

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL RICKETTSIOZELOR

37.1. DATE GENERALE

37.1.1. O minidefiniție

Rickettsiile sunt mici organisme pleomorfe, uzual intracelulare, găzduite de artropode. Sunt patogene pentru om și alte vertebrate. Deși au metabolism energetic și capacități de biosinteză independente, nu pot fosforila glucoza ca substrat energetic, ci folosesc metaboliți intermediari din gazdă, pe care îi oxidează în ciclul acizilor tricarboxilici propriu.

37.1.2. Repere taxonomice

În familia *Rickettsiaceae*, au fost diferențiate trei triburi bazate pe afinitățile de gazdă, dintre care numai două îmbolnăvesc vertebratele:

Tribul I *Rickettsieae*, care cuprinde specii patogene pentru om și specii înrudite cu ele.

Tribul II *Ehrlichieae*, care îmbolnăvesc vertebrate, mai frecvent animalele domestice. Numai două specii pot infecta omul: *Ehrlichia sennetsu* și, accidental, *E.cannis*.

Tribul *Rickettsieae* are trei genuri: *Rickettsia*, *Rochalimaea* și *Coxiella* diferențiate conform caracterelor precizate în tabelul 37.1.

Pe baza caracterelor biologice (localizarea în celula gazdă, structura antigenică) și clinico-epidemiologice ale infecțiilor determinate, în genul *Rickettsia* sunt identificate trei grupe de specii (tabelele 37.2, 37.3).

- Grupul tifosului cu *R.prowazekii* și *R.typhi* (sinonim *R.mooseri*).
- Grupul febrei pătate cu *R.rickettsii*, *R.conorii*, *R.australis*, *R.sibirica* și *R.akari*.
- Grupul tifosului de lăstăriș cu *R.tsutsugamushi*.

37.1.3. Habitat

Rickettsiile sunt găzduite în natură de către o serie de vertebrate, inclusiv omul, între care se transmit prin ectoparaziți hematofagi (tabelul 37.2). Unele specii în organismul artropodului vector se transmit transovarian între generații. Doar *R.prowazekii* își îmbolnăvește gazda nevertebrată, păduchele de corp (*Pediculus humanus* var. *corporis*), care face o infecție digestivă, moare în 1—3 săptămâni fără a transmite infecția la

descendenți. Alte excepții sunt: *Rochalimaea quintana* cu omul ca singură gazdă vertebrată și *Coxiella burnetii*, care, grație endosporului rezistent, se poate transmite între gazdele receptive atât prin căpușe, cât și prin elemente contaminate de mediu sau lapte.

Tabelul 37.1. Caractere diferențiale între genurile tribului *Rickettsieae*

Caractere	<i>Rickettsia</i>	<i>Rochalimaea</i>	<i>Coxiella</i>
Cultivarea pe medii artificiale	—	+	—
Creșterea în celula eucariotă:			
■ în citoplasmă sau nucleu	+	—	—
■ în fagolizozom	—	—	+
■ epitelular	—	+	—
Prezența endosporilor	—	—	+
Metabolism			
■ pH optim	7,0	7,0	4,5
■ CO ₂ produs din:			
glucoză	—	—	±
glutamat	+	±	+
succinat	±	+	+

37.1.4. Factori de patogenitate

Rickettsiile sunt *organisme invazive*. Suspensiile vii de *Rickettsia* au și *efect toxic*: o doză mare de rickettsii vii inoculată intravenos la șoareci li omoară în 1—8 ore prin hiperpermeabilizare capilară; supraviețuitorii efectului toxic fac, abia după câteva zile de incubare, o infecție mai mult sau mai puțin gravă, în raport cu specia de rickettsia inoculată (tabelul 37.3). Efectul toxic lipsește la *Coxiella* și la *Rochalimaea*.

37.1.5. Receptivitatea la rickettsioze

Receptivitatea omului la rickettsiile prezentate în tabelul 37.2 este generală. În același tabel sunt menționate cele mai receptive gazde animale la infecția experimentală.

37.1.6. Infecții și boli determinate de rickettsii

Rickettsiile au tropism pentru endoteliul vascular. Leziunea caracteristică este o endotelită trombozantă cu inflamație periadventițială a vaselor mici, *nodulul Popov-Frankel*, răspândită difuz.

