

II. ΠΡΩΤΟΤΥΠΑ ΑΡΘΡΑ

1. Επιπολασμός και Διαγνωστική Προσέγγιση Ρικετσιώσεων σε Νοσηλευόμενα Ατομα

Μ. Τζιράκη, Α. Λαζαρίδου, Α. Γεωργιάκη, Κ. Γιαννούλη, Γ. Αλτουβάς, Χ. Πουλοπούλου, Κ. Θέμελη – Διγαλάκη.

Τμήμα Κλινικής Μικροβιολογίας «Τζάνειο» ΓΝΠ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της μελέτης ήταν η εργαστηριακή επιβεβαίωση Ρικετσιώσεων σε ασθενείς του νοσοκομείου μας με ύποπτη κλινική συμπτωματολογία, κατά την τελευταία διετία.

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 353 ασθενείς, που νοσηλεύτηκαν την διετία 2009-2010, με παρατεινόμενο εμπύρετο και με κλινικά συμπτώματα όπως καταβολή, μυαλγία αρθραλγία και εξάνθημα. Προσδιορίστηκαν σε 361 δείγματα ορού τα ειδικά IgM και IgG αντισώματα (Abs) για την *R.rickettsii* και την *R.typhi* με την μικρομέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού (MIF- test) και αξιολογήθηκαν τίτλοι ≥ 64 μον. Προηγήθηκε ως screening test η συγκολλητινική αντίδραση Weil Felix.

Τα 300/361 δείγματα ορού ήταν αρνητικά και με τις δύο τεχνικές (83,1%). Με την Weil Felix ψευδώς θετικά ήταν 43/361 δείγματα (11,9%) στα οποία δεν ανιχνεύτηκαν ειδικά Abs. Σε 18 δείγματα από 10 ασθενείς τα αποτελέσματα ήταν θετικά και με τις δύο τεχνικές (2,83%). Σε 6/10 ασθενείς βρέθηκαν ειδικά IgM και IgG Abs έναντι της *R.typhi* και σε 4/10 ασθενείς προσδιορίστηκαν ειδικά IgM και IgG Abs έναντι της *R.rickettsii*. Τέσσερις εξ αυτών επανεξετάστηκαν δύο και έξι μήνες μετά την διάγνωση της νόσου και τα δείγματα τους διατηρούσαν θετικούς IgG τίτλους.

Συμπεράσματικά διαπιστώνεται ότι, στο πλαίσιο διερεύνησης εμπύρετων αγνώστου αιτιολογίας ο αριθμός επιβεβαιωμένων κλινικά και εργαστηριακά Ρικετσιώσεων είναι σημαντικός. Η Weil Felix κατευθύνει την διάγνωση ως προκαταρκτική εξέταση.

Λέξεις ευρητηριασμού: Ρικετσιώση, διάγνωση έμμεσου ανοσοφθορισμού (MIF- test), συγκολλητινική αντίδραση Weil Felix.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι Ρικετσιώσεις είναι νόσοι με παγκόσμια διασπορά και με κλινικές εκδηλώσεις κυμαινόμενης βαρύτητας από ήπιες έως βαριές και σπανίως θανατηφόρες. Οφείλονται στις Ρικέτσιες, μικρά gram (-) κινητά κοκκοβακτηρίδια που ζουν και αναπαράγονται υποχρεωτικά ενδοκυτταρίως [1,2]. Προσβάλλουν το ενδοθήλιο μικρών και μεσαίων αγγείων προκαλώντας εκτεταμένη αγγειίτιδα, εξάνθημα και οίδημα ζωτικών οργάνων. [1] Οι Ρικέτσιες μεταδίδονται στον άνθρωπο μέσω ενδιάμεσων μολυσμένων ξενιστών που είναι διάφορα είδη αρθροπόδων (κρότωνες, ψύλλοι, ψείρες και ακάρεα) είτε μέσω νυγμού, είτε μέσω των περιπτωμάτων τους. [1] Η ταξινόμηση των

