
DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL BRUCELOZEI

18.1. DATE GENERALE

18.1.1. O minidefiniție

Brucelele sunt cocobacili gramnegativi imobili, nesporulați. Aerobi sau carboxifili. Catalazopozitivi, oxidazopozitivi sau negativi, ureazopozitivi. Pe mediul Hiss nu produc acid din zaharuri.

18.1.2. Repere taxonomice

Genul *Brucella* reunește 7 specii: *B. melitensis* (cu 3 biovaruri), *B. abortus* (cu 9 biovaruri), *B. suis* (5 biovaruri), *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis* și *B. rangiferi*. Dintre acestea primele trei specii sunt implicate ocazional în infecții umane.

18.1.3. Habitat

În natură brucelele parazitează diferite animale: *B. melitensis* este găzduită mai ales de caprine și ovine, *B. abortus* de bovine, *B. suis* de suine. La animale, în afara gestației, brucelele evoluează latent sau ca infecție cronică, obișnuit asimptomatic. La masculi infecția se localizează frecvent în veziculele seminale. La femelele gestante infecția se reactivează și brucelele invadează placentă și țesuturile fetale, determinând avort. După avort infecția se localizează în glanda mamară cu eliminarea brucelelor timp îndelungat prin lapte. În mediul extern brucelele sunt organisme relativ rezistente.

18.1.4. Factori de patogenitate

Brucelele sunt bacterii facultativ intracelulare cu mari capacități sensibilizante. Produc endotoxină și au echipament enzimatic de invazivitate (hialuronidază).

18.1.5. Receptivitatea la infecție

Deși receptivitatea omului la brucelele este generală, boala are mai mult caracter profesional, afectând îngrijitorii de animale și personalul veterinar. Sunt posibile imbol-

năviri ocazionale de consumul de lapte și derivate de lapte nepasteurizat de la animale bolnave.

18.1.6. Bruceloza umană

Contaminarea omului se produce pe variate căi: percutană, conjunctivală, respiratorie, digestivă. Leziunile determinate de brucele sunt de tip granulomatos. În infecția cu *B. melitensis* granulomul evoluează frecvent spre cazeificare și supurație. Bruceloza evoluează septicemic, recidivant, cu febră ondulantă și afectarea sistemului reticuloendotelial (limfadenite), locomotor (artrite, poliartrite, bursite, artralгии), nervos (meningoencefalită, nevrite, radiculite etc.), organele genitale la bărbați (orhită, epididimită) și la femei (salpingită, ovarită, endometrite etc.), ficatul (eventual cu icter), rinichii (pielonefrită) etc.

În ansamblu, bruceloza determină un tablou clinic proteiform, dificil de recunoscut, cauzat de varietatea organelor afectate. Impune diferențierea de multe alte infecții cum sunt: infecțiile pulmonare acute, tuberculoza, febra Q, ornitoza, febra tifoidă, reumatismul etc.

18.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN BRUCELOZĂ

18.2.1. Diagnosticul microbiologic

18.2.1.1. Prelevate patologice

Examinăm, în raport cu stadiul bolii și cu forma clinică: hemoculturi, meduloculturi, biopsii ganglionare; mai rar: lichid cefalorahidian, exsudat articular, bilă, urină, puroi. De la animale examinăm avortonul.

18.2.1.2. Microscopia directă

Chiar pe preparate colorate imunofluorescent, microscopia directă este de cele mai multe ori negativă, din cauza numărului redus de brucele în prelevatele patologice din infecția umană.

18.2.1.3. Izolarea și identificarea

Izolarea și identificarea sunt rezervate laboratoarelor specializate, din cauza riscului infecției de laborator.

Etapa I. Însămânțăm medii de cultură speciale cu extract de ficat, geloză D, geloză îmbogățită cu eritritol. Probele contaminate (sediment urinar, lapte de la bovine, caprine etc.) sunt însămânțate pe medii selective (prin polimixină B, bacitracină, ciclohexidină). Culturile sunt incubate la 37°C în atmosferă cu 5–10% CO₂ (pentru a facilita izolarea de *B. abortus*) și urmărite 4–6 săptămâni. Izolarea prin injectare la cobai sau în oul embrionat de găină poate fi realizată în interval de 1–2 săptămâni.

