

MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR AEROGENE

MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIFTERIEI

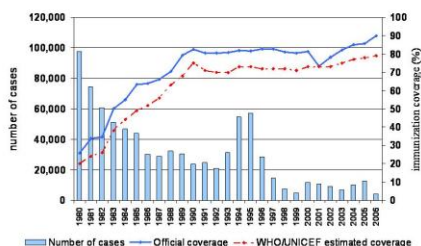
- **DIFTERIA** – toxiinfecție acută, caracterizată printr-o angină pseudo-membranoasă cu efecte toxice la distanță (miocardită, polineurită, nefroză).
Este provocată de mi/o din genul *Corynebacterium*, familia *Corynebacteriaceae*
- Genul *Corynebacterium* reunește mi/o care se caracterizează prin prezența în compoziția peretelui celular a:
 - acidului mezo-diaminopimelic
 - acizilor micolici cu catenă scurtă (22-38 atomi de C)
 Conținutul GC între 46-74 %.
Prezintă asemănări cu mi/o din genurile *Mycobacterium* și *Nocardia*

• Clasificarea genului *Corynebacterium*

- Corinebacterii fitopatogene
- Corinebacterii patogene pentru animale, care afectează accidental omul:
C.pseudotuberculosis, *C.ulcerans*
- Corinebacterii cu tropism uman:
 - Specie patogenă: *C.diphtheriae* (biovaruri *gravis*, *mitis*, *intermedius*). Colonizează frecvent rinofaringele, mai rar tegumentul. Există și purtători sănătoși.
 - Specii comensale (specii pseudodifterice, difterozii): *C.xerosis*, *C.jejkeium*, *C.pseudodiphthericum*, etc

- 1821 – Bretonneau individualizează difteria și demonstrează caracterul ei contagios
- 1883 - Klebs descrie bacteria în membranele false de angine difterice
- 1884 - Loeffler izolează bacteria, apoi demonstrează patogenitatea ei pe cobai
- 1888 - Roux și Yersin demonstrează secreția exotoxinei și inoculând-o la animal reproduc manifestările difteriei
- 1890 - Behring și Kitasato imunizează animalele cu toxină modificată
- 1923 - Ramon prepară anatoxina difterică, primul vaccin antidifteric

Diphtheria global annual reported incidence and DTP3 coverage, 1980-2006

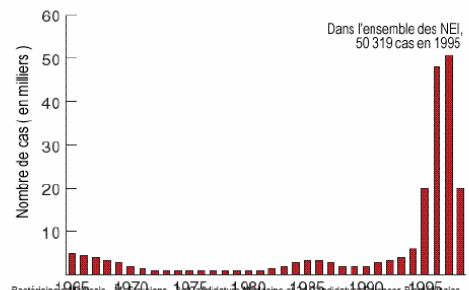


Source: WHO/FPA, Anderson, 2003
UN WHO Member States: Data as of September 2007

Date of slide: 04 October 2007
WHO

La diphtérie en Fédération de Russie et dans les Nouveaux Etats Indépendants

Nombre de cas notifiés chaque année

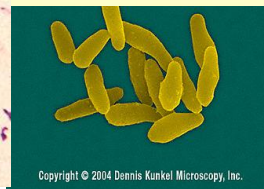
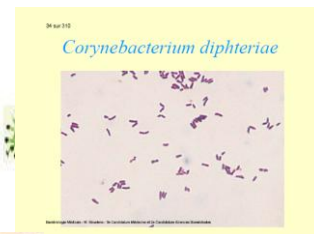


Bactériologie médicale - Institut National de Santé Publique et de Sécurité Sanitaire de la Fédération de Russie
Source: OMS

Caractere morfotinctoriale ale *C.diphtheriae*

Bacterii (bastonașe) de 1-8 μm x 0,3-0,8 μm, drepte sau puțin încurbate, cu extremitățile rotunjite sau îngroșate (aspect de halteră sau de măciucă), datorită granulațiilor de volutină (corpii Babeș-Ernst). În froiuri se aranjează ungiular, în palisade sau sub forma caracterelor chinezești, cifre romane sau litere majuscule: Y, M, N, V... Imobile, asporogene, necapsulate.

Se colorează G+, pentru evidențierea granulațiilor de volutină - Loeffler, Neisser



Caractere de cultură

C.diphtheriae este o specie facultativ anaerobă, exigentă la cultivare, temperatura optimă de cultivare 37°C, pH 7,4.

Medii de cultură electiv:

- Mediul Loeffler (ser bovin coagulat): colonii S, mici, netede, opace, albe-cenușii, apar peste 16-24 ore de cultivare

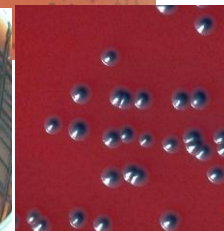
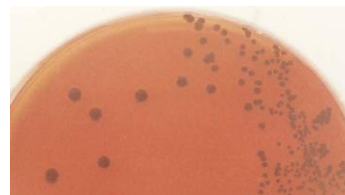
- Geloză-sânge (identic)

Medii de cultură selective diferențiale

- Mediul Clauberg (geloză-sânge cu telurit de potasiu). *C.diphtheriae gravis*: colonii R, mari, negre (reducerea teluritului în telurii), crenelate, aspect de "floare de margaretă", nehemolitice; *mitis*: colonii S, mijlocii, negre, bombate, cu zonă de hemoliză

- Mediul Tinsdale (geloză-ser-cistină-telurit de potasiu-tiosulfat) - colonii negre cu halou brun

- Mediul Bucin (geloză-sânge cu hinozol) – colonii albastre



Medii de transport si imbogatire

- Geloză-ser semilichidă cu telurit de K
- Mediul OCST (ou-cistină-ser-telurit)

Activitatea biochimică a *C.diphtheriae*:

Proteolitică:

Ureaza- (testul Zaks), cistinaza+ (testul Pizu), indol-

Zaharolitică:

Gravis: glucoza+, amidon+, zaharoza-

Mitis: glucoza+, amidon-, zaharoza-

Posedă catalază, citocromi a,b,c, oxidaza-

Se disting 22 izotipuri de *C.diphtheriae* și multiple serogrupuri (antigen O polizaharidic) și serovaruri (antigen K proteic)