Ρικετσιών υφίσταται μεταβολές λόγω της εκτεταμένης μελέτης του γονιδιώματος τους και συμπεριλαμβάνονται συνεχώς νέα μέλη. Σήμερα στην Οικογένεια Rickettsiaceae εντάσσονται 2 γένη. Το γένος *Orientia* με αντιπροσωπευτικό είδος την *O. tsutsugamushi* και το γένος των Ρικετσιών που διαχωρίζεται σε τρεις ομάδες:

- 1) την ομάδα του εξανθηματικού τύπου (Typhus Group, TG) που εκπροσωπείται από τρία είδη την *R. typhi*, την *R. prowazekii* και την *R. canadensis*.
- 2) την ομάδα του κηλιδοβλατιδώδους πυρετού (Spotted Fever Group, SPG) που περιλαμβάνει 15 είδη μεταξύ των οποίων τα *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. japonica* και *R. sibirica*.
- 3) την ομάδα των αταξινόμητων ρικετσιών.

Ανάλογα με το είδος της ρικέτσιας που προκαλεί

την λοίμωξη διακρίνονται οι παρακάτω μορφές της νόσου:

Επιδημικός εξανθηματικός τύφος που οφείλεται στην *R. prowazekii*. Είναι η μόνη από τις ρικετσιώσεις που μπορεί να εμφανιστεί υπό επιδημική μορφή.[3] Κρούσματα της νόσου αναφέρονται στην Νότια Αφρική, στις ορεινές περιοχές της Νότιας Αμερικής και στην Ασία. Η νόσος Brill–Zinsser οφείλεται επίσης στην *R. prowazekii* και χαρακτηρίζεται ως υποτροπιάζων επιδημικός τύφος.

Ενδημικός ή μυϊκός τύφος. Αιτιολογικός παράγοντας της νόσου είναι η *R.typhi* (*mooseri*) και μεταδίδεται με διάφορα είδη ψύλλου. Επικρατεί περισσότερο στις θερμότερες χώρες. Κρούσματα της νόσου έχουν αναφερθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες, την Ευρώπη και την Ασία. Στην Ελλάδα έχουν διαγνωσθεί κρούσματα της νόσου [4,6].

Κηλιδώδης πυρετός των βραχυδών ορέων. Αιτία της νόσου είναι η *R. rickettsii* και παραμένει η σοβαρότερη νόσος από ρικέτσια, διότι παρουσιάζει την υψηλότερη θνητότητα που ανέρχεται στο 3-5% παρά την εφαρμογή θεραπείας. Τα περισσότερα κρούσματα αναφέρονται στην Κεντρική και Νότια Αμερική [1].

Κηλιδοβλατιδώδης πυρετός της Μεσογείου. Αιτία της νόσου είναι η *R. conorii* και ενδημεί στη λεκάνη της Μεσογείου. [9] Χαρακτηριστικό της νόσου είναι η εμφάνιση της εσχάρας (*tache noire*).

Πυρετός της λόχμης (*scrub fever-O*). Προκαλείται από την *O. tsutsugamusi*. Παρατηρείται κυρίως σε άτομα που εργάζονται σε θαμνώδεις περιοχές στην νοτιοανατολική Ασία, στην Αυστραλία, στην Ινδία και στο δυτικό Ειρηνικό.

Κοινά κλινικά σημεία όλων των ρικετσιώσεων είναι ο υψηλός πυρετός, η κεφαλαλγία η έντονη μυαλγία καθώς και η εμφάνιση χαρακτηριστικού εξανθήματος.

Η λήψη λεπτομερούς ιστορικού είναι πολύ σημαντική για την διάγνωση της νόσου. Η ανεύρεση κρότωννα στο σώμα ασθενούς, η ενασχόλησή του με την κτηνοτροφία, τη γεωργία ή την υλοτομία η μόνιμη ή περιστασιακή διαβίωση σε περιοχή που υπάρχουν κρότωνες ποντικοί, ανθυγιεινές συνθήκες διαβίωσης, ιδιαίτερα όταν η περιοχή είναι γνωστή ενδημική της νόσου, αποτελούν στοιχεία που πάντα σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα, θέτουν την υποψία για ρικετσιώση.

