

20

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL YERSINIOZELOR

20.1. DATE GENERALE

20.1.1. O minidefiniție

Yersiniile sunt bacili scurți până la cocobacili, gramnegativi, care fixează colorantul bipolar. Mobili sau imobili. Cresc pe medii simple în prezența bilei. Oxidazonegativi și catalazopozitivi. Facultativ anaerobi, atacă zaharurile fermentativ fără producere de gaz sau numai cu cantități minime. Multe caractere fenotipice (e. g. mobilitatea) sunt dependente de temperatura de incubare, fiind mai caracteristic exprimate la 25—29°C decât la 37°C.

20.1.2. Repere taxonomice

Genul *Yersinia* aparține familiei *Enterobacteriaceae* și reunește speciile:

- *Yersinia pestis*, cu 3 biovaruri, *antiqua*, *medievalis* și *orientalis*, agentul etiologic al pestei, boală numită și ciumă;
- *Yersinia pseudotuberculosis*, care provoacă la animale pseudotuberculoza, iar la om adenite mezenterice și infecții cu alte localizări;
- grupul *Yersinia enterocolitica*, în care, pe lângă specia tip *Y. enterocolitica*, cu 5 biovaruri, sunt reunite mai multe specii asemănătoare, care la om determină mai frecvent enterocolite.

20.1.3. Habitat

Yersinia pestis parazitează peste 200 specii de rozătoare în focare naturale din Centrul Asiei și Africii (biovarul *antiqua*), Orientul Apropiat și Mijlociu (biovarul *medievalis*) sau S.U.A., America de Sud, Africa și Asia (biovarul *orientalis*). Între rozătoare infecția se transmite prin înșepătura puricilor sau solul contaminat al galeriilor în care *Y. pestis* se poate multiplica și la -2°C. Omul și alte specii animale decât rozătoarele devin gazde accidentale obișnuit infectate prin înșepătura puricilor.

Yersinia pseudotuberculosis și grupul *Y. enterocolitica* parazitează o gamă largă de mamifere și păsări și ocazional omul. Cu fecalele contaminează variate elemente de mediu, prin care se transmit de la o gazdă la alta.

20.1.4. Factori de patogenitate

Yersiniile sunt bacterii facultativ intracelulare toxigene. Virulența lor este codificată de gene cromozomiale și plasmidice, fiind evident modulată prin condițiile mediului ambiant, în special temperatură, pH, concentrație de calciu și fier. De aceea virulența tulpinilor de *Yersinia* este foarte variabilă.

Cel mai bogat echipament de patogenitate îl are *Y. pestis*:

- fracțiunile antigenice de înveliș F1, V și W și proteinele de membrană îi conferă capacitatea de a supraviețui și de a se multiplica în macrofage;
- fibrinolizina îi asigură invazivitatea;
- exotoxinele A și B;
- endotoxina.

Tulpinile virulente produc *pesticine* și sunt pigmentogene pe mediile cu hemină sau cu roșu Congo.

Yersinia pseudotuberculosis și *Y. enterocolitica* au factori de patogenitate comuni cu *Y. pestis* cum sunt proteinele de membrană și antigenii V și W, care le asigură capacitatea de a penetra, supraviețui și multiplica în fagocite. Unele tulpini de *Y. pseudotuberculosis* din serovarul O III produc o toxină letală pentru iepuri și cobai. *Y. enterocolitica* produce o enterotoxină termostabilă. Tulpini ale speciilor din grupul *Y. enterocolitica* au capacități enteroinvazive, dar nu produc toxine.

20.1.5. Receptivitatea la infecția cu yersinii

Receptivitatea la pestă este generală.

Linfadenitele mezenterice determinate de *Y. pseudotuberculosis* sau grupul *Y. enterocolitica* au potențial septicemic la gazda imunocompromisă.

