

## Diagnosticul de laborator într-un caz de rabie la om -prezentare de caz-

Gh. Bărboi<sup>1)</sup>, D. Dermengiu<sup>2)</sup>, M. Costescu,<sup>2)</sup> V. Vuță<sup>1\*)</sup>, N. Alexandru<sup>1)</sup>, M. Turcitu<sup>1)</sup>,  
St. Nicolae<sup>1)</sup>, Florina Dumitrescu<sup>1)</sup>

---

**Abstract: Laboratory diagnosis of a human rabies case.** In this paper we describe an 65 years old human case, T.S., diagnosed postmortem with rabies. National Reference Laboratory for Rabies from the Institute for Diagnostic and Animal Health has received brain samples from National Institute of Legal Medicine "Mina Minovici" for specific rabies tests to be performed. The results from direct immunofluorescence examination was found to be positive during the same day, followed in the next days by histological tests as well as RT-PCR (*Revers-Transcription Polymerase Chain Reaction*) through virus nucleoprotein gene amplification. Phylogenetic analysis placed the isolate into serotype 1 category, with highly phylogenetic similarity with the animals isolates from central areas of Romania.

**Key words:** rabies, direct immunofluorescence, PCR, phylogenetic analysis

**R**abia (turbarea) este o zoonoză virală, caracterizată prin grave tulburări nervoase, reexprimate în general prin hiperexcitabilitate și agresivitate, urmate de paralizie și moarte.

În condițiile naturale sunt sensibile la infecția rabică în măsură egală toate speciile de mamifere domestice și sălbatice, indiferent de vârstă, rasă, sex, anotimp, climă. Incidența rabiei în diversele zone geografice cunoaște o oarecare variație, influențată de dinamica populațiilor speciilor-rezevor și de statusul imun al acestora.

Sursele naturale ale infecției rabice sunt reprezentate de mamiferele infectate aflate în ultima fază a perioadei de incubație. La acestea virusul se găsește cu predilecție în sistemul nervos central și periferic, dar repartitia lui nu este uniformă. Creierul este cel mai bogat în virus, concentrația fiind mai mare în hipocampus, cerebellum și medulla oblongata (OIE Manual 2004). Virusul este prezent în salivă la sfârșitul perioadei de incubație, unde persistă până la finalul bolii.

---

\*)*Corresponding author*

1) *Laboratorul Național de Referință pentru Rabie din cadrul Institutului de Diagnostic și Sănătate Animală, Str. Dr.Staicovici nr. 63, sector 5, cod. 050557, București, e-mail: [Vuta.Vlad@idah.ro](mailto:Vuta.Vlad@idah.ro)*

2) *Institutul Național de Medicină Legală „Mina Minovici”*

În condiții naturale transmiterea infecției de la un animal la altul sau de la animale la om se face în marea majoritate a cazurilor pe cale directă, prin mușcătura animalelor turbate. Zgârieturile sunt, de asemenea foarte periculoase deoarece pot asigura inocularea virusului, dacă ghearele sunt contaminate cu salivă virulentă proaspătă. O altă modalitate de infecție directă este depunerea de salivă virulentă, prin lingere, pe diferite plăgi sau eroziuni proaspete, aflate la nivelul pielii sau mucoaselor aparente. Cele mai mici eroziuni, chiar microscopice, pot permite pătrunderea virusului rabic în organism. Perioada de incubație la animale poate varia în medie de la 15 la 60 de zile, cu limite largi între 6-90 zile, în funcție de cantitatea de salivă inoculată, de localizarea plăgii față de sistemul nervos central și de abundența filetelor nervoase (Moga Mânzat 2005).

La om, perioada de incubație variază de la 2 săptămâni până la 6 luni cu limite de până la 2 ani și 7 luni (Smolevski 1950, WHO 2007).

Diagnosticul antemortem se poate efectua prin examene de biologie moleculară (PCR) pe probe de salivă sau lichid cerebrospinal (Crepin 1998, Nagaraj 2006, Smith 2003). Postmortem diagnosticul de laborator în rabie se face prin metode virusologice, histologice și de biologie moleculară. Metoda virusologică uzuală este imunofluorescența directă prin care în urma colorării amprentelor de creier cu un conjugat specific se pun în evidență la microscopul cu lumina UV corpusculii rabici. Rezultatul este obținut în câteva ore cu un procent de detecție al cazurilor pozitive de 95-99 % (OIE Manual 2004, WHO 2007). Prin metodele histologice sunt puși în evidență corpusculii Babeș-Negri. Pentru elucidarea cazurilor negative sau dubioase, ca metode de diagnostic complementare se mai pot folosi inocularea intracerebrală a șoriceilor de laborator sau izolarea virusului pe culturi celulare.

