

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR PRODUSE DE FUNGI

Fungii reprezintă un grup divers de microorganisme eukariote implicate în etiologia infecțiilor umane, numite micoze. Micozele apar mai frecvent la indivizii imunodeprimați (cei cu transplant de măduvă osoasă, neutropenici, cei cu neoplasme sau SIDA). Fungii pot fi saprofiți, comensali sau paraziți și determină infecții pe cale exogenă sau endogenă.

Există numeroase criterii de clasificare a fungilor, dar criteriul morfologic este cel mai cunoscut și acceptat în micologia medicală. Acesta se bazează pe aspectul și structura părții asimilatoare a fungului-talul și permite descrierea a trei tipuri principale de micromiceți:

- ☐ Filamentoși: microorganisme pluricelulare, cu talul alcătuit din filamente tubulare, separe sau nu, denumite hife;
- ☐ Levuriformi: microorganisme unicelulare, rotunde sau alungite ce se multiplică prin burjeonare;
- ☐ Dimorfici: microorganisme care apar sub formă de levuri în țesuturile organismelor parazitare și sub formă filamentoasă când sunt cultivați la temperatura camerei pe medii uzuale. Astfel fungii se împart în trei mari grupe: dermatofii, levuri și mucegaiuri.

Diagnosticul de laborator al micozelor produse de levuri

Diagnosticul de laborator al micozelor produse de levuri din genul *Candida*

Levurile din genul *Candida* sunt paraziți umani și animalii. *Candida albicans* este principala specie implicată în etiologia micozelor sistemice (65-70%). Alte specii ale genului *Candida* sunt: *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. famata* etc.

Semnificația clinică. Odată ce levurile au învins sistemul imun deteriorat al gazdei, ele pot cauza o largă varietate de infecții: de la candidozele cutanate și mucoase superficiale, până la cazuri de candidoze sistemice, când celulele levurice penetrează epiteliile, diseminând în organism, pe cale sanguină și infectând o largă varietate de organe (inclusiv rinichi, ficat, creier). Candidozele se împart în două mari grupe:

1. Candidoze superficiale:

- candidoze mucoase: bucofaringiene (muguet), anale, genito-urinare.
- candidoze cutanate: onix, perionix, intertrigo, foliculite.

2. Candidoze sistemice: septicemice sau viscerale care iau forme variate (infecții urinare, osteoarticulare, renale, pulmonare, oculare, cardiace, peritoneale, etc); acestea pot fi iatrogene, nosocomiale sau endogene.

Diagnosticul de laborator presupune izolarea și identificarea speciei responsabile de producerea bolii, înaintea instalării terapiei antifungice. Dacă s-a instituit deja un tratament antifungic, recoltarea produsului patologic se va face după cel puțin trei zile de la întreruperea tratamentului.

Recoltarea produselor patologice se face diferit, în funcție de localizare.

Prelevatele se vor transporta rapid în laborator unde se vor examina și însămânța pentru a evita multiplicarea levurilor în produsul patologic. Pentru produsele patologice semi-lichide (puroi, lichidul din serozitate) se utilizează medii de transport (Portagerm, Mycoline, Synthesis).

Examenul direct constituie o etapă importantă a diagnosticului care permite evidențierea la microscop, a levurilor: elemente ovalare de 4-6 μm , asociate eventual cu prezența filamentelor miceliene.

Preparatul nativ lamă-lamelă: pe o lamă de sticlă bine degresată se depune materialul recoltat. Se adaugă apoi 2-3 picături soluție disociantă (KOH sau NaOH în concentrație de 10-30% sau dizolvant de sulfură de sodiu) și se acoperă cu o lamelă. Materialul de examinat va fi lăsat să se disocieze 20-30 minute sau chiar o oră (fragmente din unghii) înainte de examenul microscopic. Lichidul de disociere se păstrează în flacoane de culoare verde sau neagră, bine închise, în locuri ferite de lumină.

Tehnica colorației. Levurile din genul *Candida* se colorează după metoda Gram, albastru de metilen, May-Griinwald-Giemsa. Celulele levurice sunt sferice sau ovalare, cu muguri multipolari numiți blastospori (pseudomicelii formate din celule alungite așezate cap la cap). Se mai pot observa chlamidospori intens colorați, care apar ca celule sferice cu diametrul mai mare decât cel al celulelor levurice. La colorația Gram, candidele sunt gram-pozitive.

Cultivare. Speciile din genul *Candida* cresc pe mediul Sabouraud simplu, Sabouraud cu adaus de gentamicină și cloramfenicol sau Sabouraud cu actidionă și roșu fenol (mediul Mycoline). Perii, scuamele și fragmentele de unghie sunt mai întâi fragmentate și apoi însămânțate. Materialul se depune pe suprafața mediului de cultură în puncte diferite. Însămânțarea nu trebuie să dureze mai mult de 40-50 secunde și se va face de preferință la adăpost de curent și în atmosferă sterilă (boxă specială sau utilizarea unei lămpi cu ultraviolete). Urina și alte produse patologice lichide se însămânțează cu o pipetă Pasteur sterilă în 2-3 tuburi cu mediu Sabouraud lichid. Materiile fecale se lasă la macerat 24 de ore într-o soluție de ser fiziologic și antibiotice, după care se însămânțează minimum în 2 tuburi. Fragmentele de țesut obținute prin biopsie se triturează într-un mojar steril și apoi sunt trecute, în fragmente foarte mici pe mediul corespunzător.

Incubarea se face la 35-37° C, 24-48 h. *Candida albicans* dezvoltă colonii albe, cremoase, mate, cu margini regulate.

