



**USAID**  
DIN PARTEA POPORULUI  
AMERICAN



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII  
AL REPUBLICII MOLDOVA

# DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR VIRALE B, C și D

## INSTRUCȚIUNI METODICE

Chișinău - 2007

Publicarea acestor instrucțiuni metodice a fost posibilă datorită suportului acordat de către poporul american prin intermediul Agenției Statelor Unite pentru Dezvoltare Internațională (USAID). Proiectul "Prevenirea HIV/SIDA și Hepatitelor virale B și C" poartă responsabilitate integrală pentru conținutul acestor instrucțiuni. Instrucțiunile metodice nu reflectă opiniile USAID sau ale Guvernului Statelor Unite ale Americii.



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA  
PROIECTUL USAID “PREVENIREA HIV/SIDA ȘI HEPATITELOR B ȘI C”

# DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR VIRALE B, C ȘI D

## INSTRUCȚIUNI METODICE

Chișinău – 2007

### ADNOTARE

Punctele de vedere ale autorilor exprimate în această publicație nu întotdeauna reflectă opinia Agenției Statelor Unite pentru Dezvoltare Internațională (USAID) sau a Guvernului SUA



CZU: 616.36-002.1+616.36-002.2+614.4+658.562

**Aprobate la ședința Consiliului de Experți al Ministerului Sănătății  
al Republicii Moldova nr. 2 din 14 iunie 2007**

Instrucțiunile metodice au fost elaborate de grupul de autori (în ordine alfabetică):

<b>Calancea Alexandru</b>	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”
<b>Caragia Svetlana</b>	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”
<b>Cojocaru Radu</b>	Centrul Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă
<b>Cotici Alexandru</b>	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”
<b>Crudu Valeriu</b>	Proiectul “Prevenirea HIV/SIDA și hepatitelor virale B și C”
<b>Gudumac Valentin</b>	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”
<b>Holban Tiberiu</b>	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”
<b>Iarovoi Petru</b>	Centrul Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă
<b>Isac Marina</b>	Centrul Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă
<b>Niguleanu Vasile</b>	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”
<b>Plugaru Ștefan</b>	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”
<b>Popa Mariana</b>	Centrul Republican de Diagnosticare Medicală
<b>Râmiș Constantin</b>	Centrul Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă
<b>Romancenco Elena</b>	Centrul Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă
<b>Rotaru Liliana</b>	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”
<b>Spânu Constantin</b>	Centrul Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă
<b>Varticean Ana</b>	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”
<b>Vrînceanu Angela</b>	Centrul Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă

Instrucțiunile metodice au fost avizate de către experții naționali:

<b>Dumbrava Vlada-Tatiana</b>	Dr. hab. în medicină, profesor universitar, Catedra medicină internă nr. 4, USMF “N. Testemițanu”
<b>Obreja Gabriel</b>	Dr. în medicină, conferențiar, Facultatea de perfecționare a Medicilor, Catedra igienă și epidemiologie, USMF “N. Testemițanu”
<b>Ghinda Sergiu</b>	Dr. hab. în medicină, profesor cercetător, Laboratorul imunologie și imunochimie, IMSP Institutul Ftiziopneumologie “Chiril Draganiuc”
<b>Lăsâi Leonid</b>	Dr. hab. în medicină, profesor universitar, Catedra biochimie și biochimie clinică, USMF “N. Testemițanu”

**Proiectul “Prevenirea HIV/SIDA și Hepatitelor virale B și C” este finanțat de către Guvernul SUA prin intermediul Agenției Statelor Unite pentru Dezvoltare Internațională (USAID).**



# Cuprinsul

Nr.	Denumire	Pag.
	<b>CONSIDERAȚII GENERALE .....</b>	<b>6</b>
<b>1.</b>	<b>ETIOLOGIA .....</b>	<b>9</b>
1.1.	Virusul hepatitei B (VHB) .....	9
1.2.	Virusul hepatitei C (VHC).....	23
1.3.	Virusul hepatitei D (VHD) .....	29
1.4.	HEPATITELE VIRALE PARENTERALE „NON B”, „NON C” .....	32
<b>2.</b>	<b>EPIDEMIOLOGIA .....</b>	<b>34</b>
2.1.	Epidemiologia hepatitelor virale pe plan global .....	34
2.2.	Epidemiologia hepatitelor virale B, C și D în Republica Moldova .....	36
2.3.	Date epidemiologice.....	38
<b>3.</b>	<b>DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR VIRALE .....</b>	<b>43</b>
3.1.	Diagnosticul serologic al hepatitelor virale .....	43
3.2.	Diagnosticul biochimic al hepatitelor virale .....	54
<b>4.</b>	<b>METODE DE DIAGNOSTIC DE LABORATOR .....</b>	<b>76</b>
4.1.	Metoda ELISA.....	76
4.2.	Diagnosticul molecular biologic al hepatitelor .....	82
4.3.	Metode de testare rapidă .....	88
4.4.	Teste de confirmare.....	89
4.5.	Metode de diagnostic clasice .....	90
<b>5.</b>	<b>CONTROLUL CALITĂȚII INVESTIGAȚIILOR DE LABORATOR.....</b>	<b>91</b>
<b>6.</b>	<b>CERINȚE DE SECURITATE BIOLOGICĂ PENTRU LABORATOARE MEDICALE .....</b>	<b>99</b>
6.1.	Codul de practici.....	99
6.2.	Echipamentele de laborator.....	101
6.3.	Manipularea deșeurilor.....	102
	<b>SURSE BIBLIOGRAFICE.....</b>	<b>104</b>
	<b>ANEXĂ. ALGORITMUL DE DIAGNOSTIC AL HEPATITELOR VIRALE .....</b>	<b>108</b>



## SUMAR

**Actualitatea** instrucțiunilor metodice „DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR VIRALE B, C și D” este argumentată prin analiza amplă a datelor literaturii de specialitate din care se constată, că în ultimii ani, se atestă creșterea prevalenței prin hepatitele virale B, C și D în plan global. În acest context, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a declarat fenomenul în cauză de o importanță primordială, iar cercetările efectuate în direcția dată – de o semnificație majoră. OMS recomandă, ca în țările cu o morbiditate înaltă a hepatitelor virale să se efectueze o monitorizare complexă a hepatitelor virale, în special a celor parenterale, cu declararea datelor obținute în această instanță pentru aprecierea impactului problemei în plan mondial.

În aceste instrucțiuni sunt descrise metodele actuale a diagnosticului de laborator al hepatitelor virale B, C și D, cu reflectarea și unor aspecte ce țin de epidemiologia, etiologia și patogeniza hepatitelor virale. Ele au drept scop punerea la dispoziția specialiștilor din domeniu materialul documentar necesar adoptării și utilizării unei metodologii tehnice unificate și corecte de diagnosticare a hepatitelor virale, ceea ce, în consecință, va contribui la consolidarea sistemului de diagnostic și supraveghere epidemiologică a hepatitelor virale, făcând posibilă aplicarea măsurilor de prevenire și control precoce și eficiente.

## DESTINAȚIA

Instrucțiunile metodice „DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR VIRALE B, C și D” sunt destinate pentru specialiștii instituțiilor medico-sanitare publice, departamentale, private și din cadrul Centrelor de Medicină Preventivă. Aceste instrucții metodice au menirea de a fi un suport în lucrul de rutină pentru medicii microbiologi, medicii laboranți, infecționiști, hepatologi, epidemiologi, rezidenți și alți specialiști care se preocupă de problemele de diagnostic de laborator al hepatitelor și în special de metodele contemporane de testare imunologică și supraveghere epidemiologică a hepatitelor virale. Instrucțiunile metodice, de asemenea, vor fi utilizate ca material didactic pentru instruirea cadrelor postuniversitare în diagnosticul de laborator al hepatitelor virale la facultatea de perfecționare a medicilor, a rezidenților și studenților în instituțiile medicale de învățământ superior și mediu.

Instrucțiunile date vor putea fi ulterior modificate și adaptate la cerințele curente ale instituțiilor medicale de profil, reieșind din evoluția situației epidemice prin hepatitele virale, cât și apariția de metode noi de diagnostic al hepatitelor virale cu performarea lor, pe măsura acumulării de noi informații privind metodele de diagnostic, profilaxie și tratament.

**ABREVIERI**

nr.	abrevieri	Denumire deplină
1.	<b>Ac</b>	anticorp
2.	<b>ADN</b>	acidul dezoxoribonucleic
3.	<b>ADCC</b>	<i>antibody dependent cell cytotoxicity</i> = citotoxicitate dependentă de anticorpi
4.	<b>ADN-CCC</b>	covalently closed circular – ADN circular închis covalent
5.	<b>Ag</b>	antigen
6.	<b>AgHBs</b>	antigen HBs
7.	<b>AgHBc</b>	antigen HBc
8.	<b>AgHBe</b>	antigen HBe
9.	<b>AgHCV</b>	antigen HCV
10.	<b>AgHDV</b>	antigen HDV
11.	<b>Ag pre-S1, pre-S2</b>	antigen pre-S1, pre-S2
12.	<b>AgHBx</b>	antigen HBx
13.	<b>AgHBpol</b>	antigen HB polimeraza
14.	<b>ALT</b>	alaninaminotrasferaza
15.	<b>Anti-AgHBs</b>	anticorpi AgHBs
16.	<b>Anti-AgHBc</b>	anticorpi AgHBc
17.	<b>Anti-AgHBe</b>	anticorpi AgHBe
18.	<b>Anti-HCV</b>	anticorpi HCV
19.	<b>ARN</b>	acidul ribonucleic
20.	<b>AST</b>	aspartataminotransferaza
21.	<b>BL</b>	bilirubina liberă
22.	<b>BC</b>	bilirubina conjugată
23.	<b>e.c.p.</b>	efect citopatic
24.	<b>EIA</b>	enzime immunoassay – teste imunoenzimatice
25.	<b>ELISA</b>	enzyme linked immunosorbent assay - test cu enzime legate de imunosorbenți
26.	<b>FA</b>	fosfataza alcalină
27.	<b>GGT</b>	gamaglutamiltranspeptidaza
28.	<b>HA</b>	hemaglutinare
29.	<b>HAI</b>	hemaglutinoinhibare
30.	<b>HAP</b>	hemaglutinare pasivă
31.	<b>IB</b>	indicele bilirubinei
32.	<b>IFA</b>	imunofluorescență
33.	<b>IFN</b>	interferon
34.	<b>IRES</b>	<i>internal ribosome entry site</i> – situs intern de începere a translației
35.	<b>Ig</b>	imunoglobulină
36.	<b>IME</b>	imunomicroscopie electronică
37.	<b>LDH</b>	lactatdehidrogenaza
38.	<b>NK</b>	natural killer
39.	<b>ME</b>	microscopie electronică
40.	<b>PCR</b>	(polymerase chain reaction) – reacție de amplificare genomică cu ajutorul polimerazei
41.	<b>RFC</b>	reacție de fixare a complementului
42.	<b>RIA</b>	(radioimmunoassay) - radioimunoanaliză
43.	<b>RHAI</b>	reacția hemaglutinare indirectă
44.	<b>RIF</b>	reacția imunofluorescentă
45.	<b>TNF-α</b>	Tumor necrosis factor- <i>alpha</i>
46.	<b>TP</b>	timpul protrombinc
47.	<b>TTP</b>	timpul tromboplastinei parțiale
48.	<b>UI</b>	unități internaționale
49.	<b>UDF</b>	enzima uridilfosfat
50.	<b>VHA</b>	Virusul hepatitei A
51.	<b>VHB</b>	Virusul hepatitei B
52.	<b>VHC</b>	Virusul hepatitei C
53.	<b>WB</b>	Western – blot



## CONSIDERAȚII GENERALE

### Importanța serviciului de laborator și necesitatea investigațiilor de laborator.

Particularitatea principală a medicinei clinice contemporane devine vădită prin utilizarea pe larg a tehnologiilor diagnostice de laborator înalt performante, care sunt vertiginos implementate în practica medicală.

Utilizarea pe larg a metodelor noi de diagnostic, suficient de diversificate și modernizate, a schimbat totalmente conceptul privind etiologia și patogeneza multor maladii infecțioase. Mai mult decât atât, baza tehnologică curentă de diagnostic permite medicului contemporan de a efectua operativ modificările de rigoare în schemele de tratament, de a crea și elabora programe eficiente pe termen lung, aplicând măsuri curative și de reabilitare mult mai eficiente, în special pentru pacienții cronici cu recidive, infecții autoimune și procese tumorale.

Necesitatea elaborării, aplicării metodelor noi de diagnostic de laborator este dictată și de faptul că în ultimul timp profilul bolnavilor infecțioși se schimbă esențial. Crește numărul formelor clinice șterse, atipice, trenante, tot mai des se depistează pacienți cu infecții mixte bacteriene și virale.

Astfel, medicina contemporană pune în fața medicului de laborator mai multe probleme:

1. stabilirea diagnozei în baza rezultatelor investigațiilor de laborator;
2. controlul eficacității tratamentului (monitorizarea tratamentului);
3. determinarea gradului de rezistență la medicamentele utilizate și corijarea schemelor de tratament;
4. evaluarea eficienței tratamentului și elaborarea pronosticului.

La toate etapele lor, aceste probleme în mare măsură pot fi rezolvate prin efectuarea testelor de laborator contemporane, înalt performante, la care se afliază metodele de imuno și genodiagnostică, reflectate în aceste instrucțiuni metodice.

## HEPATITELE. Definiție.

Hepatitele (inflamația ficatului) constituie una dintre problemele majore de sănătate publică, datorită răspândirii globale, endemicității, morbidității și mortalității crescute, cât și ratei înalte de invaliditate consecutiv cronicizării infecției.

Hepatitele virale reprezintă o grupă de infecții, răspândite larg, cu mari variații în diferite regiuni. Ele depind, în mare măsură, de factorii socioeconomi și de starea sistemului medico-sanitar; cât și de factorii mediului extern (apă, alimente – ex. HAV și HEV), cu un impact socio-economic inestimabil.

Infecția virală a ficatului, caracterizată prin tabloul clinic de tip infecțios (febră, anorexie, stare generală alterată însoțită de sindrom icteric) poate fi cauzată de numeroase virusuri. Începând cu 1970, când a fost identificat virusul hepatitei B, până în prezent au fost descoperite și caracterizate circa 10 forme nozologice independente, cu tropism primar specific pentru hepatocit, însă cu diferită apartenență taxonomică, denumite **virusuri hepatotrope**.

Unele virusuri hepatotrope, precum **v. hepatitei F** și **v. hepatitei G** încă nu au fost suficient caracterizate.

Hepatita poate fi provocată și de alți agenți de origine virală, precum *v. herpetic*, *v. citomegalic*, *v. rubeolic*, *v. amaril*, etc. - **virusuri non-hepatotrope**.

Cele cinci tipuri de hepatită virală acută, deși cu simptomatologie clinică, leziuni histologice și teste biochimice „hepatice” similare **se deosebesc esențial** prin modul de transmitere, prin gravitatea procesului patologic și, în special, prin potențialul evolutiv spre hepatită cronică, ciroză, hepatocarcinom.





Conform datelor OMS, hepatitele virale B sunt unele din cele mai răspândite patologii infecțioase din lume. Aproximativ 30% din populația globului (circa 2 mlrd de oameni) prezintă semne de infecție, induse de VHB. La nivel global, se estimează peste 350 milioane de purtători cronici ai VHB, echivalentul a mai mult de 5% din populația globului. Dintre ei, 25% (cca 1 milion) decedează anual din cauza hepatitei virale B sau a complicațiilor asociate cu aceasta. Totodată, VHB este responsabil, în 80% de cazuri, de carcinom hepatocelular, constituind, după tutun, al doilea agent cancerigen. Hepatita virală B este considerată a 9-a cauză a mortalității în lume.

Nu mai puțin distrugător este rolul VHC, virus transmis parenteral, unul din factorii de risc principali fiind utilizarea intravenoasă a drogurilor. OMS estimează că actual circa 3% din populația globului este infectată cu VHC, care, de asemenea, prezintă o problemă majoră a sănătății publice. Majoritatea persoanelor infectate cu VHC nu prezintă simptome sau acuze în fazele timpurii ale maladiei și, astfel, nu cad sub incidența supravegherii, însă ele prezintă un risc și o sursă de infectare majoră pentru alte persoane. Existența diferitor subvariante a VHC, distribuite neuniform pe tot globul, cu o sensibilitate diferită față de tratamentele antivirale, creează dificultăți mari în vederea stabilirii unei diagnoze corecte și la timp a HVC.

*Pentru Republica Moldova hepatitele virale reprezintă mai mult decât o prioritate a domeniului sănătății publice. Acestea constituie o problemă complexă, care afectează toate componentele societății și la soluționarea căreia este necesară multă competență, înalt profesionalism suplinit cu o bază materială și tehnică eficientă.*

## SCURT ISTORIC

Primele mențiuni despre hepatitele virale, denumite inițial și ca „icter cataral”, „icter contagios” au apărut cu foarte mult timp în urmă, ele datând din anul 750 (e.n.). Pe parcursul secolelor au fost observate ictere febrile care se declanșau epidemic în timpul războaielor și care erau denumite „boală militară” sau „icter soldățesc”. Ulterior, afecțiunea a fost observată și între perioadele de epidemii, fiind cunoscută sub numele de „icter infecțios benign”.

În 1883, Lurman descrie pentru prima dată hepatita cu transmitere parenterală. În paralel, studii mai ample, privind geneza hepatitelor, au fost făcute și de medicul rus Botchin, care a recunoscut caracterul contagios al hepatitelor. Astfel, o perioadă îndelungată, toate hepatitele de origine infecțioasă erau denumite „Boala Botchin”.

În cel de-al doilea război mondial, hepatita virală a provocat o adevărată epidemie (a cuprins foarte multe teritorii și țări) - numai în armata germană au fost depistate peste 6.000.000 de cazuri. Acestea, de multe ori, fiind asociate cu vaccinarea antiamarilă (febra galbenă), ce conținea ser uman care, probabil, provenea de la un purtător aparent sănătos de virus hepatic B.

În a 2 jumătate a sec. XX se face deja diferențierea dintre hepatitele care se transmit enteral cu hepatitele care se transmit parenteral (prin sângele infectat).

Un aport enorm în studierea genezei hepatitelor virale a adus-o B. Blumberg. În 1963 el descoperă în sângele unui aborigin din Australia un antigen nou, denumit **antigen australian**, care, mai târziu a fost identificat ca antigen viral de suprafață (**AgHBs**).

Consecutiv, la bolnavii hemofilici au fost descoperiți și anticorpii față de AgHBs. Sistemul Ag-Ac detectat a fost asociat cu hepatita, care apărea foarte des la acești pacienți după transfuzii de sânge. În 1976, Blumberg primește Premiul Nobel pentru această descoperire și pentru aportul adus în studiul hepatitelor virale.

Câțiva ani mai târziu, Prinț a expus părerea precum că, antigenul australian reprezintă markerul serologic al hepatitei virale B.

În sfârșit, în anul 1970, la microscopul electronic a fost descoperit și vizualizat direct în serul sangvin al unui pacient virusul hepatitei virale B (VHB) cu antigenul de suprafață, ulterior fiind numit particula Dane, după numele cercetătorului care l-a descoperit.



În 1973 este descoperit AgHBe.

În 1974 a fost izolat genomul VHB. Iar la sfârșitul anilor '70 a fost descifrată consecutivitatea primară a nucleotidelor în genomul VHB.

În paralel, au fost descoperite celelalte virusuri hepatice: A, C, D, E și altele, care sunt încă în studiu.

Astfel, în anul 1989 a fost descoperit virusul hepatitei C (VHC) și în anul 1990 virusul hepatitei E (VHE), care au dus la „dezmembrarea” și la „sfârșitul noțiunii” de hepatită non-A, non-B.

În 1991 s-a stabilit un nou cadru nozologic al maladiilor hepatice, care include cinci entități distincte de hepatite virale (HVA; HVB; HVD; HVC; HVE), determinate de cinci virusuri particulare, cu marcheri specifici proprii: VHA, VHB, VHD, VHC și VHE.

**Tabelul 1.** Agenții cauzali ai hepatitelor virale

Fam. Picornaviridae	Fam. Hepadnaviridae	Fam. Flaviviridae	V. defectiv	Fam. Caliciviridae (?)
v. hepatitei A (VHA)	v. hepatitei B (VHB)	v. hepatitei C (VHC)	v. hepatitei delta (VHD)	v. hepatitei E (VHE)

**Tabelul 2.** Principalele caracteristici ale infecțiilor provocate de virusurile hepatice

Virusul	VHA	VHB	VHC	VHD	VHE	VHG
<b>Evoluția</b>	Acută	Cronică	Cronică	Cronică	Acută	Nedefinită
<b>Descoperirea</b>	1973	1965	1989	1977	1990	1996
<b>Calea de infectare</b>	Fecalo-oral, sexual	Sexual, parenteral	Parenteral sexual	Parenteral	Fecalo-oral	Parenteral, posibil sexual
<b>Vaccin</b>	Da	Da	Nu	Indirect prin vaccin VHB	Nu	Nu
<b>Pronostic</b>	Simptome până la 6 luni	Purtător, ciroză, cancer hepatic. Simptome extra-hepatice	Purtător, ciroză, cancer hepatic. Simptome extra-hepatice	Poate exacerba hepatita virală B.	Neclar. Până la 20% mortalitate la femeii gravide	Neclar



## I. ETIOLOGIA

### I.1. VIRUSUL HEPATITEI B (VHB)

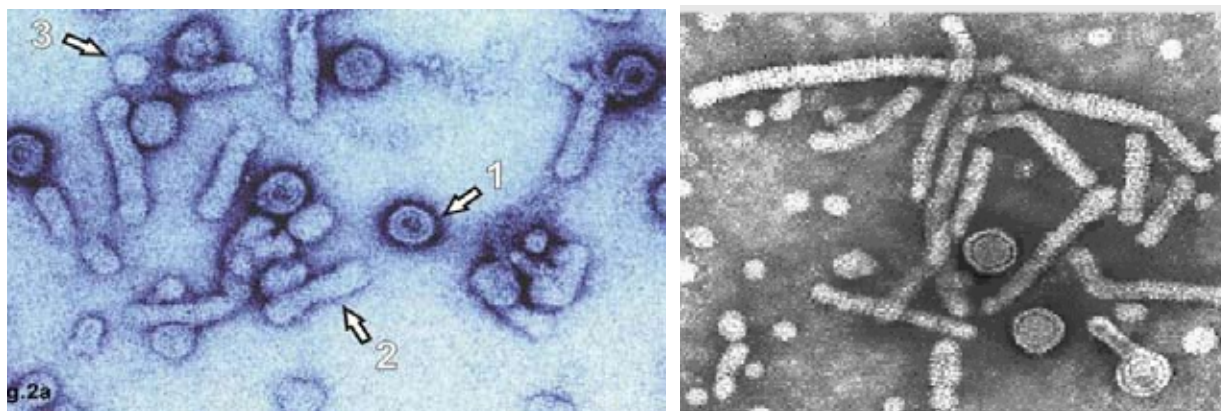
Primul component al VHB a fost evidențiat în anul 1963 de către B. Blumberg în sângele unui aborigin din Australia fiind denumit **antigen australian** și care mai târziu a fost identificat ca antigen viral de suprafață (AgHBs). Virionul complet a fost observat prima dată în anul 1970, în serul sangvin, de către Dane și colaboratorii săi, ulterior fiind denumit **particula Dane**.

#### Caractere morfologice și structurale

VHB este un virus ADN (reieșind din apartenența acidului nucleic viral), de formă sferică, cu diametrul de 42 nm, compus din *nucleocapsida core* (AgHBc), acoperit cu un *înveliș extern lipoproteic* (*peplos*) ce conține *antigenul de suprafață* (AgHBs).

#### Figura 1. Microscopia electronică al particulelor VHB.

Virioni infecțioși de 42 nm (1) (Particulele Dane). Formațiunile sferice (3) și filamentoase (2) neinfecțioase. Desen preluat [www.molecular-virology.uni-hd.de](http://www.molecular-virology.uni-hd.de)



#### Clasificare

VHB aparține familiei *Hepadnaviridae* (*Hepar* – ficat, tropism pronunțat față de hepatocite; ADN – acidul nucleic viral; *viridae* – sufixul care determină denumirea familiei), genul *Orthohepadnavirus*.

#### Tabelul 3. Clasificarea VHB

Familia <i>Hepadnaviridae</i>	
Genul <i>Orthohepadnavirus</i> (ortho – drept)	Genul <i>Avihepadnavirus</i> (avium – pasăre)
- v. <i>hepatitei B</i> (VHB) – virus care provoacă hepatita virală la om și animale;	- v. <i>hepatitei B al raței de Peking</i> DHBV (duck hepatitis B virus);
- v. <i>hepatitei marmotei</i> WHV (wood-chuck hepatitis virus);	- v. <i>cocostârcului gri</i> HHBV (heron hepatitis B virus).
- v. <i>hepatitei veruștii</i> GSHV (ground squirrel hepatitis virus).	

Particularitatea principală a tuturor virusurilor din familia *Hepadnaviridae* este prezența virionului cu un înveliș extern, ce conține **ADN circular bi-catenar, parțial monocatenar** și prezența **ADN-polimerazei virale** care are activitate de reverstranscriptază. Manifestă un tropism înalt pentru celulele hepatice (hepatocite), cantități mici de virusuri hepatice ADN, însă, pot fi găsite și în rinichi, pancreas și celulele mononucleare.



## Relații virus – celulă gazdă

**A. Cultivare** (*In vitro*) Până în prezent nu s-a reușit cultivarea VHB în culturi celulare. S-au făcut unele încercări, utilizându-se:

- culturi primare de hepatocite umane adulte și fetale, dar ele au fost utile doar pentru studierea etapelor de început al replicării virale;
- linii stabilizate de hepatom celular (HepG2, HuH7), transfectate cu clone de ADN VHB re-combinant. S-a observat eliberarea în mediul de cultură a proteinelor HBs, HBe, HBc, a nucleocapsidelor și particulelor Dane. În aceste sisteme au fost investigate secvențele transcrierii VHB.

Pe motiv, că celulele infectate cu VHB nu prezintă alterări tipice sau **e.c.p.**, iar nivelurile de virus sunt minime, pentru moment, cultivarea VHB nu este utilizată în scopuri de diagnosticare.

**B. Animale** (*in vivo*). Virusurile hepatice au un spectru de gazde foarte limitat. Gazda naturală pentru VHB este omul. Sunt susceptibile infecției experimentale și unele specii de maimuțe (*cimpanzei, gibboni*). Hepatita care apare la cimpanzei este similară celei din cazul omului, dar are o severitate medie, cu prezența AgHBs în ser; AgHBs și AgHBc în ficat; secvențelor de ADN VHB în extractele hepatice.

