

26

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUSEI CONVULSIVE

Tusea convulsivă este o boală infecțioasă acută și contagioasă, cauzată de *Bordetella pertussis*. Atacă de obicei copiii, determinând o bronșită alergizantă, care evoluează mai multe săptămâni cu accese paroxistice de tuse spasmodică. Sindroame asemănătoare, dar mai benigne, pot provoca alte specii de *Bordetella*, unele adenovirusuri, virusul respirator sincițial sau paragripal.

26.1. DATE GENERALE

26.1.1. O minidefiniție

Bordetelele sunt cocobacili gramnegativi, imobili (două specii) sau mobili (o specie). Aerobi, oxidazopozitivi, catalazovariabili. Pe mediul Bordet-Gengou formează colonii perlate inconjurate cu o zonă de hemoliză fără margini definite. Nu atacă zaharurile în medii cu peptonă.

26.1.2. Repere taxonomice și habitat

Genul *Bordetella* reunește patru specii:

- *B. pertussis*, care parazitează căile respiratorii ale omului ca agent etiologic al tusei convulsive;
- *B. parapertussis*, altă specie umană care determină sindroame mai benigne de tuse convulsivă;
- *B. bronchiseptica*, care parazitează căile respiratorii ale unei varietăți de animale domestice sau sălbatice și îmbolnăvește numai rar omul;
- *B. avium*, care parazitează căile respiratorii ale curcanilor fără a fi semnalată patogenă pentru om.

Sursă de infecție sunt bolnavii și purtătorii sănătoși. Foarte sensibile în mediul extern, aceste bacterii se transmit prin picături Flugge și secreții nazofaringiene.

26.1.3 Factori de patogenitate

Bordetella pertussis posedă următorii factori de patogenitate:

a) *Liganzi*, care, prin tropismul lor pentru cili epitelului respirator, inițiază colonizarea masivă a mucoasei respiratorii. Ligandul major este *hemaglutinina filamentoasă* (HAF), iar cel accesoriu *fimbriile*. HAF eliberată în mediu poate fi captată prin «piraterie» de către pneumococi și *Haemophilus influenzae*, care suprainsfectează căile respiratorii inferioare ale pacienților cu tuse convulsivă.

b) *Capsula* cu activitate antifagocitară.

c) Un *complex de toxine* cu acțiuni nocive multiple:

- toxiconecroza mucoasei respiratorii;
- declanșarea reacției inflamatorii locale;
- hipersecreția mucoasă în căile respiratorii;
- leucocitoza (15 000—20 000 leucocite/mm³) cu limfocitoză (peste 60%),
- imunodepresia;
- inhibiția fagocitozei;
- sensibilizarea la histamină;
- hipersecreția de insulină.

Factorii de patogenitate asigură inițierea și evoluția proceselor locale inflamatorii infiltrative, alterarea mucoasei bronșice, suprainsfecția bacteriană, alergizarea bronhiilor, hipersecreția de mucus, excitarea continuă a centrului respirator cu declanșarea acceselor paroxistice de tuse, completate cu reacții din partea altor sisteme și organe.

Celelalte specii de *Bordetella* posedă numai o mică parte din echipamentul de patogenitate al *B. pertussis* și niciodată principala exotoxină: pertussigenul.

26.1.4. Receptivitatea la tusea convulsivă

Receptivitatea la tusea convulsivă este generală. La sugari infecția evoluează deosebit de grav, frecvent mortal.

26.1.5. Tusea convulsivă

După o incubajie de 7—12 zile, boala evoluează în trei stadii: cataral, convulsiv și de convalescență, pe o durată de 1,5—3 luni.

În *stadiul cataral* (7—14 zile) semnele clinice, relativ benigne, sunt necaracteristice (catar respirator, strănut, tuse), dar pacienții sunt foarte contagioși, *B. pertussis* fiind prezentă în mari cantități în nazofaringe.

Stadiul convulsiv (2—4 săptămâni). Starea generală a pacienților se alterează progresiv și, caracteristic, apar accesele de tuse spasmodică, epuizantă, care se asociază cu cianoză, vărsături, eventual convulsii. La sfârșitul accesului de tuse, pacienții expectorează, greu, o cantitate redusă de spută vâscoasă. După 3—4 săptămâni de la debutul bolii pacientul devine necontagios, în sânge crește titrul anticorpilor până în săptămânile 8—9 de boală.

Stadiul de convalescență (cca 4 săptămâni). Lent, accesele de tuse se răresc și scad în intensitate, dar vărsăturile mai pot persista ca fenomen reflex condiționat.

26.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A TUSEI CONVULSIVE

26.2.1. Diagnosticul microbiologic

26.2.1.1. Prelevate patologice

Cât timp pacienții sunt contagioși (primele 3—4 săptămâni de boală) se prelevă mucozitățile nazofaringiene cu un tampon pernazal. Alte prelevate, sputa (difil și tardiv obținută), picăturile Flügge prelevate pe «placă tușită», sunt mai puțin satisfăcătoare.

Dată fiind marea sensibilitate a *B. pertussis* la desicare, exsudatul nazofaringian îl prelevăm pe tampon imbibat cu mediul de transport Kuznejev (soluție de tampon fosfat, cu pH 7,0, cu 0,5% agar-agar și 0,2% cărbune de lemn activat). Pentru transport, tamponul imersat în mediul Kuznejev permite supraviețuirea bordetelelor până la 5—6 ore.

Metoda «plăcilor tușite» asigură însămânțarea picăturilor Flügge direct pe suprafața mediului de cultură (vezi mai jos) cu antibiotic (4—6 UI penicilină sau 2,5 μg meticilină/ml) din placa Petri, expusă deschisă la 10—12 cm de gura pacientului în cursul accesului de tuse.