Pentru identificarea *Candidei albicans* se recomandă:

- trecerea culturii pe mediul P.C.B. Langeron cu cartofi, morcovi și bilă, acest mediu favorizând producerea de clamidospori, caracteristici pentru *Candida albicans*;
- metodă rapidă de identificare a *Candidei albicans* se bazează pe germinația rapidă a levurilor, care emit filamente în prezența serului uman sau animal. Se introduc câteva picături dintr-o suspensie de *Candida* sp. într-o eprubetă care conține 0,5 ml ser uman. Se agită, se ține apoi la termostat timp de 4 ore la 37°C după care se examinează o picătură la microscop. Dacă celulele de *Candida* încep să emită filamente, este vorba de *Candida albicans*.
- pentru diferențierea coloniilor de *Candida albicans* de alte specii de *Candida*, produsul patologic se poate însămânța pe mediul CHROMagar (agar, peptonă, amestec special cromogen, cloramfenicol). După incubarea la 37° C, timp de 48h, *C. albicans* produce colonii verzi, *C. tropicalis*, colonii albastre metalice, *C. krusei*, colonii roz, iar alte specii dau naștere unor colonii albe.

- Galeriile Api Candida permit identificarea rapidă (18-24 ore) a 14 specii de levuri: *C. albicans*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum (candidum și capitatum)*, *Saccharomyces cerevisiae* și *Trichosporon* sp.

- WELL D-ONE® PENTRU FUNGI este un sistem compus din 24 de godeuri care conțin substraturi biochimice pentru identificarea celor mai importanți fungi clinici și un test de susceptibilitate antifungică. Identificarea se bazează pe utilizarea diferitelor zaharuri și prin prezența unui substrat cromogen. Sistemul este inoculat cu o suspensie pentru fungi și se incubează la $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ timp de 24-48 ore. Microorganismul este identificat printr-un cod numeric obținut luând în considerare reacția colorimetrică a testului biochimic ca urmare a creșterii și culoarea sondei care conține suportul cromogen.

Alte sisteme de identificare includ: Auxcolor (Bio-Rad), Candifast, Fungicrom (International Microbio), precum și mediile cromogene: Candichrom II, Albicans ID2 agar, CHROMagar candida, Oxoid Chromogenic Candida Agar.

C. albicans fermentează glucoza și maltoza, nu fermentează zaharoza, lactoza și rafinoza. *C. tropicalis* fermentează glucoza, maltoza și zaharoza, dar nu fermentează lactoza și rafinoza. *C. krusei* fermentează doar glucoza. *C. guilliermondii* fermentează glucoza și zaharoza. nu fermentează maltoza, lactoza și rafinoza.

Sensibilitatea la antifungice - antifungigrama. Etapa finală a diagnosticului micologic o reprezintă efectuarea antifungigramei. Determinarea sensibilității levurilor la antifungice se bazează pe creșterea sau inhibiția creșterii acestora în prezența diferitelor substanțe antifungice. ATB-fungus testează sensibilitatea la 6 antifungice: 5-fluorocitozină, amfotericină B, nystatin, miconazol, econazol, ketoconazol. Citirea rezultatelor se face după 24-48 ore de incubare la 30°C , rezultatele exprimându-se în sensibil și rezistent. Sistemul automat Vitek 2C permite testarea sensibilității la amfotericină B, 5-fluorocitozină, fluconazol, micafungin, caspofungin, voriconazol.

Antifungigrama - metoda Kirby-Bauer. Antifungigrama clasică difuzimetrică este un test calitativ.

Principiul testării sensibilității unui inocul din cultura cu fungi patogeni este similar cu cel al testării față de medicamentele antibacteriene. Pe suprafața unui mediu de cultură agarizat (mediul Sabouraud) se însămânțează un inoculul fungic standardizat peste care se aplică discuri de antifungice. După incubarea la 37°C pentru speciile de *Candida* se citesc diametrul zonelor de inhibiție iar sensibilitatea este clasificată pe categorii: S (sensibil), R (rezistent). În prezent tehnica nu este standardizată pentru toate antifungicele, dar datorită simplității poate fi folosită în infecțiile fungice curente, non-sistemic.

Tratament: În prezent, există o gamă variată de antifungice, clasificate, în general, după modul de acțiune în: azoli (Clotrimazol, Ketoconazol etc.), poliene (Amfotericina B, Nistatin etc.), echinocandine (Caspofungin, Micafungin etc.), antimetaboliți (5-flucitozina).

Diagnosticul del aborator al afecțiunilor produse de mucegaiuri

Genul *Aspergillus*

Reprezentanții genului sunt: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A.flavus*, *A.versicolor* sunt fungi filamentoși și rezistenți.

Semnificația clinică. Infecția umană este favorizată de existența unor leziuni bronșice sau pulmonare sau este condiționată de deficitul imun cauzat de cortico-terapie, iradiere, imunodepresoare etc.

Diagnostic de laborator. Produsele patologice sunt reprezentate de spută, lichid de spălătură bronho-alveolară, fragmente de țesut recoltate prin biopsie, sânge.

Cultivare. *A. fumigatus* crește pe mediu Sabouraud fără cicloheximid, la 37°C, în aproximativ 3 zile (uneori mai târziu). Coloniile sunt de culoare verde-închis. Coloniile de *A. flavus* sunt galben-verzui (pe fața opusă a plăcii, coloniile sunt roșii-brune), cresc după aproximativ o săptămână de incubare la 37°C, iar cele de *A. niger* sunt alb-gălbui, și devin apoi negre (pe dosul plăcii sunt alb-gălbui).

La examenul microscopic din cultură, *A. fumigatus* prezintă capete sporulante cu vezicule și un șir de filide la nivelul celor două treimi externe ale suprafeței. Conidiile sunt dispuse în lanțuri paralele. *A. niger* prezintă capetele sporulante cu conidiofori, vezicule globuloase și filide dispuse în unul sau două șiruri pe toată suprafața.

Recent au fost introduse teste serologice comerciale (Platelia Aspergillus ELISA, Bio-Rad), utilizând metoda ELISA dublu-sandwich pentru detectare antigenemiei din infecțiile invazive.