Factori de patogenitate

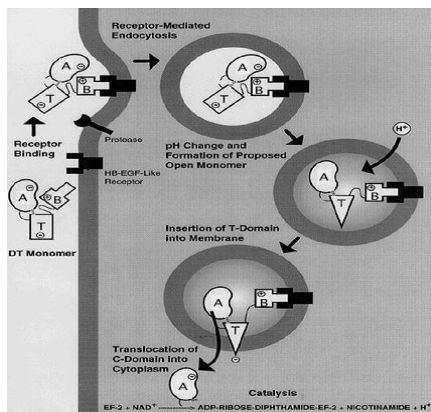
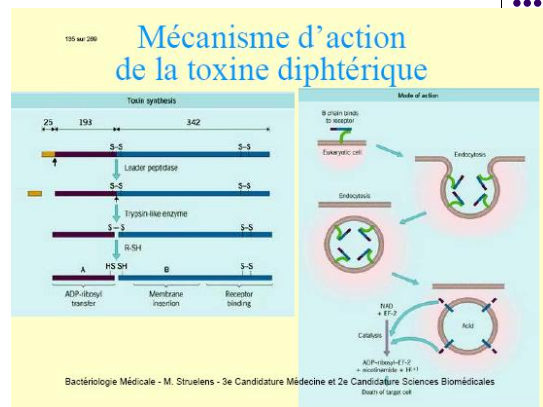
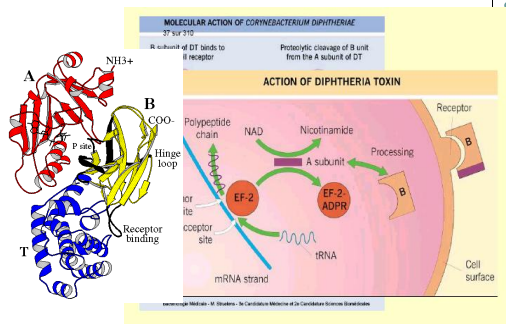
Toxina difterică - origine proteică, secretată de tulpinile lizogene (fagi beta, purtători ai genei *Tox*), în prezența unor cantități reduse de Fe. Un represor proteic bacterian controlează expresia genei *Tox*. Acest represor este activat de cantități mari de Fe.

Exotoxină tipică (fragmente polipeptidice A și B).

Mecanismul de acțiune – toxina hidrolizează NAD și transferă fragmentul ADP-riboză rezultat pe factorul de elongație EF-2, care nu mai asigură translocarea peptidil-ARNt de la situsul acceptor la situsul donator al ribosomului eucariot. Rezultă stoparea sintezei proteice. O singură moleculă este letală pentru celulă.

Toxina difuzează în organism perturbând funcționarea diferitor organe (în special SNC, cord, rinichi, suprarenale), cauzând distrofii.

Poate fi transformată în anatoxină, utilizată în vaccinare



Enzyme de patogenitate: hialuronidaza, neuraminidaza

Cord Factor – un glicolipid toxic din peretele celular

Patogeneza și formele clinice de difterie

Sursa de infecție: bolnavul cu difterie și purtătorii sănătoși de germeni (colonizează rinofaringele, rareori tegumentul sau conjunctiva).

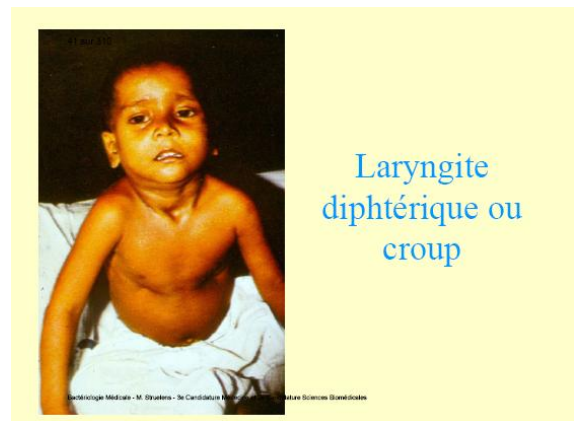
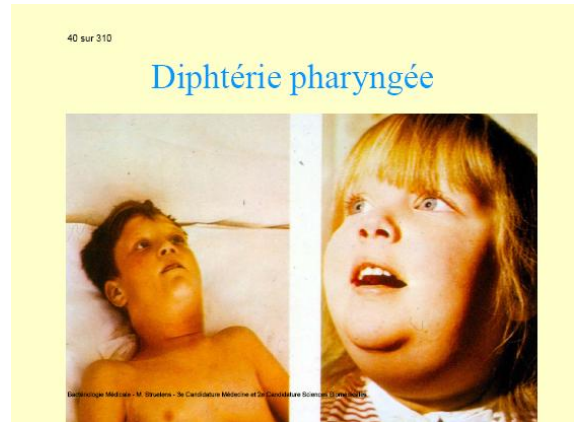
Mecanismele și căile de transmitere:

- Direct pe cale aerogenă (picături) sau contact cu plăgi contaminate
- Indirect prin obiecte (jucării, cărți), praf sau alimente contaminate (lactate)

La poarta de intrare bacteriile se multiplică și provoacă un **focar inflamator local**, determinat de acțiunea toxinei, care fiind ulterior difuzată prin limfă și sânge provoacă starea de **intoxicație generală**.

Focarul inflamator se localizează în faringe (angina difterică), mai rar în laringe (crupul difteric), nas, urechi, conjunctivă, mucoasa organelor genitale, plăgi cutanate.