Hemocultura se face prin însămânțarea a câte 5 ml sânge în două flacoane cu mediu bifazic (pantă de geloză și bulion reunite în același flacon; în poziția verticală a flaconului panta de geloză este descoperită și poate fi inundată cu bulion, pentru însămânțare, prin inclinarea flaconului). Hemoculturile sunt incubate la 37°C și urmărite timp de 5 săptămâni pentru apariția culturii. La fiecare 3—5 zile flacoanele sunt inclinate, pentru însămânțarea pantei de geloză prin inundare, și readuse la vertical. Una din hemoculturi este incubată în atmosferă cu 5—10% CO₂. Utilizarea mediului bifazic previne eventualele contaminări ale hemoculturilor clasice din cauza repicărilor frecvente necesare pe parcursul urmăririi lor.

Similar hemoculturii se urmărește și mediocultura.

Etapa II. Coloniile caracteristice, mici, S, transparente, incolore, sunt repicate pentru obținerea culturii pure necesare identificării.

Etapa III. Izolatele sunt identificate pe baza:

- *Caracterelor microscopice:* cocobacili gramnegativi, imobili, necapsulați, nesporulați.

- *Caracterelor de cultură:* creșterea pe medii special îmbogățite, necesitatea CO₂ etc.

- *Caracterelor biochimice:* producerea de H₂S și urează, inactivitatea asupra zaharurilor în mediul Hiss.

- *Activității bacteriostatice diferențiate a coloranților de anilină* (fucsină 1:25 000, tionină 1:50 000) — vezi tabelul 18.1.

Tabelul 18.1. Diferențierea principalelor specii de *Brucella*

Caractere studiate	<i>B. melitensis</i>	<i>B. abortus</i>	<i>B. suis</i>
Activitatea ureazei	Lentă	Foarte lentă	Foarte rapidă (1—5 minute)
Cultivarea în atmosferă fără CO ₂	+	Necesită CO ₂	+
Producerea de H ₂ S	—	+	±
Creștere pe medii cu coloranți:			
■ tionină	+	—	+
■ fucsină	+	+	—
Aglutinarea cu ser monospecific:			
■ anti-M	+	—	+
■ anti-A	—	+	+
Lizotipia cu bacteriofagul TB	—	+	—

- *Structurii antigenice.* Brucelele posedă două complexe antigenice majore, A și M, prezente în cantități diferite la fiecare specie. Folosim seruri monospecifice anti-A și anti-M în reacții de aglutinare. Cultura de *B. melitensis* aglutinează numai cu serul anti-M, cea de *B. abortus* cu serul anti-A, iar cea de *B. suis* cu ambele seruri imune.

- *Sensibilității la fagul Tb (Tbilisi) a speciei B. abortus.*

Etapa IV. Se citesc și se interpretează rezultatele testelor de identificare a speciei de *Brucella*, după care se completează buletinul de analiză.

18.2.2. Diagnosticul imunologic

Diagnosticul imunologic este o metodă obișnuită.

Urmărim prezența și titrul anticorpilor anti-*Brucella* și, prin test intradermic, starea de sensibilizare la aceste bacterii.

Anticorpii anti-*Brucella* pot fi depistați uzual din zilele 7—8 ale bolii. În stadiul acut al infecției sunt din clasa IgM, iar în stadiile tardive, subacut sau cronic, din IgG (rezistenți la acțiunea 2-mercaptoetanolului și la expuneri de 15—30 minute la 65°C). În stadiul subacut sau cronic al brucelozei apar anticorpi monovalenți blocanți, care inhibă reacția de aglutinare.

Pentru diagnosticul serologic al brucelozei se utilizează reacții de aglutinare pe lamă sau în tuburi, reacția Coombs pentru depistarea anticorpilor blocanți, reacțiile de fixare a complementului, opsonocitofagică sau de imunofluorescență indirectă.

