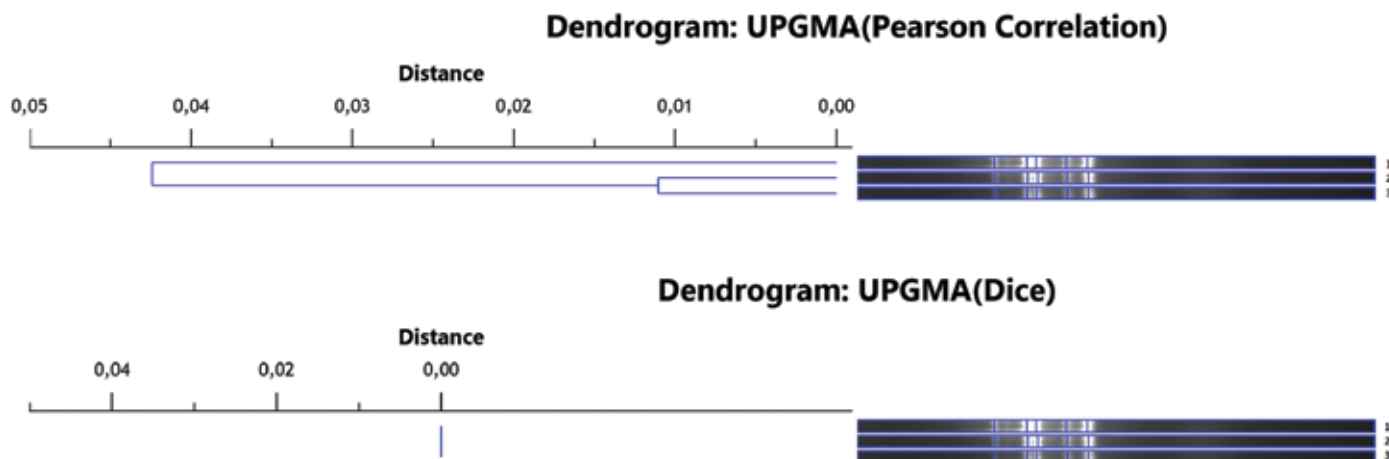
### Nadstavbová diagnostika v NRC pre *Vibrionaceae*

Potvrdenie nálezu a definitívny výsledok identifikácie bol vykonaný v NRC pre *Vibrionaceae* na RÚVZ so sídlom v Komárne. Kmeň bol potvrdený ako *Vibrio* spp. na základe mikroskopického nálezu zahnutých gramnegatívnych paličiek, pozitívnej cytochrómoxidázovej aktivity, pozitívneho string-testu, typického rastu na selektívnom TCBS-agar a citlivosti na vibriostatikum O129. Biochemicky, pomocou klasických skúmvkových testov s prídavkom 1 % NaCl, bol bližšie identifikovaný ako *V. cholerae*. Pomocou latexovej aglutinácie nebola dokázaná príslušnosť k séroskupine O1 ani O139. Napriek tomu bol kmeň testovaný metódou reverznej pasívnej latexovej aglutinácie na prípadnú produkciu cholerového toxínu s negatívnym výsledkom. Baktéria bola finálne identifikovaná ako netoxinogénny kmeň *V. cholerae* non-O1, non-O139.

Metódou selektívneho namnoženia v alkalickéj peptónovej vode bolo *V. cholerae* non-O1, non-O139 izolované aj zo vzorky studničnej vody. Vzorka vody sa podľa štandardných postupov odoberá do sterilných vzorkovník (sklenených alebo plastových) v objeme 0,5 až 1 liter. Chladenie vzorky počas prepravy môže izoláciu vibrií sťažiť alebo znemožniť – navodenie prechodu do tzv. VBNC (viable but non-culturable) stavu. Z tohto dôvodu sa chladenie vzorky pri preprave neodporúča a vzorka vody by sa mala spracovať v deň odberu.