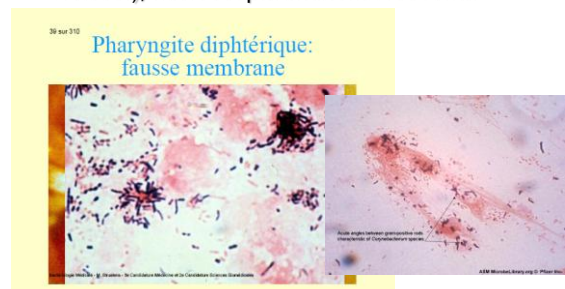
- Leziunile locale se caracterizează prin inflamație fibrinoasă. Exotoxina cauzează necroză, dilatarea vaselor și creșterea permeabilității, eliminarea fibrinogenului, care coagulează cu formarea unei pseudomembrane fibrinoase. Ea conține bacterii, hematii, PMN și celule necrozate. Se detașează dificil, nu se dizolvă în apă, este reproductibilă *in situ* în câteva ore. Membrana are tendință să se extindă.
- În forma malignă difteria este însoțită de edem al gâtului, semne toxice și paralizia vălului palatin.



- Intoxicația generală afectează SNC (disfagie, paralizii), sistemul cardio-vascular (miocardite), suprarenalele (insuficiență a suprarenalelor), rinichii (nefroză)
 - Tulpini de *C. ulcerans* pot produce toxină identică cu cea difterică
- Diagnosticul de laborator al difteriei**
- Este **URGENT!!!**
 - *Prelevate* – în funcție de forma clinică, respectând strict regulile de prelevare și transport (membrana falsă, tamponare de la periferia membranelor, tamponare cutanate, conjunctivale, etc).



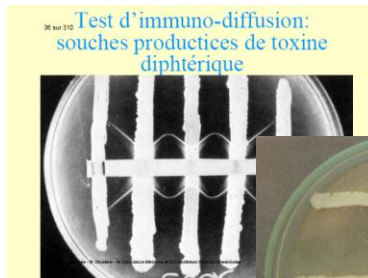
Metode de diagnostic
Examenul microscopic (Gram, Loeffler, Neisser), microscopia imunofluorescentă



Examenul bacteriologic (izolarea, identificarea culturii pure). Studierea toxigenezei – obligator. Se efectuează prin RN cu ser antitoxic *in vivo* (cobai), *in vitro* (RP Elek, Ouchterlony), sau depistarea genei **Tox** în prelevat sau în cultura pură prin PCR.

Examenul serologic – retrospectiv,

- RA cu seruri perechi (I săptămână și a III) și cultură de *C. diphtheriae*. Titrul semnificativ – 1:100 sau creșterea titrului de Ac.
- Evaluarea titrului de antitoxine în serul bolnavului (RN, RHA1, ELISA). La debutul bolii antitoxinele sunt absente sau nu depășesc nivelul de 0,5 UI/ml



Receptivitatea la difterie poate fi determinată prin:

- Testul Schick (*in vivo*): i/dermic 0,1 ml toxină difterică (1/40 DLM).

Reacție+: eritem 1cm (receptivitate la difterie),

reacție-: lipsa eritemului (persoană imună)

- RN *in vitro*
- RHA1
- ELISA

Titru antitoxinelor > 0,1 UI/ml – protector

Titru inferior 0,01 UI/ml – lipsa protecției

● Tratamentul difteriei

1. Seroterapie precoce (ser antitoxic antidifteric, Ig). Neutralizează activitatea toxinei, blocând fixarea ei pe receptorii celulari.
2. Antibioterapie (macrolide, tetracicline, cloramfenicol, aminozide, beta-lactamine). Asigură eradicarea germenilor.
3. Tratament simptomatic

● Profilaxia specifică a difteriei

Vaccinarea obligatorie cu anatoxină difterică a copiilor conform calendarului de vaccinare. Există vaccinuri asociate: ADT, ADTP.

Vaccinarea primară cu ADTP la 4-5-6 luni; revaccinarea la 22-24 luni cu ADTP; la 6-7, apoi la 14-15 ani cu ADT.

Recent a fost obținut un vaccin sintetic antidifteric. Reprezintă un polipeptid antigenic situat la joncțiunea fragmentelor A și B a toxinei difterice, o moleculă peptidică "purtătoare" și un adjuvant sintetic.

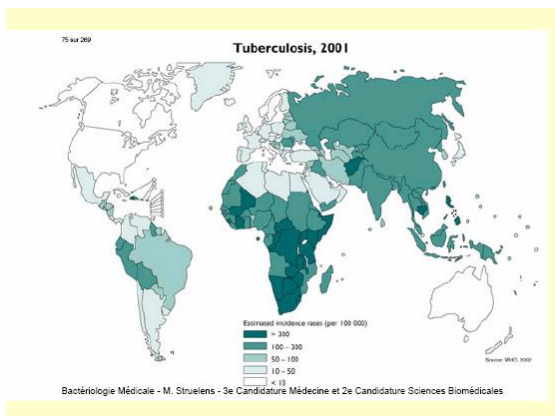
MICOBACTERIILE. MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUBERCULOZEI

- Familia Mycobacteriaceae
- Genul Mycobacterium
- Specii:
 - I. Responsabile de tuberculoza umană: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* ("complex tuberculosis")
 - II. Agentul leprei: *M. leprae* (strict umană)
 - III. Micobacterii "atipice", condiționat patogene: *M. avium*, *M. ulcerans*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, etc. Cauzează micobacterioze la persoane imunocompromise
 - IV. Micobacterii nepatogene: *M. smegmatis*, *M. gastri*, *M. phley*

- **Caracteristica generală a micobacteriilor:** Bastonașe G+ drepte sau ușor încurbate, necapsulate, asporogene, imobile, peretele celular este bogat în acizi micolici, acido-alcoolorezistență la colorarea Ziehl-Neelsen.
- ***M.tuberculosis*** este o bacterie patogenă strict umană, responsabilă de tuberculoză. Este sensibilă la căldură, lumină solară directă, raze UV sau X. Rezistentă la frig sau desicare. Este puțin sensibilă la acizi, baze (se utilizează în decontaminarea prelevatelor) sau detergenți și foarte sensibilă la soluția de alcool de 70°.