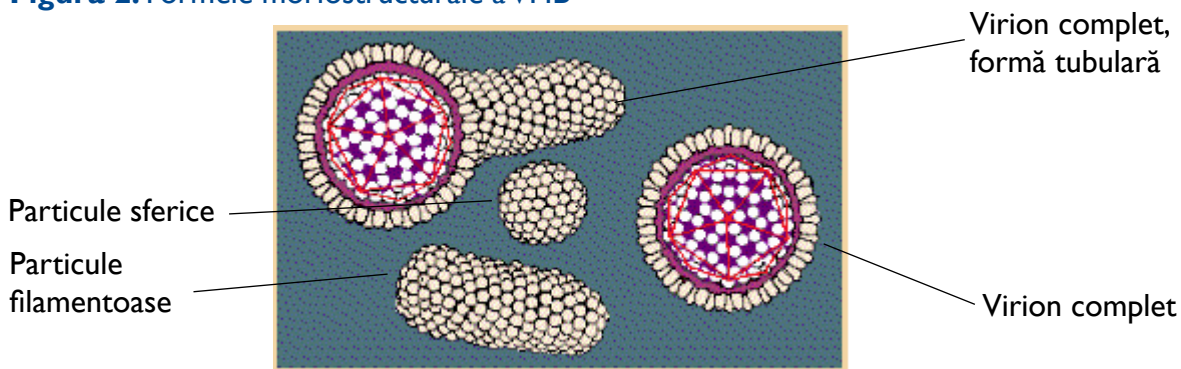
## Morfologia și proprietățile fizicochimice a VHB

VHB este un virus pleomorf. În serul unui bolnav cu hepatită virală B, cu ajutorul microscopului electronic, se pot determina 3 forme morfologice distincte:

**a) Virionul complet** (particula Dane) – particule de formă sferică, cu dimensiuni de 42 nm, învelită cu o membrană externă bilipidică de aproximativ 4 nm grosimea, ce conține lipide derivate din celula gazdă și toate genele polipeptidice S; proteinele de suprafață L (largi), M (mijlocii) și S (mici). Uneori, în formele tubulare ale virionului, proteina de suprafață se poate amplasa la marginea particulei virale. Virionii compleți reprezintă circa 7% din numărul total al particulelor virale și pot atinge o concentrație de  $10^{10}$  virioni infecțioși/ml în serul bolnavilor sau purtătorilor.

**Particulele Dane sunt structuri infecțioase, prezența lor în ser reprezintă un indicator de multiplicare virală activă.**

**Figura 2.** Formele morfostructurale a VHB



Hepatocitele infectate pe lângă virionul complet, infecțios mai poate produce în exces și alte forme virale neinfecțioase compuse din structuri ale învelișului viral (AgHBs). Astea sunt:

**b) Particulele sferice** cu dimensiuni mici, de 17-25 nm, formate din structuri ale învelișului viral (HBs), goale în interior. În serul bolnavilor structurile date se observă cel mai frecvent. În unele cazuri de hepatită cronică fiind singurul tip de particule detectate, ating o concentrație de  $10^{13}$  particule/ml ser, depășind cu mult cantitatea particulelor virale complete.

**c) Particulele filamentoase** de 22 nm în diametru și 50-230 nm în lungime, identice cu formele tubulare de virion, formate în rezultatul agregării particulelor sferice. Se întâlnesc în cantități mult mai mici. Ele pot conține AgHBs.



Particulele sferice și filamentoase, spre deosebire de particulele Dane sunt lipsite de acid nucleic, de aceea sunt neinfecțioase. Însă ele sunt înalt imunogene, astfel prezența lor în organismul persoanelor infectate induce formarea/sinteza anticorpilor neutralizanți anti-HBs în titre de protecție. Așadar acest antigen este utilizat în producerea vaccinurilor împotriva hepatitei virale B, care asigură o înaltă protecție.

**Titrul virusului în sângele pacientului poate varia de la  $< 10^4/\text{ml}$  și  $> 10^9/\text{ml}$ .**

### Particule infecțioase

1. Virion complet (Particula Dane)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Particulă 42-47 nm. Membrana externă conține lipide și trei forme de AgHBs;</li> <li>Nucleocapsida de 27 nm conține circa 180 de copii de proteine core, ADN VHB și ADN-polimeraza.</li> </ul>
------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

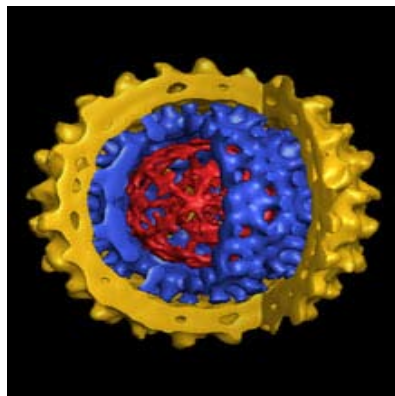
### Particule neinfecțioase

2. Particule sferice 3. Particule filamentoase	<ul style="list-style-type: none"> <li>Filamente sau sfere de 22 nm de diferită lungime, conțin lipide și, în special, una din formele AgHBs, de obicei, prezent în exces de 10 000 - 1 000 000 mai mult decât particulele Dane</li> </ul>
---------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## VIRIONUL COMPLET

**Virionul complet** (particula Dane) este format din două subunități structurale: **nucleocapsida (centrul viral) și învelișul viral**, care se pot desface în părți componente sub acțiunea detergenților neionici.

**Figura 3.** Modelul 3-D (tridimensional) al particulei virale complete VHB



VHB este de mărime mare de circa 3 ori mai mare decât molecula de hemoglobină umană. Ca și genomul uman, genomul VHB este compus din ADN circular bicatenar, parțial monocatenar, inclus într-o membrană proteică - capsida de simetrie icosaedrică, învelită la rândul său de o membrană externă, supracapsidă, formată din dublu strat lipidic cu spicule (proeminențe) glicoproteice, derivată din compartimentele celulei gazdă.

[www.molecular-virology.uni-hd.de](http://www.molecular-virology.uni-hd.de)

**I. NUCLEOCAPSIDA VIRALĂ** („core”) reprezintă centrul electrondens cu contur hexagonal, cu dimensiuni de 28 nm și include genomul viral (ADN), enzima ADN-polimeraza (cu funcție și de reverstranscriptază) și proteina principală a centrului viral - o fosfoproteină bazică-C de 21 kD denumită antigenul core al VHB (AgHBc).

#### Genomul viral

Este reprezentat de o *moleculă mică de ADN circular, bicatenar, parțial monocatenar* de 3,2kb. *Catena de sens negativ mai lungă (L)* conține 3200 nucleotide. *Catena de sens pozitiv mai scurtă (S)* conține numai 1100-2600 nucleotide. Diferența de lungime dintre ambele catene determină existența unui segment monocatenar.

Capetele 3' și 5' ale catenei L sunt constante, iar capătul 3' ale catenei S poate fi variabil. Catenele sunt complementare în pozițiile fixe 5' (regiune coezivă) aceasta asigurând circularizarea genomului. Ambele capete coezive ale extremității 5' prezintă secvențele repetitive DRs (*direct*

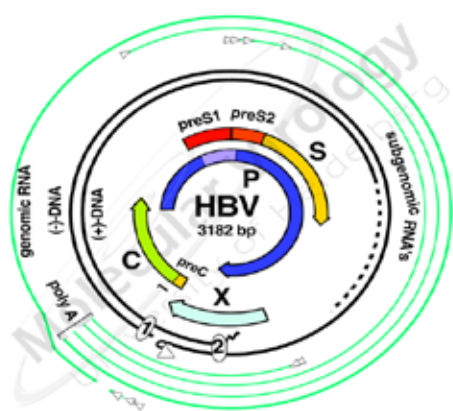


repeat), comune tuturor hepadnavirusurilor. Ei servesc ca inițiatori ai replicării, fiind „primeri” pentru sinteza secvențelor ADN respective și asigură integrarea în hepatocite. Capătul 5' a catenei S este legat de o secvență ARN capușonată, care are rolul de inițiator al sintezei celei de a doua catenă ADN. Genomul VHB se află de regulă extracromozomial ca epizom liber, dar și integrat în cromozomul gazdei. Secvențele integrate sunt caracteristic prezente în cancerul primar și rareori în hepatitele cronice.

## Organizarea genomului

**Genomul VHB** are o organizare foarte compactă și conține 4 gene care se suprapun parțial și sunt exprimate ca 4 ORF („open reading frames”) - regiuni deschise citirii: S, C, P și X, care codifică mai multe proteine, 4 fiind mai importante, precum proteinele nucleocapsidei virale (core), polimerazele virale, antigenii de suprafață (preS1, preS2 și S) și proteina X (proteina nonstructurală).

**Figura 4.** Structura genomului VHB



Cele 4 ORFs (pre-C/C, pre-S1/pre-S2/S, P și X) indicate în centru:

Gena core (C) codifică capsida proteică.

Gena P codifică ADN polimeraza virală.

Gena X codifică proteina X cu funcții complet neelucdate.

[www.molecular-virology.uni-hd.de](http://www.molecular-virology.uni-hd.de)

**Gena S** codifică proteinele de suprafață a învelișului viral - AgHBs. Este formată din trei regiuni: S, pre-S1 și pre-S2. Regiunea S codifică proteina SHBs („small” - mică), regiunile pre-S2 și S codifică proteina MHBs („middle” - mijlocie), regiunile pre-S1, pre-S2 și S - proteina LHBs („large” - largă). Regiunea S este mult mai stabilă decât regiunile pre-S1 și pre-S2 în care pot apărea mutații punctiforme, deleții și rearanjamente. Aceste fenomene apar mai frecvent în hepatitele cronice.

**Gena C** codifică proteinele structurale a nucleocapsidei virale HBc (core) și AgHBe. ORF-ul corespunzător genei C; conține 2 codoni start, ce constituie regiunea pre-C și un codon stop comun. Primul codon start codifică proteina precursoră HBe, care este secretată în ser ca AgHBe. Mutațiile din regiunea pre-C duc la dispariția AgHBe din ser, deși multiplicarea virală poate exista. Al doilea codon start codifică proteina capsidă P22C/HBc. Mutațiile în regiunea C și pre-C sunt asociate cu o evoluție gravă a infecției hepatice, în special cu hepatită fulminantă.

**Gena P** codifică ADN-polimeraza virală, participă la copierea ARN în ADN și ADN în ARN, joacă rol de reverstranscriptază și de ribonuclează, însă nu poate îndeplini funcții și de integrază (spre deosebire de reverstranscriptaza HIV). Posedă o regiune terminală care este legată covalent de ADN genomic.

**Gena X** codifică proteina HBX, legată de capătul 5' al catenei L, prezentă numai la hepadnavirusurile mamiferelor, rolul căreia pe deplin nu este elucidat.

Genomul viral mai conține și regiuni de reglare a expresiei sale: 4 promotori activatori, semnal de poliadenilare, secvențe DR1 și DR2.

### Capsida

**Capsida** este de simetrie icosaedrică, conține 180 sau 240 capsomere, formată dintr-un singur tip de proteină, proteina centrului viral HBc (P22C), care se leagă de genomul viral, cu funcții de proteinkinază și rol de autofosforilare. Structural este formată din dimeri legați prin punți disulfidice.



Capsida conține ADN-polimeraza virală care funcționează ca reverstranscriptază ce transcrie ARN pregenomic în catena de sens negativ a ADN. Alte roluri al ADN-polimerazei: a) inițierea replicării; b) enzimă tip ARN-ază pentru degradarea hibridului ARN ADN.

**2. ÎNVELIȘUL VIRAL** (supercapsida) are o grosime de 7 nm și se evidențiază la exteriorul virionului. Este constituit din dublul strat lipidic și glicoproteine (proteinele de suprafață), proeminente pe suprafața membranei ca niște spiculi.

a) Dublul strat lipidic este derivat din compartimentele celulare interne. Asamblarea virionilor are loc la nivelul reticulului endoplasmatic și nu din membrana plasmatică;

b) Proteinele de suprafață HBs:

**1. Proteina mică S (small) SHBs (24kD)** conține doar domeniul S (de suprafață) care poate fi ca o structură glicozilată (GP27) sau neglicozilată (P24 kDa). Proteina conține trei segmente hidrofobe, dintre care două traversează stratul bilipidic și două segmente hidrofile, unul din care conține *determinanții principali (antigenici) de grup și de subtip*.

**AgHBs** - este un dimer alcătuit din două molecule de SHBs legate prin punți disulfidice. Este partea componentă a particulelor sferice goale din ser și responsabilul major al antigenicității.

**2. Proteina mijlocie M (middle) MHBs (31kD)** conține doar domeniile S și pre-S2, este glicozilată și prezentă în două forme GP33 și GP36. Domeniul pre-S2 favorizează atașarea virionului de celulă prin intermediul serumalbuminei și posedă un epitop cu imunogenitate înaltă.

**3. Proteina mare L (large) LHBs (39kD)** conține domeniile S, pre-S1 și pre-S2. Se găsește în formă glicozilată GP42, cât și neglicozilată P39, lungimea proteinei fiind variabilă în funcție de subtip. Domeniul S1 contribuie la atașarea virusului de hepatocit. Proteina L, se presupune, că participă la asamblarea virală și este responsabilă de infecțiozitatea virală.

Aceste trei glicoproteine ale învelișului viral au o distribuție neuniformă la particulele virale ale VHB. Particulele subvirale (filamentoase sau sferice) de 22 nm sunt compuse predominant din proteinele S, cu cantități variabile de proteina M și foarte puțină proteina L (circa 300-400 proteine S și 40-80 proteine M și L). În schimb, particulele virale complete sunt predominant compuse din proteinele L. Proteina L conține un domeniu, căreia îi revine funcția de receptor de recunoaștere, care facilitează atașarea eficientă de receptorii superficiali ai celulei gazdă.

**Proteinele HBs (de suprafață) sunt** structurale, dar datorită reproducerii lor în exces, (în cantități de  $10^3$  mai mult decât virionii) sunt secretate în ser, unde circulă liber și pot fi considerate ca *proteine secretate*.

## Proteinele nestructurale

**Proteina HBe** nu face parte din structura virionului, fiind proteină secretată, sintetizată de regiunea genomică pre-C și nu este necesară pentru multiplicarea VHB. Este eliberată din celulă în formă de structuri polipeptidice de 22 kDa și 16 kDa, nu are tendință spre autoasamblare. Mutațiile în regiunea pre-C nu inhibă replicarea virală. *Rolul proteinei HBe*: imunomodulator al răspunsului față de hepatocitele infectate. De asemenea, proteina HBe poate fi implicată în *reglarea expresiei, asamblării și secreției proteinelor* centrului viral.

**Proteina HBx** – este prezentă doar în genomul hepadnavirusurilor proprii mamiferelor. Acționează ca *transactivator*, asigurând creșterea expresiei AgCMH I și AgCMH II. Este stimulator, în nivel scăzut, al oncogenezei VHB.

## Structura antigenică

Proteinele virale alcătuiesc un complex de antigene, prezența cărora în organism evoluează specific, în dependență de etapele și formele clinice al infecției, în funcție de răspunsul imun al gazdei.



**1) AgHBs** - antigenul de suprafață corespunde celor trei proteine membranare de suprafață HBs, este foarte imunogen și induce producerea de anticorpi anti-HBs. AgHBs, un antigen foarte heterogen, este format din două tipuri de antigene:

a) Ag specifice comune de grup „a”, localizate pe secvența aminoacizilor 124-137 și 139-147 a AgHBs sub forma a două bucle, ținta Ac neutralizanți.

b) Două perechi de antigene de subtip:

- *d/y* specifice aminoacidului în poziția 122;

- *r/w* specifice poziției 160 de arginină sau lizină. Subtipul *w* include și câteva subvariante: *w<sub>1</sub>*, *w<sub>2</sub>*, *w<sub>3</sub>*, *w<sub>4</sub>*.

Perechile *d/y* și *r/w* se exclud reciproc una pe alta, iar prin combinarea lor se formează **9 serotipuri majore**, dintre care mai frecvent întâlnite sunt patru: **adw, ayw, adr și ayr**. Determinarea serotipurilor are importanță epidemiologică, ele având o distribuție geografică diferită. În SUA, Europa de Nord, Asia și Oceania – se întâlnește frecvent determinanta *d*, mai rar - determinanta *y*. În Japonia, determinanta *d* practic domină prezența determinantei *y*. În Africa, Australia (regiunile aborigene), India, regiunea Mării Mediteraneene - determinanta *y* e întâlnită mai frecvent, în timp ce „*d*” - foarte rar. În Europa, SUA, Africa, India, Australia și Oceania - predomină determinanta *w*. În Japonia, China și Asia de Sud-Est - predomină determinanta *r*.

Subvariantele *adw*, *ayw* și *adr* sunt cele mai răspândite geografic. Subvarianta *ayr* se întâlnește foarte rar, fiind comună doar pentru o mică populație din Oceania.

Variațiile în antigenele învelișului VHB reprezintă mutații punctiforme, apărute în gena S, prezente, în special, la persoanele vaccinate sau tratate cu anticorpi specifici mono sau policlinali. Aceasta explică eșecul în vaccinare a unor persoane; apariția hepatitelor cu AgHBs negative și dificultățile ce survin în diagnosticarea acestor mutații.

**AgHBs** apare în ser la a 4-6 săptămână după infectare și dispare la aproximativ 3 luni de la debut, ce corelează cu însănătoșirea. Se determină în toate secrețiile organismului, în țesutul hepatic, limfatic și lipidic. Prezența AgHBs pe o durată mai mare de 6 luni confirmă persistența infecției.

**2) AgHBc** – antigen unic, se găsește în virionul complet și în nucleocapsidele neasamblate din nucleul hepatocitelor infectate. Poate fi detectat la purtătorii sănătoși cu hepatite cronice active în nucleul și citoplasma hepatocitelor. În ser nu se determină în stare liberă, doar ca component intern al particulelor virale. Rar poate fi evidențiat sub formă de complexe imune Ag-Ac. În nucleul hepatocitelor infectate AgHBc este determinat la aproximativ 10 zile de la infectare.

**3) AgHBe asociat nucleocapsidei**, identificat și ca antigen solubil. Este reprezentat de două tipuri de antigene: *AgHBe1* și *AgHBe2*. Epitopii *AgHBe1* sunt expuși pe suprafața capsidului, iar epitopii *AgHBe2* sunt situați în centrul nucleocapsidului, astfel că anticorpii față de *AgHBe1* reacționează numai cu proteina asamblată, iar cei față de *AgHBe2* recunosc proteina numai după distrugerea centrului viral. Mutațiile din regiune genomică pre-C/C se întâlnesc rar, aceste secvențe fiind bine conservate. În special, mutațiile în regiunea dată se observă în cazurile cu infecție cronică cu VHB. **AgHBe** este prezent în ser în perioada de incubație, imediat după apariția AgHBs și dispare după 2-4 săptămâni, înainte de dispariția AgHBs. Prezența *AgHBe* indică o replicare virală activă. Persistența îndelungată în ser determină pronostic nefavorabil.

**4) AgHBx** este mai puțin studiat. Posibil este implicat în transformarea oncogenă a hepatocitelor.

**5) ADN-ul viral** - persistența îndelungată indică infecție cronică. **ADN-ul viral** apare în ser odată cu antigenele virale. Dispare din ser la începutul celei de a doua săptămâni a perioadei de stare a infecției acute.



**Tabelul 4.** Nomenclatura infecției cu VHB

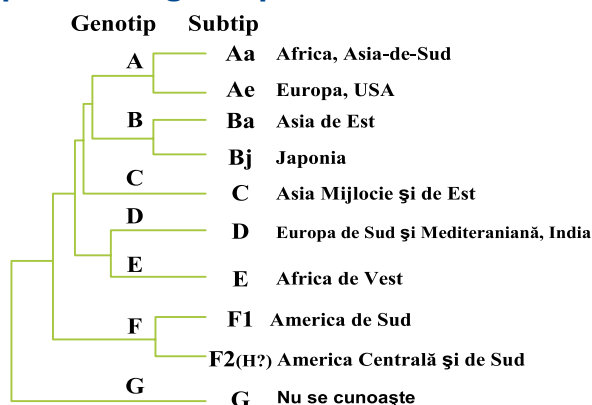
VHB	<i>Virusul hepatitei B (virion infecțios complet)</i>	Virion complet (particula Dane) de 42 nm, constă din anvelopa externă (peplos, supracapsida) de 7 nm grosime și un centru viral (nucleocapsida, „core”) de 27 nm. Centrul viral este compus din ADN circular bicatenar, parțial monocatenar și polimeraza ADN virală.
AgHBs	<i>Antigenul de suprafață al virusului hepatitei B</i>	Complexul determinantelor antigenice, denumit și antigen australian (Au) sau antigen asociat hepatitei virale (HAA). Se găsesc pe suprafața VHB sub formă de particule sferice de 22 nm sau particule tubulare.
AgHBc	<i>Antigenul core al virusului hepatitei B</i>	Antigenul specific asociat centrului viral al VHB (core) de 27 nm.
AgHBe	<i>Antigenul e al virusului hepatitei B</i>	Determinanta antigenică este strâns asociată cu nucleocapsida VHB. De asemenea circulă ca proteină solubilă în serul bolnavului.
Anti-HBs Anti-HBc Anti-HBe	<i>Anticorpi față de AgHBs, AgHBc, AgHBe</i>	Anticorpii specifici care sunt produși ca răspuns la determinantele antigenice (epitopii) respective.

## VARIABILITATEA GENETICĂ

Genomul VHB este relativ stabil, însă secvențierea ADN-ului mai multor virusuri hepatice din diverse regiuni ale globului a confirmat existența mai multor genotipuri, care diferă după structură și funcție și după distribuția geografică. Actual, se cunosc minimum 8 genotipuri, care diferă după proprietățile de replicare, după modul de expresie și recunoaștere a epitopilor imuni, și care, la rândul său, diferă după formele de manifestare a infecției. Genotipurile A, B, C și D sunt preponderent răspândite în Europa Centrală și SUA, pe când genotipurile B și C prevalează în Asia, iar genotipul D se înregistrează în regiunea Mediteraneană și India. Genotipul A și E prevalează în Africa, iar F-H se detectează în America Centrală și de Sud. Genotipurile A și F sunt segregate la rândul său în 2 subgenotipuri, iar B și C în 4 subgenotipuri.

În caz de infecție simultană cu diferite variante, recombinări între genotipuri pot avea loc în regiunile pre-core și core al VHB. Mutații minore de *tip shift antigen* pot avea loc în diferite regiuni ale genomului, ele modificând într-un fel sau altul formele infecției. Mutațiile în genomul VHB pot influența seroconversia AgHBe și, în general, evoluția infecției. La pacienții AgHBe pozitiv, genotipurile A și B sunt mai sensibile la interferon decât genotipul D și C.

### Repartizarea genotipurilor VHB în lume



(Mizokami M et al, 2004)



Variațiile virale apar mai frecvent în infecția hepatică cronică în urma mutațiilor sau delețiilor genetice în regiunile pre-C/C. Unele mutații pre-C/C se asociază cu hepatite fulminante și fluctuații mari ale aminotransferazelor. În infecții cauzate de tulpini mutante ale VHB, AgHBe poate lipsi.

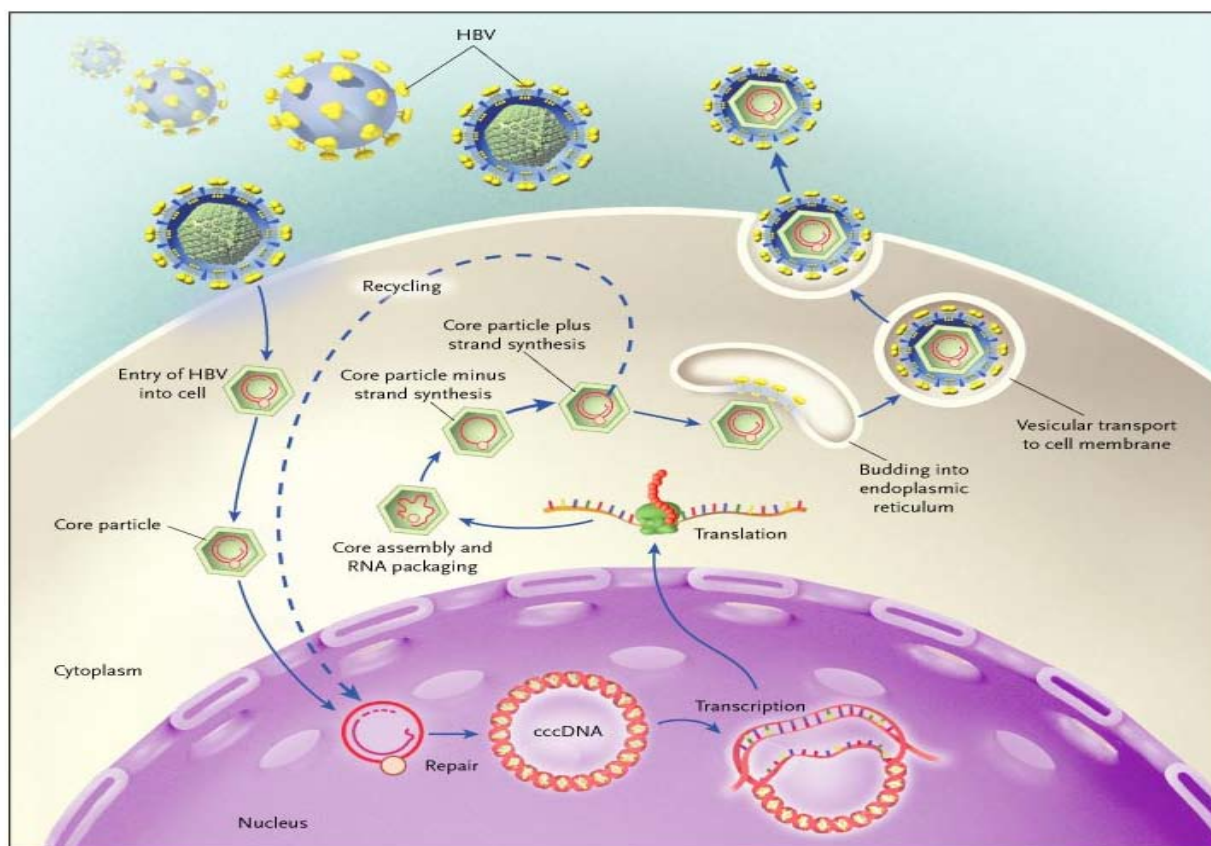
În cazurile de exces de anticorpi serici (nou-născuți de la mame purtătoare de AgHBs, persoane vaccinate sau cărora li s-au administrat  $\gamma$ -globuline) se determină variante virale mutante ce scapă de supravegherea imună și ele pot fi transmise accidental, prin transfuzii sau transplant de organ către alte persoane.

**Importanța cunoașterii genotipurilor hepatice reiese din răspunsul diferit pe care acestea o atestă față de tratamentul antiviral. Hepatitele cauzate de genotipurile asiatice B și C răspund mai greu la tratamentul cu IFN și derivatele sale, în timp ce hepatitele cauzate de genotipurile europene și americane răspund mai bine la terapia antivirală.**

## MULPLICAREA VIRALĂ

Datele referitor la replicarea VHB au fost obținute prin transfecția *in vivo* a unor animale sensibile inoculate intrahepatic cu ADN VHB (cimpanzei, rațe) și *in vitro* prin infectarea unor linii celulare continue de hepatom celular (Hep G2, Hu H7, LMH). Se disting următoarele etape a replicării virale:

**Figura 4.** Ciclul de replicare al VHB



Sursa: <http://content.nejm.org/cgi/content/full/350/1111118>

**A. Adsorbția și pătrunderea în celulă.** Ligandul viral care asigură atașarea la celulă este considerată proteina HBs de înveliș, rolul principal aparținând domeniului pre-S1 al proteinei LHBs și mai puțin domeniul pre-S2 al proteinei MHBs. Receptorii hepatocitelor pentru VHB încă nu sunt identificați. Se consideră că, liganzii virali se leagă de albuminele serice umane po-



limerizate și atașate pe membrana hepatocitelor. În acest proces sunt implicate seralbumina umană, fibronectina sinusoidelor hepatice, endonexina 2 și apolipoproteina H. Apoi urmează pătrunderea virionului în celulă prin endocitoză, dezasamblarea virionului și capsidei, trecerea în nucleu prin porii membranei nucleare a complexului ADN polimeraza virală.

**B. Biosinteza componentelor virale.** Intracelular, ADN-ul viral este convertit în formă bicatenară completă, închisă covalent, circulară și suprarăsucită. Transcrierea, translația și sinteza proteinelor se realizează astfel. Catena L de sens negativ este transcrisă în ARNm cu participarea polimerazei celulare ARN II, cu funcții de:

- ARNm care codifică proteinele suprafeței virale (S și X);
- ARNm, denumit pregenomic (pgARNm), care îndeplinește două funcții: translația proteinelor HBc, HBe, a polimerazei virale și funcția de matrită pentru ADN-ul viral. ARNm transportat în citoplasmă la nivelul ribozomilor se translează asigurând sinteza proteinelor virale.