În lucrarea de față ne-am propus să prezentăm cazul unui bărbat în vârstă de 65 de ani, T.S., fost pădurar de meserie, cu domiciliul într-o zonă de munte, diagnosticat postmortem cu rabie, fiind suspionat de turbare la un moment dat în timpul evoluției bolii. Astfel în data de 16.03.2007 T.S. s-a prezentat la Spitalul de Boli Infecțioase Focșani în stare extrem de gravă, fiind trimis de urgență la Institutul de Boli Infecțioase „Matei Balș” din București cu suspiciunea de botulism. La Institutul de Boli Infecțioase în urma consultului s-a constatat următoarea simptomatologie: comă, pupile midriatice bilaterale areactive, mișcări pendulare ale globilor oculari, sialoree, disfagie, reacția spastică la stimuli dureroși, imposibilitatea ingestiei de apă, crize tonico-clonice anamnetice. Testele serologice pentru hepatită B, hepatită C, HIV, tetanos, botulism, virusuri gripale, borelia și enterovirusuri făcute la Institutul de Boli Infecțioase au fost negative. În aceeași zi pacientul se internează prin transfer la Spitalul Clinic de Urgență București cu diagnosticul „Comă cu etiologie neprecizată. Suspiciune de rabie. Insuficiență renală. Crize tonico-clonice anamnetice.”

Din datele cuprinse în F.O. rezultă că în perioada internării în Spitalul Clinic de Urgență București (16.03.2007 -27.03.2007) s-a efectuat un examen C.T. care a evidențiat lacuna de 10/4 mm la nivelul nucleului caudat drept, sistem ventricular cu dimensiuni crescute, ușoară atrofie corticală fronto-temporo-parietal bilaterală.

Paraclinic se evidențiază leucocitoză și trombopenie, produșii de retenție azotați crescuți (creatinina 2,95 mg/dl, uree 94,8 mg/dl), enzime de citoliză și necroză crescute (ALT 71 U/l, AST 184 U/l, LDH 996 U/l, CK 3768 U/l).

Examenul neurologic efectuat la data de : 17.03.2007 evidențiază comă G.C.S. 7, reacționează spastic la stimuli dureroși, R.O.T. crescute, pupile miotice reactive, fără redoare de ceafă.

În data de 22.03.2007 se efectuează examen R.M.N. cerebral care evidențiază aspect de sinuzită etmoidală, maxilară, sfenoidală, mastoidită bilaterală, leziune lacunară cap nucleu caudat drept.

Starea generală se menține foarte gravă cu menținerea comei profunde dar cu posibilitatea suprimării suportului inotrop pozitiv și agravarea insuficienței renale, necesitând instituirea terapiei de substituție renală din data de 23.03.2007.

Menținerea suspiciunii de rabie devine dificilă în urma declarațiilor însoțitoare prin care se relevă lipsa cazurilor de rabie în perimetrul domiciliului lui T.S.. Nu s-au semnalat leziuni care ar fi putut apărea în urma mușcăturii de animal, cu excepția a două zone de eritem la nivelul călcâiului, bilateral, posibil post traumatice în urma legăturilor pentru imobilizare.

În decursul următoarelor zile starea generală s-a agravat, iar în data de 27.03.2007 pacientul a decedat, cadavrul fiind transferat la Institutul Național de Medicină Legală „Mina Minovici” pentru efectuarea examenului necropsic.

La examenul necroptic, la examenul extern al cadavrului nu s-au constatat leziuni externe care să confirme o leziune traumatică produsă prin mușcare.

La examenul craniului se constată edem marcat și congestie vasculară. Pe secțiunile efectuate prin metoda Pitres la nivelul nucleului caudat posterior de partea dreaptă prezintă o zonă cu structura distrusă de 2/2/1 cm violaceu-negricioasă. În rest se constată doar o ușoară creștere a dimensiunilor ventriculilor cerebrali. La nivelul trunchiului cerebral pe secțiune se constată existența unor zone punctiforme negricios-violacee care nu dispar la spălare cu apă.

La nivelul cordului se constată prezența unei miocardoscleroze iar la nivel pulmonar reducerea ușoară a crepitațiilor pulmonare și pe secțiune mici zone gălbui care la presarea pulmonului exprimă o cantitate redusă de mucus gălbui aerat.

Rinichiul este de consistență scăzută cu mici puncte gălbui și roșietice pe suprafața externă, pe secțiune, corticala este îngroșată și prezintă zone gălbui și striații liniare hemoragice.