Detectia antigenelor

1) Evidențierea antigenelor galactomannan în ser, urină, lavaj bronhoalveolar este utilă în diagnosticul aspergilozei invazive și în evaluarea răspunsului la tratament.

Corelație : - dispariția antigenelor semnifică vindecarea,

- menținerea antigenelor semnifică o evoluție nefavorabilă.

2) Platelia Aspergillus (EIA- Sanofi Diagnostic Pasteur)

Determinarea markerului 1,3 Beta-D-Glucan (BG) - marker pentru infecție invazivă, recomandat de 2-3 x/săptămână.

Serologia - titrarea Ac este utilă în infecția invazivă.

Micotoxinele sunt substanțe chimice produse de anumite specii de mucegaiuri (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., etc.). Ele pot fi puse în evidență și în sporiile acestora sau în substratul pe care cresc fungii.

Există o varietate foarte mare de micotoxine dar nu toate sunt importante din punctul de vedere al siguranței alimentației umane. Cele mai importante micotoxine sunt aflatoxinele, ocratoxinele, patulina și ergotoxina. Aflatoxina este o substanță toxică cu potențial cancerigen și imunorepresiv produsă de anumite tipuri de mucegaiuri. Prima dată aflatoxina a fost identificată la *Aspergillus flavus* (mucegai de la care i s-a dat și denumirea). Aceste substanțe produc afecțiuni grave mai ales la nivelul ficatului și al vezicii biliare.

Sensibilitate la antifungice. *Aspergillus* sp. sunt sensibile la itraconazol, 5-fluorocitozină. Sunt rezistente la amfotericină B.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR VIRALE

Metode:

A. Citologia

B. Microscopia electronică

C. Cultivarea

D. Serologia

E. Metode moleculare (detectia de material genetic i.e. acizi nucleici)

Citologia

Citologia este o metodă rapidă care presupune detectia efectelor produse de virus asupra structurilor celulare: modificări morfologice, apariția de nuclei multipli în celulele infectate, liza celulelor infectate, vacuolizarea, formarea de sinciții prin fuziune între celule, apariția de incluziuni intranucleare/intracitoplasmice, cilicitoftoria (vezi mai jos).

Citologia este aplicabilă într-o mare varietate de infecții virale. Astfel, infecțiile oculare, respiratorii, genitale și ale tractului urinar reprezintă localizări care se pretează foarte bine la recoltarea de probe biologice în vederea diagnosticului citologic rapid.

Prezentăm în cele ce urmează câteva exemple de aplicații ale citologiei în diagnosticul infecțiilor virale.

Citologia urinară poate releva modificări celulare în infecții cu cytomegalovirus (CMV), herpes simplex virus (HSV), papovavirusuri etc. Infecția cu CMV produce efecte citologice cum sunt: celule mărite de volum, cu incluziuni intranucleare mari și incluziuni citoplasmice bazofile.

În pneumonia cu virus rujeolic, care poate surveni la persoane imunosupresate, se pot observa celule epiteliale gigante multinucleate, cu incluziuni eozinofile intranucleare și intracitoplasmice, însă modificări similare sunt produse și de infecțiile cu virus sincițial respirator.

În infecții cu adenovirusuri, celulele prezintă incluziuni mari intranucleare și ciliocitoftorie (smocuri de cili, ramașite ale epiteliului ciliat bronșic, prezente în diferite fluide biologice, cum ar fi secrețiile respiratorii).

De menționat că modificările celulare descrise în exemplele de mai sus pot fi nespecifice sau comune mai multor afecțiuni virale și non-virale, astfel încât diagnosticul etiologic necesită efectuarea de teste suplimentare.

Microscopia electronică

Microscopia electronică permite detecția și identificarea virionilor în probe clinice prin vizualizarea directă a particulelor virale. Metoda are o specificitate înaltă însă necesită echipamente costisitoare (atât ca preț de achiziție cât și ca întreținere), personal înalt calificat și experimentat, sensibilitatea metodei este relativ scăzută (necesită prezența unui număr mare de particule virale în proba examinată pentru un rezultat pozitiv), este laborioasă și presupune examinarea a câte unei sigure probe (ca atare nu este aplicabilă în diagnosticul de rutină).

Aplicabilitate: vizualizarea rotavirusurilor în probe de materii fecale, a virusului rabic în probe de țesut cerebral, vizualizarea virionilor de virus gripal, a filovirusurilor (e.g. Ebola) etc.

Cultivarea

Virusurile pot fi cultivate pe culturi celulare și pe ouă embrionate.

1. Culturi celulare

Unele virusuri pot fi cultivate pe culturi de celule, diagnosticul bazându-se pe efectele ceșterii virale asupra celulelor din cultură.

Sunt utilizate următoarele tipuri de culturi celulare:

- Primare – obținute din organe de animale prin liza enzimatică și creștere în monostrat la care se adaugă factori de creștere (de exemplu, ser de vițel),
- Secundare – obținute prin disociere (cu tripsina) a culturilor celulare primare urmată de transferuri (pasaje) succesive ale inoculului viral de cercetat,
- Linii celulare – celule tumorale, celule “imortalizate” – procesul presupune o multiplicare continuă indusă artificial în scopuri experimentale; acestea pot susține un număr infinit de transferuri (pasaje).

Exemple:

- Cultura primară de celule renale simiene (de maimuță) poate fi utilizată pentru cultivarea orthomyxovirusurilor, paramyxovirusurilor, a unor enterovirusuri, adenovirusuri

- Culturi de celule diploide fetale – utilizate pentru cultivarea herpesvirusurilor, picornavirusurilor, adenovirusurilor

2. Ouă embrionate de găină: utilizate pentru cultivarea virusurilor gripale. 15.4. Serologia
Metodele serologice sunt utile în cazul virusurilor non-cultivabile, pentru virusuri cu evoluție lentă a infecției precum și pentru evaluarea răspunsului imun.