Η εργαστηριακή διάγνωση της νόσου επιτυγχάνεται:

α) με την απομόνωση και την ταυτοποίηση των

ρικετσιών μετά από εμβολιασμό παθολογικών υλικών σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας, σε πειραματόζωα και σε καλλιέργειες κυττάρων. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται αποκλειστικά σε εργαστήρια με βιοασφάλεια επιπέδου 3.

β) Ορολογικές μέθοδοι

Η πρώτη ορολογική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την διάγνωση των ρικετσιών ήταν η συγκολλητινοαντίδραση *Weil felix* και παραμένει η πλέον εφαρμοσμένη μέθοδος ελέγχου της δημόσιας υγείας σε ενδημικές περιοχές.

Συχνά χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές μέθοδοι διάγνωσης είναι οι ορολογικές δοκιμασίες. Με αυτές τις μεθόδους ανιχνεύονται στον ορό τα ειδικά αντισώματα IgM και IgG έναντι του βακτηριδίου. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η μέθοδος του έμμεσου μικροανοσοφθορισμού, (MIF-test) και η ανοσοενζυματική μέθοδος ELISA.[14] Άλλες ορολογικοί μέθοδοι είναι η δοκιμασία της σύνδεσης του συμπληρώματος (CF), η δοκιμασία της μικροσυγκόλλησης και η παθητική αιμοσυγκόλληση, όλες με χαμηλή ευαισθησία.

γ)Μοριακές μέθοδοι

Η μέθοδος επιλογής όμως με την μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Η PCR πλεονεκτεί έναντι των άλλων ως προς την ταχύτητα της εξέτασης, τη δυνατότητα της διάγνωσης της νόσου στα αρχικά στάδια και ως προς την ταυτοποίηση του είδους.

Η θεραπεία εκλογής για τις ρικετσιώσεις είναι η τετρακυκλίνη και τα παράγωγά της [13]. Η δοξυκυκλίνη είναι το αντιβιοτικό εκλογής για τον Μεσογειακό Κηλιδώδη Πυρετό, με δοσολογία 200mg/ημ. για 5-7 ημέρες.[13] Η *joramycin* είναι αποτελεσματική και χορηγείται σε παιδιά και εγκύους. Σε εγκύους συνιστάται η χορήγηση 3g/ημ για 7 ημέρες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εργαστηριακή διάγνωση ρικετσιώσεως σε ασθενείς με ύποπτη κλινική σημειολογία, στην διάρκεια μιας διαίτης σε Γενικό Νοσοκομείο.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Εξετάστηκαν 361 δείγματα ορού αίματος τα οποία είχαν σταλεί στο εργαστήριο, κατά τα έτη 2009-2010. Οι οροί είχαν ληφθεί από 353 ασθενείς (346 ενήλικες και 7 παιδιά) που νοσηλεύτηκαν στο Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά “Τζάνειο” με υποψία λοίμωξης από ρικέτσιες. Όλοι οι ασθενείς είχαν πυρετό, και κάποιοι από αυτούς καταβολή, μυαλγία, αρθραλγία και εξάνθημα.

Οι 18 από αυτούς είχαν περισσότερα του ενός δείγματα. Όλα τα δείγματα ορού ελήφθησαν μετά από φυγοκέντρηση σε 3000 στροφές για 10 λεπτά και φυλάσσονταν στους -20 C μέχρι να εξεταστούν. Τα δείγματα εξετάστηκαν με τις δύο ορολογικές μεθόδους που εφαρμόζονται στο εργαστήριο σε όλες τις περιπτώσεις.

1. Η συγκολλητινοαντίδραση Weil Felix (fortress diagnostics), που εφαρμόστηκε ως screening test και αξιολογήθηκαν τίτλοι θετικοί σε αραιώση >160 με το αντιγόνο OX19 στον Εξανθηματικό τύφο και με το αντιγόνο OX2 στον Κηλιδοβλαπηδωδη πυρετό της Μεσογείου.