**Replicarea genomului** decurge în interiorul capsidei preformate, concomitent cu asamblarea proteinelor capsidale adunate în jurul pregenomului, inclusiv cu polimeraza virală și o proteinkinază. Sinteza ADN L de sens negativ are loc cu participarea ADN-polimerazei virale pe matricea ARNm pregenomic prin reverstranscriere. Iar ARNm pregenomic este dezintegrat de ribonuclează și eliminat, apoi are loc sinteza catenei ADN S de sens pozitiv cu circularizarea moleculei de ADN.

**C. Asamblarea și eliberarea din celulă.** Asamblarea completă a virionului și obținerea învelișului viral are loc în structurile interne ale celulei gazdă. Formarea supercapsidei și îmbrăcarea nucleocapsidelor virale cu proteinele HBs decurge într-un compartiment intermediar între reticulul endoplasmatic și aparatul Golgi pe membrane care conțin proteinele HBs agregate. Proteinele LHBs în virionul integru predomină în raportul 4/1 față de SHBs și MHBs. Eliberarea din celulă a virionilor are loc prin exocitoză.

O particularitate a replicării VHB este sinteza în exces a proteinelor HBs organizate ca particule sferice de 20-22 nm sau ca forme filamentoase, goale în interior, neinfecțioase.

## PATOGENEZA ȘI IMUNITATEA

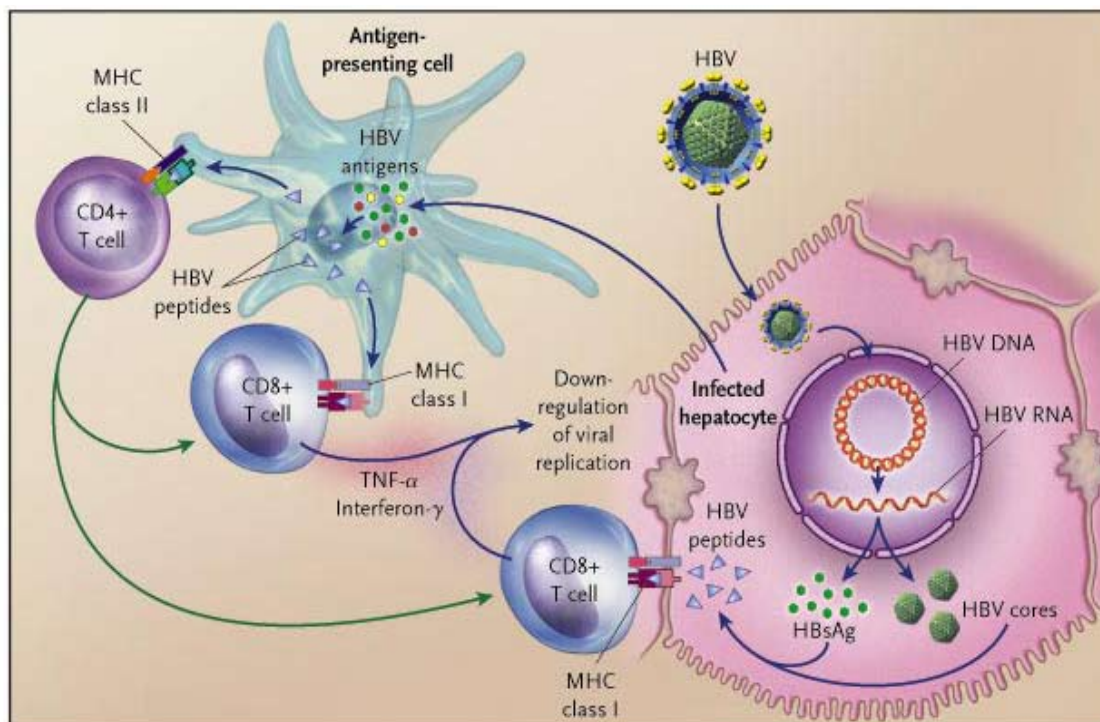
**Perioada de incubație** variază de la 45 până la 180 zile, în mediu 60-90 zile. Variațiile depind de cantitatea virusului, modul de transmitere și răspunsul gazdei.

VHB pătrunde în organism prin **diverse căi**. Nimerind în torentul sangvin, virusul pătrunde în ficat, *celula hepatică devenind gazda de replicare primară*. Replicarea virală durează circa 10-12 zile, după care virusul se răspândește în organism, fie prin *contiguitate de la celulă la celulă*, fie *pe cale sangvină*. Virusul este eliberat în torentul sangvin cauzând o **viremie masivă**. Hepatotropismul specific nu exclude replicarea virală și în alte țesuturi, organe, celule (endoteliu, epitelii biliare, celule acinare pancreatice, mononucleare sangvine, celule stem, măduvă, suprarenale, rinichi, splină, ganglioni etc.). Evoluția patogenică a infecției este determinată de statusul imun al organismului. Intensitatea și tipul răspunsului imun determină severitatea bolii.

După o perioadă de incubație ce variază între 6 săptămâni și 6 luni, intervin mecanismele apărării nespecifice. IFN $\alpha$  este responsabil de apariția febrei, mialgiei, cefaleei. Celulele NK vor induce sinteza de IFN $\gamma$  și apariția în niveluri crescute a IL2.



**Figura 5.** Procesele imune în infecția cu VHB



Sursa: <http://content.nejm.org/cgi/content/full/350/11/1118>

## Răspunsul celular

Inițial sunt activate limfocitele T citotoxice, activitatea cărora este îndreptată spre lichidarea hepatocitelor infectate, ca rezultat se dezvoltă leziuni *necroinflamatoare*, apărute în următoarele etape: a) declanșarea apoptozei, ca urmare a interacțiunii specifice Ag-limfocit; b) apariția de focare inflamatoare, ca rezultat al secreției de IFN de către limfocitele citotoxice; c) prin intermediul IFN $\gamma$  se activează macrofagele intrahepatice și induc un răspuns de hipersensibilitate de tip tardiv cu acțiune distructivă hepatică.

## Răspunsul umoral

Imunitatea umorală este asigurată de anticorpii **anti-HBs, anti-HBc și anti-HBe**.

**Anticorpii anti-HBs** sunt Ac protectori de tip neutralizanți, sintetizați față de AgHBs, în special față de domeniul major, situat pe una dintre cele două bucle  $\alpha$  la aminoacizii 139 și 147. Anti-HBs cauzează blocarea ligandului viral de atașare la receptorii celulari și în consecință induce neutralizarea infectivității particulelor virale. Anti-HBs împreună cu Ag virale alcătuiesc *complexe imune* care asigură eliminarea virusului, însă depunerea acestor complexe imune în țesuturi cauzează procese patologice extrahepatice ca urticarie, artrită, glomerulonefrită și vasculită. Anti-HBs apar după dispariția AgHBs, iar intervalul de timp dintre aceste două evenimente fiind denumit "fereastră serologică".

**Anticorpii anti-HBc** nu posedă efect neutralizant. Ei se formează ca răspuns la structurile HBc exprimate pe suprafața hepatocitelor sau eliberate după liza hepatocitelor.

- *anti-HBc de tip IgM* indică replicarea virală activă și se determină spre sfârșitul perioadei de incubație, atingând concentrație maximă în perioada de stare, dispărând în perioada de convalescență;
- *anti-HBc de tip IgG* apar la sfârșitul perioadei de stare, ating concentrație maximă în perioada de convalescență și persistă toată viața.

**Anticorpii anti-HBe** apar după dispariția AgHBe, decelându-se consecutiv apariției anticorpilor anti-HBc IgM.



## Citokinele

Citokinelor le revine un rol antiviral deosebit în reglarea răspunsului imun. Împreună cu interferonii, interleukinele IL-2, IL-12 și TNF- $\alpha$ , prin acțiune comună, inhibă replicarea virală. Experimental, s-a determinat la șoarecii transgenici infectați cu VHB, că tratamentul cu IL-12 inhibă replicarea hepatică a VHB, inducând niveluri crescute de IFN- $\gamma$  și TNF- $\alpha$ , cu efect extins și extrahepatic, de ex. în rinichi. ADN viral, precum și nucleocapsidele și alte particule intermediare de multiplicare, dispar din citoplasma hepatocitelor și celulelor renale.

*Componenta autoimună* – răspunsul față de structurile proprii ale hepatocitului (complexe lipoproteice de membrană) ar fi prezente în hepatitele virale, în special de *tipul ADCC*. Ele duc la distrugere tisulară, citoliză.

## PERSISTENȚA INFECȚIEI

Vindecarea este rezultatul eliminării antigenelor virale din circulația sangvină și dispariția virusului din țesutul hepatic (a ADN-ului, formelor replicative intermediare și al antigenelor).

Prezența în sânge a AgHBs mai mult de 6 luni confirmă cronicizarea infecției.

Cauzele persistenței virale nu sunt pe deplin cunoscute, dar depind de particularitățile:

a) *Gazdei*, și anume:

- *vârsta*: sugarii născuți de mame infectate devin în 90% purtători cronici de VHB, ca rezultat al imaturității sistemului imun (prelucrare inadecvată a Ag, absența răspunsurilor inflamatorii), expresiei scăzute a IFN $\gamma$  și a activității intense a celulelor supresoare, posibil și al instalării toleranței imune mediate de AgHBe. La adulți, doar în 10% de cazuri survine cronicizarea infecției, cauzele nefiind elucidate pe deplin;
- *imunodeficiența congenitală* (sindromul Dawn) sau *achiziționată* (infecțarea cu HIV) determină portajul cronic de VHB.

b) *Virusului* (proprietățile biologice ale virusului): ADN viral se determină în hepatocite nu numai în formă replicativă epizomală (infecție activă productivă), dar și în formă integrată în ADN cromozomial (provirus) cu infectivitate redusă și perioade de reactivare. Persistența ar evolua prin faza de hepatită cronică la cancer primar de ficat.

- *variabilitatea virală*: mutațiile virale cauzate de deleții sau mutații punctiforme în domeniul pre-C al genei C cu replicare în titre joase au fost determinate în cazul hepatitei cronice. Se presupune, că acest fapt ar duce la apariția unor tulpini virale noi de VHB, responsabile de formele de hepatite cronice;
- *particularități de replicare a VHB*: în nucleul hepatocitelor este menținut permanent un stoc de ADN CCC, fie prin transportarea înapoi în nucleu a ADN VHB nou sintetizat, fie prin reinfecție. Mărimea constantă a cantității de ADN-CCC este reglată prin *feed-back* de sinteza Ag de suprafață (AgHBs inhibă formarea ADN-CCC).

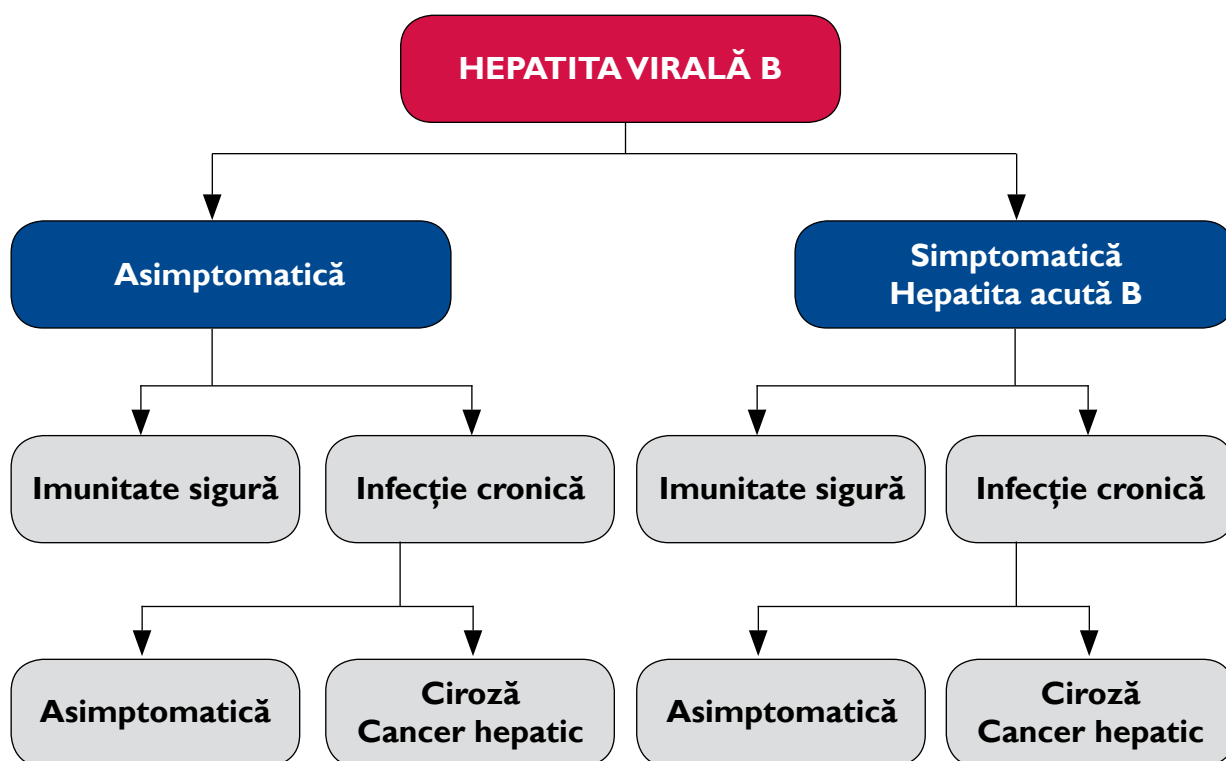
**Prezența continuă a ADN-CCC în nucleul hepatocitelor asigură persistența infecției în doză infectantă mică și conduce la infecție subclinică.**

## SPECTRUL INFECȚIEI CU VHB. Aspecte clinice și histopatologice.

Infecția cu VHB se poate manifesta foarte variat de la forme asimptomatice până la forme grave (fulminante sau oncogene), dependente de doza particulelor virale care pătrund în organism, de vârsta la care persoana s-a infectat cu VHB, de faza în care infecția este depistată și nu în ultimul rând, de răspunsul imun al persoanei.



**Figura 6 .** Spectrul infecției hepatice cu VHB



Sursa: **CDC. Division of Viral Hepatitis**

## HEPATITA ACUTĂ

**Hepatita acută clasică autolimitantă este rezultatul reacțiilor imune unice, puternice, cu eliminarea virusului circulant și a hepatocitelor infectate, ceea ce duce la vindecare.**

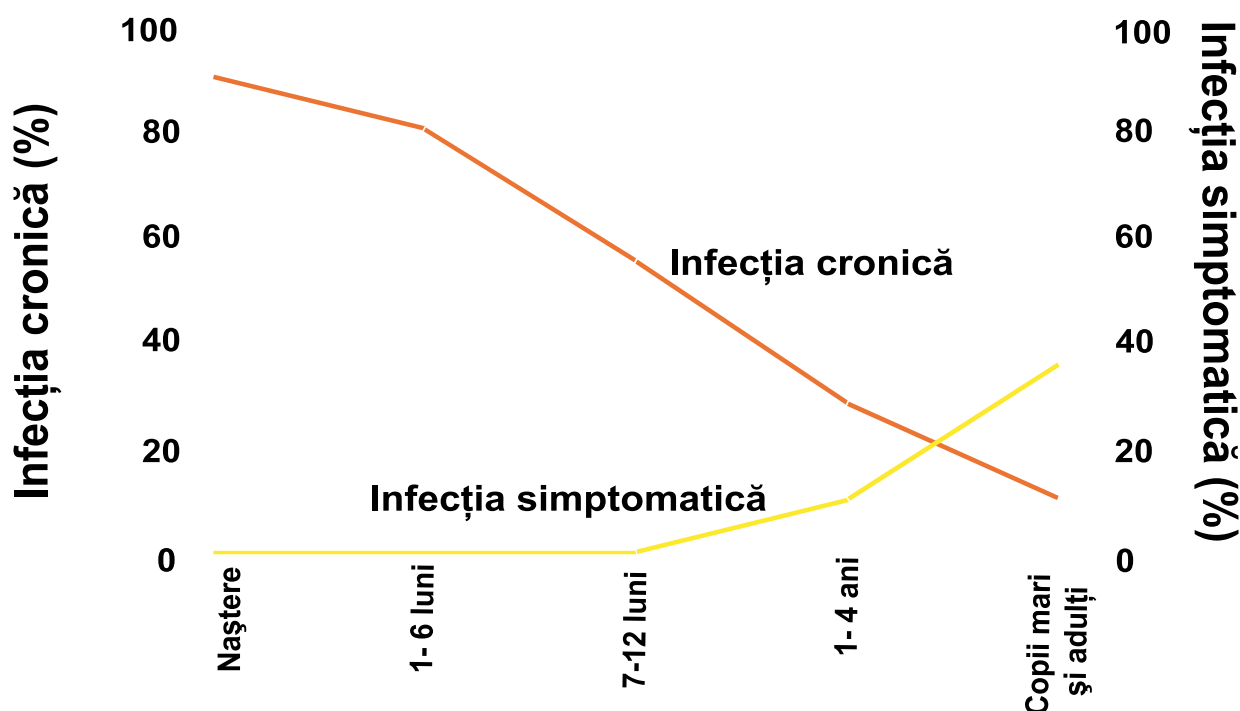
Vindecarea se determină la 90% pacienți, fiind însoțită de dispariția AgHBs și apariția anti-HBs. Formele acute de infecție cu VHB se pot rezolva spontan după 4-8 săptămâni de boală. Majoritatea pacienților se reabilitează fără consecințe semnificative și fără reactivări ulterioare. În majoritatea cazurilor, persoanele infectate nu necesită tratament sau dietă specială.

Serologic se determină AgHBs (prezent chiar în perioada de incubație), apoi anti-HBc IgM. În evoluție favorabilă simptomele treptat dispar timp de 2-3 săptămâni.

Prezența Ac protectori HBs este un indice imun favorabil, dispariția lor având loc în aproximativ 2-3 luni. Paralel cu aceasta, transaminazele revin la valori normale. În caz de reactivare a hepatitei cronice asimptomatice, fapt care deseori este dificil de diferențiat, se constată persistența AgHBs, prezența AgHBe și ADN viral în ser și rar anti-HBc IgM în titruri înalte.

**Evoluția fulminantă** a hepatitei acute se întâlnește în aproximativ 0,2% cazuri, cu insuficiență hepatică acută și sfârșit letal în 63-93% cazuri. Un indice al unei evoluții severe a bolii este scăderea timpului de protrombină sub 50%.

Figura 7. Evoluția hepatitei virale B în dependență de vârstă



## INFECȚIA ASIMPTOMATICĂ

Se consideră că pe plan global există peste 350 mln. purtători de AgHBs, la care continuu are loc multiplicarea virală, iar reacția gazdei este nulă și lipsită de simptome clinice. Purtătorii, de obicei, sunt depistați ocazional. În caz de detectare la un pacient asimptomatic a AgHBs, obligatoriu se vor efectua examinări suplimentare a markerilor hepatici.

## HEPATITA CRONICĂ

Este o manifestare a infecției persistente asociată cu replicarea continuă a VHB și răspunsuri imune slabe, cu instalarea toleranței imune. Se cronicizează numai 10% din formele acute, caracteristic fiind *absența simptomelor clinice* sau *nespecificitatea* lor. Existența lor se descoperă ocazional, în cursul unor investigații de laborator sau tardiv, după perioade îndelungate, prin apariția insuficienței hepatice, a cirozei, ascitei, hemoragiilor sau a carcinomului hepatic. Riscul de cronicizare a hepatitei crește la 90% pentru nou-născuții proveniți de la mame infectate, 30% pentru copiii infectați la vârsta până la 5 ani, 2-10% la adulți.

## CIROZA HEPATICĂ

Se dezvoltă la circa 2% pacienți cu hepatită cronică, mai frecvent în caz de prezența a anti-HBe decât în prezența AgHBe. Este caracteristică multiplicarea virală. Histopatologic, se determină hepatită cronică activă, iar clinic, se manifestă cu insuficiență hepatică și sfârșit letal. Aproximativ la 6% din pacienți ciroza evoluează spre carcinom hepatocelular.

## CARCINOMUL HEPATOCELULAR

VHB se consideră agent etiologic al carcinomului hepatocelular primar (CHP) în baza datelor epidemiologice (incidență înaltă de CHP în zonele geografice cu hepatită B endemică) și experimentale pe animale infectate cu hepadnavirusuri (apariția de CHP pe fondul de portaj cronic de virus în hepatite, evoluând cu distrugeri și regenerări hepatice). Mecanismele procesului de instalare a CHP insuficient sunt cunoscute, însă e clar, că malignizarea este favorizată de evoluția lentă, ce decurge ani de zile.



## SEMNE HISTOPATOLOGICE

Pentru hepatita acută forma clasică, histologic, sunt caracteristice *leziuni degenerative parenchimotoase* (hepatocite balonizate cu contur șters și nuclee mari) și *inflamatoare* (edem, infiltrație cu neutrofile, eozinofile și activare de celule Kupfer) însoțite de *modificări regenerative* (mitoze, diminuarea inflamației).

În funcție de localizarea și răspândirea necrozelor, se deosebesc următoarele forme histopatologice:

- *necroză în focare* și inflamație intralobulară (hepatita acută clasică);
- *necroză zonală periportală* în asociație cu leziunile de mai sus;
- *necroză confluentă* în jurul venulelor hepatice;
- *necroză masivă*, multilobulară.

Distrugerile hepatice la peste 65% dintre formele supraacute sunt letale.





## I.2. VIRUSUL HEPATITEI C (VHC)

În anul 1988, M. Houghton cu colaboratorii săi a efectuat clonarea reușită a VHC și descrierea genomului viral detectat din plasma cimpanzeilor infectați cu acest virus. Începând cu anul 1989, în rezultatul cercetărilor efectuate de Choo Q.L. și colab., hepatita C a fost determinată ca o unitate nozologică de sine stătătoare din grupul hepatitelor virale, predominând în majoritatea cazurilor în hepatitele „non A, non B”. Descoperirea agentului a fost posibilă grație aplicării tehnicilor de biologie moleculară, inclusiv clonarea secvențelor genomice virale și a investigațiilor experimentale.

### Clasificarea

La baza clasificării au fost luate în considerație caracterele similare, comune virusurilor cu genom ARN de sens pozitiv, în special ale reprezentanților familiilor *Flaviviridae* și *Pestiviridae*.

Comitetul Internațional de Taxonomie a Virusurilor a propus ca VHC să fie inclus în familia *Flaviviridae*, genul *Hepacivirus*.

**Tabelul 5. Clasificarea VHC**

Familia Flaviviridae		
Genul <i>Flavivirus</i>	Genul <i>Pestivirus</i>	Genul <i>Hepacivirus</i>
<i>v. encefalitei japoneze</i> – encefalită <i>v. encefalitei West-Nile</i> - boală febrilă, encefalită <i>v. dengă</i> – boală febrilă hemoragică, eruptivă <i>v. febrei galbene (v. amaril)</i> – febra galbenă	<i>v. diareei bovine</i> <i>v. febrei porcinelor</i>	<i>v. hepatitei C</i> – hepatita virală C

### Relații virus – celulă gazdă

**A. Cultivare (In vitro)** Până în prezent nu s-a reușit cultivarea VHC în culturi celulare. Multiple încercări de cultivare în hepatocite de cimpanzeu, celule umane fetale hepatice nu au dat rezultate preconizate. La creșterea *in vitro* în linii celulare Daudi (derivate din celulele B) sau MT2 (celule leucemice T-umane) s-au obținut niveluri joase de replicare cu apariția de cvasispecii genomice.

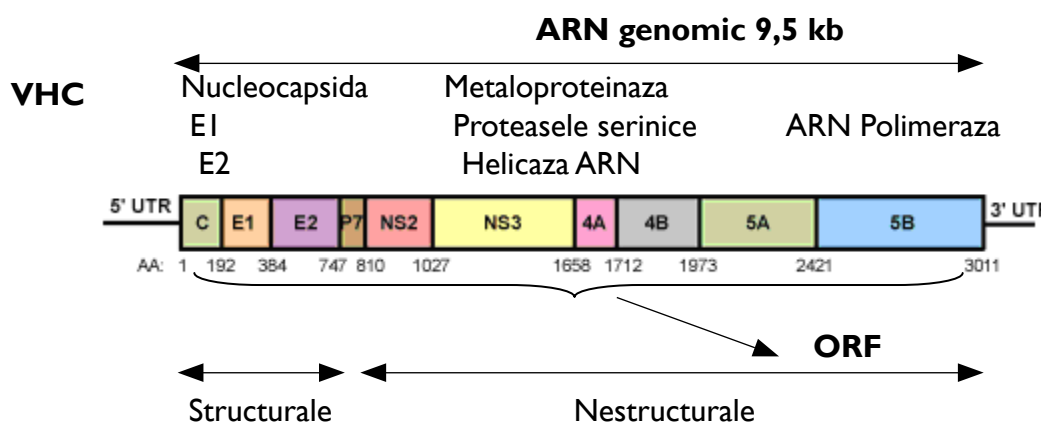
**B. Animale (In vivo).** La infectarea experimentală, cimpanzeul dezvoltă o hepatită acută, clinic și histopatologic asemănătoare celei umane.

### Caractere morfostructurale

Virionul VHC are **formă sferică** și diametrul de 40-60 nm. Nucleocapsida virală este înconjurată de o **anelopă** constituită dintr-un strat lipidic, la suprafața căreia se observă niște „spiculi” fini de 6 nm în lungime (**glicoproteienele E1 și E2 de suprafață**), codificate de ARN VHC. În interiorul virionului este localizată **nucleocapsida**, cu dimensiunile de 30-35 nm.



**Figura 8.** Organizarea genomului VHC. ARN monocatenar, liniar, de sens pozitiv.



**C** - C-core, proteina core; **E1**, glicoproteina 1 a învelișului viral; **E2**, glicoproteina 2 a învelișului viral; **NS2**, proteina 2 nestructurală; **NS3**, proteina 3 nestructurală; **4A**, proteina 4A nestructurală; **4B**, proteina 4B nestructurală; **NS5A**, proteina 5A nestructurală; **NS5B**, proteina 5B nestructurală; **3'-UTR**, regiunea 3'- necodificantă; **5'-UTR** - regiunea 5'- necodificantă

## Genomul

Este de tip **ARN monocatenar, liniar, de „sens pozitiv”**, constituit din 9400 de nucleotide. În organizarea sa se observă două zone distincte care codifică proteinele structurale și nestructurale (funcționale). Genele VHC ce codifică proteinele structurale se amplasează în regiunea 5' (5'NTR) a genomului viral, cele nestructurale în regiunea 3' (3'NTR).

### Organizarea genomică

ARN-ul viral conține un singur ORF ce codifică o poliproteină precursoră de 3008-3037 de aminoacizi, care respectiv se va cliva în proteine virale individuale: structurale și nestructurale. ARN viral este constituit din următoarele domenii:

- regiunea 5' necodificantă (5'NTR), de cca 340 nucleotide, ea fiind cea mai stabilă regiune a genomului, utilizată ca marker în PCR. Această regiune conține *structuri secundare extensive*, ce execută controlul și inițierea translației „cap independentă”, cu un *mecanism intern de inițiere*. Ea începe în regiunea IRES, localizată în interiorul secvențelor ce codifică proteina C;
- regiunea C (core): codifică proteina capsidului viral, extrem de stabilă;
- regiunile E1 și E2 NS1: codifică glicoproteinele învelișului viral E1 (Gp35) și E2 (Gp72) cu caracter hipervariabil;
- regiunile NS2, NS3, NS4 și NS5: exprimă proteinele funcționale;
- regiunea 3' necodificantă (3'NTR): are o lungime variabilă, de o structură tripartită constituită din: secvența 3' (o regiune scurtă, slab conservată de cca 28-42 nucleotide), regiunea poli (U)/polypyrimidine și secvența 3' X terminală foarte bine conservată. Una din funcțiile acesteia ar fi finisarea translației.