20.1.6. Yersiniozele

20.1.6.1. Pesta

Episodic, rozătoarele din focarele naturale de pestă se interpătrund cu rozătoarele peridomestice (șobolanii *Rattus rattus*, *R. norvegicus*; șoarecii de casă), cărora le transmit infecția realizând o epizootie de pestă «domestică». Omul contractează pesta fie când pătrunde într-un focar natural (exploratori, vânători etc.), fie în cursul unei epizootii de pestă domestică. Transmiterea infecției la om se face prin înțepătura vectorilor — purici și alți ectoparaziți ai rozătoarelor, apoi interuman prin *Pullex irritans*, puricele omului sau aerogen.

Pesta bubonică. Pe tegument, la locul înțepăturii vectorului, după o incubajie de 1—6 zile apare o pustulă sau ulcerajie însoțită de adenită cu periadenită regională hemoragică: bubonul pestos. Infecția evoluează septicemic cu localizări viscerale și în tegument, unde se produc inflamații hemoragice cu focare de necroză. Când bubonul supurează și se fistulizează, infecția se limitează la etapa ganglionară.

Pesta pulmonară apare după 3—4 zile de la inhalarea bacteriei și evoluează ca o bronhopneumonie hemoragică foarte contagioasă și letală în mai puțin de 72 ore.

20.1.6.2. Alte yersinioze

Sindroamele clinice cauzate de alte yersinii variază cu vârsta, sexul, reactivitatea și fondul genetic al pacienților. Mai frecvent infecția are poartă de intrare digestivă, doza infectantă fiind de cca 10^9 yersinii.

Y. enterocolitica produce mai frecvent enterocolite, ilcite terminale, dar afectează și ganglionii mezenterici. Poate determina angine eritematoase. La pacienți cu haplotipul HLA-B27 determină, prin mecanism autoimun, poliartrite, eritem nodos și sindrom Reyer.

Y. pseudotuberculosis produce mai frecvent adenite mezenterice. Rar a fost implicată în infecții urinare.

La pacienții imunocompromiși aceste yersinioze pot depăși etapa ganglionară limfatică și evoluează septicemic.

20.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A PESTEI

20.2.1. Diagnosticul microbiologic

Diagnosticul microbiologic este rezervat laboratoarelor specializate.

20.2.1.1. Prelevate examinate

De la bolnavi, în funcție de forma clinică a bolii, se recoltează exsudat din afectul cutanat, aspirat din bubon, puroi, spută, hemoculturi, probe tisulare necrotice.

În focarul de infecție se mai prelevă: rozătoare moarte sau sacrificate, ectoparaziții lor, probe din solul galeriilor etc.

Toate prelevatele se transportă în condiții de maximă securitate, pentru a preveni contaminarea personalului și colectivității.

20.2.1.2. Microscopie directă

Microscopia directă pe frotiuri din exsudat, aspirat ganglionar, puroi, sânge, spută colorate Giemsa, cu albastru de metilen sau albastru toluidină depistează *Y. pestis* sub formă de cocabacili colorați bipolar, dispuși izolat sau în perechi printre celulele inflamatorii. Colorația imunofluorescentă directă permite identificarea rapidă a *Y. pestis*.

20.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa 1. Se însămânțează prelevate necontaminate (aspirat ganglionar, probe biopice) pe geloză-sânge hemolizat și hiposulfat de sodiu (1:4000) ca stimulatori de creștere.

Prelevatele contaminate (spută, probe de la cadavre, broiat de purici, probe de sol) se epuizează pe medii selective prin adaos de violet de gențiană (1:100000—1:200000). Pentru succesul izolării este indicată neutralizarea fagului antipestos prin adăugarea la mediile de izolare a serului antifag.

Hemoculturile sunt indicate în fiecare formă clinică a bolii cu însămânțarea sângelui în bulion glucozat.

Se incubează culturile minimum 30 ore la 37°C sau mai bine la 28°C. O bacterie care cultivă înainte de 30 ore cel mai probabil nu este *Y. pestis*.

