

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LEPTOSPIROZELOR

30.1. DATE GENERALE

30.1.1. O minidefiniție

Leptospirele sunt spirocheți cu 10—30 spire regulate, strânse, puțin adânci și cu unul sau ambele capete încârligate. Mobilitatea le este asigurată printr-un axistil format din 2 flageli periplasmici, în jurul cărora se înrulează cilindrul protoplasmic.

30.1.2. Repere taxonomice

Leptospirele sunt reunite în familia *Leptospiraceae* cu două genuri: *Leptospira* și *Leptonema*, dintre care numai primul prezintă interes medical.

Genul *Leptospira* cuprinde 3 specii: una patogenă, *L.interrogans*, și două nepatogene, *L.biflexa* și *L.parva*.

L.interrogans are 22 serogrupe cu peste 200 serovaruri. Recent, prin anticorpi monoclonali, a fost demonstrat că antigenul specific de serovar este parte integrantă a lipopolizaharidei leptospirelor, iar antigenul specific de gen este proteic.

30.1.3. Habitat

L.interrogans este găzduită de mamifere:

■ *Gazdele de menținere*, în stare de sănătate aparentă, poartă leptospirele în rinichi și, posibil, în organele de reproducere. Există o afinitate a serogrupelor pentru o anumită gazdă de menținere: e.g. *icterohaemorrhagiae* pentru șobolanul brun, *canicola* pentru câini, *pomona* pentru porci, *tarassovi* pentru porcine și bovine, *grippotyphosa* și *hebdomadis* pentru șoareci etc. La aceste gazde doza infectantă este foarte mică și infecția se transmite larg intraspecific prin urină sau pe cale sexuală. Cele mai numeroase gazde de menținere sunt rozătoarele.

■ *Gazdele accidentale* contractează infecția, cu variate serovaruri, uzual prin elemente de mediu contaminate cu urina gazdelor de menținere sau a altor gazde accidentale. Doza infectantă este mare, frecvent infecția este manifestă clinic, iar portajul renal de durată relativ mai scurtă. Omul sau animale domestice pot fi gazde accidentale.

■ *Gazdele de amplificare* sunt gazde accidentale între care infecția se poate transmite epidemic. Așa sunt animalele domestice din crescătorii (vite, porci, câini), care transmit infecția și către gazdele de menținere sau om.

În apă și solul umed, în nămol *L.interrogans* persistă timp îndelungat (până la 42 zile). *L.biflexa* trăiește în apele de suprafață, iar *L.parva* în apa de conductă.

30.1.4. Factori de patogenitate

Virulența leptospirelor rezultă din:

- capacitatea invazivă asigurată prin mobilitatea lor mare și, probabil, producerea de hialuronidază,
- capacitatea adezivă la glicocalixul celulelor gazdei,
- capacitatea de multiplicare *in vivo*,
- acumularea de endotoxină.

30.1.5. Receptivitatea la leptospiroze

Nu numai virulența tulpinii, ci și rezistența gazdei are, în particular răspunsul imun, un rol important în severitatea manifestărilor leptospirozelor. Este bine cunoscută sensibilitatea mare a cobailor tineri la infecția experimentală cu variate serogrupe și serovaruri de *L.interrogans* și rezistența iepurilor, șobolanilor, șoarecilor.

30.1.6. Leptospirozele

Omul contractează leptospiroza prin tegumente și mucoasa conjunctivală, nazală sau bucală la contactul cu apa, nămolul, solul umed ori alimentele contaminate cu urina animalelor infectate. Sunt repede antrenate în circulația generală, fără a determina leziuni la poarta de intrare, pătrunzând în lichidul cefalorahidian și în toate țesuturile. După o incubajie de 3—14 zile, boala debutează cu o fază septicemică, febrilă, care durează cca 7 zile. Urmează o perioadă afebrilă de 1—3 zile, după care începe faza organică a bolii, manifestată prin febră și o simptomatologie variată în funcție de organele predominant afectate.