Rickettsiozele omului *evoluează ciclic* cu febră, stare tifică însoțite frecvent de exantem cu aspect variat în funcție de specia infectantă. *Frecvent infecția își continuă evoluția latent cu posibilități de reactivare.*

Tabelul 37.2. Tribul *Rickettsiae*: boli umane – transmitere și răspândire geografică, ciclul natural al infecției

Grup biologic	Specii	Boală umană	Transmitere la om	Distribuție geografică	Ciclul infecției naturale	
					artropod vector	gazda vertebrată
Grupul tifos	<i>R. prowazekii</i>	Tifos epidemic	Fecalele păduchelui infectat: grataj cutanat, inhalare	Cosmopolită	Păduche de corp (<i>P. humanus</i> var. <i>corporis</i>) Păduchi și purici ai veveriței zburătoare	Om Veverița zburătoare (in S.U.A.)
	<i>P. prowazekii</i>	Boala Brill-Zinsser (tifos de recădere)	Infecție latentă reactivată	Cosmopolită	—	Om
	<i>R. typhi</i>	Tifos murin (tifos endemic)	Fecalele puricelui infectat: grataj cutanat	Cosmopolită	Purici de șobolan: <i>Xenopsylla cheopis</i>	Șobolan
Grupul febre pătate	<i>R. rickettsii</i>	Febră pătate a Munților Stăncoși	Înșepătură de căpușă	America	Căpușe: <i>Dermacentor</i> , <i>Amblyomma</i> , <i>Haemaphysalis</i>	Mamifere sălbatice mici, mijlocii; păsări și câini
	<i>R. conorii</i>	Febră butonoasă	Înșepătură de căpușă	Litoralul mediteranean, Africa, India	Căpușă: <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Mamifere sălbatice mici; câini
	<i>R. sibirica</i>	Tifos de căpușă Nord-Asiatic (siberian)	Înșepătură de căpușă	Siberia, Mongolia	Căpușă: <i>Dermacentor</i>	Animale sălbatice și domestice
	<i>R. akari</i>	Rickettsioza veziculară	Înșepătură de Gamassidae (mici acarieni)	Rusia, N-E S.U.A.	<i>Gamassidae</i> (acarieni)	Șoarecele de casă
	<i>R. australis</i>	Tifosul de căpușă din Queensland	Înșepătură de căpușe	Australia	Căpușă: <i>Ixodes</i>	Rozătoare sălbatice mici
Grupul tifos de lăstăriș	<i>R. tsutsugamushi</i>	Tifos de lăstăriș	Înșepătură de <i>Trombiculidae</i> (mici acarieni)	Asia, Australia, Oceania	<i>Trombiculidae</i> (mici acarieni)	Rozătoare sălbatice mici; păsări
Febră de tranșee	<i>Rochalimaea quintana</i>	Febră de tranșee (febra de Wolhinia, febra de 5 zile, febra tibialgică)	Fecalele păduchelui infectat: grataj cutanat	Europa, Africa de Nord, Orientul Mijlociu, Mexic	Păduche de corp (<i>P. humanus</i> var. <i>corporis</i>)	Om
Febră Q	<i>Coxiella burnetii</i>	Febră Q (tifos pulmonar)	Inhalare de pulberi sau aerosoli contaminați. Înșepătură de căpușă	Cosmopolită	Căpușe: <i>Ixodes</i> , <i>Haemaphysalis</i>	Mamifere sălbatice mici; vite, capre, oi

Tabelul 37.3. Date importante pentru diagnosticul microbiologic și serologic al rickettsiozelor

Grupul biologic	Specii	Animalul experimental: (inoculare intraperitoneală) semne, gravitate	Număr serovaruri	Activitate serologică ¹						
				antigeni solubili		antigeni corpusculari				aglutinarea <i>Proteus</i> OX (reacția Weil-Felix)
				RFC	RHAI	RFC	IF	Mic-ro-aglu-ti-nare	Neu-tra-lizarea «toxi-nei»	
Grupul tifos	<i>R. prowazekii</i>	Cobai mascul: febră, supraviețuiește	1	SG	SG	SS	SS	SS	SS	OX19
	<i>R. typhi</i>	Cobai mascul: febră, inflamație scrotală; supraviețuiește	1	SG	SG	SS	SS	SS	SS	OX19
Grupul febrei de pătată	<i>R. rickettsii</i>	Cobai mascul: febră, necroză scrotală; moare frecvent	>4	SG	SG	SS	SS	SS	SS	OX19 sau OX2
	<i>R. conorii</i>	Cobai mascul: febră, inflamație scrotală; moare rar	1	SG	SG	SS	SS	SS	SS	OX19 sau OX2
	<i>R. sibirica</i>	Cobai mascul: febră, supraviețuiește	1	SG	?	SS	SS	?	SS	OX19 sau OX2
	<i>R. akari</i>	Șoarece: inactivitate, păr zburliț, tahipnee, ascită; moare	1	SG	SG	SS	SS	SS	Nu	Nu
	<i>R. australis</i>	Șoricea nou-născută: infecție mortală. Cobai mascul: febră, supraviețuiește	1	SG	?	SS	SS	?	Nu	OX19 sau OX2
Grupul tifos de lăstăriș	<i>R. tsutsugamushi</i>	Șoarece: ascită; moare	>8	ST	Nu	ST	ST	?	— ²	OXK
Febră de tranșee	<i>Rochalimaea quintana</i>	—	1	SS	Nu	SS	?	?	Nu	Nu
Febră Q	<i>Coxiella burnetii</i>	Cobai mascul: febră, rar moare	2 faze ³	Nu	Nu	SS	SS	SS	Nu	Nu