## CAPSIDA

Este de **simetrie icosaedrică**, constituită din proteina C “PC” (20-21 kDa). Proteina capsidică situată la regiunea N a poliproteinei precursoră se formează consecutiv clivării de către proteazele celulare. Este localizată intracelular în reticulul endoplasmatic și în nucleol.

**Proteina C** are următoarele proprietăți:

- posedă un caracter bazic puternic datorită conținutului de aminoacizi ca *arginina, lizina, prolina*;
- posedă regiuni înalt hidrofobe la porțiunea terminală C, implicate în *translocarea glicoproteinelor în reticulul endoplasmatic*, unde se finalizează glicozilarea; induce semnale de clivare a poliproteinei;
- se presupune *funcții imunomodulatoare*; proteina C suprimă specific apoptoza și interacționează cu receptorul pentru limfotoxină.



## ÎNVELIȘUL VIRAL

Învelișul viral (anelopa) este constituită din două glicoproteine - E1 (Gp35) și E2 (Gp72), codificate de genomul viral.

**Glicoproteina E1** (33-35kDa) este obținută prin clivaj proteolitic posttranslațional de către *peptidazele celulei gazdă* "semnalaze". Această glicoproteină este intens hidrofobă, ceea ce-i permite de a interacționa cu membrana celulei gazdă, fixarea în membrana celulei gazdă și transmiterea semnalelor către enzimele celulare ce o separă de proteina C.

**Glicoproteina E2** (68-73kDa) este asociată cu membrana celulară. La exteriorul regiunii N-terminale sunt expuse numeroase secvențe hipervariabile (HVR1, HVR2), fiind cel mai instabil domeniu al genomului VHC. Este sediul pentru mutații ce "scapă" de supravegherea imunologică.

## Proteine nestructurale

**NS2** este o metaloproteinază (Zn<sup>2</sup> dependentă) cu rol de scindare a NS2 de NS3.

**NS3**, multifuncțională, acționează ca *serinprotează* ce clivează poliproteina precursoră în secvențe proteice mai mici. Concomitent, funcționează ca *helicază/NTP-ază*. **Proteina NS3** participă activ la replicarea VHC, prin desfacerea și expunerea matricei ARN pentru a fi copiată de ARN-polimeraza.

**NS4**, codificată de regiunea NS4, se divizează în alte două proteine: **NS4a** ce aparține regiunii N terminale și **NS4b** aparținând regiunii C terminale. Ambele alcătuiesc o proteină heterodimerică cu specificitate genotipică.

**NS5** se clivează în 2 proteine: **NS5a** localizată în extremitatea N terminală și **NS5b** în regiunea C terminală. Se presupune, ca NS5b posedă *activitate de ARN-polimerază ARN-dependentă*.

## Antigene virale

**Antigenele VHC** au fost studiate în baza peptidelor sintetizate artificial, reconstituite și obținute prin inginerie genetică. În rezultatul investigațiilor au fost obținute următoarele antigene virale:

-**Ag C100-3**, sintetizat de fragmentul C100-3 al genei NS4. Asigură sinteza a 80-90% de Ac, însă preponderent în stadiile tardive ale infecției.

-**Ag C22-3**, derivat din regiunea nucleocapsidală C, permite depistarea infecției cu VHC la 6-9 săptămâni de la debut. Antigenul dat este reactiv cu serurile de la pacienții cu tulpini virale genotipic diferite. Reprezintă *structuri epitopice imunodominante*.

-**Ag C33-c**, codificat de regiunea NS3. Este înalt imunogen, primul permite evidențierea seroconversiei.

-**Ag C-200**, obținut prin asocierea Ag C100-3, Ag C22-3 și Ag C33-c. Creșterea numărului epitopilor reactivi mărește până la 99,5 % sensibilitatea testelor de diagnostic.

-**Ag NS5**, codificat de domeniul NS5. A fost inclus în asocierile de antigene pentru evidențierea infecției, dar nu a crescut considerabil specificitatea testelor de diagnostic.

## VARIABILITATEA GENETICĂ A VHC

VHC are o **variabilitate genetică înaltă**, frecvența mutațiilor fiind de 1,4-1,9×10<sup>3</sup> per nucleotid pe an, existând diferențe, atât în lungimea genomului, cât și deosebiri importante în nucleotidele genomice. În genomul viral s-au constatat:

- *regiuni constante* - secvențele extremității 5' NTR și a regiunii C;
- *regiuni hipervariabile* - domeniile genomice care codifică proteinele învelișului E1 și E2. E2 este considerată cea mai variabilă regiune a genomului.

În funcție de similaritatea secvențelor nucleotidice, VHC se clasifică (după Simmonds et al.) în grupe genetice mari, denumite **genotipuri**, în cadrul căreia se încadrează tulpini virale cu o



omologie nucleotidică până la 70%. În prezent se cunosc **11 genotipuri**, numerotate în ordinea descoperirii cu cifre arabe (genotipul 1, genotipul 2....., genotipul 11).

**Subtipurile**, tulpinile VHC au o similaritate virală de 70-80%, denumite conform descoperirii cu litere alfabetice (*a, b, c etc.*). Actual, se cunosc cca 100 subtipuri.

**Cvasispeciile**, un complex de variante virale genetic distincte, existente la un singur pacient infectat, cu o similaritate de cca 90%. Compoziția cvasispeciilor VHC, este rezultatul acumulării mutațiilor pe parcursul replicării virale în celulele gazdă. Prezența lor indică faptul, că un subiect infectat nu prezintă o populație virală omogenă, ci un spectru heterogen de variante genomice, care conferă virusului *un avantaj de supraviețuire* prin selecția mutanților cei mai bine adaptați condițiilor de mediu. Variabilitatea genetică ar fi modalitatea prin care VHC reușește să persiste în organismul uman, evitând acțiunea sistemului imun și determinând evoluția cronică a hepatitei virale.

**Variabilitatea genetică înaltă a VHC face posibilă infectarea succesivă a gazdei cu mai multe tulpini virale și este într-o directă corelație cu severitatea maladiei, răspunsul la terapia cu interferoni și dificultățile în prepararea de vaccinuri eficiente.**

**Tabelul 6.** Terminologia comună utilizată pentru definirea heterogenității VHC

Terminologia	Definiția	% similarității nucleotidice
<b>Genotip</b>	Heterogenitatea genetică între diferite izolate a VHC	65 - 68%
<b>Subtip</b>	Izolate strâns legate în cadrul unui genotip major	74 - 80%
<b>Cvasispecii</b>	Un complex de variante genetice în cadrul izolatelor unui singur individ	90 - 99%

**Tabelul 7.** Răspândirea geografică a genotipurilor VHC

Subtipul	Aria geografică
1a	frecvent în America de Nord și Sud, Australia
1b	frecvent în Europa și Asia;
2a	comun pentru Japonia și China
2b	comun în SUA, Europa de Nord
2c	comun în Europa de Sud și de Vest
3a	predomină în Australia (40% cazuri) și Asia de Sud
4a	predomină în Egipt
4c	predomină în Africa Centrală
5a	doar în Africa de Sud
6a	ocazional în Hong Kong, Macao, Vietnam
7a și 7b	comun pentru Thailanda
8a, 8b și 9a	predomină în Vietnam
10a și 11a	depistat în Indonezia

## MULPLICAREA VIRALĂ

Este prea puțin cunoscută în absenței unor sisteme de cultivare *in vitro*.

**A. Absorbția și pătrunderea în celulă.** Virusul se atașează de receptorul specific membranal CD81, fiind mediat de proteina virală E2. După atașarea de receptorul CD81, au loc modificări conformaționale ale E2, ceea ce permite legarea de un coreceptor specific hepatic, favorizând pătrunderea virusului în celulă prin endocitoză. Mediat de proteina E1, virusul fuzionează cu membrana endozomală cu eliberarea virionului în citosol.

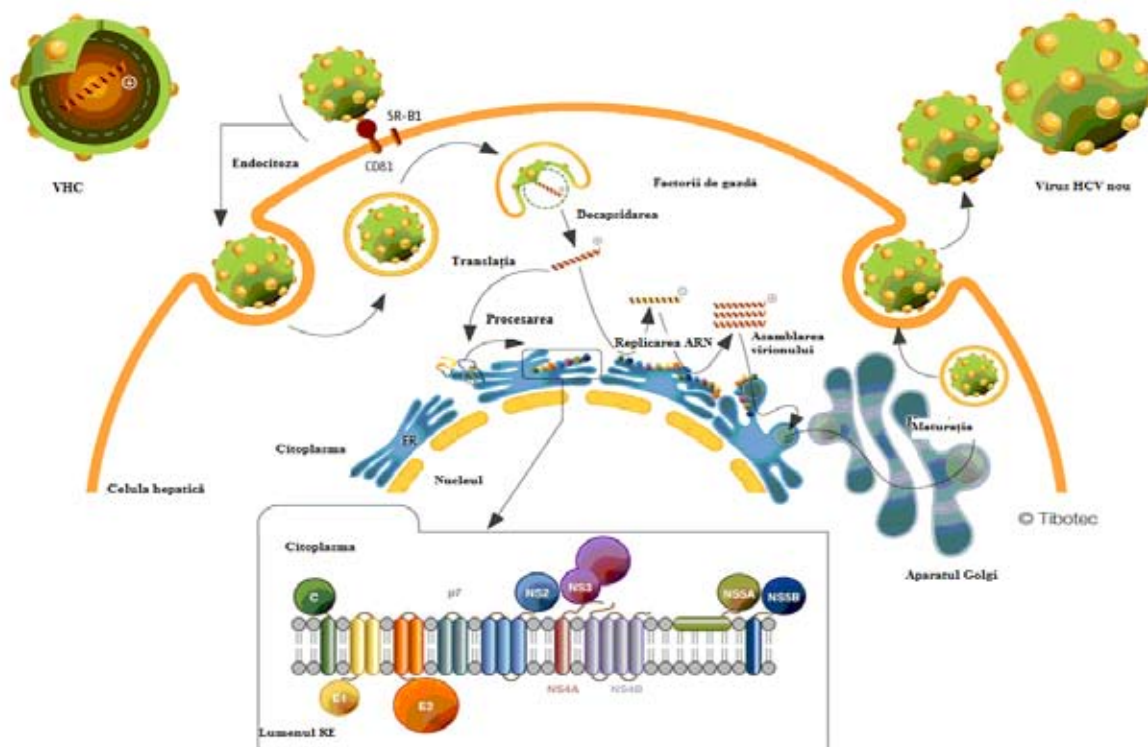
**B. Biosinteza componentelor virale.** Se presupune, că după pătrunderea în citoplasmă replicarea virală evoluează în următoarele etape:

**Traducție - sinteză de proteine.** Sinteza poliproteinei precursoră are loc pe matricea ARN genomic, care funcționează și ca ARNm, determinată de prezența structurii IRES la regiunea 5' a ARN viral. Ulterior, poliproteina este clivată de proteazele celulare "semnalaze" în proteine structurale C, E1 și E2 și de serinproteazele virale în proteinele funcționale NS3/NS4a/NS4b și NS5a/NS5b. Metaloproteaza NS2 asigură clivajul între NS2 și NS3.

**Replicarea genomului.** Pe matricea ARN de sens pozitiv cu ajutorul ARN-polimerazei ARN dependente are loc replicarea genomului. În rezultat, se produc molecule intermediare ARN de sens negativ, care la rândul lor vor servi pentru sinteze multiple de ARN genomic de sens pozitiv, ce vor contribui la codificarea de proteine virale necesare pentru sinteza proteinelor structurale și încapsidării.

**C. Asamblarea și eliberarea virusurilor din celulă.** Replicarea are loc în citoplasma hepatocitelor. Asamblarea se face la nivelul membranei reticulului endoplasmatic și aparatului Golgi. Un rol important în asamblare îl au interacțiunile specifice dintre ARN, regiunea 5' NTR și proteina C intens bazică, capabilă de multimerizare și care se asociază specific cu genomul viral. Eliberarea virusului din celulă probabil are loc prin înmugurire și învelirea în membrana celulară în care au fost inserate glicoproteinele E1 și E2.

**Figura 9.** Multiplicarea VHC



Sursa: [www.tibotec.com/.../Life\\_Cycle\\_HCV.jpg](http://www.tibotec.com/.../Life_Cycle_HCV.jpg)



## PATOGENEZA ȘI IMUNITATEA

Interacțiunea dintre virus și organismul gazdă sunt prea puțin cunoscute și presupuse prin analogii cu hepatita B.

După o *perioadă de incubație lungă, în medie de 6-7 săptămâni* (uneori până la 26 săptămâni), manifestările clinice evoluează lent, asimptomatic sau în 90% cazuri cu simptome atipice. Formele icterice sunt rare, în aproximativ 5% de cazuri. Severitatea infecției este determinată de intensitatea viremiei. Virusul nu determină *efect citopatic*, dar în rezultatul multiplicării virale se constată modificări în funcția hepatocitelor, intensitatea cărora este dependentă de reactivitatea gazdei, fără a fi cunoscute mecanismele care influențează gravitatea procesului.

**Replicarea VHC are loc în hepatocite, mononucleare, limfocitele T și B, fiind integrat în genomul celulei gazdă.**

### Răspunsul imun umoral

*Este slab și inconstant, Ac se evidențiază la a 5-6 săptămână* în cazul infectării post-transfuzionale sau mai târziu, după 6-9 luni. Nu se cunoaște pe deplin dacă acești anticorpi au o acțiune protectoare și neutralizantă. Anticorpii față de proteina C indică eliminarea VHC din organism, iar cei de tip IgM nu semnifică în mod cert o infecție acută.

**Răspunsul imun nespecific** În răspunsul nespecific participă neutrofilele, macrofagii, celulele dendritice, celule NK, limfocitele T și citokinele. După activarea acestor celule, urmează creșterea nivelului de sinteză a citokinelor imunomodulatoare, ca interferonul (IFN), care joacă un rol important în blocarea replicării VHC. Efectul imunomodulator al IFN se manifestă prin creșterea expresiei moleculelor complexului major de histocompatibilitate (CMH) de clasa I și stimularea celulelor NK și a limfocitelor T. Celulele NK determină citoliza hepatocitelor infectate, activitatea și proliferarea lor fiind dependente de interferon. Aceste celule produc IFN, având un rol important imunoregulator. Interacțiunea dintre VHC și răspunsul imun nespecific joacă un rol important în evoluția infecției.

## SPECTRUL INFECȚIEI CU VHC

**Hepatita acută** se caracterizează printr-o perioadă de incubație de lungă durată (6-7 săptămâni) și variază în dependență de calea de transmitere, perioada de incubație fiind mai scurtă în cazul transfuziei de sânge. La 80% de pacienți infecția evoluează subclinic și numai în aproximativ 20% cazuri se determină forma clinică clasică (icterică).

Nivelul transaminazelor este moderat crescut, cu valori variabile. Viremia se evidențiază în primele faze ale bolii prin PCR. Diferențierea formei acute de cea cronică este complicată din cauză că anticorpi VHC IgM apar în perioade tardive ale bolii, fiind depistați și în cazul hepatitei cronice.

Formele acute severe se întâlnesc rar, iar formele fulminante nu sunt caracteristice pentru HVC. Evoluția spre cronicizare se înregistrează aproximativ în 70% cazuri.

**Hepatita cronică** decurge asimptomatic sau cu simptome nespecifice, infecția de regulă, progresează lent, cu instalarea cirozei pe parcursul unei perioade de 5-20 ani.

Cronicizarea poate fi confirmată prin evidențierea unui nivel crescut al transaminazelor, a viremiei și a anticorpilor specifici. Forme grave predomină la pacienții imunodepresivi, de vârstă înaintată, cu alcoolism cronic. În formele agresive, de regulă, se pun în evidență genotipurile 1b, 2, de obicei, ca urmare a infecției posttransfuzionale.

**Carcinomul hepatocelular** frecvent asociat cu ciroza, apare tardiv (la 15-30 ani de la infecție) la 60-90% bolnavi cu ciroză. Virusul nu posedă structuri genomice oncogene și mecanismele dezvoltării carcinomului hepatocelular nu sunt cunoscute.



### I.3. VIRUSUL HEPATITEI D (VHD)

Antigenul viral a fost evidențiat de M. Rizotto și colab. în anul 1977 prin metoda de imuno-fluorescență în nucleele hepatocitelor pacienților, în timpul izbucnirii unei erupții neobișnuit de serioase de hepatită serică în Europa de Sud. Inițial s-a considerat că este vorba de o variantă antigenică a VHB și a fost denumit **antigen delta**. Prezența anticorpilor specifici în serul pacienților infectați și datele obținute în urma infecției experimentale pe cimpanzei, au confirmat existența unui nou agent hepatotrop. Studiile ulterioare au evidențiat la acest agent (VHD) particularități cu totul deosebite, nespecifice virusurilor animale.

#### Particularități biologice

VHD este foarte apropiat de viroizi (virusuri ale plantelor) și are următoarele caractere comune: posedă ARN monocatenar circular (caracteristic numai pentru viroizi), tipul de replicare este asemănător virozilor și decurge cu participarea polimerazei II celulare prin autoclivare și autoreglare.

Însă, spre deosebire de viroizi, genomul VHD este de dimensiuni mai mari (virozii posedă 250-300 nucleotide) și necesită participarea unui virus helper (ajutător) pentru biosinteza componentelor structurale care îi asigură infecțiozitatea. În prezent, taxonomia VHD nu a fost definitiv determinată. VHD este un satelit subviral al VHB, ultimul servind ca helper.

#### Caractere morfologice și structurale

VHD are formă sferică, dimensiuni de 35-38 nm. Genomul este în complex cu o singură proteină virală. La suprafață este învelit cu elemente de structură care aparțin virusului *helper* – VHB sau WHB (v. hepatitei marmotei).

### GENOMUL

În celulele infectate se determină câteva tipuri de ARN:

- ARN-ul genomic monocatenar de 1,7 kb și circular* (capacitate unică pentru virusuri ARN animale). În celulele infectate ARN-ul se rearanjează în filament bicatenar, în formă de bastonaș. Structura circulară nu este activă în interiorul celulei.
- ARN antigenomic* este complementar ARN-ului genomic, fiind prezent în cantități mai mici. ORF5 al ARN antigenomic codifică proteina HD.
- ARNm este identic cu ARN-ul antigenomic*, însă este poliadenilat. Spre deosebire de ARN-urile genomic și antigenomic, care se află în nucleu, ARNm se localizează în citoplasmă și este responsabil de translația proteinei HD.

#### Proteine virale

Proteina HD, unica proteină codificată de VHD, fosforilată și cu proprietăți bazice puternice, se depozitează în nucleele hepatocitelor. În ficat și în serul bolnavilor se determină sub două forme:

- *proteina HD mică* (greutatea moleculară 24000), se leagă de ARN, reglează poliadenilarea și potențează autoreplicarea.
- *proteina HD mare* (greutatea moleculară 27000) se formează în cursul replicării, reglează acest proces, fiind inhibitorul ei. Simultan, determină împachetarea ARN VHD în proteinele “helperului” VHB.

### ÎNVELIȘUL VIRAL

Ribonucleoproteina VHD este acoperită cu proteinele de suprafață ale VHB – proteina S, proteina pre-S1 și proteina pre-S2, proporția proteinelor fiind asemănătoare celei din particulele sferice de 22 nm.



## MULTIPLICAREA VIRALĂ

**Adsorbția** la receptorii celulari are loc prin intermediul AgHBs (pre-S1), iar receptorul celular definitiv nu este cunoscut.

**Strategia de replicare** a genomului este similară viroizilor. Sinteza ARN-ului se realizează cu ajutorul polimerazei ARN II celulară. Structurile multimerice formate prin clivare și ligaturare succesivă se transformă în structuri monomerice circulare.

**ARN-ul antigenomic** servește ca matriță pentru ARN progen și codifică proteina HD (ORF5).

**ARN-ul genomic** la nucleotidul 1012 poate conține uridină sau citozină. În prima variantă în urma proceselor de transcriere-translație se va forma o proteină având 195 aminoacizi. Modificarea poziției 1012 în varianta doi va determina sinteza unei proteine cu 214 aminoacizi. În dependență de aceste modificări în genomul VHD se determină sinteza a două forme de proteină virală cu funcții diferite:

- p 24 HD (mică-195 aminoacizi) necesară pentru replicarea VHD.
- p 27 HD (mare-214 aminoacizi) inhibă replicarea, asigură împachetarea VHD cu AgHBs.

## Relații virus – celula gazdă

**Culturi celulare.** În culturi celulare primare de hepatocite umane, de cimpanzei sau de marmotă se determină replicarea genomului VHD într-un număr mic de celule, limitat la un singur ciclu replicativ. Deci, replicarea VHD nu necesită prezența de helper. Prin transfecție de ARN VHD are loc sinteza de virioni compleți, însă, doar în prezența proteinelor de suprafață ale VHB.

**Animale.** La cimpanzei hepatita determinată cu VHD poate fi cauzată prin infectarea acestora cu ser de la purtători cronici umani, care conțin VHB și VHD, cauzând o *coinfecție*; sau cimpanzeilor purtători de VHB a serului ce conține VHD, obținându-se o *suprainfecție*. Boala variază, având o evoluție de la stare moderată la severă, cu prezența AgHBc și AgHD în hepatocite. În coinfecție, AgHD se detectează după ce AgHBs apare în ser.

*Marmota* suportă o infecție similară cimpanzeilor în prezența WHV.

*Șoarecii* infectați experimental nu se îmbolnăvesc.

## PATOGENEZA – IMUNITATEA

Pătrunderea VHD în organism are loc pe cale parenterală și evoluția ulterioară a bolii depinde de procesul de infectare, fie **prin coinfecție**, fie prin **suprainfecție**.

**În coinfecție** are loc infectarea concomitentă cu VHB și VHD și infecția se manifestă ca o hepatită acută după o incubatie de 6-12 săptămâni. Coinfecția poate fi confirmată prin detectarea AgHD la 1-10 zile de la debutul clinic al bolii (16-86% din pacienți) și apariția anti-HD IgM la 2-3 săptămâni. Răspunsul imun poate avea două variante:

- a) de tip IgM tranzitoriu, fără răspuns imun de tip IgG;
- b) de tip IgM de scurtă durată, urmat de anti-HD IgG pentru perioade îndelungate. Prezența Ac nu cauzează eliminarea antigenelor virale, acestea fiind detectate în hepatocite.

Replicarea VHD în hepatocit reprimă replicarea VHB, exprimată prin niveluri scăzute de ADN VHB în ser și supresia sintezei de AgHBs. Diagnosticarea coinfecției se face în baza determinării anti-HBc IgM și anti-HD IgM. În hepatita autolimitantă anticorpilor vor acționa asupra ambelor virusuri, determinând dispariția AgHBs și AgHD din ser și hepatocite. Anti-HBs conferă protecție, atât pentru VHB, cât și pentru VHD.

**Suprainfecția** are loc după infectarea unui purtător cronic de VHB cu VHD. La interval de 2-6 săptămâni, la 50-70% dintre pacienți se declanșează o hepatită acută, în rezultatul multiplicării VHD, fapt asigurat de prezența în hepatocite a VHB. Suprainfecția pe fondul persistenței AgHBs și a AgHBc se caracterizează prin prezența în hepatocite a AgHD, iar în ser a ARN VHD,





a AgHD și anti-HD IgM, însă nu și a anticorpilor VHB de tip IgM (probabil datorită fenomenului de interferență). S-au descris suprainfecții cu caracter autolimitant, când au dispărut marcerii infecției cu VHB, apoi și cu VHD, cu eliminarea ambelor virusuri. Infecția latentă cu VHD se observă la pacienții cu ciroză, infectați cu VHD, cărora li se face transplant de ficat. Noul țesut hepatic se infectează la rândul său, dar infecția este neproductivă, fără eliberare de virioni. O infecție inaparentă latentă cu VHD poate fi activată prin suprainfecția cu VHB.

**Mecanismele patogenetice**, indiferent de modalitatea de infectare, nu sunt pe deplin cunoscute. Intensitatea și tipul leziunilor hepatocitelor, evoluția diferită spre hepatită fulminantă sau cronică depind de diferiți factori, ca:

- a) căile prin care se realizează funcția de helper a VHB și interferența replicării lui de către VHD;
- b) activitatea răspunsului imun la procesele de hepatocitoliză și eliminarea VHD;
- c) intensitatea și tipul răspunsului imun anti-VHB: un răspuns imun slab duce la hepatită cronică B, favorizează persistența VHD și progresul spre ciroză; un răspuns imun excesiv anti-VHB, asociat cu prezența VHD în hepatocit, duce la forme clinice fulminante.



## I.4. HEPATITELE VIRALE PARENTERALE „NON B”, „NON C”

Pe plan mondial, o parte importantă din hepatitele virale cu mecanism parenteral de transmitere (10% posttransfuzionale și 20% în comunitate) nu sunt cauzate de virusurile hepatotrope VHB, VHC, VHD. Prin tehnici de amplificare genică, în sângele pacienților cu hepatite acute sau cronice, au fost depistate o serie de alte virusuri, transmise parenteral, precum **virusul hepatitei GB (VHGB)**, **virusul hepatitei TT (VTT)**, **virusul P.M. (V.P.M.)**, **virusul SEN (VSEN)** etc.

### VIRUSUL HEPATITEI GB (VHGB)

A fost denumit astfel, după inițialele numelui unui chirurg, bolnav de hepatită, al cărui ser a fost utilizat pentru transmiterea experimentală a hepatitei la tamarin (Deinhardt, 1967). Virusul face parte din familia Flaviviridae și include trei subtipuri: VHGB-A, VHGB-B (virusuri ale tamarinului) și VHGB-C - virus uman, cu un grad de omologie genică între subtipuri de 95% și un grad de omologie genică de 25% cu VHC. **Genomul virusului VHGB** conține ARN monocatenar, liniar, de sens pozitiv, ce codifică aproximativ 2900 aminoacizi. Sinteza proteinelor structurale este codificată la capătul 5', a celor nestructurale la capătul 3'. Genomul mai conține două proteaze și ARN-polimerază ADN dependentă.

Până în prezent nu s-a stabilit replicarea VHGB în ficat, respectiv și rolul etiologic al acestuia în hepatitele virale. Asocierea cu VHC este destul de frecventă, VHGB-C fiind determinat la 30-50% din pacienți cu hepatită cronică C, însă această asociere nu pare să influențeze severitatea maladiei. Se presupune, că VHGB poate fi un virus defectiv și replicarea acestuia necesită prezența VHC.

Transmiterea parenterală se efectuează prin transfuzii repetate de sânge, hemodializă sau utilizare intravenoasă a drogurilor. Nu s-a confirmat existența cazurilor de transmitere a bolii pe cale sexuală. Ca marker al replicării virale servește ARN-ul viral, prezent în serul pacienților din primele zile după infectare, a anticorpilor IgM, detectați după 10-12 zile de la infectare și a anticorpilor IgG, detectați mai târziu (după o lună).

### VIRUSUL HEPATITEI TT (VTT)

A fost detectat în serul pacienților cu hepatită „non A-G”, caracterizată prin niveluri crescute de transaminaze și denumit TT după inițialele numelui pacientului de la care a fost prima dată izolat (Nishizawa și colab. 1997), fiind cunoscut și sub denumirea de “virus transmis prin hemotransfuzie”.

VTT, având unele caractere comune și cu virusurile din familiile Parvoviridae, și cu cele din Circoviridae a fost repartizat într-o familie nouă – **Paracircoviridae**.

