

## DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR VIRALE

### 46.1. DATE GENERALE

#### 46.1.1. O minidefiniție

Virusurile pe care uzual le numim «ale hepatitei» sunt un grup eterogen, care au în comun numai capacitatea de a leza hepatocitele care le replică. Dar leziuni hepatice pot determina și alte virusuri decât cele «ale hepatitei» (e. g. virusul febrei galbene etc.).

#### 46.1.2. Repere taxonomice

*Virusul hepatitei A* constituie genul *Hepavirus* al familiei *Picornaviridae*. Până recent se numea chiar *Enterovirus 72*.

*Virusul hepatitei B* este inclus în familia *Hepadnaviridae*. Virionul sferic, de 42—45 nm diametru, are o anvelopă lipoproteică, în care sunt înfipite glicoproteine virale, numite antigeni HB de suprafață (AgHBs). Nucleocapsida conține un genom ADN dublucatenar și parțial monocatenar și două enzime: o polimerază și proteinchinază. Astfel nucleocapsida este sediul celorlalți doi antigeni importanți ai virusului: AgHBc (c de la engl. core = sămbure; nucleotid, nucleu) și AgHBe (e de la enzimă). Virionii sunt sensibili la eter și detergenți. În afară de virionul sferic, complet, numit și particulă Dane, în sângele și umorile pacienților apar în concentrații mai mari particule sferice cu diametrul de 22 nm sau filamente cu diametrul de 22 nm constituite numai din AgHBs.

*Virusul hepatitei C* este provizoriu inclus în familia *Flaviviridae* (vezi partea a treia, capitolul 48). Ca toate flavivirusurile este sensibil la eter, detergenți și pH 3,0.

*Virusul hepatitei D* este un mic virus ARN nud și defectiv rezistent la eter, detergenți sau pH acid. Infectează numai asociat virusului hepatitei B. Încă nu este clasificat.

*Virusul hepatitei E* aparține probabil familiei *Caliciviridae*, ale cărei virusuri nude au virioni în formă de cupă cu diametrul de 35—40 nm și genom ARN liniar, m.c. Lipsa anvelopei face virusul rezistent la eter și detergenți.

#### 46.1.3. Habitat

Gazda naturală a virusurilor hepatitelor A, B, C și E este omul. Familia *Hepadnaviridae* cuprinde și alte virusuri hepatotrope, care infectează însă numai animalele.

#### 46.1.4. Factori de patogenitate

Funcție de ligand la receptorii celulari au capsomerele virusurilor hepatitelor A și E. La virusurile hepatitelor B și C funcția de ligand o au glicoproteinele virale din anvelopă. Virusul defectiv al hepatitei D infectează numai asociat cu virusul hepatitei B, de la care utilizează AgHBs ca anvelopă cu liganzi pentru fixarea pe hepatocit și penetrare.

Glicoproteinele virale expuse pe membrana hepatocitelor infectate persistent cu virusurile hepatitei B sau C induc reacții de sensibilizare de tip II (citolitic-citotoxice) implicate în patogenia hepatitei cronice.

#### 46.1.5. Receptivitatea la infecții cu virusurile hepatitei

Receptivitatea la infecții cu virusurile hepatitei este generală.

#### 46.1.6. Hepatitele virale

Virusurile hepatitelor C și E sunt recent descoperite. De aceea mai persistă încă în terminologia medicală denumirea de hepatită non-A, non-B (NANB), utilizată pentru hepatitele care nu puteau fi diagnosticate prin metodele și reactivii pentru hepatita B sau A și care, de fapt, sunt fie o hepatită C, fie una E.

Diferențele etiologice între hepatitele virale se reflectă mai mult în particularitățile epidemiologice și prognostice decât în cele clinice.

Indiferent de agentul etiologic, se întâlnesc forme icterice, anicterice sau subclinice.

■ *Perioada de incubație* este semnificativ mai lungă în hepatitele B și C (40—180 zile) decât în hepatita A (25—30 zile).

■ *Calea de transmitere* este predominant fecal-orală în hepatitele A și E, predominant parenterală în hepatitele B și C (transfuzii, seringi, instrumental chirurgical și stomatologic contaminat cu sânge, transmitere sexuală a hepatitei B).