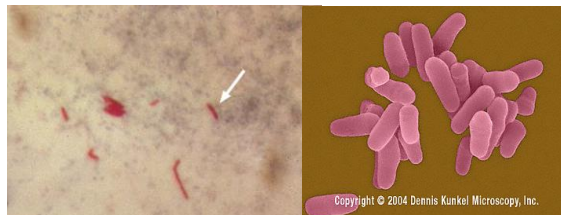


- *Mycobacterium tuberculosis* a fost cauza "Pestei Albe" în sec. 17 și 18 în Europa. În această perioadă 100 % din populația Europei a fost infectată cu *M.tbc* și 25 % din adulți au decedat.
- **Tuberculoza (TB)** în prezent este prima cauză de deces din lume dintre toate infecțiile bacteriene. Maladia afectează 1.7 mld persoane/an
- RM incidența TBC: 1990 – 49 cazuri la 100.000 (2149 anual); 2006 – 132 cazuri la 100.000 (5461 anual/3623), 2007 – 3578 cazuri, 2008 – 3399 cazuri



• Caractere morfotinctoriale

M.tbc este un bastonaș fin sau ușor încurbat, în frotiu se observă izolat, în grămezi sau corzi. Se colorează în roșu prin tehnica Ziehl-Neelsen



• Caractere de cultură

- *M.tbc* este o bacterie strict aerobă, foarte exigentă la cultivare. Toate mediile de izolare au la bază ou coagulat. Mediul de referință – **Lowenstein-Jensen** (ou, glicerină, asparagină, verde de briliant). Alte medii solide – **Popescu** (acid glutamic în locul asparaginei), **Finn** (glutamat de Na).

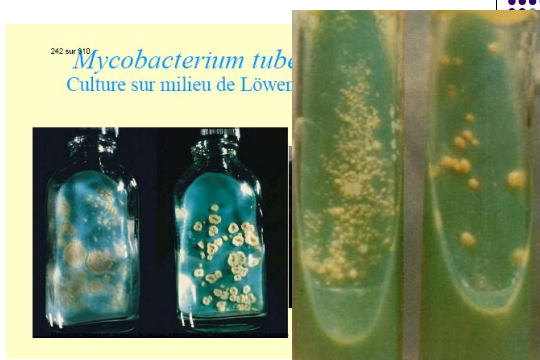


- Micobacteriile patogene cresc lent (perioada de generație – 20 ore), la 37°C, pH 6,8-7,0.

Coloniile de *M.tbc* apar peste **2-4 săptămâni**, sunt rugoase, friabile, conopidiforme, opace, de culoare crem-bej (colonii **R**).

M.bovis și *M.africanum* formează colonii **S**, mici, netede, nepigmentate, vizibile peste **4-8 săptămâni**.





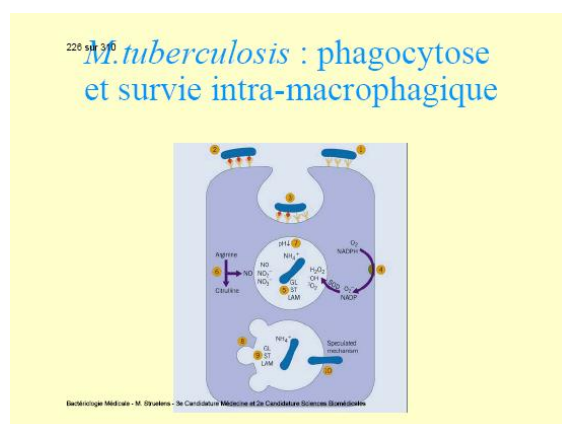
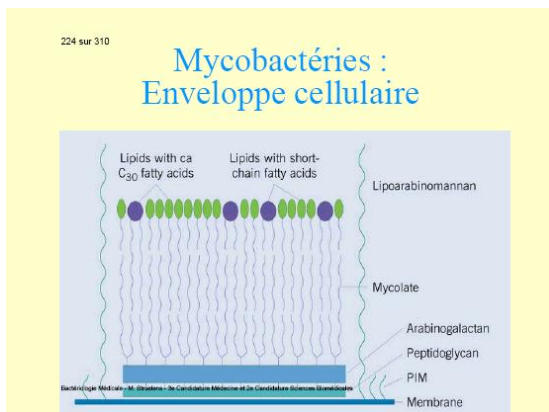
Mediul lichid **Sauton**. Conține săruri minerale, asparagină, glicerină. *M.tbc* crește în 8-10 zile sub formă de voal. Este utilizat și pentru repicarea tulpinilor de BCG.

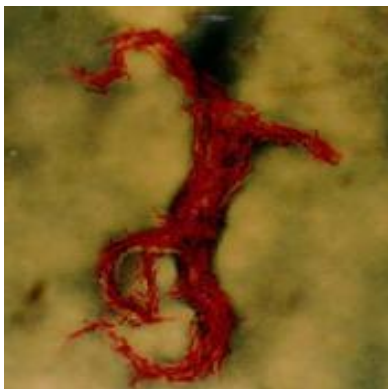
- **Activitatea biochimică** a micobacteriilor patogene
 - Toate micobacteriile patogene produc o catalază termolabilă, distrusă la 68°C timp de 20 min. Celelalte micobacterii posedă catalază termostabilă.
 - *M.tbs* și *M.bovis* hidrolizează ureea
 - *M.tbc* produce acid nicotinic (niacină), reduce nitrații în nitriți. *M.bovis* nu manifestă astfel de activitate.

Compoziția chimică și factorii de patogenitate ai micobacteriilor

Lipidele constituie 20-60% din masa celulei. Se cunosc 3 componente lipidice majore:

1. **Acizii micolici**. Prevîin distrugerea micobacteriilor în macrofage, protejează micobacteriile extracelulare de complementul din ser. Condiționează transformarea macrofagelor în celule epitelioide și celule gigante Langhans.
2. **Cord-factorul** (sulfo-lipid) perturbă respirația în mitocondrii și inhibă migrația PMN. Induce cultivarea în corzi (cosițe) a *M.tbc*.
3. **Cerurile**.





Lipidele din peretele celular al *Mycobacterium tuberculosis* sunt asociate cu următoarele proprietăți ale bacteriei:

- Impermeabilitate la colorare
- Rezistență la multe antibiotice
- Rezistență la substanțe acide și alcaline
- Rezistență la activitatea litică a complementului
- Rezistență la oxidare și supraviețuire în interiorul macrofagelor

Polizaharidele joacă un rol important în formarea Ac serici, conferind specificitatea imunologică.