**Virionul** are dimensiuni de 30-50 nm, capsidă de simetrie icosaedrică, este neînvelit.

**Genomul** conține ADN liniar, monocatenar, de sens negativ, circular închis covalent. Mărimea genomului variază între 3808-3853 nucleotide. Este constituit dintr-o regiune necodificată-NTR (cu rol în replicare) și a doua codificată, ce cuprinde 3 ORF-uri. Se consideră că ORF1 codifică proteinele structurale identice proteinei VPI a circovirusurilor, iar ORF2 codifică proteinele funcționale. Tulpinile izolate de VTT prezintă o heterogenitate destul de înaltă comparativ cu alte virusuri ADN.

**Etapele replicării** virale nu sunt cunoscute definitiv. Se presupune, că replicarea decurge cu participarea intermediarilor de tip ARN, însă reverstranscriptaza nu a fost determinată. VTT nu se cultivă în culturi celulare. La cimpanzeii infectați experimental, după o perioadă de viremie se constată dispariția virusului. Virusul se replică în ficat și titrul ADN-ului viral din hepatocite este de zeci de ori mai mare față de ADN-ul seric. Viremia variază în concentrații de  $10^3$ - $10^8$  particule/ml. Concomitent, VTT poate fi găsit în mononuclearele periferice, în secrețiile nazo-



faringiene, salivă, laptele matern, materiile fecale. Investigarea unui număr mare de pacienți cu afecțiuni hepatice și donatori de sânge, presupune că VTT este un agent infecțios larg răspândit, cu patogenitate redusă și cu infecție persistentă.

**Răspunsul imun umoral** cu formare de Ac este minimal și incapabil de eliminare a virusului din organism. La pacienții cu infecție cronică se determină în circulația sangvină complexe imune VTT IgG.

**Diagnosticul de laborator** nu este de uz curent, deoarece răspunsul imun este slab, și datorită variabilității virale înalte, prin metoda PCR este puțin posibil de a cuprinde spectrul complet de variante virale. Infecția este larg răspândită, cu ratele de prevalență cele mai înalte în Africa și America de Sud, cele intermediare în Asia și cele mai mici în SUA și nordul Europei.

**Transmiterea virusului** se realizează parenteral (se detectează la 36% donatori de sânge), dar și pe cale enterică, virusul fiind eliminat cu materiile fecale.

### **VIRUSUL P.M. (V.P.M.)**

A fost detectat în serul unui pacient (P.M.) cu hepatită acută „non A-E”. O secvență de ADN a V.P.M. s-a constatat identică cu VTT, însă comparându-se genomurile celor două virusuri, s-a determinat existența separată a acestora, iar V.P.M. fiind apropiat genomic de familia Circoviridae.

Există informație insuficientă despre acest virus.

### **VIRUSUL SEN (VSEN)**

A fost descoperit în anul 1999, este un nou virus posttransfuzional, implicat în hepatopatiile virale. Poartă denumirea după inițialele primului pacient, în al cărui ser a fost depistat. Este un virus ADN, monocatenar, fără înveliș. Este asociat cu hepatitele acute sau cronice de etiologie neprecizată. Prezența în ser a VSEN a fost demonstrată prin constatarea viremiei ADN SEN. La nivel de hepatocit, virusul încă nu a fost detectat. VSEN este prezent la aproximativ 30% din pacienții cu HIV, la 68% cu hepatite virale cronice, la 83% de hepatite posttransfuzionale și în sângele stocat cu 5-10 ani în urmă. Tratament antiviral adecvat nu există.



## 2. EPIDEMIOLOGIA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA HEPATITELOR VIRALE PE PLAN GLOBAL

Conform estimărilor Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), 2 miliarde din populația globului au contractat infecția cu **virusul hepatitei B (VHB)**, dintre care 350-400 milioane de persoane sunt infectate cronic, cu riscul de a se infecta cu virusul hepatitei D (VHD). Ei prezintă o sursă potențială de infecție pentru restul populației. Circa 170 milioane persoane sunt infectați cu VHC și mai mult de 10 milioane cu virusul hepatic D (VHD). În fiecare an apar, în diferite arii geografice, peste 100 mii cazuri de hepatită fulminantă, 400 mii hepatite cronice (HC), 700 mii ciroze hepatice (CH) și aproximativ 300 mii cazuri de carcinom hepatic primar (CPH). Astfel, numai hepatita virală B (HVB) determină anual 500 mii–1,2 milioane decese, reprezentând a 9-a cauză de deces în lume și a 2-a cauză de mortalitate prin cancer după tutun.

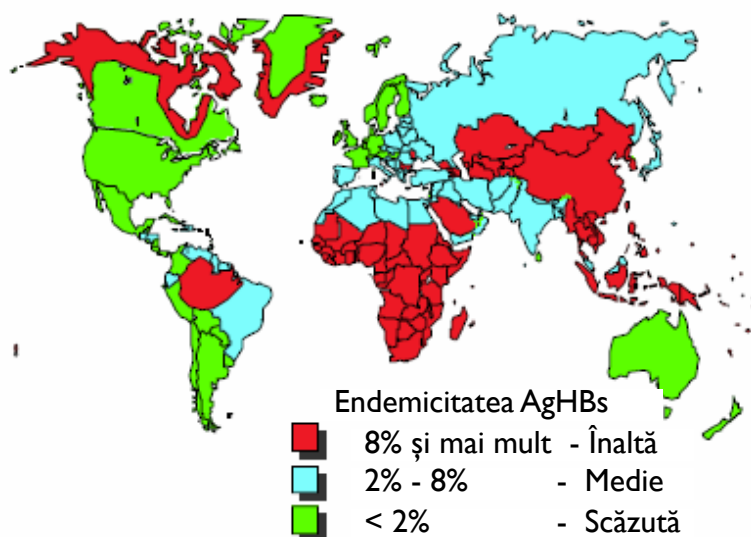
Prevalența infecției cu VHB în populația generală variază considerabil în diferite teritorii și evidențiază 3 zone de endemicitate. Aproape 45% din populația lumii locuiește în regiuni cu **endemicitate înaltă** prin HVB (frecvența decelării markerului AgHBs ajunge ori depășește 8%, riscul de infectare pe parcursul vieții depășește 60% și există un risc major de contaminare în copilărie): Africa Subsahariană, Asia de Sud-Est, Bazinul Amazonian.

Alte 43% locuiesc în regiuni cu **endemicitate medie** (frecvența decelării AgHBs variază în jur de 2-7%, riscul de infectare pe parcursul vieții este de 20-60% pentru toate grupele de populație: Orientul Mijlociu, America de Sud și Centrală, Asia Centrală, Europa de Sud-Est.

Restul populației (12%) locuiește în teritorii cu **endemicitate redusă** (frecvența decelării AgHBs este sub 2%, iar riscul de infectare pe parcursul vieții ajunge la 20%: America de Nord, Europa de Nord-Vest, Australia, America de Sud, Canada.

Actualmente, Republica Moldova, poate fi calificată ca o zonă cu endemicitate înaltă, deoarece, testarea donatorilor primari a determinat un nivel de portaj al AgHBs de peste 10%.

**Figura 10. Distribuția geografică a prevalenței AgHBs**



Sursa: *World Health Organization. Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services, 2001 Geneva, WHO, WHO/V&B/01.31*

În Europa, anual, se infectează de la 900 mii până la 1 mln. de persoane, fiecare a patra persoană dezvoltând o formă manifestă. Evoluția infecției cu VHB este invers proporțională cu vârsta: cu cât persoana infectată este mai tânără, cu atât probabilitatea cronicizării hepatitei virale este mai înaltă. La copiii infectați, până la vârsta de 1 an, riscul apariției infecției acute simptomatice este



de doar 1%, pe când riscul cronicizării infecției reprezintă 90%. Printre copiii infectați cu VHB având vârsta cuprinsă între 1 și 5 ani, de la 25 la 50% vor deveni purtători cronici, iar printre cei mai mari de 5 ani – 6-10%.

Din datele epidemiologice ale OMS s-a stabilit, că la nivel mondial, **infecția virală C** afectează 3% din populație. Din punct de vedere al repartiției geografice, se individualizează 4 arii de prevalență:

- prevalență foarte joasă – Anglia, țările Scandinave;
- prevalență joasă (0,2-1%) – țările din vestul Europei, America de Nord, Australia;
- prevalență intermediară (1,1-5%) – țările din estul Europei, bazinul Mediteranean, Asia, Egiptul;
- prevalență înaltă (5-10%).

În țările din Europa de Vest se apreciază că aproximativ 5 milioane de oameni au infecție cronică cu VHC. În SUA s-a estimat, că aproximativ 3,5 milioane de persoane au infecție cronică cu virus hepatic C, anual, înregistrându-se peste 150.000 cazuri noi.

**Virusul hepatitei D** are o răspândire geografică generală, cu predominanță în unele zone geografice, unde poate fi endemic (bazinul Mării Mediteraneene, Europa de Est, teritoriile Amazonului și în unele zone subtropicale ale Africii).

Rata de cronicizare a infecțiilor virale hepatice provocate de VHB se estimează la 15-20% și VHC la 85%.

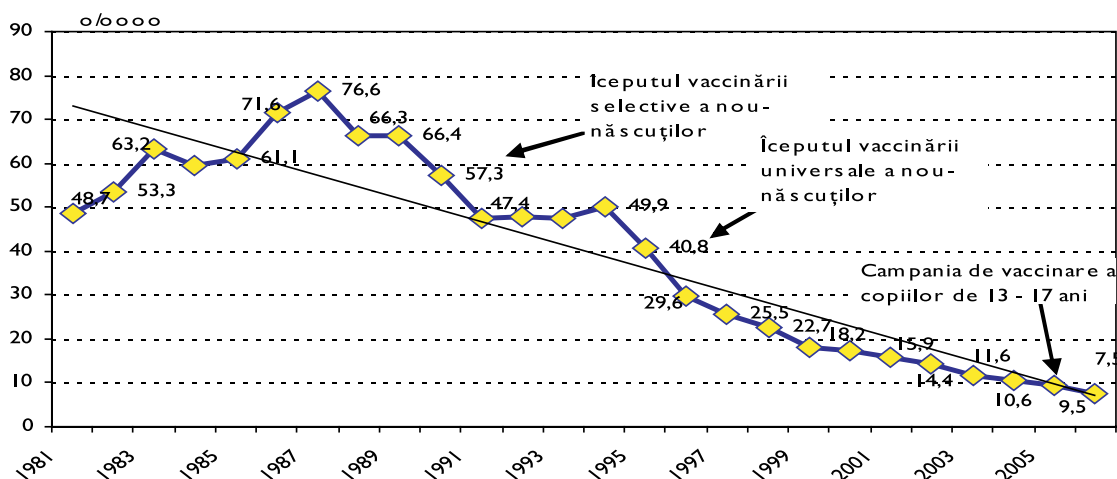
**Tablelul 8.** Spectrul serologic al diferitor hepatite virale acute în diferite zone geografice

Țara	Tipuri de hepatite virale %		
	HVA	HVB	HVC
Danemarca	39	55	6
Italia	52	30	18
Suedia	62	25	13
Grecia	70	14	16
Marea Britanie	59	28	13
Moldova	46	38	16

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA HEPATITELOR VIRALE B, C ȘI D ÎN REPUBLICA MOLDOVA

Pentru prima dată ca formă nozologică independentă, hepatita virală B (HVB) în republica noastră a început a fi înregistrată în anul 1966 la nivel de 34,3 cazuri la 100.000 populație. În anii următori, morbiditatea treptat crește, atingând în 1974 nivelul maxim de 85 la 100 mii populație. Ulterior incidența scade până la 47,9 la 100 mii populație în anul 1979, după care urmează o altă fază de creștere a incidenței, până la 76,6 la 100 mii populație în anul 1987. Începând cu anul 1988, urmează a doua fază de reducere a nivelului de morbiditate, care continuă până în prezent, constituind în anul 2006 indicele de 7,48 la 100 mii populație.

**Figura 11. Dinamica morbidității prin hepatita virală B în Republica Moldova, anii 1981-2006**



Indicii morbidității prin hepatita virală B, depășesc cu mult indicii înregistrați în majoritatea țărilor europene (de la 0,2 la 100 mii populație în Luxemburg până la 1,8 în Olanda), ceea ce contribuie la sporirea numărului de bolnavi cu hepatită cronică, ciroză hepatică și cancer primar hepatic. Indicele morbidității prin hepatite virale cronice și ciroze hepatice crește de la 772,9‰ în anul 1989 până la 1693,7‰ în anul 2005. Conform datelor statistice, în Republica Moldova, anual se înregistrează circa 2700 purtători ai AgHBs noi depistați, circa 7000 persoane cu HCr și CH, circa 200 cazuri CPH. În urma HCr, CH, anual decedează peste 3000 persoane, iar în urma CPH- circa 300 bolnavi.

Morbiditatea populației prin hepatite acute și cronice duce la consecințe socio-economice extrem de grave.

### Morbiditatea prin HVB acută în Republica Moldova după vârstă și sex

Unii din factorii biologici ce ar putea influența morbiditatea prin diferite infecții sunt sexul și vârsta, ce servesc ca criterii în determinarea grupurilor de risc. Pentru morbiditatea prin HVB factorul de vârstă a jucat un rol semnificativ, servind și ca unul din argumente în implementarea vaccinării totale contra HVB în rândul nou-născuților în Republica Moldova, începând cu anul 1994. În rezultat, ponderea morbidității prin hepatite virale B în grupele de vârstă 0-2 ani și 3-6 ani pe parcursul celor 12 ani (1995-2006) a scăzut de la 238 la cazuri unice. Persoanelor de sex masculin le revine o pondere mai mare în morbiditatea prin HVB, constituind 55,8% în raport cu 44,2% în rândul persoanelor de sex feminin.

### Repartizarea teritorială a morbidității prin HVB

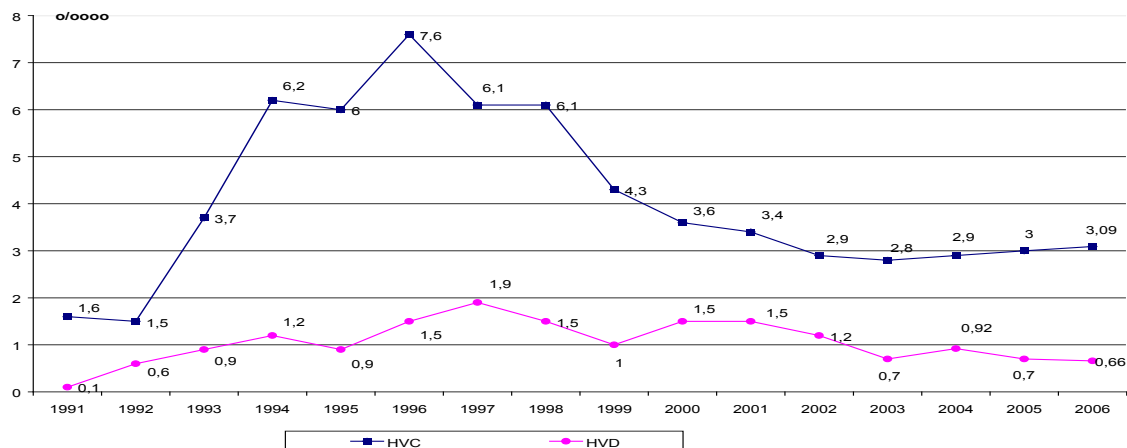
Repartizarea teritorială a incidenței hepatitei virale acute B în Europa poartă un caracter neuniform, crescând de la Nord la Sud și de la Vest la Est.



Pentru Republica Moldova, morbiditatea prin HVB variază în dependență de zone. Cu acest scop toate raioanele republicii (cu excepția celor transnistrene) au fost repartizate în 3 zone landșafto-geografice: Nord, Centru și Sud. Cea mai semnificativă scădere a incidenței prin HVB s-a constatat în zona de Centru – de la 40,0‰ în anul 1996 până la 19,6‰ în 1999, o scădere de 2 ori. În zona de Nord descreșterea a fost de 1,7 ori (de la 19,1‰ în 1996 până la 11,5‰ în 1999), iar cea mai lentă scădere s-a semnalat în zona de Sud, doar de 1,1 ori (de la 29,5‰ în 1996 până la 22,9‰ în 1999).

## HEPATITA VIRALĂ C

**Figura 12.** Dinamica morbidității prin VHC și VHD acute în Republica Moldova, anii 1991-2006



Hepatita virală C, a fost oficial înregistrată în RM în anul 1991. Datele prezentate în figura 12 ne demonstrează faptul că morbiditatea prin această infecție a crescut treptat până în 1996 - de la 1,62‰ la 7,6‰, o creștere de 4,7 ori. Începând cu anul ulterior, 1997, cifra este în descreștere de 2,5 ori, atingând în 2006 indicele de 3,09‰. Cei mai avansați indici se înregistrează în localitățile urbane. Analiza și evaluarea cazurilor de HVC acute înregistrate în raioanele și municipiile RM pe parcursul anilor 1996-2000, cu determinarea grupelor de vârstă cel mai frecvent atacate de infecția cu VHC demonstrează, că ponderea acestei infecții crește odată cu creșterea vârstei – de la 1,2% în grupa de vârstă 0-2 ani până la 62% în grupa de vârstă 20-49 ani, după care urmează o scădere până la 9,5% la persoanele ce au depășit vârsta de 60 ani. Deci, în cazul HVC, grupa de risc majoră o constituie persoanele de vârstă 20-50 ani.

## HEPATITA VIRALĂ D

Ponderea grupelor de vârstă în morbiditatea prin HVD crește odată cu vârsta – de la 0,5% pentru persoanele de 0-2 ani și 3-6 ani până la 46,6% în grupa de vârstă 20-29 ani, cu o reducere ulterioară până la 0,5-1,0% în grupele de vârstă 50 și mai mulți ani. În ceea ce privește sexul, mai frecvent afectați de această infecție, ca și în cazul virusurilor hepatice B și C, sunt bărbații, constituind 66,3%, în raport cu 33,7% față de populația feminină.



## 2.3. DATE EPIDEMIOLOGICE

### PERIOADA DE INCUBAȚIE

#### a. Hepatita virală B

Perioada de incubație a infecției cu VHB variază de la 45 până la 180 zile.

#### b. Hepatita virală C

Perioada de incubație variază de la 14 până la 110 zile, având valori medii de 28-43 zile. Divergențele care totuși se semnalează, sunt argumentate de existența mai multor genotipuri ale VHC.

#### c. Hepatita virală D

Perioada de incubație în HVD variază de la 21 până la 90 zile, iar debutul bolii este, de regulă, insidios.

### POPULAȚIA RECEPTIVĂ

#### a. Hepatita virală B

Sunt considerate receptive la infecția cu VHB toate persoanele care nu au suportat hepatita B în nici una din formele sale și, deci, la care nu sunt depistați următorii markeri ai hepatitei B: AgHBs, anti-HBs și/sau anti-HBc. Indivizii cu HBs-antigenemie sunt deja infectați, iar cei anti-HBs seropozitivi sunt imuni. Persoanele cu anticorpi anti-HBc au suportat HVB în trecut; acești anticorpi nu au calitate protectoare, dar cazuri de reinfectare cu VHB la posesorii acestora nu sunt atestate.

#### b. Hepatita virală C

Sunt considerate receptive la infecția cu VHC toate persoanele care nu au suportat HVC în una din formele sale și, deci, sunt anti-VHC seronegative.

#### c. Hepatita virală D

Populația receptivă este reprezentată de persoanele anti-HBs și/sau anti-HBc pozitive, inclusiv de cele cu HBs-antigenemie. Pentru coinfectia VHB și VHD sunt considerate receptive toate persoanele care nu au suportat hepatita D și/sau B în una din formele sale și, deci, la care nu sunt depistați următorii markeri ai hepatitei B: AgHBs, anti-HBs și/sau anti-HBc. Pentru suprainfecția VHB și VHD sunt considerați receptivi toți bolnavii cu hepatita acută sau cronică B, inclusiv persoanele cu HBs-antigenemie.

### SURSA DE INFECȚIE

#### a. Hepatita virală B

Drept sursă de infecție cu VHB sunt bolnavii cu diferite forme de hepatita B acută și cronică, inclusiv purtătorii antigenului de suprafață al VHB (AgHBs), care sunt considerate persoanele cu HBs-antigenemie persistentă pe parcursul a minimum 6 luni. Un pericol deosebit de infectare prezintă purtătorii de AgHBs la care concomitent în sânge se depistează antigenul "e" al VHB (AgHBe). Persoana infectată devine contagioasă cu 2-8 săptămâni până la debutul semnelor clinice ale hepatitei B, astfel prezentând în această perioadă un risc de infectare cu VHB pentru membrii familiei, partenerii sexuali. Fiind donator, prezintă risc pentru recipientii sângelui, derivatelor din sânge, spermei și organelor. Bolnavii cu hepatita cronică virală B și purtătorii AgHBs pot păstra importanța epidemiologică ca sursa de infecție pe parcursul întregii vieți.

#### b. Hepatita virală C

Drept sursă de infecție cu virusul hepatitei C (VHC) servesc pacienții cu diferite forme de hepatita C acută și cronică, inclusiv purtătorii VHC, care sunt considerate persoanele la care se decelează anti-VHC în sânge.

Căile artificiale de transmitere au un rol dominant în procesul epidemiologic al HVC. Cea mai importantă sursă de infecție prezintă persoanele anti-VHC pozitive, ARN pozitive sau cu indici ALT sporțiți și/sau bolnavi cu hepatomegalie, internați în secțiile de boli chirurgicale, somatice sau





hemodializă, unde se efectuează un număr considerabil de manipulații parenterale; donatorii de sânge, spermă, organe și țesuturi; narcomanii ce își administrează droguri intravenos. Persoana infectată de asemenea, prezintă risc de infectare cu VHC pentru membrii mediului habitual, partenerii sexuali etc. Gravidele anti-VHC seropozitive prezintă risc potențial de infectare cu VHC pentru nou-născuți. Bolnavii cu HVC cronică și purtătorii virusului își pot păstra importanța epidemiologică ca sursă de infecție pe parcursul întregii vieți.

### c. Hepatita virală D

**Sursa de infecție** este reprezentată de bolnavii cu HVD acută sau cronică și purtătorii VHD, drept care sunt considerate persoanele cu persistența AgHBs și anti-VHD total în sânge pe parcursul a minimum 6 luni.

## MECANISMUL ȘI CĂILE DE TRANSMITERE

### Hepatita virală B

La bolnavii cu hepatită acută sau cronică B și purtătorii de AgHBs virusul persistă în *mediile fiziologice ale organismului*. Cantitatea de material infectat, suficient pentru producerea infecției cu VHB, poate fi de 0,00004 ml. Volumul mediu de sânge inoculat în timpul unei înțepături cu acul este de aproximativ 0,0001 ml și poate conține până la 100 doze infecțioase de virus al hepatitei B.

Realizarea procesului epidemic al hepatitei B, asigurând existența VHB ca specie, are loc prin mecanismul parenteral de infectare pe diferite căi stabilite pe parcursul evoluției. Nominalizarea acestor căi și clasificarea lor în două grupuri – naturale și artificiale - are o importanță epidemiologică considerabilă în ceea ce privește aplicarea corectă a măsurilor de profilaxie și combatere a infecției prin HVB.

#### Căile naturale:

- ▲ Perinatală (verticală): transmiterea de la mama infectată la făt în timpul nașterii (intranatală) și intrauterin (când sunt leziuni ale placentei).
- ▲ Orizontală: transmiterea ca rezultat al contactelor habituale directe cu persoane infectate, în lipsa intermediarii prin vectori artificiali.
- ▲ Sexuală: transmiterea ca rezultat al contactelor sexuale cu persoane infectate.

#### Căile artificiale:

##### 1. Nozocomială – transmiterea infecției prin intermediul intervențiilor medicale:

- ▲ Pacient-medic: Infectarea personalului medical de la pacienții infectați.
- ▲ Pacient-pacient: Infectarea pacienților receptivi de la pacienții infectați prin intermediul echipamentului medical contaminat în timpul acordării asistenței medicale cu aplicarea manipulațiilor parenterale în unitățile medico-sanitare (*manipulații stomatologice, operații chirurgicale, hemodializă, transfuzii de sânge sau derivate sanguine, transplant de organe, injecții, colectarea probelor de sânge sau alte medii fiziologice pentru investigații de laborator, cercetări instrumentale endoscopice etc.*)
- ▲ Medic-pacient: infectarea pacienților prin contact direct cu personalul medical infectat.
- ▲ Pacient-societate: Infectarea ocazională a persoanelor receptive din afara instituției medicale prin intermediul acelor și a altor instrumente medicale ascuțite utilizate care, fiind decontate, nu au fost nimicite definitiv.

**2. Habitual-comunală** – transmiterea agentului patogen în mediul habitual ca urmare a prestării serviciilor cosmetice populației prin intermediul unor vectori artificiali (obiecte de igiena personală: trusa pentru bărbierit, periuța de dinți, prosoape, truse de manichiură și pedichiură, epilatoare și alte dispozitive pentru manipulații cosmetice etc.).

## Utilizarea intravenoasă a drogurilor (AIVD)



**VHB nu se transmite** pe cale aerogenă, alimentară, hidrică sau prin intermediul insectelor hematofage.

În țările unde se respectă strict regulile de dezinfectare și sterilizare a instrumentelor medicale de multiplă folosință, virusul nu se transmite pe această cale. Totodată, în instituțiile medicale unde regulile antiseplice se încalcă, transmiterea VHB are loc prin instrumente, utilaj medical și soluții perfuzante contaminate. Au fost depistate cazuri de infectare cu VHB prin intermediul acelor de acupunctură, lanțete pentru colectarea sângelui. În practică sunt cunoscute cazuri când soluțiile perfuzante în ambalaj mare pentru mai mulți bolnavi au fost contaminate prin intermediul seringilor prelucrate neadecvat, fapt ce a condus la infectarea a sute de pacienți în secțiile unor unități medicale.

În diferite teritorii rolul dominant îl joacă diferite căi de transmitere. În zonele economic dezvoltate o importanță primordială o dețin căile parenterale și sexuale de transmitere, iar în țările în curs de dezvoltare – cea orizontală și perinatală. Schimbările în modul de viață și obiceiuri, starea și educația sanitaro-igienică, factorii economici și sociali în mod esențial determină prevalența anumitor căi de transmitere.

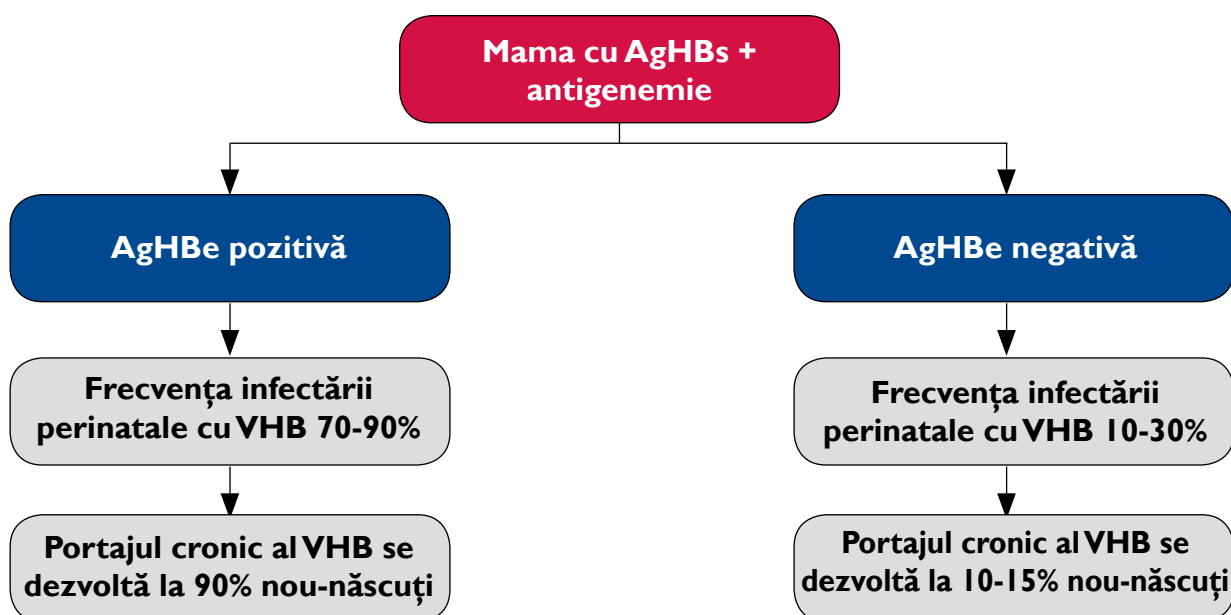
## CARACTERIZAREA CĂILOR NATURALE DE TRANSMITERE A VHB.