La examenul histopatologic se constată:

**Creier (cortex) :** La nivelul meningelui rare elemente limfomonocitare, staza accentuată și edem meningeal; în substanța nervoasă la nivelul cortexului pe alocuri moderată reacție glială și prezența de corpi amilacei; în substanța alba microfocare hemoragice pericapilare alături de câteva venule ectaziate cu accentuată stază sanghină și foarte rare elemente limfomonocitare perivascularare; edem cerebral accentuat.

Pe un alt fragment se observă focare hemoragice de dimensiuni variabile unele confluențe cu dilacerarea substanței nervoase și minimă reacție inflamatorie subacută; rare elemente inflamatorii limfomonocitare perivascularare și aspecte de leucostazie vasculară incipientă.

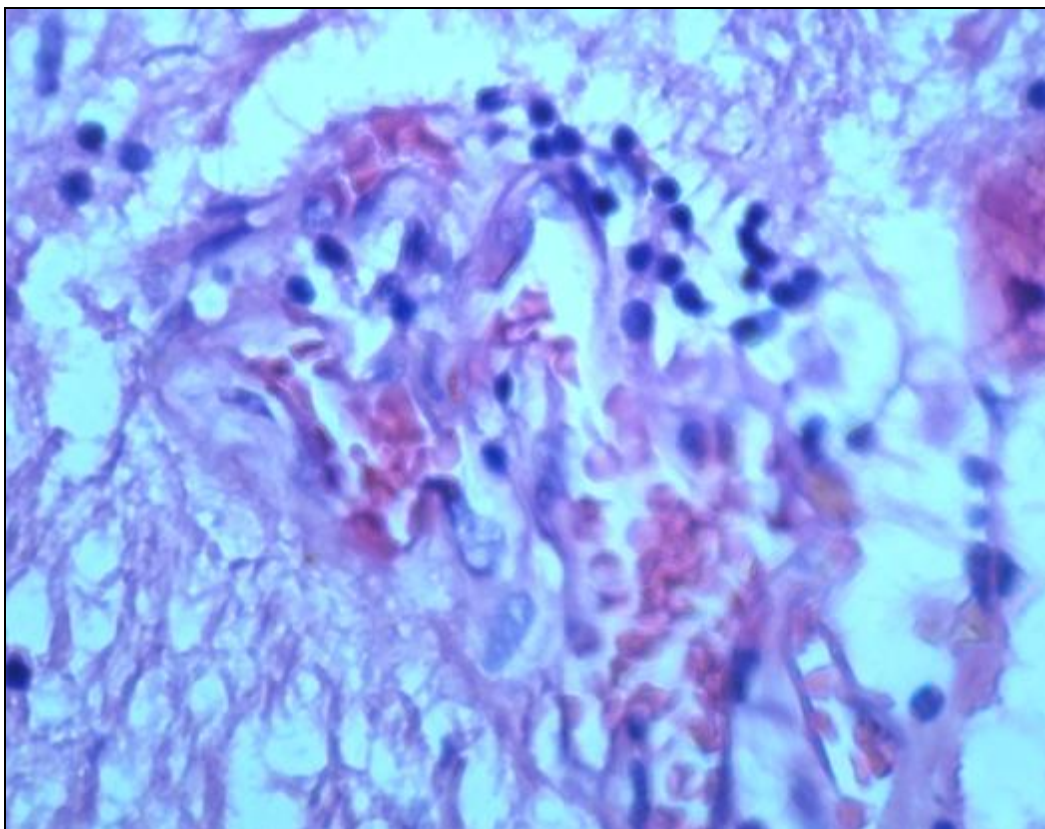
**Creier (nuclei bazali):** Numeroase microfocare hemoragice pericapilare, reacție glială difuză, foarte rare elemente limfomonocitare în jurul vaselor de calibr mic, unele cu peretele fibrohialin altele cu endoteliul tumefiat; frecvenți corpi amilacei. Accentuat edem cerebral. (Fig. 1, 2)