Proteinele reprezintă suportul imunității celulare și a hipersensibilității tardive.

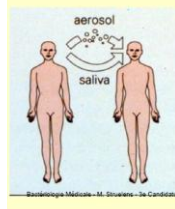
Patogeneza și formele clinice de tuberculoză

Sursa de infecție – omul bolnav cu TBC cu leziuni pulmonare cavitare deschise în bronșii (*M.tbc*, *M.africanum*) sau bovinele bolnave (*M.bovis*).

Transmiterea se efectuează pe cale aeriană (picături, praf). Rareori este posibilă contaminarea prin obiecte, alimente (lapte nepasteurizat) sau mâini contaminate.

Receptivitatea este influențată de vârstă și factorii de mediu: carențe nutritive, alcoolism, stare imunosupresivă, etc

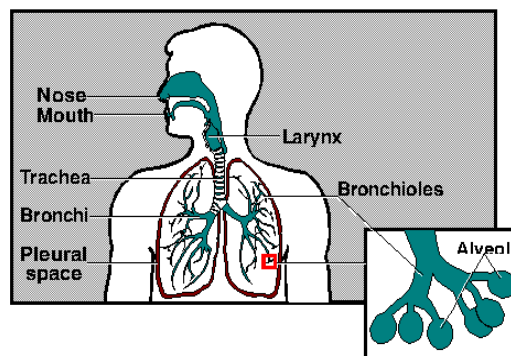
Transmission des infections

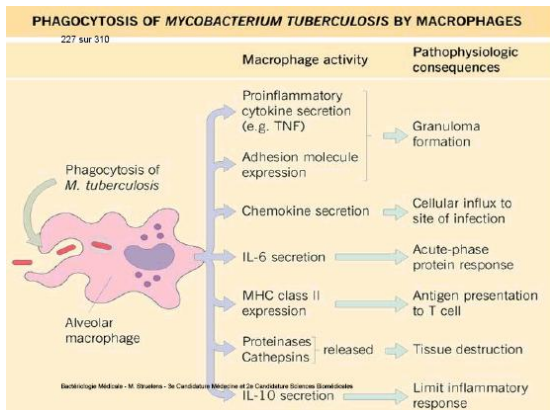


• Primoinfecția tuberculoasă

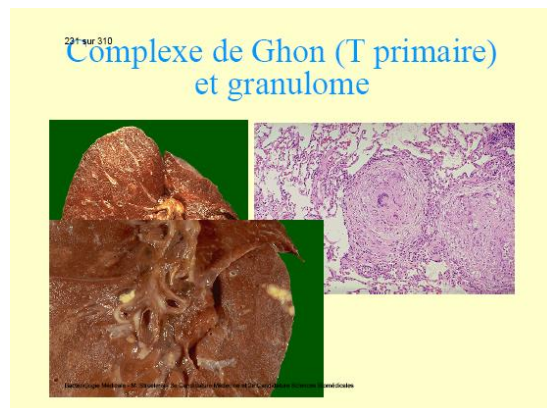
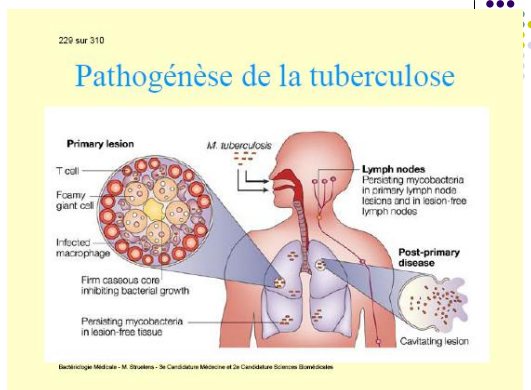
Reprezintă un ansamblu de manifestări clinice, umorale și anatomice care se desfășoară în organism în urma primului contact cu agentul TBC.

După contaminare (mai frecvent în copilărie), bacteriile pătrund în alveolele pulmonare (90 %), unde sunt captate de macrofage în care se multiplică (bacterii facultativ intracelulare, împiedică formarea fagolizosomului). Apare o leziune inflamatoare exsudativă nespecifică.





Peste câteva săptămâni (4-12) se dezvoltă o imunitate celulară și leziunea exsudativă evoluează în leziune granulomatoasă. Sub acțiunea unor citokine secretate de limfocitele T (în special IFN gamma) are loc activarea macrofagelor, care devin deja capabile să distrugă micobacteriile. În același timp macrofagele activate se diferențiază în celule epitelioid și celule multinucleate gigante. Ele sunt înconjurate de limfocite și fibroblaste. Acesta este **granulomul tuberculos**, semn caracteristic primoinfecției. Infecția se extinde pe cale limfatică, cu afectarea ganglionilor regionali.



- **Primoinfecția inaparentă.** La cca 85% leziunile se vindecă și se pot autosteriliza. Nici o expresie clinică sau radiologică.
- **Infecția primară subclinică.** Dacă multiplicarea bacteriilor este masivă, în leziunile tuberculoase se realizează o necroză cazeoasă (tuberculom). Frecvent are loc calcifierea tuberculomului (complexul Ghon, leziunea este vizibilă radiologic), cu autosterilizarea spontană sau cu persistența unor bacterii în leziune.

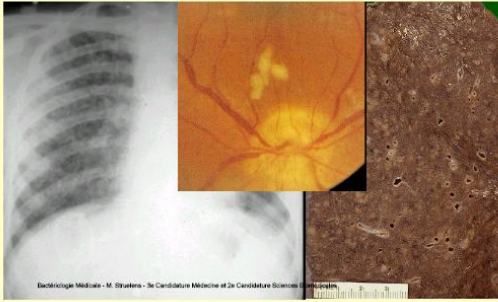
Consecințele primoinfecției inaparente sau subclinice: dezvoltarea imunității antituberculoase și a sensibilizării tuberculinice.

Tuberculoza primară manifestă necomplicată. Pacienții au febră, astenie, pierdere în greutate, etc. Etapa ganglionară poate fi depășită cu diseminări hematogene și afectarea pleurei, meningelui, măduvei osoase, parenhimei organelor. Leziunile pot evolua fie spre cicatrizare, fie spre agravare.