În faza organică leptospiroza poate evolua anicteric (simplă febră, sindrom meningeal, nevrite, mielite, encefalite, sindrom renal) sau icteric (sindromul Weil). Această evoluție nu ține atât de serovarul infectat, cât de virulența tulpinii și reactivitatea gazdei. Endotoxemia este responsabilă de gravul sindrom cardiovascular hemoragic cu letalitate de 6—8%. Manifestările hemoragice sunt mai frecvente în leptospirozele icterice.

Leptospirele se pot localiza în uterul gravid și trec transplacentar determinând avort.

Cele mai grave îmbolnăviri le cauzează leptospirele din grupele *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *bataviae* ș. a.; forme benigne, cele din grupul *grippotyphosa*.

30.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ ÎN LEPTOSPIROZE

30.2.1. Diagnosticul microbiologic

30.2.1.1. Prelevate patologice

În prima săptămână de boală se urmăresc leptospirele în sânge, iar din a doua săptămână în urină și, la pacienți cu meningită, în lichidul cefalorahidian. Cum leptospirele

sunt foarte sensibile la pH acid, se prelevă probe de urină alcalinizată prin administrare prealabilă pacientului de citrat de potasiu sau bicarbonat de sodiu. Necroptic se prelevă probe de țesut renal și hepatic. În scopuri epidemiologice se examinează și urină sau țesut renal de la animale, probe de apă, nămol.

30.2.1.2. Microscopia

Se examinează preparate native și preparate colorate.

Examenul preparatului umed între lamă și lamelă a sedimentului de urină sau lichid cefalorahidian la microscopul cu fond negru depistează leptospirele strălucitoare, cu morfologie caracteristică și cu mișcări de rotație, flexie și translație. Microscopia plasmei sangvine în preparat nativ poate da erori, din cauza confuziei expansiunilor fibrilare ale trombocitelor și hematiilor cu leptospire.

Efectuăm frotiuri de sânge, din sedimentul umorilor prelevate sau amprente de organe. Pe preparatele microscopice colorate Giemsa leptospirele apar colorate în roșu-violet, iar după impregnare argentică Fontana-Tribondeu în negru-brun.

Mai puțin accesibilă este colorația imunofluorescentă directă.

30.2.1.3. Izolarea și identificarea

Leptospirele pot fi izolate pe medii artificiale sau prin inoculare la animale receptive.

Multe tulpini de leptospire cultivă ușor pe mediile clasice, care sunt, în principiu, soluții saline, mai mult sau mai puțin complexe, tamponate la pH 7,2 și suplimentate cu 10% ser de iepure inactivat (e.g. mediile Korthof, Stuart). Unele tulpini sunt mai pretențioase, dar pot fi izolate pe medii semisintetice cu serum-albumină bovină și acizi grași (e.g. mediul EMJH — Ellinghausen-Mc Cullough-Johnson-Harris). Cultura apare după 10—30 zile de incubare aerobă la 28°C fără a modifica semnificativ turbiditatea mediului. Apariția culturii o urmărim la intervale de 5 zile prin microscopie pe fond negru.

Umorile și țesuturile pot conține inhibitori pentru leptospire. De aceea însăămânțăm probele ca atare și în diluții. Exemple:

Hemocultura. Se însămânțează 0,5 ml într-un prim tub cu 10 ml mediu și se omogenizează. Se transvazează 0,3 ml din acest amestec în al doilea tub cu 3 ml mediu, se omogenizează și se transvazează 0,3 ml în al treilea tub tot cu 3 ml mediu.

■ **Urina și sedimentul urinar.** Se însămânțează 1—2 picături per tub cu cca 5 ml din proba ca atare și diluată 1:10.

■ **Omogenatele tisulare** sunt inițial diluate prin modul de preparare (2 g probă/5 ml fluid).

Probele contaminate sunt însămânțate în mediu cu 5-fluorouracil 200—400 μg/ml, pentru a preveni invadarea mediului de către organismele de contaminare.