Všetky tri izoláty boli podrobené zisťovaniu príbuznosti metódou (GTG)5 PCR s následnou klastrovou analýzou získaných profilov v softvéri Phoretix1D Pro za využitia dvoch rôznych prístupov – Diceov algoritmus a Pearsonova korelácia. Obe analýzy ukázali veľmi blízku príbuznosť/totožnosť izolovaných kmeňov, ktoré teda môžu byť považované za jeden kmeň (**obrázok 1**).

**Obrázok 1.** Klastrová analýza (GTG)5 PCR profilov získaných izolátov *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139, dráha 1 – izolovaný kmeň zo stolice – Medirex, a. s., dráha 2 – izolovaný kmeň zo stolice – NRC-V, dráha 3 – izolovaný kmeň zo studničnej vody. Z oboch metód klastrovania je zrejma blízka príbuznosť/totožnosť izolátov



### Stanovenie citlivosti na antibiotiká a liečba infekcie

Hnačka spôsobená *V. cholerae* (toxigénnymi aj netoxigénnymi kmeňmi) je riešená primárne rehydratáciou a cieľnou terapiou antibiotikami. Najdôležitejšia je náhrada tekutín a elektrolytov, ktoré sa počas ochorenia strácajú, jednak perorálnou formou, jednak intravenózne. Antibiotická terapia v prípade cholery je presne stanovená. Tetracyklín a azitromycín sú antibiotikami prvej voľby. Skracujú čas vylúčovania baktérií a redukujú objem stolice o 50 %<sup>(5)</sup>. V prípade gastrointestinálnych infekcií *V. cholerae* non-O1, non-O139 sa podanie antibiotík odporúča v prípade komplikovaných ochorení a u imunokompromitovaných pacientov. V analógii s choleroou sú to tetracyklíny, ktoré inhibujú syntézu proteínov, čím znižujú produkciu toxínu, alebo skupina fluorochinolónov. Rozhodnutie o terapii závisí aj do lokálneho stavu citlivosti na antibiotiká, resp. rezistencie. Pri izolovanom kmeni bolo stanovenie citlivosti vykonané diskovým difúznym testom na Muellerových-Hintonových agarových pôdach a komerčne dodávanými antibiotickými diskmi podľa štandardných postupov EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Keďže aktuálne normy EUCAST neobsahujú interpretačné kritériá pre *V. cholerae*, boli použité kritériá pre *Enterobacteriaceae*. Izolovaný kmeň bol rezistentný proti kotrimoxazolu, intermediárne citlivý na ampicilín a gentamicín a citlivý na ciprofloxacín a tetracyklín. Dĺžka terapie závisí od zdravotného stavu pacienta, priebehu a závažnosti ochorenia. Medián je 14 dní. Na základe stanovenej citlivosti bol v terapii cielene použitý perorálny ciprofloxacín v dávke 0,5 g 2x denne. Pôvodne bol navrhnutý na 10 dní, ale pacientka nebola schopná dodržať dĺžku terapie vzhľadom na ťažší priebeh ochorenia. Vakcína proti infekciám spôsobeným *V. cholerae* non-O1, non-O139 v súčasnosti neexistuje.

### Diskusia

Napriek tomu, že ochorenie vypuklo u imunokompetentnej pacientky, jeho priebeh bol vážny a klinické príznaky pretrvávali dlhodobo. Identifikácia *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 ako príčiny ochorenia bola prekvapujúca, ale umožnila nastavenie adekvátnej a cielenej terapie. Prírodným prostredím vibrií je more a pobrežné vody, ale *V. cholerae*, *V. metchnikovii*