### Transmiterea perinatală

Transmiterea perinatală a VHB de la mama infectată copilului este una din cele mai importante căi de transmitere a hepatitei virale B, din acele considerente, că anume la nou-născuți riscul de cronicizare a infecției acute este maximal. Din acești purtători se formează o populație de indivizi cu infecție persistentă, care, la rândul său, va servi drept sursă de infecție pentru alți oameni, inclusiv și pentru copiii lor.

Prin termenul de *transmitere perinatală* se subînțelege, atât infectarea congenitală sau antenatală (intrauterină), cât și infectarea intranatală, ce se realizează în timpul actului nașterii. Aproximativ 98% de cazuri de infectare perinatală au loc intranatal și doar circa 2% din nou-născuți se infectează congenital. Depistarea AgHBs la gravidă nu este un indiciu pentru întreruperea sarcinii sau pentru naștere Cezariană.

**Figura 13.** Evoluția și sechelele infectării perinatale cu VHB





Transmiterea perinatală poate avea loc în două cazuri:

- ▲ Când femeia se îmbolnăvește de HVB acută în timpul gravidității, în special în ultimul trimestru;
- ▲ Când dânsa este purtătoare cronică al VHB (purtător de AgHBs).

Varianta a doua este cea mai frecvent întâlnită și valoroasă din punct de vedere epidemiologic. Dacă femeia face HVB acută în primul trimestru al gravidității, riscul de infectare pentru copil este minimal, cu excepția cazurilor când dânsa în continuare devine purtător al AgHBs. În al doilea trimestru al sarcinii nivelul riscului constituie circa 6%, dar crește considerabil (până la 67%) dacă femeia se îmbolnăvește în al treilea trimestru. Termenii de îmbolnăvire în timpul gravidității și prezența markerilor infectivității înalte (AgHBe) sunt factori determinați în transmiterea perinatală. Evoluția și sechelele infectării perinatale sunt prezentate în schema din figura 13.

## Transmiterea orizontală

Un număr considerabil de cazuri de HVB și portaj al AgHBs este strâns legat de transmiterea agentului patogen de la copil la copil sau de la adult la adult sau adult-copil și invers – cale care deseori este numită orizontală. Importanța relativă a diferitor factori ai căii orizontale de transmitere a VHB încă nu este definitivată. În general, se poate spune că are loc realizarea contactelor directe ale persoanelor receptive cu microcantități de sânge sau alte fluide fiziologice ale persoanelor infectate în mediul habitual. Se consideră că până și cantitățile microscopice de sânge pe pielea purtătorilor de AgHBs cu impetigo, leziuni de scabie, zgârieturi pot provoca îmbolnăvirea cu VHB la persoane receptive cu leziuni ale pielii. Transmiterea orizontală are loc mai frecvent printre copiii mici și adolescenți.

De asemenea, calea orizontală poate fi realizată și în alte vârste. În special o astfel de infectare are loc în mediul habitual al familiilor purtătorilor de AgHBs. Chiar și în teritoriile cu endemicitate joasă a infecției cu VHB a fost demonstrată elocvent răspândirea infecției în familii, atât printre copii, cât și de la adulți la copii și invers. Această concepție a fost confirmată în repetate rânduri prin erupțiile de HVB în familiile purtătorilor cronici ai AgHBs și colective închise de copii – orfelinat, internate, case de copii. Așadar, în republica noastră, nu poate fi neglijată importanța căii orizontale de transmitere a VHB.

## FACTORII DE RISC ASOCIAȚI CU TRANSMITEREA VIRUSULUI

### a. Hepatitei B

- ▲ Transfuzii sau transplante de la donatori AgHBs pozitivi;
- ▲ Multiple manipulații parenterale;
- ▲ Nașterea de la mamă infectată cu VHB;
- ▲ Administrarea intravenoasă a drogurilor;
- ▲ Hemodializa;
- ▲ Traume profesionale cu instrumente medicale contaminate;
- ▲ Contacte sexuale / habituale cu indivizi AgHBs pozitivi;
- ▲ Parteneri sexuali multipli;
- ▲ Examinarea pacienților cu instrumentar stomatologic contaminat.

### Grupele populaționale de risc pentru infecția cu VHB sunt:

- ▲ personal medical și paramedical
- ▲ copii născuți din mame infectate cu VHB
- ▲ homosexuali sau heterosexuali cu parteneri multipli
- ▲ contactii familiari ai purtătorilor de AgHBs
- ▲ imigranți din zone hiperendemică



- ▲ hemofilici și politransfuzăți
- ▲ personalul din serviciile de psihiatrie
- ▲ deținuți și personalul de supraveghere
- ▲ utilizatorii de droguri intravenoase, toxicomani
- ▲ persoanele instituționalizate.

### **b. Hepatitei C**

- ▲ Transfuzii sau transplantate de la donatori infectați. Hemodializa;
- ▲ Administrarea intravenoasă a drogurilor;
- ▲ Traume profesionale cu instrumente medicale contaminate;
- ▲ Contacte sexuale / habituale cu indivizi anti-VHC pozitivi;
- ▲ Parteneri sexuali multipli;
- ▲ Nașterea de la mamă infectată cu VHC.

### **Mediile fiziologice ale organismului potențial infectate cu VHB, VHC și VHD**

- ▲ Sângele și derivatele din sânge
- ▲ Lichidul cefalo-rahidian, pleural, pericardial etc.
- ▲ Exudatul din plăgi
- ▲ Sperma, secretul vaginal, sângele menstrual
- ▲ Organele prevăzute pentru transplantare
- ▲ Saliva, secrețiile nazofaringiene
- ▲ Laptele mamă, lacrima, sputa, sudoarea, urina, fecalele (*fiind contaminate cu microcantități de sânge*).

## **TESTAREA DONATORILOR DE SÂNGE ȘI GREFE**

### **Testarea donatorilor de sânge și grefe la AgHBs**

Tot sângele și produsele sangvine recoltate necesită a fi testate obligatoriu la AgHBs prin metoda imunoenzimatică, cu teste care asigură detectarea minimală a AgHBs la nivel de 0,025-0,5 ng/ml. Se admite utilizarea reagenților prestați în formă de set (variante pe microplăci sau cu bile) de la producători autorizați de către Ministerul Sănătății. Se recomandă a include în afara martorilor din seturi, un martor intern, slab pozitiv, obținut prin diluarea serului și verificat pentru reproductibilitate la valorile de limita minimală.

Serurile primar pozitive vor fi supuse verificării repetate în duble probe, efectuate după aceeași tehnică. Dacă în testarea repetată rezultatul este dublu negativ, proba se considera negativă. Rezultatele pozitive pot fi confirmate prin metoda de neutralizare specifică (testul confirmativ) și/sau depistarea anti-HBc și anti-HBe.

### **Testarea donatorilor de sânge și grefe la anti-VHC**

Principiul și cerințele tehnice de testare la anti-VHC sunt asemănătoare cu cele pentru depistarea AgHBs. Reactivul trebuie să depisteze anticorpi la cel puțin 2 antigeni VHC (NS3 și NS4). Pentru confirmarea rezultatelor pozitive, se poate aplica metoda de imunoblot. Donatorii de sânge și derivatele lui vor fi supuși, peste fiecare 6 luni, controlului la prezența virusurilor VHB și VHC prin metoda reacției de polimerizare în lanț (RPL).



### 3. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR VIRALE

Pentru depistarea agenților cauzali ai infecțiilor virale se utilizează următoarele metode de diagnostic

TESTE SPECIFICE		TESTELE NESPECIFICE
<p><b>I. DIRECTE - depistarea directă a agentului cauzal.</b></p> <p><b>Virusologic</b> – izolarea agentului propriu-zis - „regula de aur” a diagnosticului de laborator. Metoda este laborioasă și de durată (5-10 zile).</p> <p><b>Citologic</b> - studierea agentului cauzal în frotiuri colorate. Este slab sensibilă. Există un anumit subiectivism în aprecierea rezultatelor de către examinator.</p> <p><b>Imunocitologic</b> – evidențierea antigenului în frotiuri cu ajutorul anticorpilor specifici (reacția imunofluorescentă directă). Este o metodă sensibilă, dar se obțin des rezultate fals pozitive sau fals negative.</p> <p><b>Metode molecular biologice</b> – determinarea unui sector specific al ADN/ARN din genomul virusului (reacția de polimerizare în lanț-PCR). Sunt metode înalt sensibile, se apropie de „standardul de aur”.</p> <p><b>Metode serologice</b> - determinarea agentului cauzal prin metoda imunofermentativă (ELISA).</p>	<p><b>II. INDIRECTE - indică indirect prezența Ag în organism.</b></p> <p><b>Metodele serologice</b> – determinarea anticorpilor formați în procesul răspunsului imun al organismului la pătrunderea agentului infecțios.</p> <p><b>RFC</b> - reacția de fixare a complementului</p> <p><b>IFA</b> - reacția de imunofluorescență indirectă</p> <p><b>ELISA</b> - reacția imunofermentativă</p>	<p><b>TESTE BIOCHIMICE</b></p> <p>Activitatea bilirubinei</p> <p>Activitatea GGT</p> <p>Activitatea fosfatazei alcaline</p> <p>Activitatea AST și ALT</p> <p>Timpul protrombinei</p> <p>Amoniacul</p> <p><b>Teste funcționale</b></p>

Actualmente nu există nici o metodă de diagnostic de laborator care ar permite stabilirea unui rezultat cert de 100% privind prezența agentului cauzal. De aceea, în multe cazuri, este necesar de a se efectua 2 sau mai multe metode de diagnostic; deseori se impune efectuarea repetată a investigațiilor de laborator.

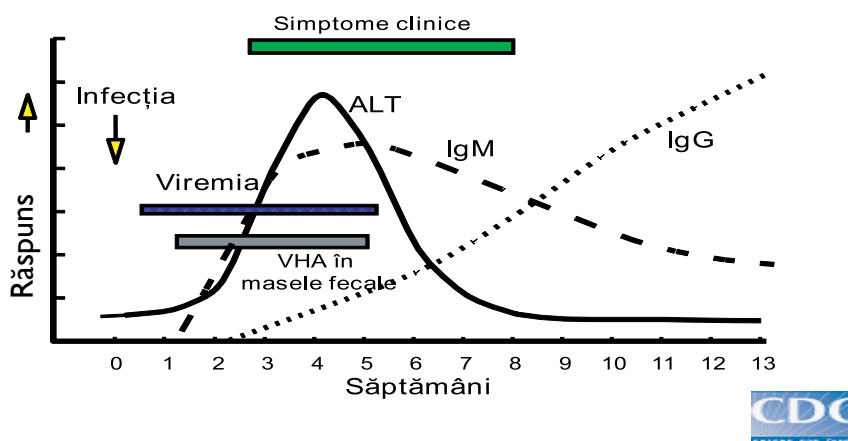
#### 3.1. DIAGNOSTICUL SEROLOGIC AL HEPATITELOR VIRALE

*Indicii ce determină prezența virusului hepatitei în organism se numesc marcheri hepatici.*

#### DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITEI VIRALE A

Pentru diagnosticul imunologic al hepatitei virale A este utilizată metoda ELISA cu depistarea anticorpilor anti-VHA IgM în stadia precoce și anti-VHA IgG, ultimul fiind marker al imunității protective eficace la o infecție ulterioară și metoda PCR cu detecția ARN-VHA. Anticorpilor anti-VHA IgM apar în perioada de incubație cu 3-5 zile înainte de apariția primelor simptome clinice, circulând în sânge pe parcursul perioadei manifeste și mai târziu (circa 4 luni).

Detecția anticorpilor anti-VHA IgG caracterizează finisarea procesului infecțios activ, sanarea organismului. Testarea anticorpilor anti-VHA fără diferențiere pe clase nu este informativă.


**Figura 14. Infecția cu VHA**


### Acidul ribonucleic al VHA (ARN-VHA)

Detecția ARN-VHA a fost posibilă datorită introducerii în practica medicală a PCR. ARN-VHA se depistează în sânge, chiar din faza inițială a procesului infecțios și se înregistrează la pacienții cu un titru înalt anti-VHA IgM. Indicarea ARN viral în sânge în faza precoce a procesului infecțios este metoda de elecție al diagnosticului și aprecierea activității replicative a virusului.

### DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITEI VIRALE B

Diagnosticul pozitiv de hepatită virală, suspectate în baza datelor clinice și epidemiologice se precizează numai cu ajutorul testelor specifice de laborator.

Testele specifice pun în evidență numeroși markeri ai prezenței infecției hepatice cu VHB și anume antigenii:

- |          |           |
|----------|-----------|
| ▲ AgHBs, | ▲ pre-S1, |
| ▲ AgHBc, | ▲ pre-S2, |
| ▲ AgHBe, | ▲ AgHBx   |

La toți acești antigeni se secretă anticorpii respectivi:

- |                         |                |
|-------------------------|----------------|
| ▲ anti- HBs,            | ▲ anti- pre-S1 |
| ▲ anti- HBc-IgM și IgG; | ▲ anti-pre-S2  |
| ▲ anti- HBe             | ▲ anti- HBx    |

Acești antigeni și anticorpii lor respectivi prezintă complexul de markeri specifici ai VHB, detecția cărora diferă după importanță în diagnosticul, prognosticul hepatitei virale și aspectul epidemiologic. Aprecierea rezultatelor indicației anti-HBx și anti-HBpol este studiată insuficient. Pentru uz clinic (diagnosticul de hepatită virală B acută, urmărirea evoluției clinice, vindecarea sau tendința la cronicizare) sunt necesare mai multe complexe de teste (cel puțin primele 3 categorii de markeri).

Pentru diagnosticul imunologic al hepatitei virale B este utilizată **metoda ELISA** cu detecția antigenelor și anticorpilor respectivi, **testul radioimun (RIA)**, **imunodifuzia în gel, RHAI**. Metodele generației a III (ELISA și RIA) sunt cele mai sensibile comparativ cu RHAI (de 10-60 ori) și imunodifuzia în gel (de 1000 ori). Actualmente, testul ELISA s-a impus ca indispensabil pentru diagnosticul infecției cu VHB.

*În mod uzual, pentru diagnostic se cercetează prezența AgHBs.*

**AgHBs** în evoluția hepatitei virale B acute este detectabil în sânge din perioada de incubație, în ultimele 2 săptămâni de incubație înainte de debutul bolii clinice și de apariția semnelor biochimice, apoi persistă în primele 4-6 săptămâni ai perioadei clinice, ulterior formează complexe



cu anti-HBs și în formă liberă nu se testează. Depistarea AgHBs mai precoce arată la infecțiozitate mai majorată, spre exemplu la hepatitele posttrasfuzionale, iar circulația lui mai prelungită arată la o concentrație inițială mai înaltă și gravitatea bolii. **AgHBs** uneori se menține în perioada de boală până la 21 săptămâni.

**Persistența lui mai mult de 6 luni de la debutul bolii prezintă semnificație, fie de trecere în stare cronică, fie în acea de purtător de antigen și se asociază de obicei cu prezența de particule Dane și de ADN VHB.**

Dacă AgHBs nu se apreciază, aceasta nu mărturisește despre sanație și însănătoșire, la majoritatea pacienților, uneori continuu se testează ADN-VHB, ce caracterizează potențiala infecțiozitate. Depistarea AgHBs nu în mod obligatoriu demonstrează replicarea activă a VHB.

Obținerea unui rezultat negativ pentru **AgHBs** nu înseamnă și infirmarea diagnosticului de hepatită virală B. În acest caz sunt posibile următoarele eventualități:

- ▲ Decelarea antigenului a fost încercată prea târziu, după ce acesta a dispărut către sfârșitul bolii.
- ▲ Ag este blocat în complexul antigen-anticorp (în hepatitele virale severe și în hepatita fulminantă). În aceste cazuri, antigenul poate să reapară ulterior în sânge sau este “demascat” prin corticoterapie.
- ▲ Posibil metoda utilizată este insuficient de sensibilă pentru decelarea antigenului.
- ▲ Existența în unele cazuri (5%-10%) a “ferestrei serologice”, perioada în care AgHBs a dispărut din sânge, iar anticorpilor anti-HBs nu au apărut încă (apar mai târziu, în convalescență).

În aceste cazuri numai decelarea de anticorpi anti-HBc IgM, martori ai unei infecții active, permit un diagnostic indubitabil de hepatită virală acută B.

Față de AgHBs apar anticorpilor respectivi **anti-HBs**.

**Anti-HBs** la pacienții cu hepatita B acută se testează tardiv, după dispariția AgHBs. În perioada de convalescență prezența anti-HBs semnifică vindecarea sigură a bolii și imunitatea postinfecțioasă (fiind singurii anticorpi din cursul acestei infecții cu acțiune protectivă).

În majoritatea cazurilor, anticorpilor anti-HBs apar după trecerea unui anumit interval de timp de la dispariția (negativarea) AgHBs rezultând astfel (pentru diagnostic) o „ferastră serologică”. Durata perioadei “ferestrei serologice” negative constituie circa 3-4 luni cu variații până la un an.

Termenul apariției anti-HBs e dependent de statutul imun al pacientului. Titrul anti-HBs rareori este înalt și cu timpul scade până la concentrații nedetectabile. La reconvașcenți, în 10-15%, cazuri după hepatita acută B, chiar după mulți ani de la dispariția AgHBs, nu se determină anticorpilor anti-HBs. De altfel, anti-HBs pot persista pe parcursul vieții.

În plan diagnostic, determinarea anti-HBs poate servi ca criteriu de confirmare retrospectivă a hepatitei virale B în anamneză. Dacă la controlul primar al pacientului, cu complexul simptomatic al hepatitei acute, AgHBs lipsește în sânge și se detectează anti-HBs, aceasta nu numai că nu confirmă, dar dimpotrivă exclude diagnosticul HVB acute. Concomitent s-a constatat, că în HVB la o parte din bolnavi cu anti-HBs se determină o antigenemie (AgHBs) continuă. Anti-HBs se detectează la cercetările de screening ale populației aparent sănătoase, mai ales la adulți, confirmând postinfecția HVB.

Controlul sistemului AgHBs - anti-HBs în dinamică are importanță clinică pentru aprecierea evoluției procesului infecțios și deznodământul lui. Detectia anticorpilor anti-HBs, îndeosebi în combinație cu anti-HBe se consideră ca criteriu veridic al dezvoltării imunității protective postinfecțioase, însănătoșirii după hepatita B acută. Creșterea anti-HBs în sânge este un test control destul de informativ ce confirmă eficacitatea vaccinării împotriva infecției HVB. Cu totul altfel, este apreciată apariția precoce al anti-HBs, detectia lor în faza acută a HVB, imediat după dispariția AgHBs. O așa dinamică a sistemului AgHBs-anti-HBs este considerată ca un prognostic nefavorabil și prevestește riscul apariției **HVB cu evoluție fulminantă și comă hiperimună**.

**AgHBc (AgHBcor)** poate fi depistat numai în biotatul ficatului în nucleele hepatocitelor. În sânge în formă liberă nu se testează, dar amplasarea lui cordială apreciază imunogenitatea



lui majoră. În serul sangvin al pacienților cu HVB acută apar precoce anticorpi anti-HBc IgM, indicația cărora are o importanță diagnostică majoră, **fiind indicatorul principal de infecție acută.**

**Anti-HBc IgM** în serul pacienților cu hepatită virală B acută apar foarte precoce, detecția lor are o mare importanță diagnostică. **Anti-HBc IgM** se determină deja în perioada de incubație, la debutul fazei acute a hepatitei virale, odată cu creșterea maximală a ALT, în perioada icterică, confirmând replicarea activă a virusului. Pentru controlul neinvaziv anti-HBc poate fi apreciat și în salivă având mare importanță în medicina pediatrică; în special în stadiile tardive, când rezultatele testării AgHBs sunt negative. Detecția anti-HBc IgM este un criteriu de diagnostic a hepatitei virale B foarte important, în special în perioada “ferestrei serologice” de la dispariția AgHBs și până la apariția anti-HBs. Anti-HBc IgM poate circula în sânge pe parcursul a câtorva luni, apoi după finisarea procesului infecțios, dispăre ca criteriu de eliberare a organismului de VHB (vindecarea bolii). Persistența lui în sânge în titru mic semnifică o infecție persistentă activă sau acutizarea procesului cronic.

**Anti-HBc IgG.** La bolnavii cu HVB în faza acută, concomitent cu anti-HBc IgM apar și anticorpii clasei IgG. Apariția anti-HBc IgG poate fi detectată de la debutul procesului infecțios, care corespunde fazei de incubație. După dispariția anticorpilor IgM a VHB, ei pot circula timp îndelungat în sânge, posibil toată viața, fiind un *marcher al postinfecției*.

La reconvalescenți, după suportarea hepatitei virale acute, anti-HBc IgG se depistează concomitent cu anti-HBc IgM. La unii bolnavi cu HVB, anti-HBc IgG pot fi absenți, ceea ce presupune o imunitate slabă la infecție.

**AgHBe** în hepatita B acută se testează în sânge la etapele precoce a procesului infecțios, la primele manifestări clinice ale hepatitei virale; frecvent la evoluția ciclică cu acutizări a HVB. În formele ușoare ale hepatitei virale, circulația lui e tranzitorie. AgHBe, de regulă, nu se testează în sânge la o antigenemie (AgHBs) continuă. În formele grave a hepatitei B circulația AgHBe este mai îndelungată, însă depistarea AgHBe mai precoce decât AgHBs este imposibil.

S-a constatat, că spre deosebire de AgHBs, depistarea AgHBe caracterizează activitatea replicativă înaltă a VHB. Titrele înalte ale AgHBe corespund activității replicative înalte a ADN viral și întotdeauna se îmbină cu detecția corpusculilor complete Dane.

**AgHBe este considerat ca marcher al infecțiozității înalte a sângelui.** S-a demonstrat, că la pătrunderea serului, care conține AgHBe în singhele persoanei aparent sănătoase, riscul infectării este de câteva ori mai înalt, decât la contaminarea sângelui după seroconversie (dispariția AgHBe și apariția anti-HBe). Deci, indicația AgHBe are însemnătate nu numai diagnostică, dar și epidemiologică.

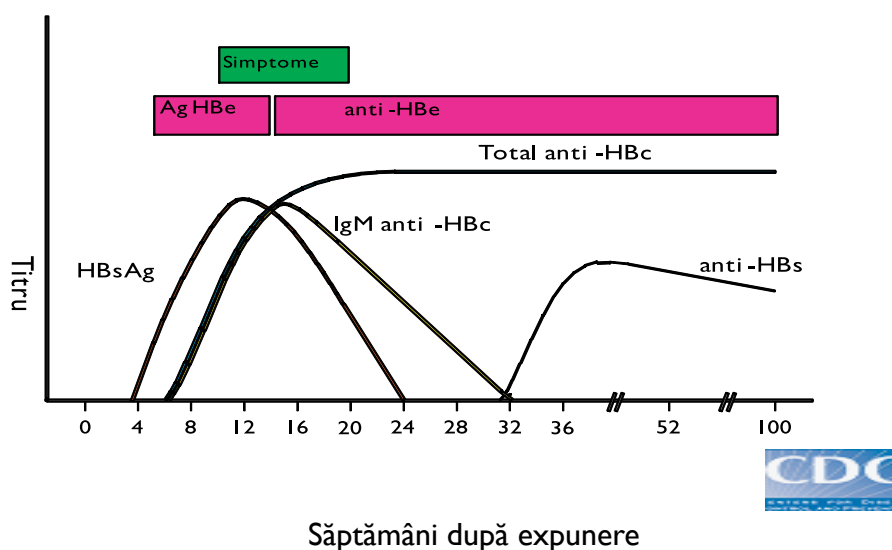
**Anti-HBe** în HVB acută cu evoluție ciclică se testează în sânge în stadiile precoce. De obicei, la un control primar la majoritatea pacienților, AgHBe în formă liberă nu se apreciază. Peste puțin timp apar anti-HBe. Ca regulă, aceasta are loc la a 2-3 săptămână a perioadei icterice și poate rezulta o altă “fereastră serologică” cu dispariția AgHBe și apariția anticorpilor anti-HBe. Dimpotrivă, persistența AgHBe constituie un indice al evoluției bolii către cronicizare a unui proces activ (valoare predictivă nefavorabilă). Anti-HBe circulă în sânge mai frecvent pe parcursul a 2-5 ani, mai rar câteva luni.

Apariția seroconversiei (AgHBe - anti-HBe) indică scăderea bruscă a activității procesului infecțios. Cu toate acestea, și după apariția anti-HBe, replicarea VHB nu se stopează complet. Circulația îndelungată a anti-HBe la purtătorii cronici ai AgHBs poate fi rezultatul mutației VHB în zona precor cu formarea tulpinii VHBe. Este important, că seroconversia AgHBe - anti-HBe deseori corelează cu creșterea ALT, iar uneori și cu acutizarea procesului clinic.





**Figura 15.** Hepatita virală B acută.



### Aprecierea sumară a complexului de markeri.

Aprecierea sumară a complexului de markeri ai HVB permite caracteristica mai amplă și mai sigură a fazelor debutului procesului infecțios, cu aprecierea profilului serologic al pacienților. La o investigație primară, diagnosticul de VHB se confirmă prin detecția în sânge a AgHBs, anti-HBc IgM. În dependență de gravitatea bolii se vor testa AgHBe și ADN VHB. Rezultatele indicării AgHBe - anti-HBe sunt variabile. La pacienții gravi se păstrează AgHBe, la pacienții ușori pot apărea anti-HBe sau poate să lipsească.

În faza de reconvenșență în formele ușoare a HVB cu evoluție ciclică, AgHBs deja nu se depistează. În formele grave se păstrează și se depistează anti-HBc IgM și IgG. La un debut progredient al infecției HVB, se observă o circulație stabilă în sânge a markerilor ADN VHB, AgHBs și AgHBe.

**Tabelul 9.** Diagnosticul serologic al hepatitei virale B

Marker	Perioada de incubație	Infecția acută	Postinfecție	Infecția cronică	Vaccinarea
AgHBs	+ <sup>a</sup>	+	-	+	-
AgHBe	+	+	-	+/-	-
ADN-VHB	+	+	- <sup>b</sup>	+/-	-
anti-HBc total	-	+	+	+	-
anti-HBc IgM	-	+	-	+/- <sup>c</sup>	-
anti-HBe	-	-	+/-	+/- <sup>d</sup>	-
anti-HBc	-	-	+	-	+

+<sup>a</sup> detectabil, +/- poate fi detectabil, -<sup>b</sup> PCR negativ, <sup>c</sup> poate fi pozitiv în 10-15% cazuri, <sup>d</sup> pacienții cu HB cronică se detectează AgHBe sau anti-HBe.