Proporția izolării *B. pertussis* scade de la 95—80% în săptămânile 1—2 de boală, la 40—20% în săptămânile 2—3 și sub 20% în săptămânile 3—4.

26.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă pe frotiuri din mucozitățile nazofaringiene sau spută colorate cu ser imun fluorescent anti-*pertussis* și anti-*parapertussis* permite depistarea și identificarea rapidă a speciilor respective.

26.2.1.3. Izolarea și identificarea

Prin izolare și identificare pot fi confirmate până la 80—90% din cazurile de tuse convulsivă surprinse în stadiul cataral. Ulterior procentul izolărilor scade progresiv.

Etapa I. Se epuizează tamponul cu exsudat nazofaringian sau sputa pe mediul Bordet-Gengou sau geloză-cazeină-sânge-cărbune activat, care conțin 4—6 UI penicilină sau 2,5 μg meticilină/ml, pentru inhibiția bacteriilor grampozitive de contaminare, cu incubare la 37°C, în atmosferă umedă, timp de 7 zile.

Etapa II. Se urmărește zilnic apariția coloniilor caracteristice. Coloniile de *Bordetella* sunt bombate, perlate cu aspectul picăturilor de mercur, cu hemoliză fără limite, precise. *B. pertussis* crește cel mai lent, abia după 3 zile, cu colonii mici. *B. parapertussis* crește în 1—2 zile și formează colonii mai mari. Coloniile de *B. bronchiseptica* apar a doua zi și sunt cele mai mari.

Se repică 3—15 colonii tipice sau suspecte, pentru a se obține cultura stock pe pantă în vederea identificării.

Etapa III. Se identifică izolatele pe baza caracterelor prezentate în tabelul 26.1:

Tabelul 26.1. Caractere diferențiale între speciile *Bordetella*

Testul	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. avium</i>
Creșterea pe mediul:				
■ Bordet-Gengou	+ (3 zile)	+ (1—2 zile)	+ (1 zi)	+ (1 zi)

Tabelul 26.1 (continuare)

Testul	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. avium</i>
■ Mac Conkey	—	+	+	+
■ geloză cu peptonă	—	+	+	+
Tirozinază ¹	—	+	—	—
Oxidază	+	—	+	+
Urează	—	+	+ ²	—
Nitratază	—	—	+	—
Citrat, utilizare	—	d	+	d
Mobilitatea	—	—	+	+

Simboluri: ↔ — 90% sau mai multe din tulpini pozitive; ↔ — 90% sau mai multe din tulpini negative; d — 11—89% din tulpini pozitive.
¹ Pigmentogenează pe geloză cu peptonă (Innegrire).
² Reacție pozitivă după 4 ore.

a) *Microscopice*: cocobacili gramnegativi cu sau fără capsulă. *B. pertussis* și *B. parapertussis* sunt imobile. *B. bronchiseptica* este mobilă.

b) *Caractere de cultură*: La izolarea din organism, *B. pertussis* nu crește pe medii cu peptonă; celelalte specii cresc, inclusiv pe mediul Mac Conkey, care conține și săruri biliare.

c) *Teste biochimice*. Caractere de gen: inerția fermentativă. Caractere diferențiale între specii: scindarea tirozinei, utilizarea citratului, producerea de urează, reducerea nitraților în nitriți, producere de catalază, oxidază.

d) *Identificarea antigenică* a izolatelor o facem cât mai curând după izolare, pentru a evita degradarea antigenică prin subcultivări repetate. Se utilizează seruri monospecifice în reacții de aglutinare sau imunofluorescență.

Etapa IV. Se analizează, se interpretează rezultatele testelor de identificare și se redactează buletinul de analiză cu precizarea dacă au fost izolate sau nu *Bordetella* și anume care specie.

26.2.2. Diagnosticul imunologic

26.2.2.1. Metoda serologică

Anticorpilor anti-*Bordetella* apar abia în săptămânile 2—3 ale bolii și titrul lor crește progresiv până în săptămânile 8—10.

Se prelevă două probe de ser, în dinamică, la interval de 3 săptămâni. Cum sindromul de tuse convulsivă este poli etiologic, indicată inițial este reacția de fixare a complementului cu baterie de antigeni care includ: antigenii *B. pertussis* și *B. parapertussis* alături de antigenii adenovirali, virusuri respirator sincițial și paragripal. Semnificativă este creșterea de cel puțin 4 ori a titrului față de unul din antigenii etiologici posibili.

Anticorpilor anti-*Bordetella* pot fi depistați prin reacții mai sensibile: de aglutinare (titruri semnificative de peste 1:80), de hemaglutinare indirectă (titruri semnificative de cel puțin 1:80 — 1:160) sau ELISA.

26.2.2.2. Intradermoreacția Flossdorf

Această reacție depistează sensibilizarea de tip întârziat, care apare la convalescenții de tuse convulsivă față de alergenul specific al *B. pertussis*.

Desigur, diagnosticul imunologic al tusei convulsive are numai o valoare retrospectivă cu interes mai mult pentru epidemiolog.

26.2.3. Biopreparate și medicamente utilizate pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul tusei convulsive

- Seruri imune aglutinante și fluorescente antipertussis și antiparapertussis, pentru identificarea culturilor de *Bordetella*.
- Aglutinogen pertussis și parapertussis; baterie de antigeni fixatori de complement pentru serodiagnostic.
- Monovaccinul inactivat antipertussis sau trivaccinul difterotetanopertussis pentru profilaxie.
- Estolat de eritromicină pentru tratamentul antimicrobian.