**Trunchi cerebral :** Numeroase microfocare hemoragice pericapilare; accentuat edem troncular (Fig. 3).

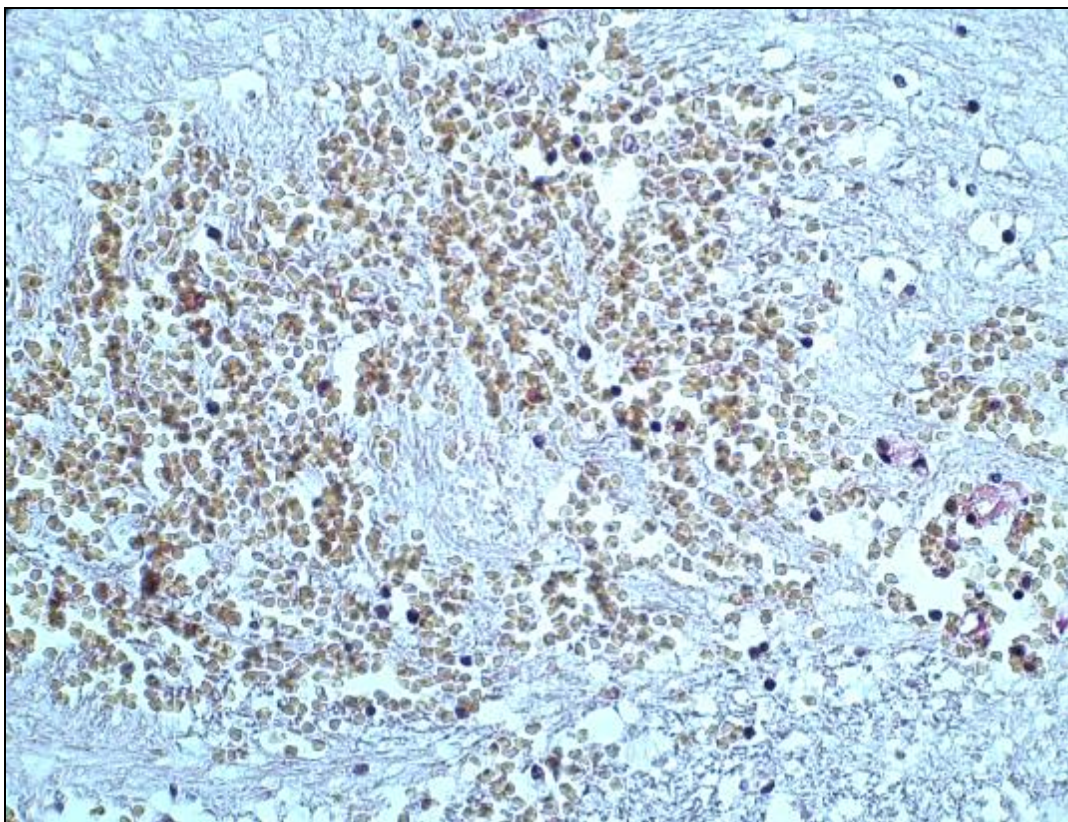
**Cerebel :** Accentuată stază cu minimă hemoragie meningeă intrascizurală; rare elemente inflamatorii limfomonocitare; în substanța cenușie câteva microfocare hemoragice pericapilare; edem meningo-cerebelos (Fig 4).



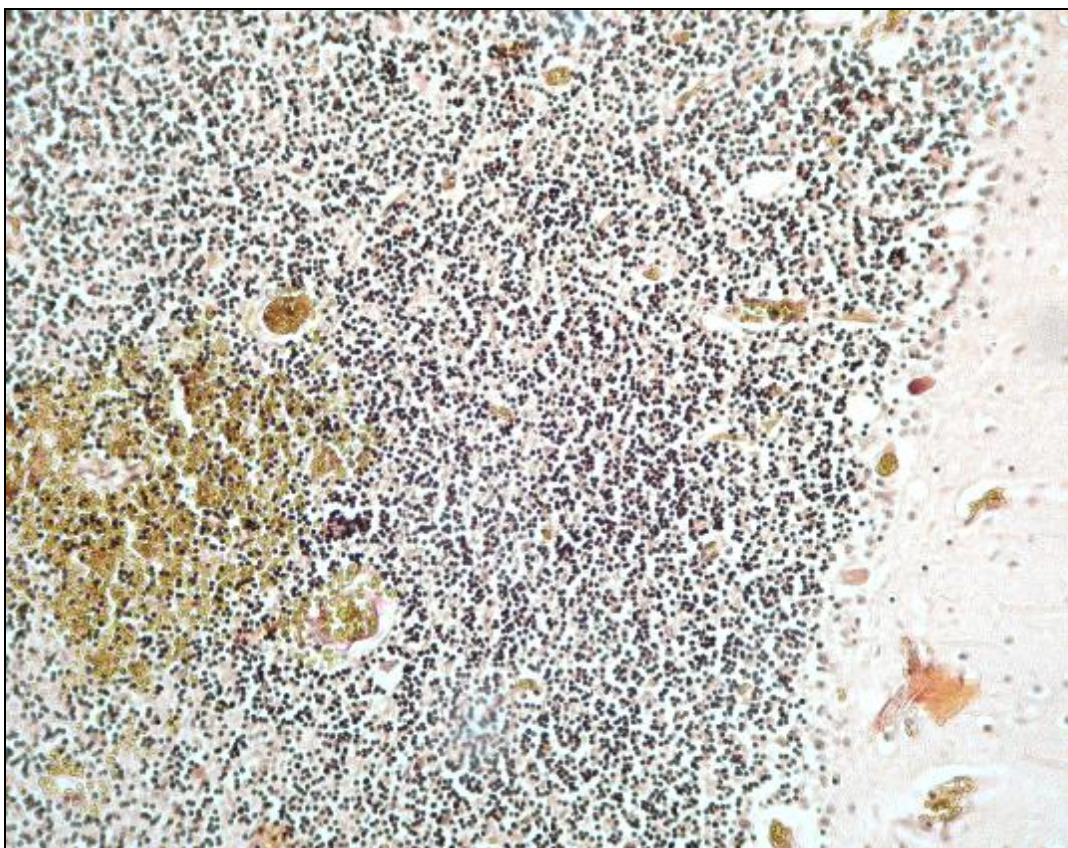
**Fig. 1** Nuclei bazali-microfocare hemoragice perivasculare, col.VG, ob x 10