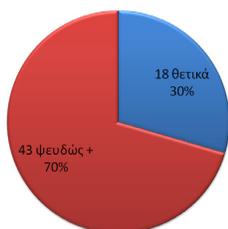
2. Η μέθοδος του έμμεσου μικροανοσοφθορισμού MIF-test (FOCUS diagnostics), όπου αναζητήθηκαν τα ειδικά αντισώματα IgM και IgG έναντι της R.rickettsii και της R.typhi. Τίτλοι >64 χαρακτηρίστηκαν ως θετικοί.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα 300 από τα 361 εξεταζόμενα δείγματα ορού αίματος ήταν αρνητικά και με τις δύο μεθόδους σε ποσοστό 83,1%.

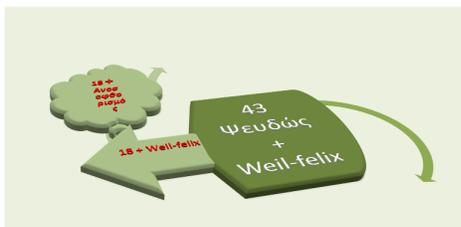
Τα 43 (11,9%) ήταν ψευδώς θετικά με την Weil Felix και δεν ανιχνεύτηκαν ειδικά αντισώματα Πίνακας (1).

Ποσοστό θετικών δειγμάτων με την μέθοδο Weil-Felix



Πίνακας (1).

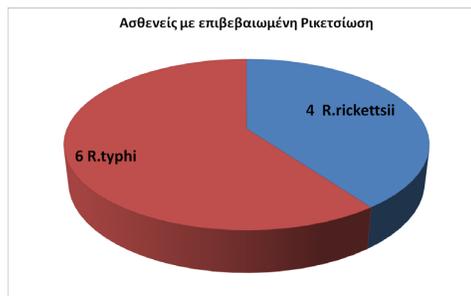
Σε 18 (2,83%) δείγματα ορού αίματος από 10 ασθενείς τα αποτελέσματα ήταν θετικά και με τις δύο τεχνικές Πίνακας (2).



Πίνακας (2): Επαλήθευση των θετικών Weil-Felix δειγμάτων με την ειδική τεχνική του Ανοσοφθορισμού

Σε 6 από τους 10 ασθενείς βρέθηκαν ειδικά IgM και

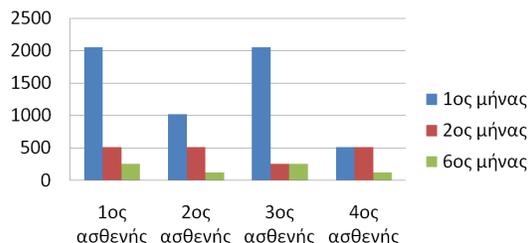
IgG αντισώματα έναντι της R.typhi. Σε 4 από τους 10 ασθενείς προσδιορίστηκαν ειδικά IgM και IgG αντισώματα έναντι της R.rickettsii (πίνακας 3).



Πίνακας (3).

Σε τέσσερις από αυτούς επανεξετάστηκαν δείγματα ορού αίματος δύο και έξι μήνες μετά την διάγνωση της νόσου και συνέχιζαν να διατηρούν θετικούς τίτλους IgG αντισωμάτων ένδειξη χρόνιας λοίμωξης (πίνακας 4).

Πορεία των ειδικών IgG αντισωμάτων σε 4 ασθενείς με Ρικετσιώση στην διάρκεια ενός εξαμήνου



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια οι ρικετσιώσεις παρουσιάζουν όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον τόσο σε ερευνητικό όσο και κλινικό επίπεδο, διότι παρατηρείται αύξηση των κρουσμάτων παγκοσμίως, ενώ ταυτοποιούνται νέα είδη ρικετσιών, οπότε οι ρικετσιώσεις θεωρούνται αναδυόμενο νόσημα. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν προστεθεί πάνω από 10 νέα είδη, ενώ συγχρόνως διαπιστώθηκε η παθογόνος δράση στον άνθρωπο στελεχών που θεωρούνταν μη παθογόνα.[7]

