

Diagnosticul de laborator al infecțiilor virale

Diagnosticul de laborator al infecțiilor virale se poate efectua prin numeroase metode, cele mai utilizate fiind izolarea și identificarea agentului viral (metode directe), fie prin teste serologice (diagnostic serologic).

Diagnosticul direct

Virusurile datorită dimensiunilor foarte mici (20-300 nm) nu pot fi observate la microscopul optic, ci doar la microscopul electronic.

Infecțiile virale pot fi diagnosticate ocazional utilizând microscopia electronică prin vizualizarea directă a particulelor virale. Metoda prezintă avantajul de a putea fi vizualizate mai multe tipuri de particule virale. Dezavantajele includ costul și complexitatea întreținerii microscopului electronic.

Anumite tehnici asociate microscopiei pot evidenția virusurile în țesuturile obținute prin biopsie sau necropsie.

Prin imunofluorescență se utilizează anticorpi marcați fluorescent care detectează antigenele virale la nivelul țesuturilor (virus herpes simplex 1 și 2, virusul varicella-zoster). Este aplicabilă ca metodă de diagnostic în laboratoare care dispun de microscop cu fluorescență.

De obicei în laboratoarele de cercetare virusologică se face examinarea electronomicroscopică, deoarece aceste laboratoare au în dotare microscop electronic. Se face de obicei examinarea lichidelor veziculare.

Recoltarea probelor biologice în scopul diagnosticului direct virusologic se face pe medii aseptice tamponate care vor fi decontaminate bacterian fie prin adăugare de antibiotice, fie prin centrifugare sau filtrare.

Virusurile supraviețuiesc, trăiesc și se multiplică doar în interiorul unei celule vii (culturi de celule, animale de experiență, ouă embrionate). Prezența virusurilor în structurile vii, utilizate pentru izolare, este pusă în evidență prin modificări histologice caracteristice sau prin evidențierea unor agenți virali hemaglutinanți.

Identificarea virusurilor odată cultivate se face prin RFC (reacție de fixare a complementului) sau HAI (reacție de hemaglutinoinhibare)

- Inocularea pe animale de experiență se face subcutan, intravenos, intraperitoneal, intranasal, intracerebral, prin scarificare corneeană sau cutanată. După inoculare, animalul prezintă semne de boală, iar virusul replicat va fi identificat în sânge și țesuturi.
- Inocularea pe ouă embrionate a suspensiilor virale se face pe ouă de găină, la care se verifică prin transluminare la ovoscop viabilitatea și dezvoltarea embrionului. Se poate face inoculare intravitelin, intraalantoidian sau intraamniotic. Cu același produs patologic se inoculează întotdeauna 2-3

ouă, care se incubează la temperatura de 34-35°C, timp de 2-3 zile. După incubare se sacrifică embrionul și se examinează lichidele și țesuturile care pot prezenta modificări macroscopice și/sau microscopice. Lichidele embrionare pot prezenta proprietăți caracteristice virusului replicat (capacitate hemaglutinantă). Reacția HAI permite evidențierea virusurilor hemaglutinante.

- Inocularea în culturi celulare a suspensiilor virale. Liniile celulare pot fi de proveniență umană (Hela) sau animală (Vero). În diagnosticul virusologic pe linii celulare, se introduce suspensia virală obținută din produsul patologic împreună cu mediul de întreținere. Se incubează la 37°C iar replicarea virală este demonstrată prin ECP (efect citopatogen). Culturile virale prezintă atât avantaje cât și dezavantaje, comparativ cu alte metode de diagnostic. Culturile virale sunt singurele dintre metodele diagnostice care izolează virusuri viabile ce pot fi păstrate pentru studii viitoare. Dezavantajele metodei ar fi: costul ridicat, timpul relativ prelungit de determinare virală, dar și varietatea virusurilor.

Diagnosticul serologic al infecțiilor virale

Imunodiagnosticul reprezintă metoda cea mai accesibilă de diagnostic în infecțiile virale și constă în identificarea anticorpilor antivirali în serul bolnavilor.

Se pot realiza 2 tipuri de investigații:

- Detecția de anticorpi antivirali de tip IgM (care apar în răspunsul imun primar). Semnifică o infecție acută, au viață scurtă deoarece dispar în câteva săptămâni. De obicei se utilizează testul ELISA
- Anticorpi antivirali de tip IgG care apar în răspunsul imun secundar (apar după o perioadă de cel puțin 2-3 săptămâni de la o infecție virală și care persistă mai mulți ani, uneori chiar toată viața.
- Se poate determina seroconversia. Se recoltează două probe de sânge. În proba I nu există anticorpi, apoi în proba a II a apar anticorpi specifici virusului de detectat sau se determină creșterea semnificativă a titrului de anticorpi între cele două probe (de cel puțin patru ori).

Testele enzimaticе sunt cele mai des utilizate în diagnosticul infecțiilor virale. Testul ELISA (enzyme-linked-immunosorbant-assay) pune în evidență anticorpii antivirali prin tehnică indirectă.

Metodele moleculare de diagnostic sunt cele mai folosite în determinarea și identificarea agenților patogeni pentru care culturile și serologia sunt greu de realizat. Reacția de polimerizare în lanț (PCR) prezintă sensibilitate și specificitate înaltă și de aceea reprezintă o metodă de elecție pentru identificarea directă a acidului nucleic. Metoda se bazează pe abilitatea ADN sau ARN polimerazei de a

copia secvențe a unor gene ținta folosind nucleotide complementare. PCR este o eficientă deoarece permite detectarea prin intermediul aceleași reacții, a mai multor agenți ce pot produce același sindrom clinic.