Reacția de aglutinare rapidă pe lamă, Huddleson folosește antigen brucelic concentrat și colorat. Pe o placă de sticlă se depun, la intervale, picături cu cantități descrescând de ser suspect: 0,08; 0,04; 0,02; 0,01 ml, alături de care se depun picături de antigen Huddleson în cantități egale de 0,03 ml (tabelul 18.2). Cu colțul unei lame de microscop se amestecă picăturile de reactivi începând de la diluția mai mare spre diluția mai mică a serului. Cu alt colț al lamei se amestecă picăturile martorilor, începând cu martorul antigen. Se încălzește lama la 37°C timp de 1—2 minute cu mișcări de rotație. Citirea se face după maximum 8 minute (interval în care placa este menținută în cameră umedă). Se urmărește apariția și mărirea grunțiilor violeți-albaștri de aglutinare și se face clarificarea amestecului. Suspensiile martor trebuie să rămână omogene, colorate în violet. Rezultatul se exprimă după o scară convențională în procente de aglutinare: 100; 75, 50 și 25 (respectiv +4 la +1). O aglutinare de 50% corespunde unui titru de 1:100 în reacția Wright, titrul minim semnificativ.

Tabelul 18.2. Schema reacției de aglutinare rapidă pe lamă, Huddleson

Reactivi	Reacția, diluții de ser				Martorii	
	1	2	3	4	ser	antigen
Ser suspect	0,08	0,04	0,02	0,01	0,04	—
Antigen Huddleson	0,03	0,03	0,03	0,03	—	0,03
Soluție salină izotonă	—	—	—	—	0,03	0,03
Titru corespunzător în reacția Wright	1/50	1/100	1/200	1/400		

Reacția Huddleson este indicată pentru triajul serurilor în focarele de bruceloză. Rezultatele pozitive trebuie verificate prin reacția Wright.

Reacția de aglutinare lentă în tuburi, Wright. În tuburi de aglutinare efectuăm, cu soluție salină izotonă, diluții duble ale serului suspect de la 1:12,5 până la 1:400 în volume de 0,5 ml. În fiecare tub pipetăm apoi câte 0,5 ml antigen Wright (suspensie de brucele omorâte standardizată la 20 miliarde germeni/ml) diluat 1:10 (tabelul 18.3). Toate tuburile

sunt incubate 20—24 ore la 37°C, apoi încă 1—2 ore la temperatura camerei. Citim reacția cu ochiul liber prin comparație cu tuburile marcor și notăm intensitatea aglutinării de la +4 la 0 după cum urmează: +4 = supernatant clar cu depozit de aglutinat, care la agitare apare grunjos în lichidul transparent; 0 = suspensie omogenă similară cu martorul antigen; +2 = supernatant cu opacitatea martorului 2 antigen și depozit de aglutinat grunjos. Titrul minim semnificativ pentru diagnostic este 1:100 cu aglutinare +2. Titrurile de 1:50 sunt dubioase.

Tabela 18.3. Schema reacției de aglutinare lentă în tuburi, reacția Wright, pentru diagnosticul brucelezei

Reactivi	Reacția propriu-zisă (numărul tuburilor și cantități, ml)						Martor ser	Martori antigen ¹	
	1	2	3	4	5	6		1	2
Soluție salină izotonă	0,92	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,92	0,5	0,75
Ser suspect	0,08	—	—	—	—	—	0,08	—	—
Diluția de ser	1:12,5	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	—	—	—
Antigen Wright (diluat 1:10)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—	0,5	0,25
Diluția finală a serului	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	—	—	—

¹ Martori de capacitate corespunzătoare respectiv 1: reacției negative (aglutinare 0) și 2: reacției pozitive 50% (++)

În reacția Wright aglutinarea poate lipsi la primele diluții de ser sau complet, din cauza anticorpilor blocați monovalenți, situație frecventă în stadiul cronic al infecției. Anticorpilor blocați pot fi depistați prin reacția Coombs: în tuburile negative ale reacției Wright se adaugă la antigenul brucelic (spălat pentru îndepărtarea imunoglobulinelor fixate nespecific și resuspensionat) o cantitate determinată de ser antiimunoglobulină umană. Aglutinarea indică prezența anticorpilor blocați. Un titru de 1:100 în reacția Coombs este diagnostic semnificativ.

Clasa anticorpilor anti-*Brucella*, IgM sau IgG, se determină prin reacția Wright sau reacția de hemaglutinare indirectă (pasivă), cu hematii cuplate cu antigen brucelic, efectuate în paralel cu probe ale serului suspect tratate și netratate cu 2-mercaptoetanol. Diferența mare dintre titruri indică predominanța anticorpilor IgM (infecție primară acută). Diferențe ne semnificative între titruri semnifică predominanța anticorpilor IgG (infecție cronică sau latentă subclinică).