Tuberculoza primară cu complicații. Rareori (10% cazuri), evoluția este defavorabilă: masele necrotice sunt evacuate în bronșii, vase sanguine, pleură sau pericard cu formarea unei caverne, unde bacteriile se multiplică intens. Fistulizarea într-un vas sangvin diseminează infecția sistemic (tuberculoza miliară). Starea generală este alterată, apare febră, tuse, uneori hemoptizie. **Bolnavul este contagios, eliminând bacterii cu sputa.**

233 sur 310

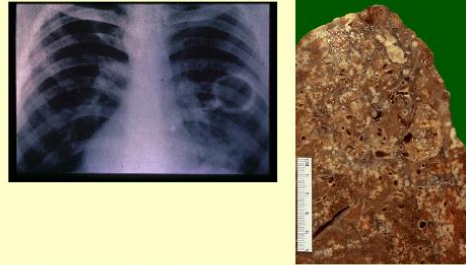
Tuberculose miliaire



Endocrinologie Médicale - M. Bivulescu - 3e Candidature Médecine et 2e Candidature Sciences Biomédicales

234 sur 310

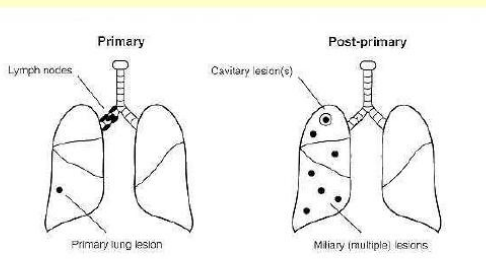
Caverne tuberculeuse



Endocrinologie Médicale - M. Bivulescu - 3e Candidature Médecine et 2e Candidature Sciences Biomédicales

230 sur 310

Tuberculose primaire et post-primaire



Endocrinologie Médicale - M. Bivulescu - 3e Candidature Médecine et 2e Candidature Sciences Biomédicales

Tuberculoza secundară. Se manifestă în condiții de scădere a reactivității imune, prin reinfecții masive sau reactivarea unor focare latente. Focarele noi apar în ritm lent și evoluează cronic fără tendință de vindecare spontană.

Alte forme clinice de tuberculoză: ganglionară, meningeană, osteo-articulară, uro-genitală.

Imunitatea antituberculoasă este celulară, nesterilă. Hipersensibilitatea tardivă însoțește imunitatea celulară. Ac circulanți nu au rol protector.



235 sur 310

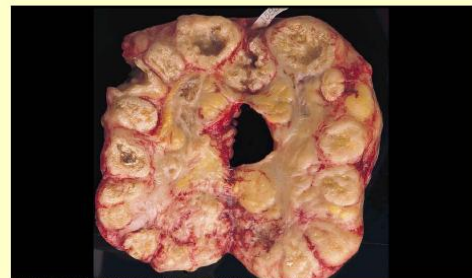
Tuberculose extra-pulmonaire Mal de Pott



Endocrinologie Médicale - M. Bivulescu - 3e Candidature Médecine et 2e Candidature Sciences Biomédicales

236 sur 310

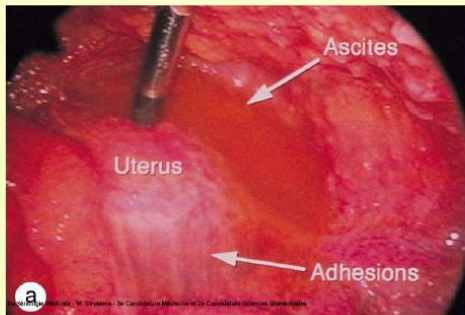
Tuberculose rénale



Endocrinologie Médicale - M. Bivulescu - 3e Candidature Médecine et 2e Candidature Sciences Biomédicales

237 sur 310

Tuberculose g nitale et periton eales



Infecția tuberculoasă	Tuberculoza pulmonară
M.tbc prezentă in organism	M.tbc prezentă in organism
Testul tuberculinic pozitiv	Testul tuberculinic pozitiv
Examen radiologic normal	Examenul radiologic eviden�iaz� leziune
Frotiurile �i culturile din spută sunt negative	Frotiurile �i culturile din spută sunt pozitive
Fără simptome	Tuse, febră, scădere in greutate
Necontagios	Frecvent contagios p�n� la tratament
Nu este definit ca tuberculoză	Definit ca bolnav de tuberculoză

Diagnosticul de laborator al tuberculozei

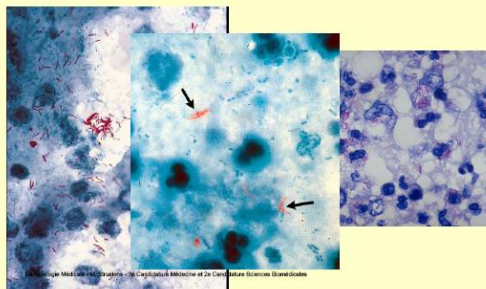
- **Prelevate:**  n func ie de forma clinică: sputa matinală (5-10 ml), tubaje gastrice, urină, lichid pleural, articular, peritoneal, LCR, biopiate, etc
-  n caz de necesitate se efectuează omogenizarea /decontaminarea cu NaOH  i concentrarea (prin centrifugare) a prelevatelor.

Metode de diagnostic

1. **Examenul microscopic** – frotiuri colorate Ziehl-Neelsen (bastona e purpuriu izolate) sau cu auramină (bastona e galbene pe fondul negru). Sensibilitatea – 10^4 bacili/ml

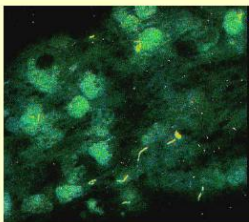
222 sur 310

Coloration de Ziehl-Neelsen: Bacilles alcool-acido-r sistants



241 sur 310

Coloration   l'auramine Bacilles alcool-acido-r sistants



Bactériologie Médicale - M. Stratiariu - 3e Carte de Lucru Médicale et de Cercetare Științific  tiin ific  tiin ific

2. **Examenul bacteriologic** – izolarea culturii pure pe mediile speciale, identificarea ei, testarea sensibilit ii la chimioterapice (prin metoda dilu ilor în mediu solid)
3. **Metoda biologică** (inocularea la cobai). Serve te uneori pentru confirmarea virulen ei micobacteriei
4. **PCR** pentru detectarea rapidă a micobacteriilor direct în prelevate
5. **Intradermoreac ia la tuberculină** (reac ia Mantoux). Se cercetează starea de hipersensibilitate cutanată la tuberculină. Tuberculinia reprezintă un filtrat dintr-o cultură bulionic  autoclavat  de *M.tuberculosis*.