Principalele metode serologice utilizate sunt:

1. Reacția de fixare a complementului (RFC);
2. Hemaglutinoinhibarea (HAI);
3. Reacția de neutralizare;
4. Imunofluorescența directă și indirectă;
5. Reacții de aglutinare pasivă: Latex-aglutinarea; hemaglutinarea pasivă;
6. Testele imunoenzimatice: ELISA - "enzyme-linked immunosorbent assay"; Western blot;
7. Teste radioimune ("Radioimune assay" - RIA)

1. Reacția de fixare a complementului (RFC)

RFC are aplicabilitate în diagnosticul unui mare număr de infecții virale (herpesvirusuri, adenovirusuri) dar și bacteriene (sifilis), însă în ultimele decade locul acestei metode a fost treptat luat de reacțiile bazate pe tehnici imunoenzimatice (a se vedea principiul RFC în volum sem I).

2. Hemaglutinoinhibarea (HAI)

Acizii nucleici ai unor virusuri codifică proteine de suprafață care au capacitatea de a aglutina hematiile unor specii animale. De exemplu, virusurile gripale posedă o proteină de anvelopă numită hemaglutinina (HA) care se leagă de hematii determinând aglutinarea acestora (hemaglutinare). Reacția hemaglutininei virale cu hematiile are ca rezultat formarea unei rețele de celule aglutinate care se vor dispune neregulat în tubul sau godeul din placa de microtitrare în care se efectuează reacția. Hematiile neaglutinate se vor depune pe fundul tubului sau godeului sub forma unui buton compact.

Figura 69: Reacția de hemaglutinoinhibare (HAI)

Hemaglutinarea poate fi utilizată pentru a releva prezența virusului în culturi celulare infectate iar identitatea virusului sau a anticorpilor specifici din serul pacientului pot fi determinate prin HAI (inhibiția specifică a acestei hemaglutinări).

Principiul testelor de HAI se bazează pe acțiunea anticorpilor specifici anti-virali (de exemplu anti-virus gripal) care vor preveni atașarea virusului la hematii. Prin urmare hemaglutinarea este inhibată în prezența anticorpilor specifici anti-virali.

Test POZITIV (prezența anticorpilor specifici anti-virali în serul testat) = hemaglutinare absentă.

Test NEGATIV (serul de testat nu conține anticorpi specifici anti-virali) = hemaglutinare prezentă.

Metoda este aplicabilă în diagnosticul infecțiilor cu virusuri care au capacitatea de a produce hemaglutinarea, e.g. virusuri gripale, paragripale, adenovirusuri, virusul rubeolic, alphavirusuri, bunyavirusuri, flavivirusuri și unele tulpini de picornavirusuri.

3. Reacția de neutralizare (seroneutralizare) se bazează pe capacitatea anticorpilor neutralizanți specifici de a bloca (neutraliza) antigenele corespunzătoare. Spre exemplu, în cazul virusurilor cultivabile, adăugarea de anticorpi neutralizanți determină inactivarea (neutralizarea) virusului respectiv indicată de absența efectelor asupra culturii celulare. Prezența anticorpilor neutralizanți în serul unui pacient reprezintă un marker al infecției cu virusul respectiv sau o evidență serologică a vaccinării.

Metoda este aplicabilă în infecțiile cu virusuri gripale, paragripale, rotavirusuri, herpesvirusuri etc.

4. Imunofluorescență directă și indirectă

Imunofluorescența s-a dovedit foarte valoroasă în identificarea antigenelor virale în celule infectate din produse biologice sau în culturi celulare inoculate cu probe biologice recoltate de la pacienți. Produsele biologice pot fi recoltate din tractul respirator superior, tractul genital, mucoasa oculară sau piele cu ajutorul tamponelor sterile sau prin aspirație nazofaringiană, lavaj traheal, bronșic, puncție pleurală, peritoneală sau cerebrospinală. IF directă și indirectă sunt aplicabile în infecțiile respiratorii cu orthomyxovirusuri, adenovirusuri și herpesvirusuri. De asemenea, metoda are aplicabilitate și pentru țesuturi, fiind utilizată în biopsii, pentru diagnosticul infecțiilor cu herpesvirusuri, sau la necropsii din țesuturi cerebrale pentru diagnosticul post-mortem al rabiei.

5. Reacții de aglutinare pasivă: latex-aglutinarea; hemaglutinarea pasivă

Aceste teste detectează prezența de anticorpi specifici utilizând particule sau celule inerte (particule latex sau hematii) acoperite cu un antigen cunoscut. Când proba biologică de testat conține anticorpii respectivi, la contactul cu particulele inerte acoperite cu antigen se va produce aglutinarea ca urmare a reacției antigen-anticorp (test pozitiv). În absența anticorpilor în proba de testat, particulele inerte acoperite cu antigen nu se vor aglutina (test negativ). Aplicațiile acestor metode includ teste disponibile comercial sub forma de kituri pentru diagnosticul infecțiilor cu rotavirusuri, adenovirusuri, virusuri gripale etc. dar și pentru infecții bacteriene (e.g. infecții streptococice - determinare de grup), determinare de grup sanguin etc.

6. Teste imunoenzimatice: ELISA - "enzyme-linked immunosorbent assay"; Western blot (a se vedea capitolul de reacții antigen-anticorp din vol I de Lp)

Aplicabilitatea testelor imunoenzimatice este foarte largă, incluzând o gama variată de infecții bacteriene, virale, fungice, etc. Printre infecțiile virale în care tehnicile imunoenzimatice reprezintă baza diagnosticului etiologic amintim: infecțiile cu virusuri hepatice (A, B, C, D), infecția HIV, rujeola, rubeola, infecția cu virus Epstein-Barr, infecția cu virus urlian.