■ *Vârsta incidenței maxime*: copilul și adultul tânăr pentru hepatitele A și E; adulții pentru hepatitele B și C (între vârstele de 15—29 ani frecvența crescută a hepatitei B poate fi legată de promiscuitatea sexuală și utilizarea de droguri injectabile).

■ *Complicațiile* sunt rare în hepatitele A și E. Evoluția hepatitei E poate fi gravă la subnutriți și la gravide. Infecția cu virusul hepatitei B se cronicizează însă în proporție de 5—10%, iar cu cel al hepatitei C în proporție de 30—50%, principalele urmări fiind ciroza hepatică și carcinomul hepatocelular.

### 46.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A HEPATITEI A

*Prelevate examinate*: materii fecale, sânge, urină.

*Diagnosticul rapid* se face prin imunomicroscopie electronică, radioimunotestare și ELISA.

■ Virionii se evidențiază în extractul fecal prin IME, dacă concentrația este mai mare sau egală cu  $10^4$ . Se amestecă extract 10—20% din materii fecale cu ser imun specific în raport de 9:1. Se incubează la 37°C și se centrifughează 30 minute la 10 000 rpm, după care se decantează supernatantul și se examinează sedimentul la microscopul electronic.

■ Pentru radioimunotestare se adsorb inițial anticorpul pe suprafața unui suport (în eprubete, godeuri), apoi se aplică extractul din materiile fecale pentru cuplarea antigen-anticorp pe suport. Antigenul cuplat se determină prin antiglobuline marcate cu  $^{125}\text{I}$ . Preparatul anticorpilor marcați trebuie să conțină 1—2 atomi de iod radioactivi la o moleculă de anticorp.

■ O sensibilitate înaltă o are și ELISA, care de asemenea evidențiază antigenul viral utilizând anticorpi marcați cu peroxidază.

*Diagnosticul biochimic* (metodă nespecifică) se face paralel. Dozăm în serul sangvin: aldolaza, alaninaminotransferaza (ALT), aspartataminotransferaza (AST), bilirubina.

*Diagnosticul serologic* se bazează pe evidențierea anticorpilor IgM, care apar destul de precoce, și a celor IgG. În acest scop se folosesc ELISA, ARI sau RFC.

*Preparate biologice pentru diagnostic și profilaxie specifică:*

■ Truse cu imunoglobuline marcate pentru depistarea antigenică rapidă a virusului hepatitei A.

■ Truse cu antigen viral și imunoconjugate pentru depistarea anticorpilor IgM și IgG antiviral hepatită A.

■ Imunoglobulină umană standard, care, administrată în doze de 0,1 ml/kg corp, previne boala la contactii familiari și din colectivități de copii.

## 46.3. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A HEPATITEI B

### 46.3.1. Diagnosticul direct

#### 46.3.1.1. Prelevate patologice

Se prelevă și se examinează sângele bolnavului.

#### 46.3.1.2. Diagnosticul rapid

Depistarea AgHBs se face prin RID, contraimmunoelectroforeză (CIE), reacția inversă de hemaglutinare indirectă (RIHAI), ELISA, ARI. RID și CIE sunt cele mai puțin sensibile.

În laboratoarele obișnuite destul de utilă este RIHAI, pentru care, în rezumat: pregătim diluții duble succesive ale materialului de examinat (antigenului) în soluție stabilizatoare (volum egale din soluția 30% zaharoasă și ser uman normal). Reacția se efectuează pe plăci din plastic în 3 rânduri de godeuri. Din fiecare diluție a antigenului se pipetează câte o picătură în godeul corespunzător al fiecărui rând. Apoi:

■ în godeurile din primul rând se adaugă câte o picătură din soluția stabilizatoare;

■ în godeurile din rândul doi câte o picătură de ser imun anti-Ag HBs diluat 1:10;

■ în godeurile din rândul trei câte o picătură de ser imun heterolog. Se incubează amestecul 20 minute la temperatura camerei. Se adaugă în toate godeurile câte o picătură din suspensia 1% de eritrocite sensibilizate cu imunoglobuline anti-AgHBs și se agită minuțios.

Citim rezultatele reacției după 30—40 minute. Dacă proba conține AgHBs, hemaglutinarea se observă în rândurile 1 și 3, dar lipsește în rândul 2, unde antigenul a fost neutralizat cu ser omolog.

