

## DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL GRIPEI

### 43.1. DATE GENERALE

#### 43.1.1. O minidefiniție

Virusurile gripale au virion sferic (ocazional filamentos la primele pasaje în embrionul de găină), cu diametrul de 80—120 nm. Nucleocapsida helicală este inclusă într-o anvelopă derivată din membrana celulei gazdă, în care sunt înfipte radiar două tipuri de glicoproteine virale: hemaglutinina (H) și neuraminidaza (N). Genomul ARN m.c. liniar «-», are asociată o transcriptază și este fragmentat în 7 sau 8 segmente, fiecare reprezentând o genă.

Sunt sensibile la eter și dezoxicolat de sodiu.

#### 43.1.2. Repere taxonomice

Virusurile gripale sunt incluse în familia *Orthomyxoviridae* (gr. *orthos* = drept, corect; *myxo* = mucus; adevăratele mixovirusuri), care cuprinde două genuri:

- *Influenzavirus* cu două specii: *virusurile gripale tip A și tip B*, care au genom cu 8 segmente;

- *Mesainfluenzavirus* cu o singură specie: *virusul gripal tip C*, care are genomul numai cu 7 segmente, pentru că o singură glicoproteină funcționează ca ligand și enzimă de distrugere a receptorilor celulari (vezi mai jos).

Diferențierea tipurilor de virus gripal se face uzual prin RFC cu antigenul nucleocapsidic.

Conform nomenclaturii Comitetului de experți al O.M.S. (1980), virusurile gripale de tip A se diferențiază în 13 subtipuri după hemaglutinină (H1—H13) și în 10 subtipuri după neuraminidază (N1—N10). Astfel există subtipurile de virus gripal A numite: H1N1; H2N2; H3N2.

#### 43.1.3. Habitat

Virusul gripal tip A infectează omul, unele mamifere (porci, cai) și păsări (rațe ș.a.), iar între tulpinile umane și animale se produc reasortări genice. Tipurile B și C sunt specific umane.

#### 43.1.4. Factori de patogenitate

Hemaglutinina funcționează ca ligand la receptori ai epitelului respirator, care conțin acid sialic. Neuraminidaza hidrolizează stratul de mucus și deschide acces virionilor spre receptorii epiteliali. Prin capacitatea lor de hidroliză acidul sialic din glicocalixul celulei gazdă, neuraminidazele joacă de asemenea rol în eliberarea virionilor din celula care i-a replicat și previn autoaglutinarea virionilor prin distrugerea resturilor de acid sialic din anvelopa virală.

Fenome de sensibilizare de tip Arthus sunt posibile la nivel pulmonar după infecții consecutive, apropiate în timp, cu variante antigenice ale virusului de tip A.

#### 43.1.5. Receptivitatea la infecția cu virusurile gripale

Receptivitatea la infecția cu virusurile gripale este generală.

#### 43.1.6. Gripa

Gripa este o infecție a tractusului respirator, care survine, epidemic sau pandemic. Boala apare după o incubajie de 1—2 zile. Obişnuit virusul este prezent în nazofaringe 1—2 zile înainte și 1—2 zile după debutul bolii. Bolnavii au frisoane, febră, stare de rău, dureri musculare, prostrație și semne de inflamație a căilor respiratorii, uneori discrete. Deosebim următoarele forme clinice ale bolii:

- gripa tipică (cu sau fără complicații);
- forme atipice (afebrile, acatările, fulgerătoare).

După gravitatea evoluției distingem forme ușoare, medii și severe.

### 43.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A GRIPEI

#### 43.2.1. Diagnosticul direct

##### 43.2.1.1. Prelevate patologice

Se examinează exsudatul nazofaringian, prelevat în primele 3 zile de boală pe tampon de vată și amprente de pe mucoasa nazală, iar în cazuri letale, fragmente din țesutul pulmonar și raclatul de pe mucoasa traheobronșică.

##### 43.2.1.2. Diagnosticul rapid

Diagnosticul rapid se bazează pe depistarea antigenului viral, mai eficient prin imunofluorescență, în amprente de mucoasă nazală sau în celulele epiteliale din secreția nazofaringiană. Se utilizează, pentru metoda directă sau indirectă, imunoglobuline fluorescente comerciale. Antigenul specific apare în citoplasmă cu aspect de conglomerate care iluminează clar.