Ωστόσο φαίνεται ότι συμβαίνει και πραγματική αύξηση των κρουσμάτων τα τελευταία χρόνια, εξ' αιτίας διαφόρων παραγόντων όπως η αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος που έχει αντίκτυπο στο βιολογικό κύκλο των αρθροπόδων, η αύξηση των αδέσποτων σκυλιών στις αστικές περιοχές, τα μεγάλα μεταναστευτικά ρεύματα

ανθρώπων με συνέπεια κακές συνθήκες υγιεινής, η συνεχής μετακίνηση ζώων για εμπορικούς σκοπούς και πολλές άλλες αλληλεπιδράσεις [8,12].

Οι ρικετσιώσεις δεν εμφανίζουν ειδικές κλινικές εκδηλώσεις με αποτέλεσμα να εντάσσονται στις περιπτώσεις διερεύνησης πυρετού αγνώστου αιτιολογίας. Γι' αυτό ο ρόλος του εργαστηρίου είναι καταλυτικός στην αιτιολογική διάγνωση της νόσου.

Οι μοριακές μέθοδοι για την ταυτοποίηση του είδους δεν μπορούν να εφαρμοστούν στα κλινικά εργαστήρια ως μέθοδοι ρουτίνας παρά μόνο σε ερευνητικά κέντρα σε επιλεγμένες περιπτώσεις.

Στην μελέτη μας η εργαστηριακή επιβεβαίωση των ρικετσιώσεων σε ασθενείς με ύποπτη κλινική συμπτωματολογία, στηρίχτηκε στην εφαρμογή δύο ορολογικών μεθόδων, την συγκολλητινοαντίδραση Weil Felix και την μέθοδο του έμμεσου μικροανοσοφθορισμού (MIF-test).

Η συγκολλητινοαντίδραση Weil Felix είναι μια απλή και χαμηλού κόστους μέθοδος και βασίζεται στις κοινές αντιγονικές θέσεις στελεχών *Proteus vulgaris* με στελέχη Ρικετσιών.

Στην μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται αντιγόνα από τρία στελέχη Πρωτέα (*P. vulgaris* OX2, *P. vulgaris* OX19 και *P. mirabilis* OXK). Η μέθοδος όμως υπολείπεται σε ευαισθησία και ειδικότητα.[1] . Συνεχίζεται όμως η εφαρμογή της ως προκαταρκτική εξέταση στο εργαστήριο μας, γιατί δεν έχουν ανευρεθεί ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα ώστε να αποκλείουν τη διάγνωση μιας πιθανής ρικετσιώσης. Πράγματι στην μελέτη μας, ανευρέθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε 43 δείγματα ορού αίματος.

Μέθοδος επιλογής για την ορολογική διάγνωση των ρικετσιώσεων είναι ο έμμεσος μικροανοσοφθορισμός (MIF-test)) [15]. Πρόκειται

για μια τροποποίηση της μεθόδου του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Είναι μια αξιόπιστη δοκιμασία, που μας επιτρέπει την ανεύρεση ειδικών αντισωμάτων έναντι των διαφόρων τύπων ρικετσιών. [10,11] Από τα 61 δείγματα ορού αίματος που ήταν θετικά με την μέθοδο της Weil Felix, μόλις στα 18 ανευρέθηκαν ειδικά αντισώματα με τον ανοσοφθορισμό.

Η δυνατότητα αναζήτησης ειδικών IgM και IgG αντισωμάτων μας επιτρέπει να διευκρινίσουμε και το χρονικό στάδιο της νόσου. Σε 4 από τους 10 ασθενείς που τα αποτελέσματα ήταν θετικά και με τις δύο τεχνικές, έγινε επανεξέταση δειγμάτων ορού στους δύο και έξι μήνες μετά την διάγνωση της νόσου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι συνέχιζαν να διατηρούν θετικούς τίτλους IgG αντισωμάτων.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του CDC, στις Η.Π.Α αναφέρονται 400 περιπτώσεις ρικετσιώσεων σε ένα χρόνο.[6] Αναλογίζεται κανείς πόσο σημαντικός είναι ο αριθμός των επιβεβαιωμένων κλινικά και εργαστηριακά περιστατικών στο νοσοκομείο μας κατά την διετία 2009-2010 ανέρχεται σε ποσοστό 2,83%.