7. Teste radioimune ("Radioimune assay" - RIA) (a se vedea capitolul de reacții antigen-anticorp din vol I de Lp)

Metode moleculare

Metode de diagnostic molecular al infecțiilor virale

a) Sondele ADN sunt utilizate pentru detecția sensibilă și specifică a genomului viral; detecția se bazează pe complementaritatea dintre secvența sondei ADN și secvența unei anumite secțiuni din genomul virusului de cercetat; sondele sunt marcate cu nucleotide tratate radioactiv sau chimic. b) Hibridizarea in situ - detecția de secvențe de genom viral în biopsii de țesuturi cu ajutorul sondelor ADN

c) Tehnicile de hibridizare de tip "Dot blot"

"Southern blot" – hibridizarea ADN-ADN: ADN-ul viral este separat prin electroforeză, transferat pe filtru de nitroceluloză și identificat pe baza mobilității electrofortetice și prin hibridizare cu sonde ADN marcate.

"Northern blot" – hibridizarea ARN-ADN: ARN viral este separat electroforetic, transferat pe filtru de nitroceluloză și detectat prin sonde ADN marcate.

d) Polymerase chain reaction (PCR) – Se bazează pe replicarea semiconservativă a ADN. Se utilizează în biologia moleculară pentru a obține un număr foarte mare de copii de acid nucleic viral, bacterian, etc (amplificare) urmată de identificarea produsului amplificării.

Diagnosticul de laborator al gripei

Principalele metode utilizate în infecția cu virusuri gripale (de tip A și B) sunt: 1. Cultivarea virusurilor

2. Imunofluorescența directă

3. Testele serologice

4. Testele rapide de detecție a antigenelor virale

5. Metodele de diagnostic molecular

a. amplificarea acizilor nucleici b. secvențierea acizilor nucleici

1. Cultivarea virusurilor gripale reprezintă metoda tradițională pentru diagnosticul etiologic al gripei și presupune recuperarea virusului din probe clinice prin propagare în linii celulare de mamifere sau în ouă embrionate. Introdusă în anii 1940, cultivarea este și astăzi considerată unul dintre “standardele de aur” în diagnosticul infecțiilor virale. Metoda se realizează prin inocularea liniilor celulare sau a ouălor embrionate cu probe biologice și propagarea (realizarea de reinoculări sau “pasaje” succesive) timp de 7-10 zile. Diagnosticul se realizează prin observarea și monitorizarea efectului citopatic, iar confirmarea etiologiei gripale se realizează prin marcare cu anticorpi specifici, hemadsorbție sau microscopie cu imunofluorescență.

2. Imunofluorescența directă se realizează sub forma testului direct cu anticorpi fluorescenți (DFA = Direct Fluorescent Antibody Test). Testul DFA cunoscut și ca testul cu anticorpi imunofluorescenți (IFA = immunofluorescent antibody test), folosește marcarea directă a celulelor epiteliale respiratorii din probele de exudat sau aspirat naso-faringian cu anticorpi specifici anti-virus gripal cuplați cu substanțe fluorescente. Diagnosticul se realizează prin examinarea cu microscopul cu fluorescență care permite vizualizarea particulelor fluorescente (anticorpii fluorescenți fixați la antigenele virale). Metoda este mai rapidă și mai ușor de efectuat decât cultivarea, însă nu oferă posibilitatea identificării subtipurilor virusului gripal de tip A.

3. Testele serologice cel mai frecvent utilizate în detectarea anticorpilor specifici anti-gripali sunt hemaglutinoinhibarea (HAI), neutralizarea, fixarea complementului și ELISA.

a. Testul HAI se bazează pe capacitatea anticorpilor anti-hemaglutinina de a preveni atașarea virusului gripal la hematii ale diferitor specii (om, găină, cal, cobai). Testul se realizează cu diluții seriale de ser, iar diluția cea mai mare care previne hemaglutinarea reprezintă titrul HAI al serului respectiv.

b. Neutralizarea este un alt test care măsoară nivelul de anticorpi specifici anti-gripali în urma infecției sau după vaccinare. Metoda se bazează pe capacitatea anticorpilor specifici anti-virus gripal de a neutraliza virusul, prevenind astfel infectarea culturilor de celule. Deși testul este mai sensibil decât HAI, aplicarea sa în diagnosticul de rutină este restricționată deoarece presupune utilizarea de particule virale infecțioase în laboratoare cu nivel de biosecuritate 2+ sau

c. Fixarea complementului este o metodă bazată pe imunodifuzie care măsoară răspunsul în anticorpi față de proteinele virale. Datorită sensibilității mai scăzute, metoda a fost înlocuită de HAI, neutralizare sau ELISA.

d. Testele ELISA sunt disponibile fie sub forma de kituri cu plăci de nitroceluloză a 96 de godeuri fie sub forma de stripuri de hârtie (teste rapide). Una dintre limitele majore ale

testelor ELISA o reprezintă sensibilitatea mai scăzută în comparație cu tehnicile bazate pe amplificarea de acizi nucleici.

4. Testele rapide de detecție a antigenelor virale utilizează anticorpi monoclonali împotriva nucleoproteinelor virale și se bazează fie pe tehnici ELISA fie pe imunocromatografie. Sunt disponibile sub formă de casete, stripuri sau carduri, se efectuează facil și rapid (aproximativ 30 minute), iar rezultatele se interpretează vizual pe baza de modificări de culoare. Aceste teste sunt foarte utile pentru diagnosticul rapid al gripei, rezultatele fiind ulterior confirmate și completate prin metode de diagnostic molecular.