Pentru izolarea *in vivo* se folosesc cobai tineri (100—200 g) care sunt injectați intraperitoneal. Izolarea din probe de apă este mai indicată să se facă prin inoculare percutană (revedi partea întâi, 9.3.2). Se urmăresc animalele inoculate timp de 14—21 zile. De la cadavre sau animale sacrificate se prelevă sânge, fragmente de ficat, rinichi, plămâni pentru microscopie, reizolare *in vitro* și identificare.

Identificarea leptospirelor izolate se efectuează prin studiul:

- **caracterelor de cultură** (vezi mai sus);
- **caracterelor microscopice** (vezi mai sus);
- **sensibilității** la 8-azaguanină sau 2,6-diaminopurină (*L.interrogans* este sensibilă, *L.biflexa* rezistentă);

- patogenității experimentale;
- structurii antigenice prin reacția de aglutinare-liză cu seruri imune anti-*Leptospira* specifice de serogrup și serovar (vezi mai jos).

30.2.2. Diagnosticul serologic

Anticorpilor anti-*Leptospira* pot fi decelați după 7—8 zile de boală. Titrul lor ajunge maxim în săptămânile 3—4, apoi scade și se menține la valori mici luni (anticorpilor fixatori de complement) sau ani de zile după vindecare (aglutininele).

- *Reacția de fixare a complementului* se efectuează cu antigenul specific de gen preparat din *L. biflexa* tulpina Patoc I. Creșterea de cel puțin 4 ori a titrului constatată în serurile perechi recoltate la intervale de cca 8 zile în cursul celor 2—4 săptămâni de observație a pacienților confirmă diagnosticul de leptospiroză fără a putea preciza serogrupul infectant.

- *Reacția de aglutinare-liză (RAL)* este sensibilă și specifică, precizează serogrupul și serovarul, dar este accesibilă numai laboratoarelor care întrețin în colecție tulpinile serogrupurilor și serovarurilor de *Leptospira* circulante în zonă.

În tuburi se diluează serul suspect de la 1:50 la $\geq 1:1600$. Pe lame de microscop, se amestecă o picătură din cultura vie a tulpinii fiecărui serogrup de *Leptospira* cu o picătură de diluție a serului. Se acoperă picăturile cu câte o lamelă și se incubează preparatul în cameră umedă timp de 15—20 minute, după care se citește reacția la microscopul cu fond negru. *RAL pozitivă*: leptospirele din serogrupul corespunzător anticorpilor se aglutinează sub formă de gheme stelate (păianjen), devin imobile, se dezagregă granular și dispar. La diluții mai mari ale serului poate să se manifeste numai aglutinarea. *RAL negativă*: leptospirele rămân dispersate uniform cu morfologia și mișcările caracteristice. Diluția până la care mai apare RAL pozitivă indică titrul serului. Titruri mai mari de 1:200 sunt sugestive, iar creșterea de cel puțin 4 ori a titrului în cursul bolii confirmă leptospiroza și indică serogrupul și serovarul infectant.

Teste serologice noi utilizate pentru serodiagnosticul leptospirozelor sunt: ELISA, reacția de hemaglutinare indirectă etc.

30.2.3. Biopreparate folosite pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și terapia leptospirozelor

- Seruri imune anti-*Leptospira* de grup și variantă utilizate pentru identificarea tulpinilor izolate.
 - Colecția de leptospire cu tulpini din fiecare serogrup pentru montarea RAL.
 - Antigen *Leptospira biflexa* Patoc I, cu specificitate de gen, pentru RFC.
 - Suspensie de eritrocite sensibilizate cu antigen *Leptospira* pentru RHAI.
 - Vaccin anti-*Leptospira* (suspensie polivalentă de leptospire omorâte) pentru vaccinarea persoanelor din grupuri cu risc.
 - Imunoglobulină anti-*Leptospira* utilă în tratamentul bolii.