¹ Abrevieri: RFC — reacția de fixare a complementului; RHAI — reacție de hemaglutinare indirectă cu hematii sensibilizate prin antigenul solubil; IF — imunofluorescență; SG — specificitate de grup; SS — specificitate de specie; ST — specificitate de serovar; ? — nu există informații.

² Rezultate greu de interpretat.

³ *Coxiella burnetii* are o variație antigenică de fază. Din gazdele naturale (om, animale, artropode) se izolează în faza I particularizată printr-un antigen care reacționează în RFC cu anticorpii din infecția tardivă a cobaiului. Adaptarea la embrionul de găină, prin pașaje succesive în sacul vitelin, selectează faza II, care reacționează în RFC cu anticorpii din infecția precoce a cobaiului. Prin reinoculări la gazdele naturale, indivizii minoritari din faza I sunt selectați și întreaga populație infectantă revine la faza I. Și la om răspunsul imun precoce determină anticorpi fixatori de complement pentru faza II și numai în convalescența tardivă sau în infecția cronică apar anticorpi fixatori de complement specifici fazei I. Curent se identifică antigenii în fazele I și II prin reacții de microaglutinare și imunofluorescență.

Tifosul exantematic epidemic este determinat de *R.prowazekii*, iar reactivările infecției latente sunt cunoscute sub numele de boala Brill-Zinsser. *R.typhi* determină tifosul murin sau endemic.

Febrele pătate. *R.rickettsii* este cauza febrei pătate a Munților Stâncosi, cea mai gravă rickettsioză. *R.conorii* determină febra butonoasă, *R.australis* tifosul de căpușă din Queensland, *R.sibirica* tifosul de căpușă Nord-Asiatic, iar *R.akari* rickettsioza variceliformă.

Tifosul de lăstăriș este determinat de *R.tsutsugamushi*.

Rochalimaea quintana este agentul etiologic al febrei de 5 zile, boală numită și febră de tranșee sau febră de Wolhynia.

Coxiella burneti cauzează febra Q numită și tifos pulmonar. Infecția se poate croniciza cu leziuni de endocardită subacută sau hepatită granulomatoasă. La animale (bovine, ovine, caprine, rozătoare) infecția evoluează cronic sau latent cu reactivări în cursul sarcinii, când *C.burneti* se multiplică masiv în placentă, țesuturile fetale și uger.

Ehrlichia sennetsu determină la om, în Japonia, rickettsioza sennetsu manifestată prin febră însoțită de limfadenopatii postauriculare și cervicale cu limfocitoză.

37.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A RICKETTSIOZELOR

37.2.1. Diagnosticul microbiologic

Contagiozitatea și gravitatea rickettsiozelor restrânge acest diagnostic numai la laboratoarele de specialitate ale centrelor naționale de referință.

37.2.1.1. Prelevate patologice

Se examinează, în funcție de forma clinică a bolii, eventualele complicații și scopul urmărit (diagnostic la bolnav, investigație epidemiologică):

- Sânge prelevat în primele zile de boală. După ziua a 7-a, uneori până în ziua a 12-a, se încearcă izolarea rickettsiilor din chiagul sangvin mojarat, din sedimentul globular al sângelui heparinat, pentru a elimina anticorpul care pot împiedica izolarea.

- Artropode capturate după hrănirea cu sânge pe pacienții suspecți de rickettsioză (tifos exantematic: păduchi — vezi tabelul 37.2) sau de pe animale din focarul de infecție (căpuși de pe câini din locuința pacienților cu febră butonoasă, de pe animale din focare de febră Q sau febre pătate). Artropodele sunt capturate în recipiente prevăzute cu dop de bumbac sau plută, nu de cauciuc.