**Fig. 2** Nuclei bazali - vas de calibru mic cu celule endoteliale tumefiate, elemente inflamatorii limfomonocitare si edem perivascular, col. HE, ob x 100



**Fig. 3** Trunchi cerebral-microfocar hemoragice pericapilare, col.VG, ob x 40



**Fig. 4** Cerebel-microfocar hemoragic pericapilar in substanta cenusie, col.VG, ob x 20

**Plăman:** Rare focare bronhopneumonice. Moderată stază septală, edem alveolar accentuat și mici zone de atelectazie. Hipertrofie fibro-conjunctivă a pereților arteriolari. Microlitiază pulmonară.

**Cord:** Pericardită cronică focală sclerogenă. Moderată miocardofibroză cu foarte mic focar cicatricial subendocardic. Lipomatoza interstițială cu rare elemente inflamatorii limfomonocitare. Zone întinse de hipoxie miocardică și edem interstițial. Aspecte de ateroscleroză coronariană.

**Ficat:** Staza cronică stadiul I/II. Mici focare de steatoză. Aspecte de leucostazie capilară incipientă. Hemangiom cavernos cu tromboza recentă.

**Rinichi:** Aspecte incipiente de tubulonefroză. Nefrită cronică interstițială reziduală. Moderata arterio si arterioloscleroză renală. Rari microchiști de retenție urinară.

In mod clasic diagnosticul histopatologic de encefalomielita rabica include urmatoarele elemente:

- Prezenta de infiltrate mononucleare
- Prezenta de mansonie perivasculare limfocitare sau polimorfonucleare
- Observarea unor aglomerari limfocitare in focare
- Noduli Babesi (alcatuite din celulele gliale)
- Corpusculii Negri (incluziuni rotund ovalare observabile mai ales in citoplasma celulelor piramidale din cornul lui Ammon si celulele Purkinje din cerebel)

In cazul analizat, tabloul histopatologic encefalic era neconvingator, multe din elementele asa-zis caracteristice pentru meningo-encefalita rabica fiind abia schitate, sau chiar absente.

Din pacate, nici unul din elementele de mai sus luate separat sau impreuna nu sint absolut specifice si nu sint admise ca diagnostic de certitudine in rabie (spre exemplu, pe de o parte corpusculii Negri se evidentiaza doar in aproximativ 50% din animalele cu turbare, iar pe de alta parte se pot observa si in cazuri in care infectia rabica este cert absenta). Si totusi, avind in vedere pericolul biologic implicat de diagnosticul de rabie am considerat ca se impunea investigatii suplimentare pentru confirmarea sau infirmarea suspiciunii de meningo-encefalita rabica.

În acest context, în urma contactelor stabilite între Institutul Național de Medicină Legală „Mina Minovici” și Institutul de Diagnostic și Sănătate Animală București (IDSA), în data de 29.03.2007 Laboratorul Național de Referință pentru Rabie din cadrul IDSA primește probe prelevate din encefalul lui T.S. (o emisferă) în vederea examenelor specifice în diagnosticul rabiei. În după-amiaza aceleiași zile rezultatul examenului de imuno-fluorescență directă pe amprente de hipocampus, cerebellum și medulla oblongata colorate cu conjugat fluorescent specific a fost pozitiv, confirmând suspiciunea de rabie (Fig. 5).