a *V. mimicus* dokážu osídľovať aj vody s nízkou salinitou, ako sú jazerá (napr. Neziderské jazero, Rakúsko, ale aj viaceré slovenské jazerá), povrchové a odpadové vody. Vibriá sú schopné prežívať niekoľko týždňov aj vo výkaloch, ich počet narastá najmä v letných mesiacoch, keď sa teplota vody zvyšuje. Zdroj infekcie u pacientky bol potvrdený. Infekcia bola spôsobená konzumáciou, resp. používaním kontaminovanej vody z plytkej kopanej studne, ktorú v domácnosti denne využívali. Príčina kontaminácie vody v studni zostáva nejasná, dôvodom môže byť kontaminácia a presakovanie z okolitého prostredia do studne a množenie infekčných agensov v letných mesiacoch. Napriek tomu, že baktérie sa vyskytujú v prostredí, zostávajú infekcie spôsobené vibriami ojedinelé a raritné. Prezentovaný prípad infekcie potvrdzuje, že treba venovať zvláštnu pozornosť zdravotnej bezchybnosti pitnej a úžitkovej vody, odstraňovaniu výkalov a odpadkov a tiež potravinám konzumovaným v surovom stave. V prípade rodiny bolo nutné nainštalovať k zdroju vody (studni) filtračný systém, ktorý v budúcnosti vylúči riziko vzniku podobnej infekcie. Je vhodné upozorniť ošetrojúcich lekárov aj v krajinách s miernym podnebí, ako je Slovenská republika, na riziko výskytu infekcií spôsobených *Vibrio cholerae* a ostatných druhov *Vibrio* spp. a v prípade gastroenteritíd (napr. po konzumácii vody zo studne) žiadať analýzu prítomnosti týchto baktérií v biologickej vzorke. Vďaka moderným metódam identifikácie patogénnych mikroorganizmov vo vzorkách,

napr. pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF, sa diagnostika črevných nákaz v posledných rokoch v laboratóriách Medirex, a. s., výrazne skvalitňuje.

### Záver

Predložená kazuistika pacientky bola prvým potvrdeným prípadom infekcie *V. cholerae* non-O1, non-O139 v našom regióne aj na Slovensku. Prípad potvrdzuje potrebu promptnej a kvalitnej diagnostiky týchto infekcií v laboratóriách klinickej mikrobiológie a neustále zvyšovanie erudovanosti klinických mikrobiológov. Je tiež dôležité zvýšiť povedomie a informovať o možnosti výskytu takýchto ochorení na Slovensku aj odbornú lekársku verejnosť. Identifikácia vibrií izolovaných z klinických materiálov by mala byť vždy potvrdená v NRC pre *Vibrionaceae* pri RÚVZ v Komárne, ktoré rovnako v prípade výskytu *V. cholerae* vykonáva dôkaz príslušnosti k séro skupinám s vysokým potenciálom epidemického výskytu a dôkaz produkcie cholerového toxínu. NRC tieto vyšetrenia vykonáva s pôsobnosťou pre celú SR.

### Podakovanie

Táto práca bola čiastočne vytvorená realizáciou projektu Centrum excelentnosti environmentálneho zdravia, ITMS č. 26240120033, na základe podpory operačného projektu Výskum a vývoj, financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

### LITERATÚRA

- Engel MF, Muijsken MA, Mooi-Kokenberg E, et al. *Vibrio cholerae* non-O1 bacteraemia: description of three cases in the Netherlands and a literature review. 2016.
- Versalovic J, Carroll KC, Funke G, et al. Manual of clinical microbiology. Washington, DC: ASM Press; 2011.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*. Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*. Ch 6. Atlanta: CDC. [Accessed 13 Apr 2016]. Available from: <http://www.cdc.gov/cholera/pdf/Laboratory-Methods-for-the-Diagnosis-of-Vibrio-cholerae-chapter-6.pdf>
- Ou TY, Liu JW, Leu HS. Independent prognostic factors for fatality in patients with invasive *Vibrio cholerae* non-O1 infections. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; 36: 117-122.
- Leibovici-Weissman Y, Neuberger A, Bitterman R, et al. Antimicrobial drugs for treating cholera. *Cochrane Database Sys Rev* 2014; 6: CD008625.
- Deshayes S, Daurel C, Cattoir V, et al. Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia: case report and literature review. *Springerolus* 2015; 4: 575.



**RNDr. Daniela Lacková, PhD.**

Medirex, a. s.

Nábřežná 3, 934 01 Levice

e-mail: [daniela.lackova@medirex.sk](mailto:daniela.lackova@medirex.sk)