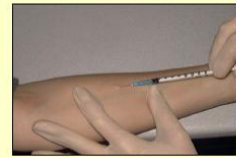
Pe fața anterioară a antebrațului se injectează i/dermic 2, 5 sau 10 UI de tuberculină în volum de 0,1 ml. Lectura peste 72 ore. Reacția pozitivă se manifestă printr-o indurație și congestie cu diametrul superior sau egal cu 5 mm. Interpretarea se efectuează în funcție de contextul clinic

- **Reacția +** indică că subiectul a fost infectat cu micobacterii (primoinfecție), a fost vaccinat cu BCG sau este bolnav de tuberculoză (în acest caz diametrul depășește 10 mm).
- **Reacția negativă** exclude diagnosticul de tuberculoză și indică receptivitatea individului la tuberculoză.



240 sur 310 Intra-dermo réaction à la tuberculine

• Injection intra-dermique de PPD (tuberculine)



• Examen après 72 h : induration (réaction d'hypersensibilité retardée) : diamètre > 10 mm



Bactériologie Médicale - M. Struelens - 3e Candidature Médecine et 2e Candidature Sciences Biomédicales

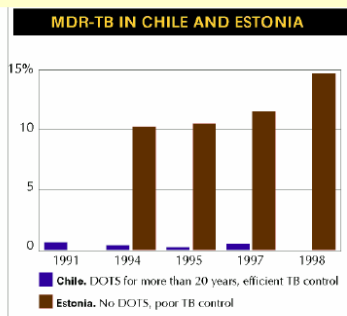


Tratamentul tuberculozei

- **DOTS (Directly Observed Treatment Short Course Chemotherapy)**. DOTS este o strategie a OMS implementată în 1993.
 - Principiile DOTS
 - tratament standardizat
 - tratament bifazic constituit dintr-o fază intensivă și faza de continuare
 - asocieri de medicamente antituberculoase
 - supraveghere directă a regularității administrării tratamentului antituberculos
- Din 2005 – Program Național de Control și Profilaxie a Tuberculozei (2006-10)



16 sur 200



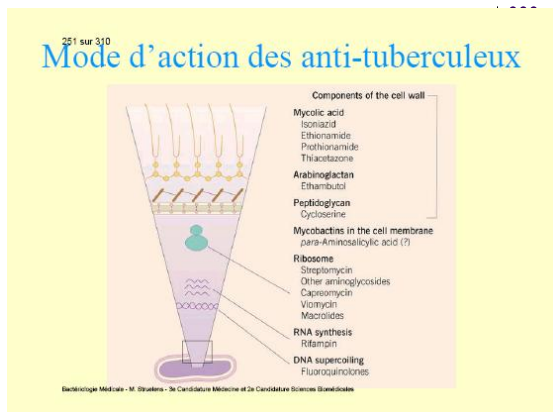
Bactériologie Médicale - M. Struelens - 3e Candidature Médecine et 2e Candidature Sciences Biomédicales

1. Antibiotice cu spectru larg: rifampicină, streptomycină, kanamicină, D-cicloserină
2. Fluorochinolone
3. Chimioterapice care inhibă sinteza acizilor micolici (Isoniazida, Pirazinamida, Etambutolul, Etionamida)

Exigențele terapiei antituberculoase: a împiedica selecția mutațiilor rezistenți și a steriliza definitiv focarul.

În acest scop se utilizează asocierea a 3-4 droguri pe o perioadă de 6-12 luni.





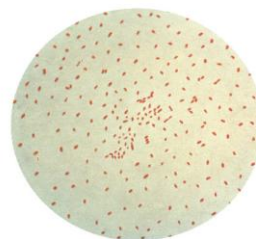
Profilaxia specifică

Vaccinarea obligatorie cu vaccinul BCG. El reprezintă o tulpină vie avirulentă de *M.bovis*. A fost obținută de Calmette și Guérin în 1921 după multiple repicări (230 pasaje) pe mediu cu cartof, bilă și glicerină.

Vaccinul se administrează i/dermic la vârsta de 4-5 zile de la naștere. Revaccinarea – la 7 ani, apoi peste fiecare 5 ani (persoanele cu reacția Mantoux negativă).

MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUSEI CONVULSIVE

- **Familia Halobacteriaceae**
- **Genul Bordetella**
- **Specii:**
 1. *Bordetella pertussis* (agentul tusei convulsive)
 2. *Bordetella parapertussis* (agentul parapertusei)
 3. *Bordetella bronhiseptica* (pneumonii, bacteriemii)
 4. *Bordetella avium*
 5. *Bordetella holmsenii* (izolată din hemoculturi)
 6. *Bordetella hinzii* (izolată din prelevate respiratorii)
 7. *Bordetella trematum* (infecții cutanate și auriculare)



B.pertussis – agentul cauzal al tusei convulsive

- **Caractere morfobiologice**

Cocobacterii G-, asporogene, imobile, formează microcapsulă, în frotiu se dispun separat, în perechi sau lanțuri scurte.

Reprezintă mi/o strict aerobe, foarte pretențioase la cultivare.

- **Medii speciale de izolare:**

- mediul Bordet-Gengou (geloză-sânge cu amidon și glicerină)

- geloză-cazeină-sânge-cărbune activat

Mediul de transport Kuznețov (soluție tampon fosfat, 0,5% agar-agar, 0,2% cărbune activat)

- Peste 3-5 zile de incubare în atmosferă umedă la 37° C apar colonii S mici, bombate, lucioase, cu aspect de picături de mercur, hemolitice (corespund bacteriilor virulente – faza I), forme R – avirulente, faza IV.
 - Coloniile de *B.parapertussis* apar în 48 ore, *B.bronhiseptica* – în 24 ore
- B.pertussis* manifestă activitate biochimică redusă: oxidaza+, nu fermentează glucidele, ureaza-, nitrat-reductaza- .