- De la pacienții cu febră Q, în afară de sânge, în raport cu complicațiile posibile, se mai prelevă: spută, exsudat pleural, lichid cefalorahidian, probe necroptice (valvule cardiace, țesut hepatic), iar de la animalele din focarul de infecție: placentă, lapte, urină, căpuși de pe animale.

37.2.1.2. Microscopia directă

Pe amprente sau secțiuni histologice din probe biotice sau necroptice rickettsiile apar intracelular ca bacili fini sau cocobacili albaștri-purpurii în colorația Giemsa sau roșu viu în colorațiile Machiavello ori Giménez.

Colorația imunofluorescentă identifică rapid *R.rickettsii* pe secțiunile biopsiilor din leziunile cutanate ale pacienților cu febră pătată a Munților Stâncosi, *C.burneti* pe secțiuni

ale valvulelor cardiace de la pacienți decedați cu endocardită după febra Q. Aceste rickettsii pot fi identificate prin colorația imunofluorescentă și pe frotiuri din hemolimfa căpușelor infectate.

37.2.1.3. Izolarea și identificarea

Prelevatele fluide necontaminate se injectează intraperitoneal la animalele receptive (tabelul 37.2) direct la patul bolnavului. Când se prevede un interval mai mare de o oră până la inoculare, necondiționat prelevatele trebuie imediat congelate la -25°C . Întotdeauna se inoculează două animale.

Din probele tisulare necontaminate se injectează supernatantul suspensiei 10% (greutate/volum) în soluție salină izotonă centrifugată 15 minute la 1 000 rpm.

Toate probele contaminate (spută, urină, lapte, suspensii de placenta) se infectează numai după tratarea timp de 20—30 minute cu penicilină în proporție de 1 000—5 000 UI/ml inoculum.

Artropodele vii se imobilizează, prin refrigerare la $3-5^{\circ}\text{C}$, se spală repetat cu apă distilată sterilă (sau se mențin o oră în soluție 1:1 000 mertiolat de sodiu, dacă gazda de izolare este embrionul de găină), după care se omogenizează (10—15 artropode/10 ml soluție salină izotonă sterilă), și se injectează supernatantul tratat cu penicilină 1 000 UI/ml.

Izolarea rickettsiilor prin inocularea direct în sacul vitelin al embrionului de găină a prelevatelor patologice de la om este mai puțin sensibilă.

Unul din animalele care prezintă semne de boală (vezi tabelul 37.2) este sacrificat. Rickettsiile sunt urmărite, microscopic, în exsudatul fibrinos de pe suprafața splinei sau tunicii vaginale a testiculului, pe amprente colorate Machiavello, Giemsa sau imunofluorescent. Rickettsia izolată la cobai sau șoarece este adaptată ușor la cultivarea în sacul vitelin al embrionului de găină în vederea preparării unui antigen corpuscular, care se identifică prin reacții cu seruri imune de referință (RFC, microaglutinare, microimunofluorescență — tabelul 37.3).

Cobaii care nu prezintă semne de boală sau care supraviețuiesc bolii febrile sunt testați serologic, după 3—4 săptămâni de la inoculare, pentru apariția anticorpilor antirickettsieni (tabelul 37.3 și 37.2.).

Rochalimaea quintana se izolează din sânge prin însămânțare pe geloză special îmbogățită cu 6% ser de cal inactivat 30 minute la 56°C și 4% eritrocite de cal lizate. După 12—14 zile de incubare la 37°C în atmosferă cu 5% CO_2 apar microcolonii (examinare sub stercomicroscop) în care organismul este identificat microscopic pe frotiuri colorate prin tehnica Giménez și antigenic prin RFC cu ser imun specific anti-*Ro. quintana*.

37.2.2. Diagnosticul serologic

37.2.2.1. Metodele nespecifice

Metode nespecifice: reacțiile de aglutinare cu antigeni *Proteus* OX (tabelul 37.3).

Reacția Weil-Felix este o reacție de aglutinare în tub. Se pozitivează la sfârșitul primei săptămâni de boală. Titrul aglutininelor ajunge maxim la începutul convalescenței și scade la valori ne semnificative în interval de la una până la câteva luni după boală, fără reacții anamnestice în rickettsiozele de recidivă. Semnificative pentru diagnostic sunt titrurile care cresc de cel puțin 4 ori în evoluția bolii. Spre exemplu, în tifosul exantematic de primoinfecție titrul aglutininelor anti-*Proteus* OX19 poate fi de 1:500 la sfârșitul primei săptămâni de boală și crește până la 1:10 000 în convalescență.