5. Metodele de diagnostic molecular a. Amplificarea de acizi nucleici

- RT-PCR (reverse-transcription PCR) este metoda moleculară cel mai frecvent utilizată pentru identificarea virusurilor gripale. Alături de cultivarea virală, este considerată "standard de aur" în diagnosticul gripei. Tehnica include 3 etape esențiale: (1) extracția ARN viral din proba clinică (exudat nasofaringian, aspirat bronșic); (2) revers-transcripția ARN viral într-o catenă unică de ADN complementar (ADNc) sub acțiunea revers-transcriptazei; și (3) amplificarea și detecția produsului amplificat.

- Alte metode de amplificare de acizi nucleici: SAMBA (Simple Amplification-Based Assay), NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)

b. Secvențierea acizilor nucleici (secvențierea genomică) determină ordinea (secvența) nucleotidelor (A, U, C, G) în fiecare dintre genele din genomul viral (ARN). Se poate realiza secvențierea întregului genom viral (whole genome sequencing) sau secvențierea parțială (partial-genome sequencing) care se focusează pe secvențierea genelor hemaglutininei (HA) și neuraminidazei (NA) care codifică cele două proteine de suprafață ale virusurilor gripale. Aceste proteine de suprafață sunt responsabile de numeroase aspecte ale infecției cum ar fi răspunsul la terapia antivirală, potențialul zoonotic (infecția omului cu virusuri care infectează animalele), gradul de similitudine între virusurile gripale circulante și tulpinile utilizate în vaccinuri, etc.

Diagnosticul de laborator al hepatitelor virale

Termenul de "hepatită virală" desemnează o inflamație acută sau cronică a ficatului determinată de o infecție cu unul dintre "virusurile hepatice" identificate până în prezent. De altfel, tropismul principal pentru țesutul hepatic este singurul caracter comun al acestor virusuri, în rest ele fiind diferite taxonomic, structural, patogenetic și evolutiv.

În cazul diagnosticului de hepatita (inflamație a ficatului), susținut clinic și biochimic, etiologia virală poate fi confirmată prin teste specifice. În cele ce urmează sunt redate principalele metode utilizate în diagnosticul etiologic al hepatitelor virale.

Diagnosticul de laborator al infecției cu virus hepatitic A (HAV) se bazează pe următoarele teste:

1. Anticorpii anti-HAV IgM prin ELISA. Testul este înalt sensibil și specific atunci când se realizează din seruri recoltate de la persoane cu simptome tipice de hepatită acută (icter, manifestări digestive acute). De obicei, IgM anti-HAV sunt deja detectabili cu 5- 10 zile înainte de instalarea simptomelor și rămân la niveluri ridicate în ser timp de 4-6 luni. După această perioadă, titrul IgM anti-HAV începe să scadă în paralel cu creșterea titrului anticorpilor IgG anti-HAV care vor persista, în general, toată viața în serul pacienților care au trecut prin infecție. De asemenea, IgG anti-HAV sunt detectați și în serul persoanelor vaccinate.

2. Microscopia electronică permite vizualizarea și identificarea virionilor HAV în probe de scaun sau de sânge la pacienții cu hepatită virală A. Metoda este de înaltă sensibilitate și specificitate, însă este costisitoare și rar utilizată pentru diagnosticul de rutină.

3. Metodele moleculare utilizează tehnici de amplificare a acizilor nucleici (PCR) din probe de ser, scaun și țesut hepatic. Sensibilitatea și specificitatea acestor metode sunt de asemenea foarte ridicate, însă datorită costurilor relative mari sunt mai rar folosite în diagnosticul de rutină. Ele pot fi de mare utilitate în investigarea epidemiilor.

Diagnosticul de laborator al infecției cu virus hepatitic B (HBV) se bazează pe următoarele teste:

1. Metoda ELISA pentru determinarea de antigene HBV și anticorpi specifici împotriva acestora:

a. Antigenul de suprafață al HBV (HBsAg) este decelabil în ser la 2-10 săptămâni de la infecție. În cazul infecțiilor acute autolimitate care evoluează spre vindecare, HBsAg devine nedetectabil după 4-6 luni de la infecție. Persistența acestui antigen în ser pentru mai mult de 6 luni reprezintă un marker serologic de cronicizare a infecției HBV.

b. Anticorpul împotriva antigenului de suprafață al HBV (anti-HBs) apar la câteva săptămâni după ce HBsAg devine nedetectabil în ser și, la majoritatea pacienților, asigură imunitatea de durată ("pe viață"). Prezența sa în ser reprezintă markerul de infecție HBV vindecată sau dovada serologică a vaccinării anti-HBV.

c. Anticorpul de tip IgM împotriva antigenului "core" al HBV (IgM anti-HBc) apar în decursul primelor săptămâni de la infecția acută și rămân detectabili timp de 4-8 luni. În perioada de "fereastră serologică" (de câteva săptămâni până la câteva luni) între dispariția HBsAg și apariția AC anti-HBs, detecția IgM anti-HBc poate fi singurul mod de a face diagnosticul de infecție acută HBV. Unii pacienți cu infecție cronică HBV sau unii purtători asimptomatici de HBV pot prezenta teste pozitive pentru IgM anti-HBc în cursul fazelor de reactivare sau reactivare a infecției cronice. Acest aspect face ca un test IgM anti-HBc pozitiv să nu fie întotdeauna un marker relevant pentru diagnosticul de infecție acută.

d. Anticorpul total (IgM+IgG) anti-HBc sunt detectabili, de regulă, la toți pacienții care au fost expuși la HBV (infecții acute sau cronice). Acești anticorpi nu oferă protecție împotriva infecției HBV ei fiind doar markeri serologici ai trecerii prin infecție.

e. Antigenul "e" al HBV (HBeAg) este o proteină virală solubilă care apare în ser în fazele precoce ale infecției acute HBV și dispare de obicei la scurt timp după nivelul maxim al alanin aminotransferazei serice. Persistența sa mai mult de 3 luni după debutul bolii este un marker potențial de cronicizare a infecției HBV. Marea majoritate a pacienților cu infecție HBV cronică și HBeAg pozitiv prezintă o afectare hepatică activă.

f. Anticorpul împotriva antigenului "e" al HBV (anti-HBe); Seroconversia spontană (negativarea HBeAg și pozitivarea anti-HBe) este de obicei asociată cu scăderea replicării HBV și o evoluție mai favorabilă.