Este recomandat și *rinocitodiagnosticul*. În acest scop se prelevă amprente de pe

mucoasa cornetelor nazale pe lame înguste de  $5 \times 100$  mm, groase de 1,5 mm (se pot folosi și lame din plastic transparent), care se introduc în cavitatea nazală. Se efectuează extemporaneu și frotiuri din exsudat nazal prelevat pe tampon. Preparatele microscopice se usucă la temperatura camerei și se mențin în baia de colorant (200 ml apă distilată, 0,1 ml soluție saturată de fucsină bazică în alcool metilic și 0,4 ml soluție saturată de albastru de metilen tot în alcool metilic) 10—15 minute. Se spală și se examinează microscopic.

Incluziunile virale din citoplasmă apar colorate în roșu ca formațiuni mici, sferice. Citoplasma și nucleul celulelor se colorează în albastru-violet.

În ultimul timp este preferat testul ELISA pentru punerea în evidență a antigenilor specifici de tip.

#### **43.2.1.3. Izolarea virusului**

Metoda de bază pentru izolarea virusului gripal din exsudatul (sau lichidul de spălătură) nazofaringian este infectarea embrionilor de găină în vârstă de 10—11 zile.

Virusul gripal tip B se dezvoltă preferențial în culturi de celule din rinichi de maimuță sau embrion uman.

Pentru inhibarea florei bacteriene, se tratează materialul de examinat cu antibiotice (500—1000 UI/ml penicilină și 200  $\mu$ g/ml streptomycină).

Se injectează volume de 0,2 ml prelevat în cavitatea amniotică și alantoidiană la cel puțin 5 embrioni, care se incubează la 37°C timp de 3—4 zile. După incubare, se răcesc embrionii 2—4 ore în frigider, apoi se aspiră lichidul amniotic sau alantoidian cu seringă sau cu pipeta Pasteur.

Acumularea virusului în embrionul de găină se testează prin RHA pe lamă sau în tuburi cu suspensie 1% de eritrocite de găină.

Virusul izolat se identifică prin RIHA, RIHAds (cu suspensie 0,4% eritrocite de cobai, dacă am izolat virusul în culturi de celule), RN, RFC.

#### **43.2.2. Diagnosticul serologic**

Examenul serologic este o metodă retrospectivă, care confirmă diagnosticul de gripă când depistează creșterea de cel puțin 4 ori a titrului anticorpilor în serul bolnavului.

Uzual se examinează seruri perechi: primul recoltat în perioada acută de boală (până la 3—5 zile), iar al doilea după a 10-a zi de boală. Serurile se testează în paralel. Pentru aceasta, primul ser îl conservăm la -20°C până în momentul testării.

Se efectuează RFC, RIHA, ELISA sau RN. La efectuarea RIHA întotdeauna se ia precauția de a distruge inhibitorii nespecifici ai hemaglutinării prin tratarea serurilor cu neuraminidază de vibron holerici urmată de inactivare timp de o oră la 60°C în baie de apă.

#### **43.2.3. Preparate biologice pentru diagnostic, profilaxie și tratament**

■ Seruri antigripale specifice de tip A, B, C și subtipuri A (H1N1, H2N2, H3N2) pentru identificarea virusurilor gripale prin RFC, RIHA ș.a.

- Antigeni specifici de tip și subtip pentru serodiagnosticul gripei.
- Vaccin viu antigripal preparat din lichidul alantoidian al embrionului de găină infectat cu tulpini vaccinale.
- Ser polivalent antigripal obținut prin hiperimunizarea căilor cu virusuri gripale de diferite tipuri. Se produce liofilizat în combinație cu antibiotice și sulfamide. Se administrează intranasal pentru profilaxie și tratamentul bolii.
- Imunoglobulină umană hiperimună antigripală obținută de la donatori imunizați cu vaccin viu antigripal de tip A și B. Se administrează intramuscular pentru profilaxia și tratamentul gripei în focare.
- Interferon leucocitar uman pentru profilaxie.
- Amantadină și rimantadină cu acțiune terapeutică la începutul bolii.
- Unguent cu 0,1—0,5% oxolină pentru administrare intranasală; antigripină în varianta pentru copii și adulți.