Reacția Kudike-Steuer este o reacție orientativă prin aglutinare pe lamă. Pe o lamă de microscop se depune o picătură din sângele de examinat și se defibrinează prin mișcări circulare cu colțul altei lame. Pe picătura de sânge uscat se depune o picătură din suspensia de *Proteus OX19*. Aglutinarea suspensiei în interval de maximum 10 minute indică o reacție suspectă (corespunde unui titru de cca 1:250 la aglutinarea în tub) și trebuie confirmată prin reacții specifice.

37.2.2.2. Metodele specifice

Metode specifice: reacțiile cu antigeni rickettsieni.

■ *Reacția de fixare a complementului* este larg utilizată. Uzual se utilizează *antigenul rickettsian total*. Anticorpul fixator de complement apar la sfârșitul primei săptămâni de boală, ating un maxim în săptămâna a 3-a sau a 4-a de boală și persistă, la titruri reduse, luni sau ani după vindecare. Sunt semnificative titruri peste 1:16, când cresc de cel puțin 4 ori în evoluția bolii.

Pentru diagnosticul febrei Q în formele acute se folosește antigenul de *C.burneti* în faza II. Se urmăresc anticorpul fixator de complement, care sunt decelați din ziua 8—10 de boală și urmează o dinamică similară celorlalte rickettsioze. Semnificative pentru diagnostic sunt titruri de 1:8—1:16 cu condiția creșterii de cel puțin 4 ori în cursul bolii.

Urmărirea prin RFC a anticorpilor IgM permite stabilirea precoce a diagnosticului rickettsiozelor de primoinfecție pe probă unică de ser.

■ *Reacția de microaglutinare* folosește *antigeni corpusculari purificați*. Este mai sensibilă decât RFC. Curba aglutininelor evoluează paralel cu cea a anticorpilor fixatori de complement.

Endocardita cu *Coxiella* trebuie suspectată la pacienți cu hemoculturi repetate negative și titruri peste 1:200 în microaglutinarea cu *antigenul în faza I*.

■ *Reacția de hemaglutinare indirectă* decelează anticorpi din ziua a 4-a de boală. Titrul lor crește timp de 3 săptămâni până la 1:32 000 — 1:64 000, după care scade până la valori ne semnificative (<1:1 000) în intervalul de 3 luni de la debutul bolii. Deci reacția de hemaglutinare pasivă este foarte utilă în regiunile endemice, pentru că un rezultat pozitiv indică îmbolnăvirea recentă și este mult mai ușor de interpretat decât rezultatele RFC sau reacției de microaglutinare.

■ *Reacția de imunofluorescență indirectă* este rar utilizată. Însă depistarea prin această reacție a anticorpilor IgA anti-*C.burneti* în fazele I și II poate depista endocardita din febra Q.

■ *Reacțiile moderne ELISA și imunofluorescență indirectă cu antigen Coxiella burneti în faza II* depistează rapid și cu mare sensibilitate anticorpul IgM pentru diagnosticul febrei Q pe probe unice de ser.

37.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul rickettsiozelor

■ Seruri antirickettsiene cu specificitate de grup și de specie sau serovar pentru identificarea izolatelor în laboratoarele de referință.

■ Antigeni *Proteus OX* pentru reacția Weil-Felix și Kudicke-Steuer.

■ Antigeni rickettsieni totali cu specificitate de grup pentru RFC.

- Antigen rickettsian solubil pentru sensibilizarea hematiilor in reacția de hemaglutinare indirectă.
- Antigeni rickettsieni corpusculari pentru reacțiile serologice cu specificitate de specie: RFC, microaglutinare, imunofluorescență indirectă.
- Antigen *Coxiella burneti* faza II pentru RFC.
- Antigen corpuscular *Coxiella burneti* faza I pentru serodiagnosticul endocarditelor subacute din febra Q.
- Truse ELISA pentru depistarea anticorpilor IgM anti-*C.burneti* faza II.
- Vaccinuri anti-*R.prowazekii* (inactivat sau, mai imunogen, viu atenuat) și anti-*Coxiella burneti* (extract antigenic din suspensia de *C.burneti* faza I).
- Antibiotice antirickettsiene: tetracicline, cloramfenicol.