**Tabelul 10.** Combinarea tipică a markerilor hepatitei B și importanța lor clinică

AgHBs	Anti-HBs	Anti-HBc	AgHBe	Anti-HBe	ADN-VHB	Concluzie (diagnosticul)
+	-	IgM	+	-	+	Hepatita B acută de infecțiozitate majorată.
+	-	IgG	+	-	+	Hepatita B cronică de infecțiozitate majorată.
+	+	IgG	-	+	- / +	Hepatită B cronică cu infecțiozitate micșorată.
+	+	+	+/-	+/-	+	Infecție cu două subtipuri VHB sau Seroconversie. Se întâlnește rar.
-	-	IgM	+/-	+/-	+ / -	Hepatita acută.
-	-	IgG	-	+/-	-	Purtători de AgHBs cu replicare joasă.
-	+	IgG	-	+/-	-	Hepatita B acută. Însănătoșire.
-	+	-	-	-	-	Hepatita B tratată. Reacția la vaccinare împotriva hepatitei B. Posibil diagnostic greșit.

### ADN-ul virusului hepatitei virale B (ADN VHB)

Detecția ADN VHB a fost posibilă în ultimii ani datorită descoperirii metodei PCR. Scopul metodei constă în efectuarea replicării virusului *in vitro*. Cu ajutorul PCR se permite detectarea cantităților minimale de virus până la o moleculă. Volumul mediu de sânge infectat, suficient pentru depistarea ADN VHB a fost de 0,082 ml. ADN VHB se detectează la pacienții și donatorii cu AgHBs negativi în 4,4-7,8%.

La un debut ciclic a hepatitei virale acute, ADN VHB se detectează în sânge chiar din perioada incipientă a bolii. La un debut progredient, circulația ADN HVB se depistează timp îndelungat. Nivel majorat al ADN VHB la majorarea neînsemnată a ALT prezintă markerul unei imunități slabe. Indicarea prezenței ADN VHB a permis confirmarea replicării virusului în monocite și depistarea tulpinilor mutante, posibil nu numai în plasma sângelui, dar și în celulele mononucleare circulante. ADN viral poate fi decelat și în genomul hepatocitelor, precedând dezvoltarea cancerului hepatic, chiar în situația unor reacții serologice negative.

Determinarea ADN viral s-a obținut și în diferite secreții a persoanelor infectate cu VHB (saliva, sperma).

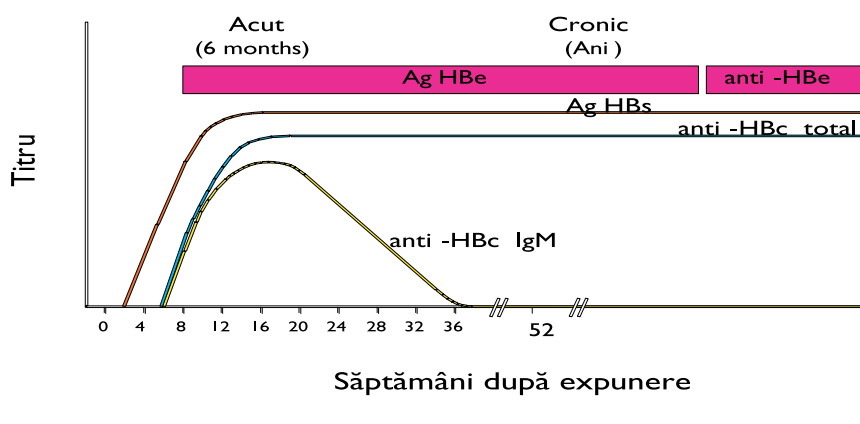
Pentru HVB, PCR este o metodă de referință care completează diagnosticul ELISA de screening primar, fiind un criteriu de apreciere a activității replicative a VHB, aprecierea prognosticului, precum indicarea și aprecierea eficacității tratamentului cu interferon. Este necesar de menționat, că PCR ca și alte metode pot da rezultate fals-pozitive. Pentru a minimaliza numărul acestor reacții, este necesar de respectat condițiile și controlul calității acestei reacții.

### Marcherii hepatitei virale B cronice.

Depistarea markerilor specifici ai HVB are o valoare diagnostică majoră în diagnosticul formelor cronice. Persistența AgHBs timp de 6 luni și mai mult este un indice de apariție a hepatitei virale B cronice.



**Figura 16.** Detecția markerilor hepatitei B evoluție cronică



Criteriu de diferențiere a formelor HVB cronice îi aparține detecției AgHBe. Circulația AgHBe în sânge mai mult de 6 luni de la debutul bolii, confirmă HVB cu activitate replicativă înaltă (AgHBe-pozitiv sau replicativ). Apariția seroconversiei (lipsa AgHBe și prezența anti-HBe) concomitent cu detecția AgHBs duce la dezvoltarea HVB cronice cu activitate replicativă joasă. (AgHBe negativă - hepatită cronică negativă).

În HVB cronică cu activitate replicativă joasă, în dependență de nivelul ALT, se deosebesc hepatită virală B de tip integrativ și hepatită virală B de tip mixt -integrativ.

**Tabelul 11.** Criteriile de diferențiere a HBV cronice de tip replicativ și integrativ

Tipul hepatitei	ADN-VHB	AgHBe	Anti-HBe	Anti-HBc	AgHBs	ALT	anti-HDV anti-HCV anti-HAV
Replicativ	+	+/-	-/+	+	+	+	+
Integrativ	-	-	+	-	+	-	-
Integrativ-mixt	-	-	+	-	+	+	+

Diagnosticul hepatitei virale de tip replicativ confirmă circulația stabilă a AgHBe, testarea ADN-VHB în concentrații mari (mai mult de 50pg/50μl), înregistrarea în ser a anti-HBc clasa IgG și IgM (concentrații mai mici).

Circulația continuă a anti-HBc IgM, îndeosebi în concentrații esențiale într-o măsură oarecare corespunde indicelui activității înalte al alterărilor morfopatologice a ficatului. Dintre testele serologice caracteristice hepatitei virale B cronice cu evaluare replicativă înaltă este necesară testarea anticorpilor anti-HBe, a ADN-VHB și concentrației CIC (AgHBe - anti-HBe). Hepatita virală cronică B de tip integrativ decurge cu HBs-antigenemie persistentă cu diferite concentrații, în absența AgHBe.

## DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITEI VIRALE C

La hepatita virală C diagnosticul este bazat pe testarea markerilor antigenici și anticorpilor respectivi, precum și detecția ARN-VHC. În HVC markerii se detectează prin metoda imunoenzimatică.

**Antigenii VHC** pot fi identificați numai în biopsatul ficatului. Cu ajutorul anticorpilor monoclonali folosiți împotriva AgHC s-a descoperit AgHCcor în citoplasma hepatocitelor la 60-90% bolnavi de hepatită virală C cronică. Acest antigen este codat de zonele NS3 și NS4 a genomului ARN-VHC. Mai târziu, s-a demonstrat, că antigenul poate fi detectat numai în 5% de hepatocite.



Antigenii VHC chiar dacă și pătrund în sânge, în majoritatea cazurilor, nu pot fi depistați de către ELISA, datorită concentrațiilor minore (nu depășește  $10^5$ /ml). Însă datorită test-sistemelor de ultimă generație, depistarea antigenului VHC este posibilă și în sânge. Datorită acestor test sisteme s-a demonstrat:

- ▲ Posibilitatea detecției AgHCcor în ser sau plasmă;
- ▲ Specificitatea detecției AgHCcor;
- ▲ Depistarea persoanelor cu antigen în sânge la depistarea anti-VHC negativ;
- ▲ Depistarea majorată (90,3%) a AgHCcor în ser la pacienții cu anti-VHC și ARN-VHC;
- ▲ Corelația directă între concentrația de ARN-VHC și depistarea AgHCcor;
- ▲ Micșorarea fazei „ferestrei serologice” - de la momentul infectării până la depistarea anti-VHC pozitiv.

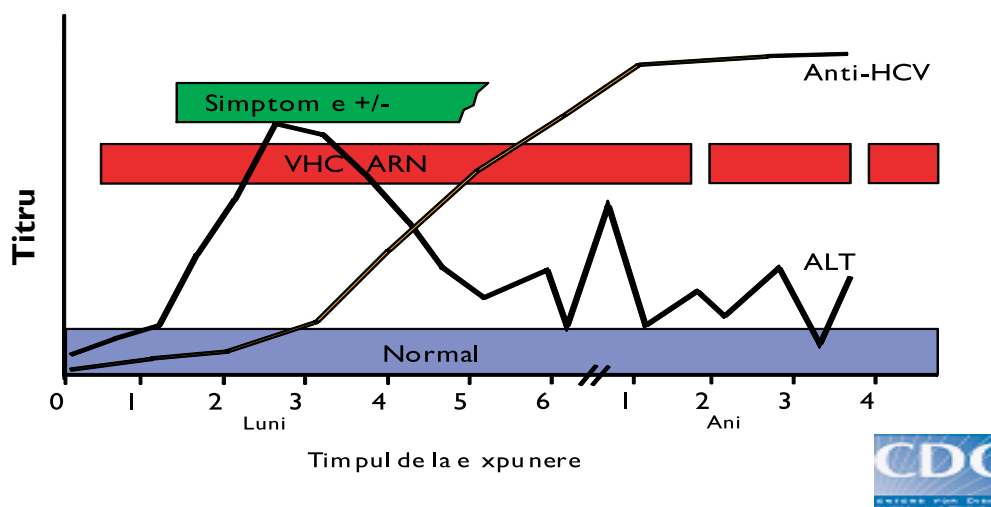
S-a determinat că, AgHCcor se detectează în 83% la următoarea zi după depistarea ARN-VHC și cu 26 zile până la apariția anti-VHC.

## ANTICORPII VHC.

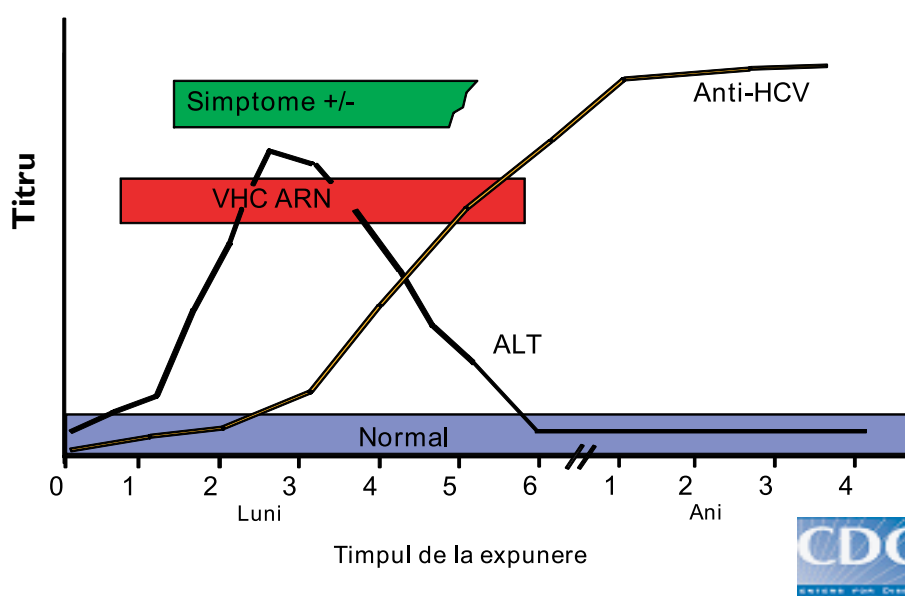
Se depistează **anti-VHC sumar (IgM+IgG)**, **anti VHC IgG**, **anti VHC IgM și anti-NS4 (anticorpi față de proteinele nestructurale)**. Pentru cercetările de screening a anticorpilor VHC se utilizează metoda imunoenzimatică, dar pentru confirmare - imunoblot. În cazurile tipice anti-VHC apar la sfârșitul procesului infecțios, peste 4-9 luni după infectare sau la 20-150 zi de boală. Însă, în unele cazuri anti-VHC se depistează la 2-4 săptămâni după transfuziile de sânge infectat. În unele cazuri seroconversia are loc după un an după infectare. Datorită tendinței hepatitei C spre cronicizare, anticorpii se depistează în sânge timp îndelungat. Anti-VHC, cu excepția anticorpilor la proteina C (anti-core clasa M) nu indică la replicarea virusului, nu caracterizează activitatea lui și pot arăta la o postinfecție. Trebuie de menționat, că la recipientii de sânge, pot fi identificați anti-VHC ai donatorului care la o unică transfuzie nu în mod obligatoriu manifestă despre o infectare posttransfuzională. Identificarea anticorpilor anti-VHC, de regulă, rezolvă diagnosticul etiologic, dar nu caracterizează debutul infecției (acut, cronic) și nu rezolvă prognosticul ei. La pacienții cu HCV cronică anti-HCV se depistează în sânge nu numai în formă liberă, ci și în componența complexelor imune circulante. Concentrația este mai mare la o evaluare concomitentă a hepatitelor provocate de HBV și HCV. Anticorpii se secretă la fiecare proteină virală, amplasată în regiunile structurale și nestructurale. Investigațiile de o singură dată nu întotdeauna sunt convingătoare, având în vedere posibilitatea „ferestrei serologice negative”. Monitorizarea procesului este destul de important pentru stabilirea fazei acute și celei cronice a HVC. La pacienții în faza acută, la controlul primar, pot fi depistați anticorpi anti-HCcor IgM și IgG, ca regulă, în absența anticorpilor la proteinele nestructurale. Investigațiile ulterioare demonstrează dispariția anti-HCcor IgM și creșterea frecvenței depistării anticorpilor anti-NS4 (fiind un indice favorabil al însănătoșirii). În faza de activare a HVC cronice în sânge se identifică anti-HCcor IgG și IgM și anticorpi la proteinele nestructurale. Determinarea anti-HC IgM în sânge în perioada acută nu depășește 2 luni de la evoluția benignă. Aprecierea cantitativă a concentrației anti-HC IgM, spre deosebire de anti-HBc IgM este dificilă datorită cantităților minore a anticorpilor și nu este utilizată în clinică.



**Figura 17.** Infecția acută VHC cu progresarea în infecție cronică



**Figura 18.** Infecția acută HCV cu însănătoșire



Determinarea cantitativă a conținutului anti-HCV este importantă în evaluarea eficacității tratamentului pacienților cu interferon. În absența markerilor antigenici a VHC pentru stabilirea diagnosticului infecției este necesară determinarea ARN VHC prin reacția de polimerizare în lanț (PCR).

**Acidul ribonucleic al VHC (ARN VHC)** - determinarea în sânge a ARN VHC este criteriul cel mai important în depistarea viremiei, care demonstrează replicarea activă continuă a VHC. Determinarea ARN VHC în sânge a fost numit „standardul de aur” al diagnosticului și diferențierea diferitor variante ale evoluției HVC. În faza acută a hepatitei, ARN se determină în sânge peste 1-2-săptămâni după infectare, cu mult până la apariția anti-HC. Depistarea ARN VHC în faza latentă cu anti-HC negativ, prognozează spre cronicizarea procesului. Determinarea ARN-VHC în serul sangvin și în biopsatul ficatului are o mare însemnătate în confirmarea rolului VHC în formarea carcinomului hepatocelular.

**Tabelul 12.** Combinarea tipică a markerilor hepatitei virale C și importanța lor clinică

Anti HCor IgM	Anti HCor IgG	Anti - NS-IgG	Interpretarea rezultatelor cu ajutorul ELISA
+	+	—	Se presupune hepatită C acută.
—	+	—	1. Însănătoșire 2. Stadiul de trecere în hepatită C cronică (faza latentă)
—	+	+	1. Însănătoșire 2. Faza latentă a hepatitei C cronice
+	+	+	1. Acutizarea în faza latentă a hepatitei C virale 2. Faza de reactivare

**Tabelul 13.** Însemnătatea diagnostică a markerilor hepatitei C virale

Marker	Serviciul sânge	Confirmare diagnostic poz. anti HC	Diagnosticul maladii	Monitorizare tratament.	Prognostic eficacitate tratament	Examinări epidemiologice
Anti-HC	+		+			+
Spectrul anti-HC		+	+	+	+	
anti-HC IgM		+	+	+	+	
AgHCCore		+	+	+	+	+
ARN-VHC	+	+	+	+		+
ARN - VHC Cantitatea				+	+	
Genotipul VHC					+	+
Serotipul VHC					+	+

## DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITEI VIRALE D

Evoluția VHD este dependentă de *prezența/absența VHB* în materialul infectat sau în organismul susceptibil. În organismul uman infecția cu VHD se poate întâlni în două forme principale - **coinfecție** (infecțarea concomitentă cu ambele virusuri - VHB și VHD) și **suprainfecție** (infecțarea cu VHD la prezența deja a infecției cu VHB).

Diagnosticul hepatitei virale D se confirmă prin detectarea **markerilor infecției cu VHD**:

- antigenul viral* al VHD (AgHD) în ser prin metodele RIA, ELISA și Western-blot; în probele bioptice prin IFA în nucleul sau citoplasma hepatocitelor infectate.
- anticorpi anti-HD* – de tip IgM și IgG sunt detectați prin ELISA sau RIA.
- ARN VHD*. ARN VHD se detectează prin *metoda PCR* sau prin *hibridizarea in situ*. Prezența ARN VHD în ser este indicator de viremie. ARN-VHD se depistează în sânge în toate variantele HVD Coinfecție și HVD Suprainfecție. Indicarea ARN-VHD în sânge și mai ales în bioptatul ficatului prezintă metoda de elecție a diagnosticului de HVD, comparativ cu testele serologice.

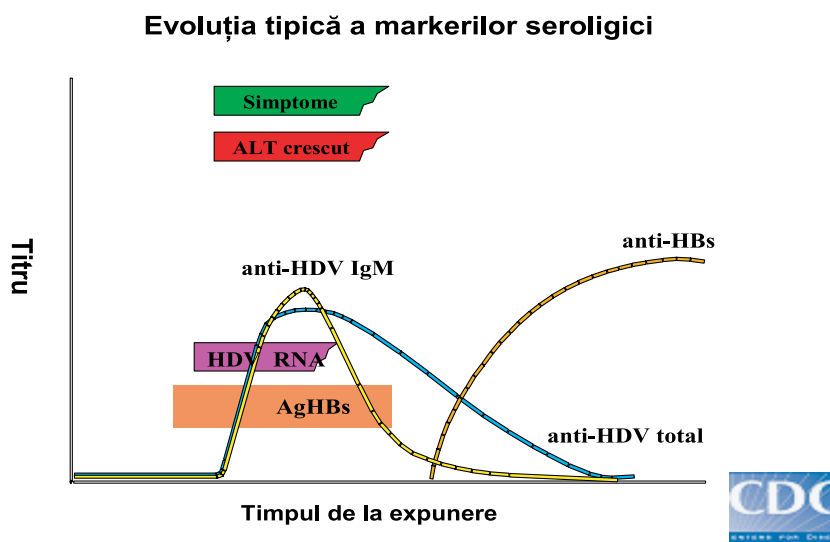
În hepatita acută rezultată prin *coinfecție* se va urmări apariția AgHD în prima perioadă de boală, apoi aceea a anti-VHD IgM și anti-HBc IgM (marker de infecție cu VHB). În *coinfecție*, prezența anti-VHD IgM este tranzitorie.



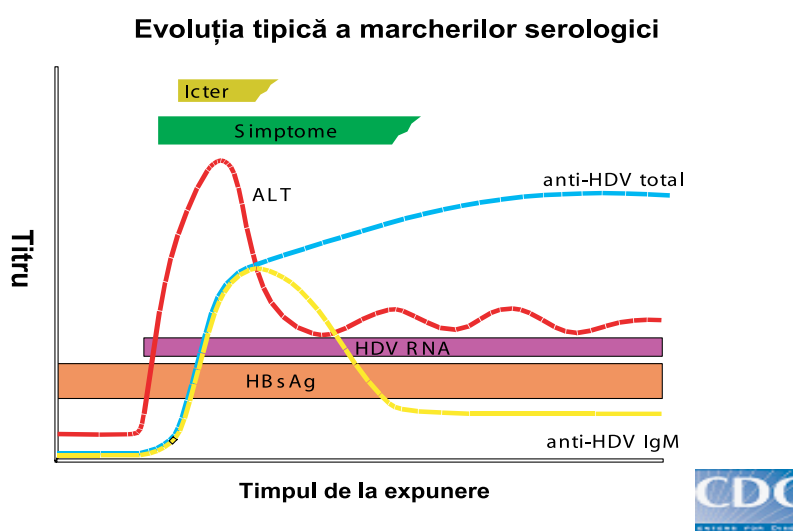
Consecutiv, suprainfecției, se va constata că markerii infecției cu VHD se vor suprapune markerilor indicatori de infecție cronică cu VHB. Astfel, la AgHBs existent în ser se va determina prezența AgHD, anti-HD IgM și anti-HD IgG. Anti-HD IgM poate persista perioade îndelungate. Caracteristic este absența de anti-HBc.

În hepatitele fulminante, markerii VHD nu sunt detectabili în ser, ci numai în hepatocite.

**Figura 19.** Detecția markerilor HBV-HDV Coinfecție



**Figura 20.** Detecția markerilor HBV-HDV Suprainfecție



### Acidul ribonucleic al VHD (ARN VHD).

Indicarea ARNVHD ca și în HVB poate fi identificat în sânge în faza inițială cu ajutorul PCR. ARNVHD se depistează în sânge în toate variantele VHD - Co-și Suprainfecție. Indicarea ARNVHD în sânge și mai ales în biopsatul ficatului prezintă metoda de arbitraj a diagnosticului de HVD și aprecierea activității procesului infecțios.



## 3.2 DIAGNOSTICUL BIOCHIMIC AL HEPATITELOR VIRALE

Pentru identificarea tulburărilor funcționale celulare ale ficatului se folosesc investigații biochimice, care cuprind:

- ▲ Teste enzimatic;
- ▲ Testele metabolismului bilirubinei,
- ▲ Testele de disproteinemie.

Acești indici sunt nespecifici și nu caracterizează etiologia hepatitelor virale, însă prezintă importanță în diagnosticul primar al hepatitelor virale și monitorizarea lor, fiind folosite pentru punerea în evidență a modificărilor patobiochimice ce se produc la nivelul celulelor hepatice.

### TESTELE ENZIMATICE

Dozările de enzime serice își găsesc o largă aplicabilitate în bolile ficatului, în esență, astfel de determinări pot oferi informații cu privire la următoarele aspecte ale patologiei hepatice:

- 1) Detectarea unei creșteri patologice a permeabilității membranei hepatocitului (AST, ALT, GLDH, LDH<sub>4-5</sub>).
- 2) Depistarea unei insuficiențe a sintezei de proteine în hepatocite (pseudocolinesteraza serică și enzime cu rol în coagularea sângelui).
- 3) Indicii cu privire la existența unui proces de colestază (FA și GGT).
- 4) Indicii cu privire la o eventuală inducere de enzime (ca exemplu tipic GGT)

### AMINOTRANSFERAZELE

**ALT serică – B. 10-40UI/l; F. 7 – 35 UI/l;**

**AST serică – B. 15-40UI/l; F. 13 – 35 UI/l;**

**Alaninaminotransferaza (ALT) și aspartataminotransferaza (AST)** sunt pe larg răspândite în celulele întregului organism.

AST se găsește în special în ficat, miocard și mușchii striati. Cantități mai reduse de enzimă se găsesc și în rinichi, pancreas, plămâni și eritrocite.

ALT se găsește în cantități mari în citoplasma celulelor hepatice și în cantități mai reduse în musculatura striată, miocard, rinichi și pancreas. Activitatea AST și ALT în ficat este de aproximativ 7000 și 3000 ori respectiv mai mare decât activitatea în serul sanguin. ALT se întâlnește exclusiv în formă citoplasmatică; AST în hepatocite se găsește atât în citozol (60% activitate), cât și în mitocondrii (40% activitate). În normă se determină doar forma citozolică a AST, nu și cea de proveniență mitocondrială. AST este mai rapid metabolizată avînd un timp de înjumătățire (T/2) de numai  $17 \pm 5$  ore, pe cînd ALT are T/2 de  $47 \pm 10$  ore.

Activitatea AST și ALT poate fi influențată de un șir de alți factori, diferiți de bolile hepatice, care vor fi luați în considerație la interpretarea rezultatelor de laborator. La persoanele adulte, activitatea AST și ALT este mai înaltă la bărbați decât la femei. Până la vârsta de aproximativ 15 ani, activitatea AST este mai înaltă decât cea a ALT, cu schimbarea situației către vârsta de 15 ani la bărbați și 20 ani la femei cînd nivelul AST tinde a fi mai diminuat decât cel al ALT, iar după 60 ani ele devin aproape egale. Activitatea ALT la femeile de vîrstă fertilă poartă un caracter ciclic, fiind corelată de ritmurile lunare ale hormonilor sexuali. La femeile sănătoase creșterea maximală a estradiolului se constată în „vârful ovulator” (a 12-a zi de la începutul ciclului menstrual). Dinamica activității ALT este asemănătoare cu cea a estradiolului. În „vârful ovulator” al ciclului menstrual activitatea ALT depășește valorile normale aproape de 1,5 ori. O anumită corelație dintre nivelul activității ALT și creșterea estrogenilor a fost depistată și la pacientele cu hepatită





virală, fapt ce trebuie luat în considerație la externarea din staționar și dispensarizarea lor ulterioară. Pentru excluderea eventualelor erori la interpretarea valorilor sporite ale ALT în aceste cazuri se recomandă de a nu efectua dozarea ALT în perioada „vârfului ovulator”.

**Tabelul 14.** Factorii ce afectează activitatea AST și ALT în lipsa afecțiunilor hepatice

FACTORII	AST	ALT	COMENTARII
<b>În timpul zilei</b>	-	În 45% cazuri variază pe parcursul zilei, fiind mai înaltă înainte de masă și mai scăzută seara	<b>Nu sunt diferențe semnificative pe parcursul zilei între orele 9 dimineața și 9 seara, atât în afecțiunile hepatice, cât și la cei sănătoși</b>
<b>Din zi în zi</b>	Variațiile de la o zi la alta constituie 5-10%	Variațiile de la o zi la alta constituie 10-30%.	<b>Variații similare se constată, atât în afecțiunile hepatice, cât și la cei sănătoși, vârstnici și tineri</b>
<b>Sexul</b>	Valori mai mari la bărbați decât la femei	Valori mai mari la bărbați, decât la femei. La femeile de vârstă fertilă crește de 1,5 ori în perioada „vârfului ovulator” al ciclului menstrual.	<b>Aceeași corelație dintre nivelul activității ALT și increția estrogenilor a fost depistată și la pacientele cu hepatită virală</b>
<b>Indicele de masă corporal (IMC)</b>	Valori cu 40-50% mai sporite la cei cu IMC majorat	Valori cu 40-50% mai mare la cei cu IMC majorat	<b>Corelație directă între masa corporală și transaminazele AST și ALT</b>
<b>Efortul fizic</b>	Crește de 3 ori la persoanele ocupate cu lucrul fizic intens	Cu 20% mai scăzut la persoanele supuse efortului fizic obișnuit decât la cei care nu se ocupă cu lucrul fizic sau supuse efortului fizic intens	<b>Efectul efortului fizic este mai evident la bărbați; diferențe foarte mici la femei (&lt;10%)</b>
<b>Modul de păstrare</b>	- stabilă la temperatura camerei – 24 ore; - la +4 °C- 21 zile, descrește cu <10%	- stabilă la temperatura camerei - 24 ore; - la +4 °C timp de 21 zile descrește cu 10-15%	<b>Stabil în cazul separării serului de celulele sanguine</b>
<b>Hemoliza, anemia hemolitică</b>	Induc creșteri semnificative	Induc creșteri semnificative	<b>Valorile depind de gradul hemolizei, ele fiind de obicei, de câteva ori mai reduse decât creșterea LDH</b>
<b>Afecțiuni musculare</b>	<b>Crește semnificativ</b>	<b>Crește moderat</b>	<b>Proportională cu gradul creșterii CK</b>



Bolile hepatice sunt cea mai importantă cauză a activității sporite a ALT și o cauză frecventă a majorării AST, de aceea acești indici pot fi folosiți ca markeri ai sindromului citolitic, deoarece aceste enzime sunt eliberate în urma leziunilor hepatocelulare. ALT și AST pot fi apreciate ca un „adevărat seismograf” al leziunilor hepatice (Bruhl). De menționat că, ALT este mai specifică pentru afecțiunile hepatice decât AST, de aceea ea este deseori numită *transaminaza hepatică*.