2. Metodele moleculare – ADN-HBV poate fi detectat prin teste calitative sau cantitative. Nivelul de ADN-HBV (viremia) se măsoară de regulă prin PCR. Nivelul ADN-HBV se utilizează de obicei pentru a evalua posibilitatea și oportunitatea începerii terapiei antivirale precum și pentru evaluarea răspunsului la tratament.

Diagnosticul de laborator al infecției cu virus hepatitic D – virusul hepatitic D (agentul Delta) este un virus defectiv care nu poate infecta decât împreună cu HBV. Există două posibilități:

- Coinfecția: pacientul se infectează simultan cu HBV și HDV

- Suprainfecția: HDV infectează un pacient purtător al unei infecții HBV preexistente (de obicei o infecție cronică); în această situație, evoluția infecției este agravată

Diagnosticul etiologic se bazează pe detecția prin ELISA a markerilor serologici ai HDV (anticorpi IgM anti-HDV) și pe detecția ARN-HDV în ser prin tehnici de biologie moleculară (PCR).

Diagnosticul de laborator al infecției cu virus hepatitic C

În practica clinică, diagnosticul virologic și monitorizarea infecției HCV se bazează în principal pe utilizarea a 4 markeri:

1. anticorpii totali anti-HCV,
2. antigenul "core" HCV,
3. ARN-HCV
4. genotipul HCV.

Acești markeri sunt determinați prin metode serologice imunoenzimatice de tip ELISA (anticorpii totali anti-HCV și antigenul core HCV) și metode de diagnostic molecular (ARN- HCV și genotipul HCV).

1. Anticorpii totali anti-HCV devin decelabili după aproximativ 60 zile, așa-numita perioadă de "fereastră serologică" (perioada dintre momentul infecției și momentul în care secreția de anticorpi specifici atinge nivelul la care pot fi detectați prin tehnicile de laborator; dacă în această perioadă ARN-HCV și antigenul core HCV sunt deja detectabili). După apariția în ser, acești anticorpi persistă toată viața la pacienții care dezvoltă o infecție HCV cronică.

2. Antigenul "core" HCV poate fi detectat în serul persoanelor infectate. S-a demonstrat că nivelul seric al antigenului HCV "core" (detectabil prin tehnici ELISA) este corelat semnificativ cu nivelul ARN-HCV măsurat prin tehnici de biologie moleculară. Astfel, determinarea antigenului "core" al HCV poate constitui o alternativă la măsurarea ARN- HCV, fiind o metodă mai ușor de efectuat, mai ieftină și mai puțin grevată de riscul contaminării probelor din unele tehnici de biologie moleculară. Cu toate acestea, detecția antigenului "core" este mai puțin sensibilă iar nivelul seric al acestui marker poate varia mult de la un individ la altul.

3. Detecția și cuantificarea ARN-HCV în sângele periferic reprezintă un marker de încredere al replicării HCV. Acest marker este decelabil la 1-3 săptămâni după momentul infectant, deci cu aproximativ 1 lună mai devreme decât pozitivarea testelor serologice pentru anticorpii totali anti-HCV. Persistența ARN-HCV după o perioadă de 6 luni denotă infecția HCV cronică.

Detecția și cuantificarea ARN-HCV se realizează prin 2 categorii de tehnici de biologie moleculară:

- cele care se bazează pe amplificarea acidului nucleic țintă (cum este PCR) și
- cele care presupun amplificarea de semnal (cum sunt testele "branched DNA"): aceste tehnici folosesc multiple oligonucleotide (nucleotide "de captura") cu secvențe cunoscute care hibridizează la regiuni complementare din acidul nucleic de testat; sonde de captură, atașate la suprafața unei plăci de microtitrare (cu godeuri) se leagă la nucleotidele de captură fixând astfel acidul nucleic țintă la placă.

4. Determinarea genotipului HCV (genotiparea)

Lanțurile (catenele) de ARN-HCV se clasifică în 6 genotipuri (1-6) și un mare număr de subtipuri. Genotiparea se poate face prin așa-numita analiză directă a secvenței care constă în analiza filogenetică a secvențelor generate după amplificarea prin PCR a unei porțiuni de genom viral și compararea cu secvențe de referință. O altă metodă este hibridizarea inversă a ampliconilor (produsilor de amplificare prin PCR) cu ajutorul sondelor.

Determinarea genotipului HCV este necesară pentru stabilirea schemei terapeutice anti- HCV. Diagnosticul de laborator al infecției cu virus hepatitic E (HEV) se bazează pe detecția în ser a anticorpilor IgM anti-HEV prin ELISA și a ARN-HEV prin PCR.

De menționat că în infecțiile cu virusuri hepatitice, pe lângă afectarea predominant hepatică, pot fi afectate și alte organe și țesuturi. De exemplu, infecția cronică HCV poate determina și manifestări extrahepatice: afecțiuni limfoproliferative (crioglobulinemia), nefropatii, tiroidite, fibroza pulmonară idiopatică, porfirie cutanată tardivă, lichenul plan, poliartrita cronică.

Pe de altă parte, țesutul hepatic poate fi afectat și în cazul unor infecții cu virusuri al căror tropism principal nu este hepatocitul (CMV, EBV).

Diagnosticul de laborator în infecția HIV

Diagnosticul etiologic al infecției cu HIV se realizează prin teste ELISA, immunoblot (Western blot) și tehnici de biologie moleculară (PCR), în conformitate cu algoritmi de testare elaborate pe baza dinamicii markerilor serologici ai infecției. Markerii serologici pe baza cărora se realizează diagnosticul de infecție, stadializarea, abordarea terapeutică precum și evaluarea răspunsului la tratament sunt: ARN-HIV, antigenul p24 al HIV1, anticorpii (IgM, IgG) anti-HIV1/HIV2.