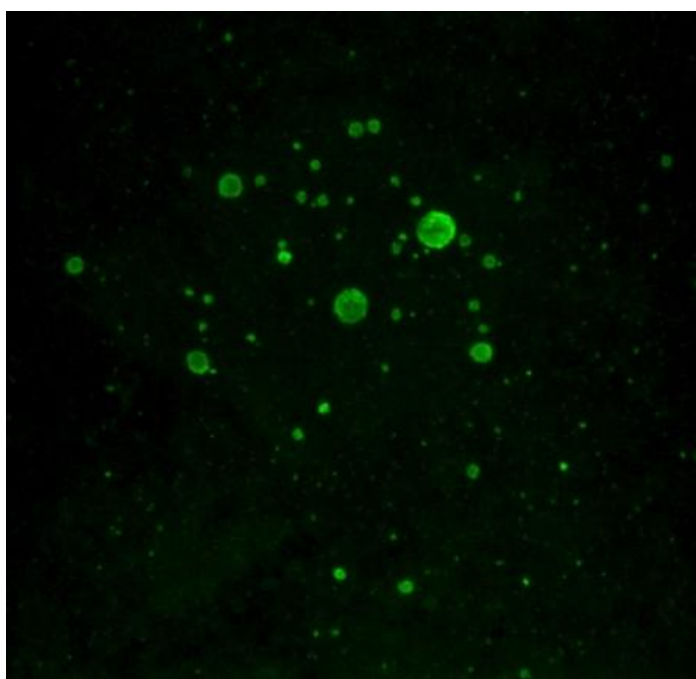
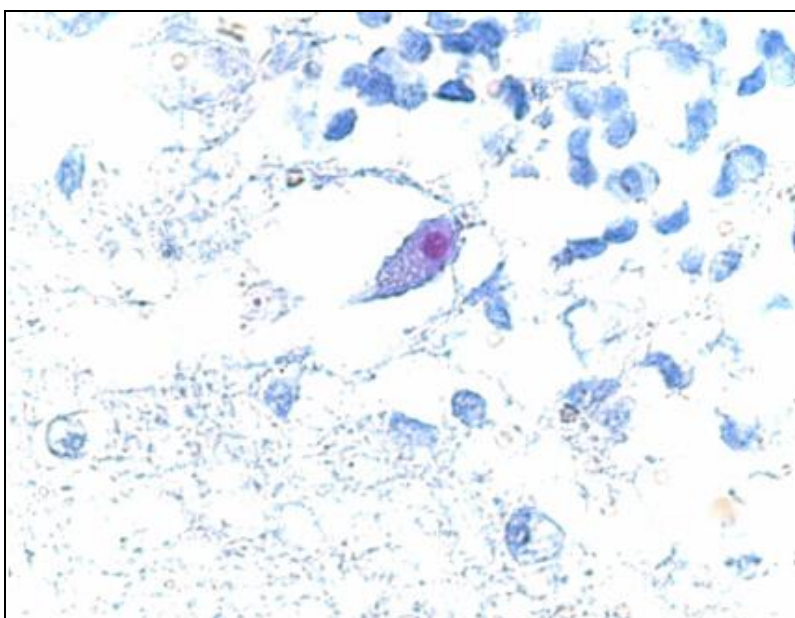
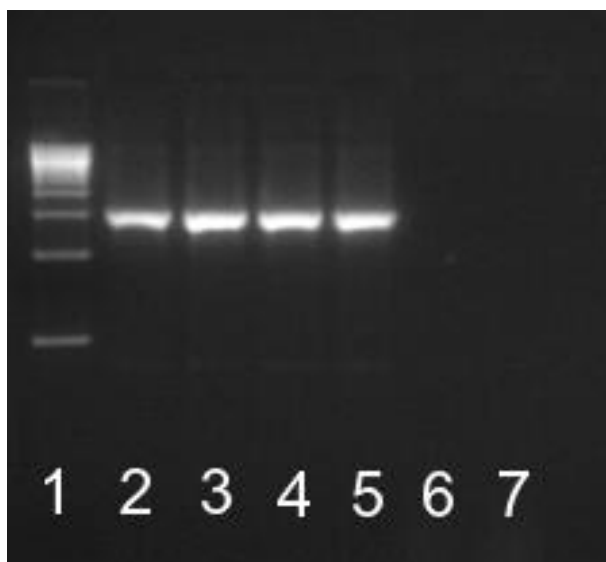


Fig. 5 IFD-corpuseculi rabici, x



**Fig. 6** Corpuscul Babeș-Negri în celula Purkinje-Cerebel, colorația Mann, x

Testul de imuno-fluorescență directă (IFD) a fost completat ulterior cu examenul histopatologic care a relevat prezența corpusculilor Babeș-Negri în secțiunile histologice examinate (Fig. 6), precum și de testul RT-PCR (*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*) prin amplificarea unui fragment de 1534 perechi de baze din gena nucleoproteinei virusului rabic (Fig. 7).