Etapa II. Se urmărește pe mediile solide apariția de colonii mici (0,1—1 mm diametru) cu centrul opac, periferia transparentă și marginile ondulate. În bulion *Y. pestis* determină turbiditate minimă, creșterea fiind sub aspect de peliculă superficială cu extindere de filamente în profunzimea mediului și depuneri la fundul recipientului.

Etapa III. Diagnosticul pestei fiind o urgență, testele de identificare nu se mai succed în ordinea clasică, ci cu unele inversiuni. Culturile sugestive sunt verificate microscopic și imediat se procedează la aglutinarea cu ser specific antipestos și testarea sensibilității la fagul antipestos.

Examenul ulterior al caracterelor de cultură (creșterea progresivă a coloniilor, formarea în bulion a unui vâl cu prelungiri sub formă de stalactite în profunzimea mediului, care rămâne relativ clar), biochimice (vezi tabelul 16.1) și patogenitatea pentru șoarece, șobolan sau cobai diferențiază izolatele de alte yersinii și le confirmă ca *Y. pestis*.

Tabelul 20.1. Caractere diferențiale ale yersiniilor

Caractere	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Grupul ¹ <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>
Mobilitate (25°C)	—	+	+	d
Lizidecarboxilază	—	—	—	+
Ornitindecarboxilază	—	—	+	+
Urează	—	+	+	—
Gelatinază	—	—	—	+
Citrat (Simmons, 25°C)	—	— ²	D	+
Voges Proskauer (25°C)	—	—	+	d
Indol	—	—	D	—
Gaz din glucoză	—	—	v	v
Acid din:				
■ glucoză	+	+	+	+
■ lactoză	—	—	D	—
■ ramnoză	—	+	D	—
■ zaharoză	—	—	+	—
■ sorboză	—	—	+	—
■ sorbitol	—	—	+	—
<p>Simboluri: «+» — 90% sau mai mult din tulpini pozitive; «—» — 90% sau mai mult din tulpini negative; d — 11—89% din tulpini pozitive; v — caracter instabil la diferite tulpini (diferit de «d»); D — reacții diferite cu specia.</p> <p>¹ Grupul <i>Yersinia enterocolitica</i> cuprinde: <i>Y. enterocolitica</i>, <i>Y. aldovae</i>, <i>Y. frederiksenii</i>, <i>Y. intermedia</i>, <i>Y. kristensenii</i>.</p> <p>² Tulpinile din serovarul IV sunt citratpozitive.</p>				

Etapa IV. Se analizează, se interpretează și se comunică etapizat rezultatele testelor de identificare: e. g. «Am izolat un cocobacil gramnegativ, cel mai probabil *Y. pestis* conform testelor preliminare de identificare. Urmază confirmarea». «Confirmăm izolarea *Y. pestis*».

20.2.2. Diagnosticul serologic

Are numai o valoare retrospectivă, după cca 2 săptămâni de la debutul bolii. Se recurge la reacția de aglutinare, RFC sau testul de seroprotecție a șoarecelui, sau, mai bine, la *hemaglutinare indirectă* cu eritrocite sensibilizate cu antigenul F1.

20.2.3. Biopreparate utilizate pentru diagnosticul și profilaxia pestei

- Ser antipestos fluorescent.
- Ser antipestos (F1) aglutinant.
- Bacteriofag antipestos.
- Suspensii omorâte de *Y. pestis*.
- Eritrocite sensibilizate cu fracțiunea antigenică F1 pentru serodiagnostic.
- Imunoglobulină antipestoasă.
- Vaccin viu atenuat antipestos.

20.3. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN ALTE YERSINIOZE

Se face microbiologic prin izolarea și identificarea *Y. pseudotuberculosis* sau a speciilor din grupul *Y. enterocolitica* (din materii fecale, biopsii ganglionare, apendice, probe de alimente etc.) sau serologic (depistarea anticorpilor în serul bolnavilor).