Antigenul HBs se depistează în serul bolnavului după 1—4 săptămâni de la contagiu

(în perioada de incubație) și cu câteva săptămâni (2—8) înainte de modificările biochimice (creșterea activității aminotransferazelor).

Cantitatea de AgHBs este maximă în perioada de stare a bolii, iar în următoarele 3 luni cantitatea lui scade sau persistă. Depistarea AgHBs după un an de la îmbolnăvire indică o hepatită cronică sau un portaj asimptomatic.

Depistarea în sânge a AgHBe și AgHBc în același timp cu AgHBs denotă o infecție acută cu replicarea activă a virusului. În general, AgHBc rămâne cantonat în hepatocite și apare rar în sânge.

Persistența îndelungată a AgHBe semnifică cronicizarea procesului și un potențial infectiv crescut al sângelui și secrețiilor (spermă etc.).

Stadiul de convalescență cu vindecare microbiologică se caracterizează prin dispariția din serul bolnavului a antigenilor HBc și HBe și apariția anticorpilor față de toți cei trei antigeni virali.

Nu dispunem de posibilități practice pentru izolarea virusului hepatitei B, care poate fi cultivat numai în țesuturi de cimpanzei și în hepatocitele embrionului uman.

#### *46.3.1.3. Teste biochimice*

Testele biochimice sunt aceleași ca și în hepatita A. La bolnavii gravi nivelul aspartaminotransferazei este mai înalt ca al alaninaminotransferazei. Apare bilirubina în urină (normal absentă).

#### **46.3.2. Diagnosticul serologic**

Determinarea anticorpilor specifici față de antigenii virusului hepatitei B se efectuează prin RID, CIE, ARI, ELISA sau RHA1 cu eritrocite sensibilizate cu AgHBs.

Anticorpul anti-HBs pot fi depistați după 1—3 luni de la dispariția antigenului HBs și persistă timp de 3—4 ani.

Anticorpul anti-HBc se depistează în sânge după 3—5 săptămâni de la apariția antigenului HBs. Acești anticorpi au importanță diagnostică deosebită: servesc ca marker serologic pe parcursul primelor 1—2 luni de boală.

Anticorpul anti-HBe apar după 1—3 săptămâni de la debutul bolii și persistă câteva luni la titruri joase.

Diagnosticul hepatitei B se bazează pe depistarea antigenilor HBs și HBe și a anticorpilor anti-HBc și anti-HBe din clasele IgM și IgG. Prezența în ser a anticorpilor anti-HBc din clasa IgM indică fără echivoc hepatita B acută. Titruri înalte și stabile de anticorpi anti-HBc demonstrează prezența unei infecții cronice.

#### **46.3.3. Preparate biologice pentru diagnosticul și profilaxia specifică a hepatitei B**

■ Truse ELISA pentru depistarea și identificarea antigenilor sau anticorpilor față de antigenii virusului hepatitei B.

■ Vaccin cu AgHBs purificat din plasma purtătorilor sau, mai eficient, obținut prin inginerie genetică (clonarea genei virale care codifică AgHBs în drojii de bere). Așa este vaccinul belgian Engerix. Calendarul vaccinărilor prevede în Moldova vaccinarea nou-născuților în primele 24 ore, cu revaccinări la 1 lună și 6 luni.

#### **46.4. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A HEPATITELOR NON-A, NON-B**

Diagnosticul este dificil. Se iau în considerație datele clinicoepidemiologice. În cazul hepatitei NANB parenterală, prin teste specifice ca ARI, ELISA, trebuie excluse hepatitele A și B. În prezent se comercializează deja truse ELISA pentru depistarea antigenului HCV sau a anticorpilor anti-HCV.

Pentru hepatita NANB enterală nu este elaborat nici un test serologic. Putem depista în materiile fecale ale bolnavilor virionii prin imunoscopie electronică, folosind seruri specifice obținute de la convalescenți.

Hepatita D o diagnosticăm prin depistarea antigenului viral delta, AgHD, în ser prin ARI sau ELISA ori în ficat prin metode imunohistochimice. De asemenea putem depista prin ELISA sau ARI anticorpilor specifici din clasa IgM ori IgG. Anticorpilor anti-HDV îi căutăm numai în seruri AgHBs pozitive.