**Fig. 7 Legendă:** Poziția nr.1-marker molecular 500 perechi de baze (500pb); Poziția nr.2-probă hipocamp; Poziția nr.3-probă cerebel; Poziția nr.4-probă omogenat creier; Poziția nr.5-standard pozitiv; Poziția nr.6-standard de extracție negativ; Poziția nr.7-standard de amplificare negativ

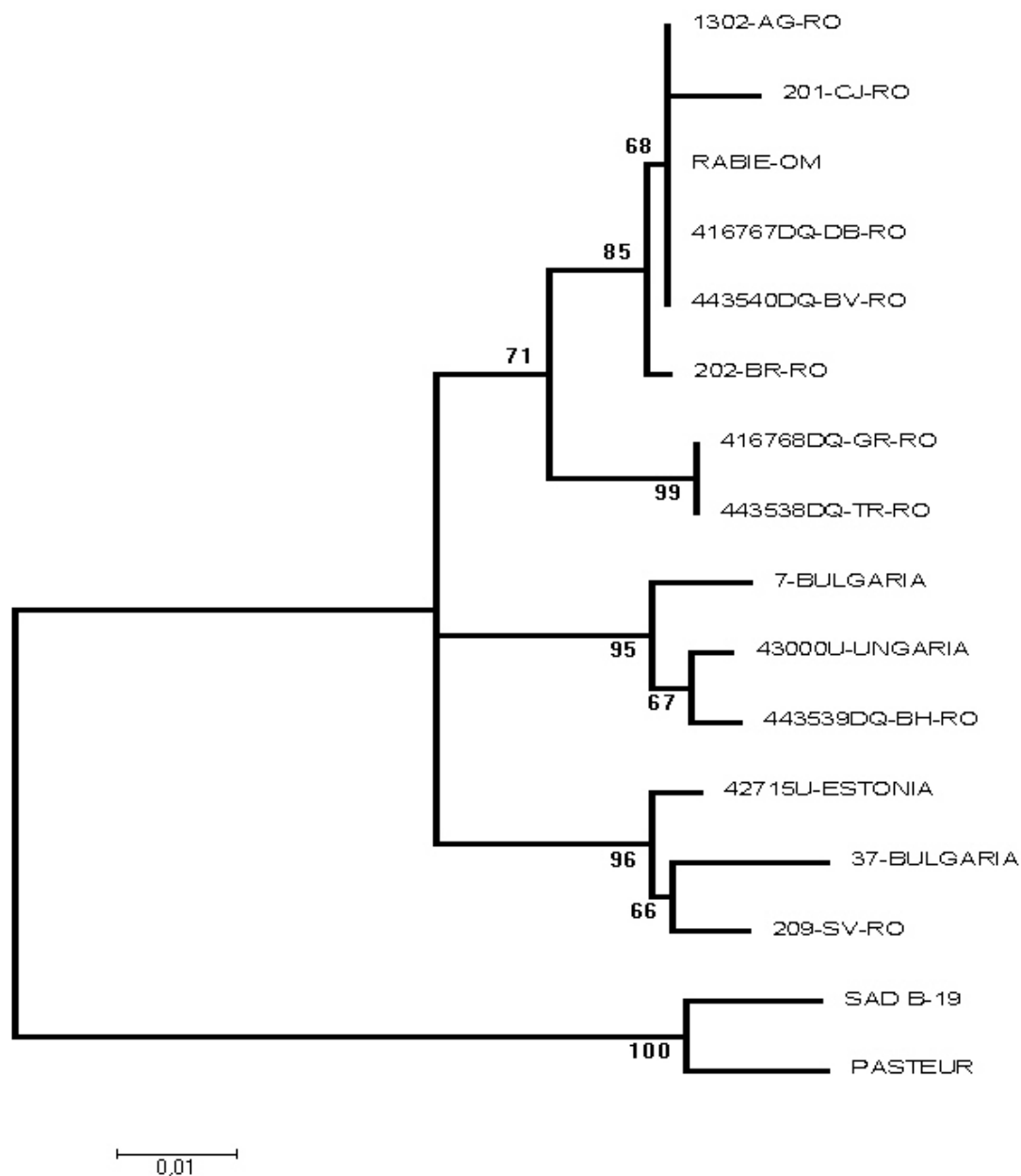
În continuare, s-a efectuat secvențierea fragmentului genic amplificat, zonă de elecție pentru stabilirea filogeniei tulpinii de virus rabic în cauză (Fig. 8).