- **Structura antigenică** a *B.pertussis* este complexă: există Ag capsulare polizaharidice, Ag proteice, Ag fimbrial (hemaglutinina), Ag lipopolizaharidic.
- **Factorii de patogenitate**
 1. **Adezine:**
 - **Hemaglutinina filamentoasă** (purată de pili). Permite atașarea bacteriei la mucoasa tractului respirator, de asemenea se fixează pe macrofage și limfocite.



- **Aglutinogene.** Proteine de suprafață situate pe fimbrii. Participă la atașarea *B.pertussis* la celulele epiteliale.
- **Pertactina.** Proteină a membranei externe, permite fixarea pe membrana celulelor eucariote
- **Subunitatea B a toxinei pertușice.** Se fixează pe leucocite și împiedică migrarea lor spre focarul inflamator.



2. Toxine

- **Toxina pertușis** (citotoxină de tip A-B). Acționează asupra diferitelor celule eucariote, mărind concentrația intracelulară de AMP ciclic (în special în celulele epiteliale ale TR). Provoacă hiperlimfocitoză, sensibilizare la histamină, hipersecreție de insulină.
- **Adenilat-ciclaza-hemolizină.** Hemolizina provoacă moartea macrofagelor și monocitelor, adenilat-ciclaza perturbă activitatea bactericidă a PMN, monocitelor și macrofagelor și stimulează secreția sero-mucoasă a căilor respiratorii.



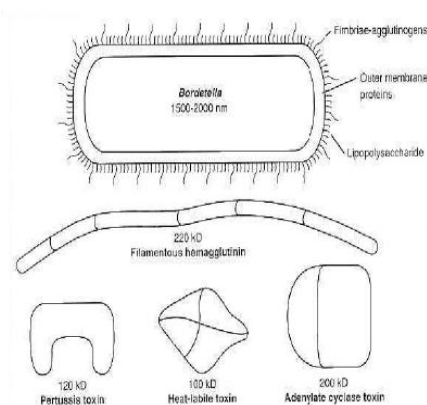
- **Toxina dermonecrotică.** Se eliberează în urma lizei bacteriene.
- **Toxina citotrahală.** Glicopeptid care inhibă sinteza ADN, provocând distrugerea celulelor ciliate
- **Endotoxina**
- **Capsula** (antifagocitar)



Patogeneza tusei convulsive

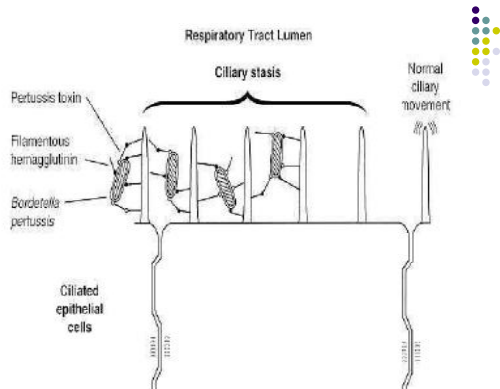
Sursa de infecție – omul bolnav, în special în perioada de debut al bolii.

Mecanismul de transmitere – aerogen, prin picături



B.pertussis manifestă tropism pentru mucoasa căilor respiratorii: faringe, trahee, bronșii, bronchiole, chiar alveole. Alterarea epitelului ciliat împiedică eliminarea mucusului, el fiind eliminat doar prin tuse. Tusea survine din cauza iritației mucoasei de către toxina bacteriană. Excitația de lungă durată a receptorilor terminali ai nervului pneumogastric determină un flux continuu de impulsuri în bulbul rahidian, ce duce la formarea unui focar de excitație dominant. El atrage excitații nespecifice de la alți receptori, fapt ce determină accesele de tuse, care devin tot mai grave și mai frecvente.





Un stimul puternic poate stinge dominanta, cu atenuarea tusei. Focarul este foarte stabil, persistă și după dispariția bacteriei din organism.

- În evoluția tusei convulsive se disting 4 stadii (perioade):
 - I. **Perioada de incubatie** (3-15 zile)
 - II. **Perioada catarală**, foarte contagioasă. Caracterizată prin tuse seacă, rinoree (3-14 zile)
 - III. **Perioada convulsivă** (paroxistică). Accese de tuse spasmodică, epuizantă, asociată cu cianoză, vomă, convulsii. (2-4 săptămâni)
 - IV. **Perioada de convalescență** (2-4 săptămâni)



Complicații grave sunt posibile la copiii sugari: bronho-pneumonii, encefalite.

Imunitatea este durabilă, umorală. Rol protector au Ac anti-toxină pertussis și anti-hemaglutinină filamentoasă.

Diagnosticul de laborator al tusei convulsive

Prelevate: mucozități nasofaringiene sau bronșice, recoltate cât mai precoce.

Metode de diagnostic

1. RIF
2. **Examenul bacteriologic** (însămânțare cu tamponul sau prin tehnică "plăcilor tușite")
3. Tehnici de biologie moleculară (PCR)
4. **Examenul serologic** (RA, RFC, ELISA). Reacțiile se pozitivează din săptămâna a II a perioadei convulsive. Se examinează seruri perechi prelevate la interval de 14-21 zile. Semnificativă este o creștere de cel puțin 4 ori a titrului Ac.

Tratamentul tusei convulsive

Eritromicină sau cloramfenicol– cel puțin 10 zile (până la apariția Ac)

Imunoglobulină umană antipertussis

Profilaxia specifică

- Imunizarea artificială obligatorie cu vaccin ADTP. Componentul antipertusic este reprezentat de o suspensie de bordetele de faza I, adsorbite pe adjuvant.

Vaccinul acelar conține unele componente bacteriene (anatoxina pertussis, hemaglutinina filamentoasă). Este mai bine tolerat, dar mai puțin eficace.

- Imunoglobulină umană antipertussis