Algoritmul de diagnostic se bazează pe dinamica acestor markeri în serul persoanelor infectate. După momentul infectant, primul marker detectabil în ser este ARN-HIV (la aproximativ 10 zile de la infectare), urmat de pozitivarea testelor pentru antigenul p24 (după aproximativ 2 săptămâni) și de apariția anticorpilor anti-HIV (la aproximativ 20 de zile de la momentul infectant). Anticorpii IgM anti-HIV sunt decelabili cu testele actuale (ELISA de generația a IV-a) la 3-5 zile de la apariția antigenului p24 și la 10-15 zile de la apariția ARN-HIV; anticorpii IgG anti-HIV apar ulterior și persistă pe toată durata infecției.

Pe baza acestei dinamici a markerilor HIV, infecția se clasifică în următoarele stadii:

- Perioada de “eclipsă” (sau de “fereastră serologică”) – interval inițial (după infecție) în care nu se decelează niciun marker HIV în ser
- Perioada de seroconversie – intervalul între infecția HIV și apariția primilor anticorpi detectabili; durata acestei perioade depinde de tipul de teste folosite pentru testare și de sensibilitatea acestora
- Infecția acută – intervalul între apariția ARN-HIV detectabil și pozitivarea testelor de detecție a anticorpilor specifici; durata acestei etape depinde de asemenea de tipul de teste folosite și de sensibilitatea acestora.
- Infecția HIV instituită (cronică) – acest stadiu se caracterizează printr-un răspuns deplin în anticorpi de tip IgG detectați prin ELISA și confirmați prin test Western blot.

Principalele testele incluse în algoritmul de diagnostic sunt testele ELISA, Western blot și testele de încărcare virală (de cuantificare a viremiei).

1. Testele ELISA detectează anticorpii anti HIV1 și/sau HIV2 (teste de generația I, II, III) și antigenul p24 al HIV1. În prezent sunt disponibile și teste combinate care oferă posibilitatea detecției concomitente a anticorpilor anti-HIV și a antigenului p24 al HIV1. Testele ELISA, chiar cele de generația I și II, au o sensibilitate bună în infecția HIV instituită (cronică) însă pot să nu detecteze infecții recente aflate în perioada de “eclipsă” sau “fereastră serologică” în care persoana infectată poate prezenta un nivel ridicat al viremiei HIV, cu urmări nefaste în ceea ce privește transmiterea infecției.

2. Testele Western Blot sunt utilizate pentru confirmarea testelor repetat pozitive prin ELISA. De menționat că în cazul testelor ELISA combinate care decelează anticorpii anti-HIV 1&2 concomitent cu detecția antigenului p24 al HIV 1, confirmarea prin Western blot nu mai este necesară.

3. Testele de încărcătură virală (masurarea nivelului viremiei) cuantifica nivelul HIV în sânge. De obicei sunt utilizate pentru a monitoriza efectele tratamentului sau pentru diagnosticul precoce al infecției HIV. Sunt utilizate trei tipuri de tehnologii:

a. reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) – este o aplicație care combină tehnologia PCR cu revers-transcripția, proces care implică acțiunea unor enzime numite revers- transcriptaze care realizează conversia secvențelor de ARN în secvențe de ADN complementar (ADNc) care sunt apoi amplificate și identificate prin PCR.

b. branched DNA (bDNA) – se bazează pe oligonucleotide “de captură”, sintetizate astfel încât să aibă secvențe complementare cu regiuni ale ARN-HIV și care astfel se vor hibridiza la aceste regiuni fixând ARN-HIV la un suport solid.

c. nucleic acid sequence-based amplification assay (NASBA) este o tehnică bazată pe amplificarea materialului genetic la temperatura constantă (41°C) sub acțiunea a 3 enzime (o ARN-ază, o revers-transcriptază și o ARN-polimerază).

Marker serologic

Apariția în ser după infecție

Metode de detectare

ARN-HIV

≈10 zile

Tehnici moleculare

Antigen HIV1 p24

≈15 zile

Tehnici imunoenzimatică (ELISA)

Anticorpi anti HIV (IgM)

≈20 zile

ELISA + Western blot

Anticorpi anti-HIV (IgG)

40-50 zile

Idem

114

Având în vedere necesitatea de a depista cât mai precoce persoanele infectate cu HIV, încă de la descoperirea acestui virus în 1985, a existat interes pentru realizarea de teste rapide, efectuate din salivă. Aceste teste au la baza faptul ca anticorpii anti-HIV sunt decelabili și în salivă, deși concentrația lor în acest produs biologic este mult mai scăzută decât în sânge, iar nivelurile sunt fluctuante, ceea ce afectează sensibilitatea. Cu toate acestea, cercetările au continuat în vederea optimizării testelor din salivă care prezintă avantaje legate de recoltarea mai facilă a probelor și invazivitate redusă.

În prezent, orice test salivar pozitiv necesită confirmare prin tehnicile menționate mai sus. Conform CDC, detecția precoce este cheia întreruperii transmisiei HIV deoarece tratamentul antiretroviral instituit precoce reduce rata transmiterii și scade riscul complicațiilor infecției HIV cum ar fi pneumoniile cu germeni oportuniști și tuberculoza.

Cercetătorii de la Stanford University au raportat recent efectuarea unor studii preliminare pentru un nou test HIV din salivă care poate decela niveluri scăzute de anticorpi anti-HIV folosind antigene virale atașate la ADN care este apoi amplificat și detectat cu ajutorul echipamentelor standard (PCR). Autorii afirmă că noul test va fi de 1000 de ori sau chiar de 10.000 ori mai sensibil decât actualele teste din salivă.