Reacția de fixare a complementului (vezi 10.2.2.3). Titruri semnificative sunt cele $\geq 1:10$ din zilele 12—14 de boală. Reacția este mai ales utilă în formele cronice și latente de bruceleză. Se negativază o dată cu vindecarea microbiologică. În reacțiile postvaccinale pozitivarea este tranzitorie.

Reacția opsonofagocitară. Deși nu are valoare diagnostică, de obicei, evaluează gradul de rezistență a bolnavului (valoare prognostică). Serul bolnavilor de bruceleză opsonizează o suspensie de brucele și stimulează fagocitoza semnificativ mai puternic decât serul persoanelor normale.

Tehnica reacției: într-un tub, la amestecul de 0,25 ml suspensie standardizată de brucele inactivate în fază S cu 0,25 ml soluție 2% citrat de sodiu, se adaugă 0,5 ml sânge de la bolnav. În tubul martor, la amestecul aceluiași reactivi, se adaugă 0,5 ml sânge de la o persoană sănătoasă. Din conținutul tuburilor, incubate 20 minute la 37°C, se efectuează frotiuri subțiri colorați Giemsa. Se numără brucelele fagocitate de 25 polimorfonucleare examinate consecutiv, înregistrând intensitatea fagocitozei conform tabelului 4.4.

Tabelul 18.4. Calcularea indicelui opsonocitofagic (IOC)

Numărul germeilor fagocitați per PMN	Intensitatea fagocitozei	Numărul de PMN din grupa de intensitate	Calcularea IOC (coloanele 2×3)
0	0(0)	0	0×0 = 0
1—20	+(1)	6	1×6 = 6
21—40	++(2)	4	2×4 = 8
≥ 41	+++ (3)	15	3×15 = 45
<i>Total:</i>		25	59

La persoane sănătoase IOC variază între 0 și 10. La bolnavi un indice între 11—24 este dubios, unul între 25—49 este pozitiv, iar unul între 50—75 este intens pozitiv și corespunde unei bune reactivități imune.

Diagnosticul serologic prin reacțiile moderne de *hamaglutinare indirectă*, *ELISA*, *colorație imunofluorescentă indirectă* este mai sensibil în formele cronice și latente ale infecției și elimină rezultatele fals pozitive prin reacții încrucișate cu fracțiuni antigenice comune între *Brucella*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica* sau *Vibrio cholerae*.

Intradermoreacția Burnet depistează sensibilizarea de tip întârziat la brucele (vezi tabelul 11.1). După 24—48 ore se măsoară diametrul zonei infiltrativ-eritematoase. Interpretare: diametrul de 10 mm indică o reacție slab pozitivă, de 30 mm o reacție pozitivă, de 60 mm o reacție intens pozitivă. Intradermoreacția la brucele se pozitivează după 14—30 zile de la debutul bolii sau după vaccinarea cu vaccin viu atenuat și persistă timp îndelungat.

In concluzie:

- Diagnosticul de bruceleoză acută se confirmă prin reacțiile Huddleson și Wright pozitive cu anticorpi predominant din clasa IgM, RIF indirectă și i.d.r. Burnet slabă sau pozitivă.

- Diagnosticul de bruceleoză cronică sau latentă se confirmă prin predominanța anticorpilor din clasa IgG; reacția Coombs și RFC pozitive la titruri semnificative, i.d.r. Burnet pozitivă sau intens pozitivă.

18.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul, profilaxia și tratamentul brucelezei

- Antigen Huddleson: suspensie de *Brucella* omorâtă și colorată cu 20 miliarde germeni/ml.

- Antigen Wright: suspensie de *Brucella* omorâtă cu 20 miliarde germeni/ml.

- Suspensie eritocitară sensibilizată cu antigen bruceleozic.

- Seruri imune monospecifice A și M anti-*Brucella*.

- Bacteriofag anti-*Brucella Tb* (Tbilisi).

- Brucelele.

- Vaccin anti-*Brucella* omorât (curativ) sau viu atenuat (profilactic).

- Antibiotice: tetraciclină + streptomycină, biseptol.