Analiza filogenetică pentru tulpina de virus rabic izolată, efectuată cu programe dedicate (Mega v.3.1- Kumar S.,2004), a relevat apartenența acesteia la serotipul 1, precum și înrudirea filogenetică cu izolatele de virus rabic de la animale din zona centrală a României (în primul rând cu cele din județele BV, DB, AG).

intr-o certitudine, permitind pe de o parte luarea unor masuri rapide de ancheta epidemiologica si vaccinarea personalului medical si medico-legal venit in contact cu pacientul sau cu produsele biologice ale acestuia (merita mentionat faptul ca o asistenta medicala s-a intepat in timp ce preleva probe biologice de la pacient).

Trebuie in final mentionat ca diagnosticul stabilit cu promptitudine in urma investigatiilor specialistilor din cadrul Institutului de Diagnostic și Sănătate Animală, a transformat suspciunea de rabie (privita a priori drept o elucubratie in conditiile raritati extreme a acestor cazuri)

Un alt aspect important relevat de acest caz este pericolul biologic real (chiar daca de multe ori nebanuit) la care este expus atit personalul medical cit si cel din serviciile de anatomie patologica si serviciile de medicina legala.



**Fig. 8** Arborele filogenetic

**Legendă:** 1302-AG-RO- bovină jud. AG; 201-CJ-RO- vulpe jud. CJ; RABIE-OM; DQ416767-creier câine jud. DB; DQ443540- cabalină jud. BV; 202-BR-RO- vulpe jud. BR; DQ416768- pisică jud. GR; DQ443538- vulpe jud. TR; U43000-izolat rabie Ungaria; DQ443539- pisică jud. BH; U42715-izolat rabie Estonia; 209-SV-RO- bovină jud. SV

## Concluzii

1. Prin examene de laborator (virusologice, de biologie moleculară și histologice) a fost realizat un diagnostic complex de rabie la om.
2. Prin testul de imunofluorescență directă diagnosticul de rabie a fost pus în decurs de 3 ore de la primirea probei.



3. În urma analizelor filogenetice tulpina de virus rabic identificată s-a dovedit a fi înrudită cu alte tulpini de virus rabic de la animale pe teritoriul României.
4. Analiza filogenetică a relevat procentul mare de similaritate cu izolatele de la animale de pe teritoriul României, demonstrând infecția cu o tulpină locală.

### Bibliografie

1. Crepin P., Audry L., Rotivel Y., Gacoin A., Caroff C. *Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid* J. Clin. Microbiol.-Apr 1998, 36 (4), 1117-21.
2. Kumar S., Tamura K., and Nei M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
3. Mânzat Moga R.-*Boli virotice și prionice ale animalelor* Ed. Brumar Timișoara 2005, 625-629.
4. Nagaraj T., Vasanth JP., Desai A., Kamat A., *Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples comparison of real time and conventional RT-PCR techniques* J. Clin. Virol-May 2006, 36 (1), 17-23.
5. Smelovskii SI., *Case of human rabies with an incubation period of 2 years and 7 months following the bite of a rabid wolf* Vestn Khir Im II Grek-1950.
6. Smith J., McElhinney L., Parson G., Brink N., Doherty T., Agranoff D., Miranda ME., *Case report: rapid-antemortem diagnosis of a human case of rabies imported into the UK from the Philippines* J. Med. Virol.-Jan 2003, 69 (1), 150-5.
7. \*\*\*[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00044.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00044.htm).
8. \*\*\*[www.who.int/entity/rabies/human/en/Rabiesgroupenf2.gif&imgrefurl](http://www.who.int/entity/rabies/human/en/Rabiesgroupenf2.gif&imgrefurl).
9. \*\*\*[www.webhealth/topics/GeneralHealth/generalhealthsub/generalhealth/neurological/rabiessymp.html+human+rabies+symptoms](http://www.webhealth/topics/GeneralHealth/generalhealthsub/generalhealth/neurological/rabiessymp.html+human+rabies+symptoms).
10. \*\*\*<http://www.uct.ac.za/depts/mmi/jmoodie/rabies2.html+human+rabies+incubation+period&hl>.