Η εφαρμογή της Weil Felix ως screening test σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα των ασθενών μπορεί να κατευθύνει την διάγνωση ρικετσιώσεων. Σε αυτό συμβάλλει σημαντικά και ο κλινικός γιατρός που στα πλαίσια διερεύνησης εμπύρετων αγνώστου αιτιολογίας περιλαμβάνει την αναζήτηση ειδικών αντισωμάτων έναντι των διαφόρων τύπων ρικετσιών.

Από τα ανωτέρω, διαπιστώνεται ότι η έγκαιρη και έγκυρη εργαστηριακή διάγνωση με τον προσδιορισμό ειδικών αντισωμάτων οδηγεί στην αποτελεσματική θεραπεία των ρικετσιώσεων.

SUMMARY

The aim of this study was the assessment of the serological findings of patients who presented in our hospital with clinically suspected rickettsiosis during a two-year period. Material and methods: We studied 361 serological samples from 353 patients. We applied serological methods of analysis: the Weil Felix reaction as screening test and the indirect microimmunofluorescence serologic test (MIF test) for the detection the specific IgM and IgG antibodies.

Results: 300/361 sera were negative in both methods, 43 were false positive with Weil Felix reaction and 18 were positive in both methods. In six patients were found IgM and IgG antibodies of *R. typhi* and *R. rickettsii* in four patients.

The serological diagnosis with the Weil Felix reaction as screening test and the MIF test are the more reliable methods for the final diagnosis of rickettsiosis.

Key words : rickettsiosis, diagnosis, Weil Felix reaction, MIF test

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rault D, Roux V: Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Rev Clin Microbiol.* 1997;10:694-719
2. Παπαπαναγιώτου Ι, Κυριαζοπούλου-Δαλαίνα Β. Ρικέτσιες. In: Press US, editor. *Ιατρική Μικροβιολογία & Ιολογία*. Θεσσαλονίκη; 2004. P 183-187
3. Azad AF Beard CB: Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis.* 1998;4:179-18
4. Gikas A, Doukakis S, Pediaditis J, et al: Murine typhus in Greece: epidemiological, clinical, and therapeutic data from 83 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96:250-253
5. Tselentis γ, Psaroulaki A, Maniatis J, et al: Genotypic identification of murine typhus *Rickettsia* in rats and their fleas in an endemic area of Greece by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 1996;54:413-417
6. Walker DH, Fishbein DB: Epidemiology of rickettsial diseases. *Eur J Epidemiol.* 1991;7:237-245
7. Parola P, Paddock CD, Raoult D: Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 719-756.
8. Rault D, Tissot Dupont H, Caraco P, et al: Mediterranean spotted fever in Marseille: descriptive epidemiology and the influence of climatic factors. *Eur J Epidemiol.* 1992;8:192-197
9. Olmer D, Olmer J; [Epidemiological rickettsial diseases in the Mediterranean coast; boutonneuse fever.]. *Rev Path Physiol Clin;* 1956;56:80-92
10. La Scola B, Rault D; Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2715-2727.
11. Mc Dade JE; Diagnosis of rickettsial diseases: a perspective. *Eur J Epidemiol.* 1991;7:270-275.
12. Mansueto S, Tringali G, Walker DH: Widespread simultaneous increase in the incidence of spotted fever group rickettsioses. *J Infect Dis* 1986;154:539-540.
13. Rault D, Drancourt M: Antimicrobial therapy of rickettsial diseases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:2457-2462
14. Brouqui P, Parola P, Fournier PE, et al: Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;49:2-12
15. Kularatne, SAM and IB Gawarammana. Validity of Weil Felix test in the diagnosis of acute rickettsial infections in Sri Lanka *Troy Soc Trop Med Hyg.* 2009;103:423-424.