Modificările enzimatică din bolile ficatului depind de acuitatea procesului, de mecanismul de producere a leziunii (inflamație sau necroză), de gradul în care, parenchimul hepatic a fost înlocuit cu țesutul conjunctiv, de funcția proteosintetică a ficatului și de terapia aplicată.

În majoritatea bolilor de ficat, activitatea ALT este mai înaltă decât cea a AST, excepție este hepatita alcoolică, în care se determină activitatea mai înaltă a AST.

*Hepatitele acute virale* se caracterizează prin creșterea progresivă a transaminazelor serice și în special a ALT, fenomen care se constată și în caz de hepatită anicterogenă. Se poate afirma că nu există hepatită acută, fără modificări ale transaminazelor. Creșterea acestor enzime începe în perioada de prodrom, înainte de creșterea bilirubinei, iar în cursul primelor două săptămâni ale perioadei icterice atinge valori maxime: ALT crește de 25-50 de ori decât valorile normale, iar AST de 15-30 ori decât valorile normale. Creșterea ALT nu implică numai o necroză a celulelor, ci doar o creștere a permeabilității membranei hepatocitului. Valori excesiv de mari și în special o creștere la fel de exprimată a AST și a ALT denotă existența unei hepatite severe cu zone extinse de necroză. În astfel de cazuri crește și GLDH (enzima mitocondrială).

În hepatitele virale acute valorile enzimelor cresc la peste 400 UI ajungând la cifre de 1000-2000 UI. În hepatita virală A transaminazele ajung cifre înalte chiar de la începutul bolii și scad rapid. În hepatita virală B creșterea transaminazelor este moderată, cifrele cresc lent pe parcursul unei luni sau a câtorva luni de zile. Importanța testelor enzimatică, în special dozarea ALT și AST constă în aceea că acestea prezintă criterii precoce de confirmare a diagnosticului de hepatită acută, în special în focarul epidemiologic. Determinările seriate reflectă evoluția clinică a afecțiunii hepatice.

O importanță prognostică mai mare decât gradul de creștere al transaminazelor se atribuie duratei acestei creșteri.

**Lipsa tendinței de normalizare a ALT-ului după 8-10 săptămâni de boală este un indiciu de trecere spre „hepatita persistentă”.**

Nu se poate vorbi despre o vindecare a hepatitei acute, decât atunci când transaminazele s-au normalizat și rămân normale, chiar și după eforturi moderate.

Creșterea rapidă și marcată a AST și ALT ( $> 600$  UI/l și adesea  $> 2000$  UI/l), urmată de o scădere abruptă în decurs de 12-72 ore, este considerată caracteristică pentru obstrucția acută a ductelor biliare. Creșterea bruscă a AST poate apărea și în hepatita acută virală fulminantă (rar  $> 4000$  UI/l, dar scade mai lent; în plus, testele serologice sunt pozitive) și în leziunile acute de etiologie chimică.

Creșterea ușoară a nivelurilor AST și ALT (de obicei  $< 500$  UI/l) asociată cu creșterea FA  $> 3$  ori față de valoarea normală sugerează icter colestatic, iar o creștere mai importantă a AST și ALT (mai ales  $> 1000$  UI/l) asociată cu o creștere a FA  $< 3$  ori comparativ cu norma indică icter hepatocelular.

Determinarea concomitentă a ambelor enzime permite aprecierea genezei hiperenzimiei, deseori calculându-se **coeficientul AST/ALT**, în normă acesta fiind egal aproximativ cu 1,0-1,3.

- micșorarea lui ( $\leq 0,7$ ) confirmă geneza „hepatică” a hiperenzimiei.
- majorarea acestui indice ( $\geq 1,3$ ) are altă geneză.

De menționat totuși că, atunci când leziunile celulelor hepatice capătă un caracter necrotizant, raportul amintit crește, întrucât majorarea activității ALT se asociază cu o creștere și mai exprimată a AST, fiind mărite și valorile enzimei mitocondriale GLDH.



Aceste “distorsiuni” ale rapoartelor AST/ALT se explică prin următoarele:

- ▲ în cazul unor leziuni moderate care afectează doar permeabilitatea membranei hepatocitelor se produce scurgerea din celule a enzimelor citozolice, așa cum este ALT, pe când în cazul unor leziuni cu caracter necrotizant se eliberează din celule și enzimele mitocondriale (de exemplu GLDH), iar AST, cu localizare biloculară (citozolică și mitocondrială), crește mai mult decât ALT;
- ▲ timpul de înjumătățire (T/2) al ALT este mai prelungit, de aceea această enzimă persistă în ser mai mult decât AST, al cărui timp de înjumătățire este mai scurt. Ca urmare, în hepatita acută virală, când survine o lezare destul de rapidă dar relativ moderată a unui mare număr de hepatocite, după cum s-a menționat mai înainte, creșterea transaminazelor depășește de 15-100 de ori limita superioară a normalului (în mediu de 50 ori), iar de regulă ALT > AST.

În hepatita cronică progresivă transaminazele cresc de cel mult 20 ori față de limita superioară a normalului (valori între 5-20), iar în procesele necrotice AST > ALT.

Hepatita cronică stabilizată se însoțește de regulă de creșteri mai puțin exprimate ale acestor enzime (2-3 ori de la limita superioară a normalului) și de obicei ALT > AST.

AST crește în infarctul de miocard acut (IMA) și în afecțiunile musculare, situații în care ALT este normală.

### RECOMANDĂRI:

Se impune standardizarea valorilor de referință ale ALT între diferite laboratoare, o necesitate prioritară pentru evaluarea pacientului și interpretarea rezultatelor investigațiilor. Se consideră adecvate pentru uzul clinic următoarele performanțe ale dozării transaminazelor: eroarea analitică a valorilor limitei superioare de referință a dozării ALT ≤ 10%, iar pentru AST eroarea total ≤ 15-20%.

Laboratoarele vor folosi valori de referință separate atât pentru maturi - bărbați și femei, cât și pentru copii și vârstnicii de peste 60 ani. Activitatea ALT la femei este supusă influenței ciclurilor lunare, de aceea pentru excluderea eventualelor erori la interpretarea rezultatelor nu se recomandă dozarea ALT în perioada „vârfului ovulator”

Cazurile când se depistează creșterea inexplicabilă ale ALT și/sau AST vor fi evaluate prin testări repetate; în cazurile individuale de expunere la un efort fizic major se va efectua testarea repetată după o perioadă de sistare a efortului fizic. Pentru a determina intervalul necesar de timp sunt necesare studii suplimentare.

**GLUTAMATDEHIDROGENAZA (GLDH)** este o enzimă localizată cu predominanță în ficat și mai precis la nivelul mitocondriilor acestui organ. Creșteri exprimate ale GLDH survin în caz de **necroze** ale celulelor hepatice. Creșteri moderate pot surveni în primele zile ale unei colici biliare.

### PSEUDOCOLINESTERAZA

**Pseudocolinesteraza serică (PCE) 130-300 UI/L (la t 25 °C)**

Pseudocolinesteraza (**acilcolinacil hidrolaza, PCE**) este o enzimă care catalizează reacția de hidroliză a esterilor colinei, se sintetizează în ficat, fiind apoi secretată activ în plasma sanguină.

De menționat, că modificările serice ale enzimelor celulare nu dau indicii asupra stării funcționale a ficatului. Aceasta poate fi însă explorată prin urmărirea nivelului pseudocolinesterazei serice, care reflectă **funcția proteosintetică** a ficatului.



Hepatita acută este însoțită de o scădere moderată a PCE serice, fenomen care denotă o alterare a funcției proteosintetice a ficatului, dând indicii asupra gravității procesului. În perioada de vindecare a unei hepatite acute se constată de regulă o creștere a pseudocolinesterazei care adeseori depășește valorile normale și indică un prognostic favorabil. Dimpotrivă scăderea progresivă a acestei enzime indică un proces de atrofie a celulelor hepatice și anunță instalarea comei hepatice.

PCE scade mult în insuficiențele hepatice (hepatite, ciroze), în insuficiența cardiacă cu ficat de stază, în intoxicațiile cu organofosforice (unele insecticide) și la bolnavi cu denutriție proteică gravă.

Scăderi moderate se pot întâlni în anemii severe (mai ales megaloblastice), precum și în reacția de fază acută (în infecții acute, postoperator sau după un infarct miocardic).

În tabelul 15 sunt trecute principalele situații care duc la modificări ale activității PCE serice.

**Tabel 15** Modificările activității serice a pseudocolinesterazei în diverse situații și stări patologice

Scăderi	Creșteri
- Insuficiența hepatică (hepatite, ciroze)	- Perioada de vindecare a unei hepatite acute
- Ficat de stază	- Sindromul nefrotic
- Denutriție proteică	- Hipertiroidism (fără cașexie)
- Malabsorbție	- Diabet cu suprapondere
- Anemii severe (mai ales megaloblastice)	- Obezitate (mai ales androidă)
- Hipotiroidism sever	- Hiperlipoproteinemie tip II b sau IV
- Reacție de fază acută (infecții acute, postoperator, infarct miocardic)	
- Impregnare tumorală	
- Intoxicații cu pesticide organofosforice	
- Sarcină	
- Contraceptive orale	
- Scăderi cu caracter genetic	

Indicatorii cei mai utilizați pentru depistarea unei reduceri a proteosintezei hepatice în afară de PCE sunt albumina serică și factorii coagulării dependenți de vitamina K.

**Testarea altor enzime ca fosfataza alcalină, gama-glutamiltanspeptidaza, 5-nucleotidaza, lactatdehidrogenaza sunt utile pentru diagnosticul diferențiat al hepatitelor virale cu alte hepatite și patologii de origine diferită.**

## FOSFATAZA ALCALINĂ

**FA serică (metoda de referință recomandată de CLIA și IFCC, substrat – para-nitrofenilfosfat, AMP, 37 °C).**

**B. (25-50 ani) - 53-128 UI/l;**

**F. (25-50 ani) - 42-98 UI/l;**

**copii (3-17 ani) – până la 350 UI/l.**

**Fosfataza alcalina (FA)** – fosfhidrolaza monoesterilor acidului ortofosforic hidrolizează fosfații organici la un pH alcalin. În normă valorile FA diferă puțin între bărbații și femeile adulte între 25 și 60 ani. După 60 ani, valorile de referință cresc la femei, deși studiile nu au determinat



o corelație elocventă între osteoporoza (frecvent întâlnită la femei la această vârstă) și sporirea activității fosfatazei alcaline în serul sanguin.

Agenții helatori, cum ar fi citratul, oxalatul sau EDTA leagă cationii de zinc și magneziu, cofactori necesari ai activității FA și pot cauza valori fals scăzute, chiar până la zero. Transfuziile de sânge (conținând citrat) conduc, printr-un mecanism similar, la o micșorare tranzitorie a FA.

Determinările efectuate de rutină în clinică măsoară o sumă a activității mai multor izoenzime de proveniență hepatică, osoasă, renală, precum și eliberate din peretele intestinal. La femei fosfataza alcalină poate proveni și din glanda mamară și din placentă.

**Tabelul 16.** Factorii ce afectează activitatea fosfatazei alcaline în lipsa afecțiunilor hepatice

FACTORII	FOSFATAZA ALCALINĂ	COMENTARII
De la zi la zi	Variațiile de la o zi la alta constituie 5-10%	Variații similare se constată în afecțiunile hepatice și în lipsa lor; la vârstnici și cei tineri
Primirea alimentelor	Crește până la 30 UI/l	În special la persoanele cu grupa de sânge B și O valorile rămân crescute până la 12 ore după ingerarea alimentelor.
Indicele de masă corporal (IMC)	Valori cu 25% mai mare la cei cu IMC mărit	-
Modul de păstrare	Stabilă la păstrarea la 0 - +4 °C până la 3 zile; Stabilă la -25 °C – 30 zile	La dezghețarea probelor înghețate valorile pot crește cu 30%.
Hemoliza	Hemoglobina inhibă activitatea enzimei	-
Sarcina	Crește de 2-3 ori în al 3-lea trimestru	Creșterea este determinată de prezența izoenzimelor placentei și oaselor
Fumatul	Crește valoarea cu 10%	-
Contraceptivele orale	Descresc valorile cu 20%	-
Altele	Valori crescute se constată în afecțiunile osoase, tumori (marker nespecific al tumorilor). Descresce după enterite severe la copii și în hipofosfatemie	Natura hepatică a FA poate fi confirmată prin dozarea izoenzimelor ei și a altor enzime colestactice - GGT, LAP, 5-nucleotidaza

Cea mai mare parte din FA serică derivă din oase. Fosfataza alcalină osoasă este produsă în osteoblaști și are rol în formarea țesutului osos. Această fosfatază alcalină osoasă cu masa moleculară mare nu se elimină prin bilă, fiind probabil catabolizată în celulele sistemului de macrofage fagocitare.

În absența afecțiunilor osoase sau a sarcinii, creșterea FA serice indică **afectarea funcției excretorii hepatice**. Creșterile activității fosfatazei alcaline în afecțiunile biliare se datorează retenției FA produse de celulele care mărginesc căile (ductele) biliare. FA atinge valori de peste 3-10 ori în obstrucția biliară extrahepatică, colestatza intrahepatică sau ciroza biliară primară.



Este cel mai bun marker al obstrucției biliare, dar nu diferențiază colestaza intrahepatică de obstrucția extrahepatică.

În hepatita virală sau alte hepatopatii parenchimotoase, fosfataza alcalină depășește de 1,5 - 2 ori norma. Creșteri de peste 2-10 ori față de normă, pe fonul celorlalte teste funcționale hepatice normale, sugerează existența unor metastaze hepatice sau boli infiltrative hepatice maligne de tipul leucemiei, limfomului sau infecții hepatice cu fungi sau *Criptosporidium*.

Creșterile de fosfataza alcalină în afecțiunile hepatobiliare se însoțesc de o creștere a gama-glutamyltransferazei (GGT), 5-nucleotidazei (5-NT) și leucinaminopeptidazei (LAP) care se elimină tot prin bilă. În aceste cazuri, nivelurile serice ale GGT, 5'-NT și LAP cresc în paralel cu nivelul seric al FA, dar GGT și 5'-NT sunt normale în sarcină și în afecțiunile osoase, în timp ce LAP este crescută în sarcină, dar este de obicei normală în afecțiunile osoase.

Principala metodă de diferențiere a sursei fosfatazei alcaline crescute este fracționarea sa. Separarea formelor tisulare nespecifice de FA (os, ficat, și rinichi) este dificilă, acestea fiind similare ca structură. Frațiunea hepatică este termostabilă, iar cea osoasă termolabilă. FA specific osoasă poate fi determinată prin inactivare cu căldură, prin metode imunologice și electroforetice.

Atunci, când nu sunt condiții pentru diferențierea izoenzimei hepatice de cea osoasă se recomandă explorarea activității serice a gama-glutamyltransferazei. Astfel, creșterea concomitentă a FA și GGT atrag atenția spre o origine hepatică a FA în cadrul unei colestaze, pe când o creștere izolată a FA poate sugera izoenzima de origine osoasă.

### RECOMANDĂRI:

Valori de referință vor fi stabilite separat în dependență de vârstă și sex, pentru femeile însărcinate.

Probele pentru dozarea fosfatazei alcaline se vor colecta dimineața pe nemâncate. În caz contrar, pacienții cu valori ușor elevate vor fi reevaluați repetat pe nemâncate.

Atunci când sursa activității sporite a fosfatazei alcaline nu este evidentă din datele clinice și de laborator este necesar de a determina activitatea altor enzime indicatoare ale colestazei – GGT, 5-nucleotidaza, leucinaminopeptidaza.

## GAMA - GLUTAMILTRANSFERAZA

**Gama-glutamyltransferaza serică –B - 8-35 UI/l); F - 5-25 UI/l)**

**Gama-glutamyltransferaza la copii nou-născuți este de 3-5 ori mai mare**

**Gama-glutamyltransferaza** (gama-glutamyltranspeptidaza, GGT, CE 2.3.2.2) - catalizează transferul grupării gama-glutamyl de pe un peptid pe un alt peptid sau pe un aminoacid. Prin acest mecanism enzima intervine în sintezele proteice și în retroresorbția tubulară a acizilor aminați din filtratul glomerular. Enzima este localizată mai ales în rinichi, veziculele seminale, ficat, căile biliare și pancreas (ductului și celulele acinare), intestine.

Valoarea diagnostică a GGT constă în special în creșterea impresionantă a activității sale în serul bolnavilor cu retenție biliară. Astfel, în timp ce fosfataza alcalină crește de aproximativ treicinci ori față de limita superioară a normalului, GGT depășește această limită de 10-30 ori, fără a prezenta modificări în afecțiunile osoase. Titrul GGT este normal în afecțiunile osoase și în sarcină. În schimb, creșteri ale GGT se întâlnesc și în suferințe ale hepatocitului, ca de exemplu în hepatite cronice, neoplasm primitiv sau metastatic al ficatului, ficat gras, insuficiență cardiacă cu stază hepatică precum și boli ale pancreasului. Creșterile moderate constatate în infarctele miocardice par a fi secundare unei congestii hepatice cauzată de tulburările circulatorii.



Creșterea izolată a GGT este un test sensibil de screening și de monitorizare în cazurile de alcoolism. De menționat că creșterea nivelului GGT determinată de alcool sau de anticonvulsivante nu este însoțită de creșterea FA. Se consideră că aceste modificări ale GGT în ser reprezintă un rezultat al inducerii microzomale de enzimă. Cu alte cuvinte staza biliară, alcoolul sau barbituricele ar stimula sinteza de enzimă în ficat crescând eventual permeabilitatea membranelor microzomale. Merită semnalat și faptul că GGT este ușor crescută (1,5-2 ori față de limita superioară a normalului) și în serul subiecților cu hipertrigliceridemie sugerând o stimulare a proteosintezelor hepatice la acești subiecți. În acest sens, trebuie arătat că în cirozele atrofice cu deficit exprimat de proteosinteză (pseudocolinesteraza mult scăzută), activitatea GGT în ser este mai joasă decât în cirozele compensate care evoluează cu ficat mărit.

**Tabelul 17. Factorii ce afectează activitatea GGT în lipsa afecțiunilor hepatice**

FACTORII	MODIFICĂRILE	COMENTARII
<b>De la zi la zi</b>	Variațiile constituie 10-15%	<b>Modificări similare se constată, atât în afecțiunile hepatice, cât și în lipsa lor, la persoanele în vârstă și cei tineri</b>
<b>Indicele de masă corporal (IMC)</b>	Valori mai mari cu 25% la cei cu IMC moderat crescut; Valori mai mari cu 50% la cei cu IMC > 30	<b>Diferențe similare atât la bărbați, cât și la femei</b>
<b>Modul de păstrare</b>	Stabil la păstrarea la 0-4 °C până la 3 zile; la - 25 °C - 30 zile	-
<b>Sarcina</b>	Valori mai scăzute cu 25% în perioada timpurie a gravidității	-
<b>Preparatele medicamentoase</b>	Crește la administrarea carbamazepinei, cimetidinei, furosemidei, fenobarbitalului, ibuprofenului, methotrexatului, phenitoinii, contraceptivelor orale, acid valproic, etc.	<b>Valorile cresc de 2 ori comparativ cu limitele de referință generale. La phenytoin poate crește de 5 ori și mai mult.</b>
<b>Fumatul</b>	Crește cu 10% la 1 pachet/zi; aproximativ de 2 ori mai mare în fumatul intens	
<b>Consumul de alcool</b>	<b>Relații directe între consumul de alcool și GGT</b>	<b>Nivelul poate fi crescut pentru câteva săptămâni după stoparea consumului de alcool în alcoolismul cronic</b>

Creșteri importante ale GGT și FA se întâlnesc în leptospiroza icterohemoragică (boala Weil), în intoxicația cu clorpromazină și în tumorile primitive sau metastatice ale ficatului.

Creșterea progresivă de FA și GGT la un bolnav fără icter sugerează dezvoltarea unui proces malign care trebuie documentat prin imagistică și explorarea radiologică a tubului digestiv. Pe de altă parte, în cazurile în care tumora hepatică comprimă sau obstruează coledocul se vor dezvolta toate manifestările unei colestatice extrahepatice (icter mecanic), iar creșterea progresivă a GGT și FA se asociază cu hiperbilirubinemie (bilirubină conjugată) și cu creșterea acizilor biliari în ser.

În bolile obstructive ale ficatului GGT crește în mediu de 12 ori, pe când FA - în mediu de 3 ori. Creșterea GGT se constată la 80-95% de pacienți cu diverse forme de hepatită acută. Pacienții cu diabet, hipertiroidism, artrită reumatoidă și boli pulmonare obstructive deseori au



valori crescute ale GGT, cauzele acestui fapt sunt neclare. GGT poate rămâne anormală timp de săptămâni după un infarct miocardic acut. Cele relatate mai sus mărturisesc despre valoarea predictivă și specificitatea joasă a GGT pentru bolile hepatice.

*GGT este considerată cel mai sensibil test de screening pentru alcoolism, totodată, GGT este un indicator mai sensibil în comparație cu fosfataza alcalină în afecțiunile hepatice la copii.*

### RECOMANDĂRI:

Se recomandă ca probele pentru determinarea GGT să se colecteze dimineața pe nemâncate.

Se vor stabili valori de referință separate pentru bărbații adulți, pentru diferite categorii de vârstă la femei și copii.

Din cauza specificității joase, dozarea GGT se va efectua doar cu scopul determinării sursei de fosfatază alcalină majorată, atunci când este necesar de a confirma originea hepatică a FA.

## LACTATDEHIDROGENAZA

**Lactatdehidrogenaza serică adulți – 130-300 UI/L; nou-născuți - 415 – 690 UI/l**

Lactatdehidrogenaza (LDH) – (L-lactat-NAD-oxidreductaza. CE I.1.1.27) este o enzimă care conține zinc și catalizează reversibil oxidarea lactatului în piruvat.

LDH se găsește în cantități mari în mușchiul striat, ficat, miocard, rinichi și ganglionii limfatici și în cantități mai reduse în pancreas, eritrocite și plămâni. Din această cauză creșterea activității LDH se întâlnește în mai multe boli, cea ce face dificilă interpretarea rezultatelor obținute.

LDH poate fi separată în cinci izoenzime, iar determinările spectrului izoenzimatic au o importanță diagnostică mai mare, deoarece fiecare organ sau țesut are un spectru izoenzimatic specific.

Creșteri marcate ale activității serice ale LDH se constată în necroza toxică a ficatului, tumori hepatice, ficatul metastazat, infarctul miocardic și unele boli hematologice (anemia pernicioasă, leucemiile acute).

Creșteri moderate se notează în hepatita virotică, boli ale musculaturii scheletice, infarct pulmonar, mononucleoza infecțioasă, hemoliza acută și, uneori, în accidente cerebrale. Studiul izoenzimelor arată o creștere a fracțiunilor LDH1 și LDH2 în afectarea miocardului și a fracțiunilor LDH4 și LDH5 în leziunile hepatice.

Pentru investigarea diferitor leziuni ale hepatocitelor în afară de cele menționate, se determină și activitatea enzimelor organospecifice ale ficatului:

- ▲ Sorbitoldehidrogenaza;
- ▲ Fructoza-1-monofosfat aldolaza;
- ▲ Ornitincarbamiltransferaza;
- ▲ Urokinaza.

Spre deosebire de aminotransferaze aceste enzime se localizează numai în hepatocite, în alte țesuturi ele sunt prezente în cantități foarte mici sau lipsesc totalmente. Prin urmare, creșterea tuturor acestor enzime în sânge constituie un indiciu de leziune celulară hepatică. Însă, ca teste diagnostice sunt mai puțin sensibile comparativ cu ALT. Provenind în special din ficat, ele nu oferă mult în plus față de datele furnizate de enzimele celulare determinate de rutină și de aceea sunt rar utilizate. Interpretate în lumina datelor clinice, determinările de transaminaze sunt însă suficiente pentru diagnostic.

### Modificările testelor enzimatiche serice în unele disfuncții hepatice

*Leziunile toxice ale ficatului* (intoxicații cu tetraclorură de carbon, intoxicații cu ciuperci, intoxicații alcoolice) se însoțesc de creșteri majore ale enzimelor celulare în ser. Gradul de creștere





al enzimelor celulare în ser în astfel de intoxicații este LDH >AST >ALT>GLDH, pe când în afecțiunile inflamatorii ale ficatului (hepatite), ordinea este ALT > AST > LDH> GLDH.

*Hepatitele cronice* se caracterizează prin valoarea moderat crescută a transaminazelor serice (20-100 UI/l). În aceste situații trebuie efectuate și testele de disproteinemie pentru explorarea mezenchimului hepatic.

În *cirozele hepatice* creșterea enzimelor este de regulă moderată, deoarece masa celulară este redusă. Diminuarea sintezelor proteice la nivelul ficatului în ciroză duce la o sărăcire a celulelor în ALT astfel încât în formele avansate ale unor ciroze această enzimă nu mai crește nici măcar în cursul exacerbarilor acute.

*Tumorile hepatice* nu dau modificări enzimatică caracteristice, dar în ficatul metastazat se constată o creștere moderată a transaminazelor și totodată o creștere marcată a LDH și GGT. Fosfataza alcalină și bilirubina cresc în funcție de gradul în care se perturbă eliminarea bilei.

În *bolile sistemice*, precum LES, sarcoidoza, TBC, bruceleza, siclemia se înregistrează anomalii ale testelor funcționale hepatice.

## TESTELE METABOLISMULUI PIGMENȚILOR BILIARI

**Bilirubina serică: totală – 8,5-20,5 mkmoli/l  
conjugată, directă – 2,2-5,1 mkmoli/l**

Bilirubina, componenta cea mai importantă a bilei, provine din distrugerea hemoglobinei, care are loc în sistemul macrofagal în diferite organe și țesuturi ale organismului, inclusiv și în ficat.

*Conversia hemoglobinei în bilirubină se face prin următoarele etape:*

- ▲ desfacerea inelului tetrapirolic al hemului sub acțiunea unui sistem enzimatic denumit hemoxigenază, cu formare de *verdoglobină* sau *coleglobină* de culoare verde la nivelul sistemului macrofagal;
- ▲ pierderea fierului de către *coleglobină*, cu formarea *biliverdin-globinei*;
- ▲ detașarea globinei din complexul biliverdin-globina și eliberarea *biliverdinei*, albastră-verzuie, care este redusă de către biliverdin-reductază în **bilirubina neconjugată (indirectă)** de culoare roșie. Bilirubina neconjugată (indirectă) formată la nivelul macrofagelor trece în sânge. Ea este toxică și insolubilă în apă, dar solubilă în lipide și solvenții organici. Transformarea hemului în bilirubină decurge rapid în decurs de 2-3 ore;
- ▲ în sânge bilirubina se leagă reversibil cu *albuminele plasmatică* și este transportată spre ficat. Legarea bilirubinei de albumina poate fi inhibată de o serie de medicamente (sulfanilamide, unele antiinflamatoare, substanțe de contrast utilizate în colangiografie, etc) și, de asemenea, de prezența în plasmă a unor cantități mari de acizi grași liberi. Aceștia determină modificări conformaționale în structura albuminei serice, având ca rezultat diminuarea capacității de legare a bilirubinei. Din motivele menționate, capacitatea de legare a bilirubinei de către albumina serică este limitată (circa 25 mg bilirubina legată în sângele unui adult). Dacă bilirubina produsă în alte țesuturi decât în ficat depășește capacitatea de transport de către sânge, ea difuzează în țesuturi.

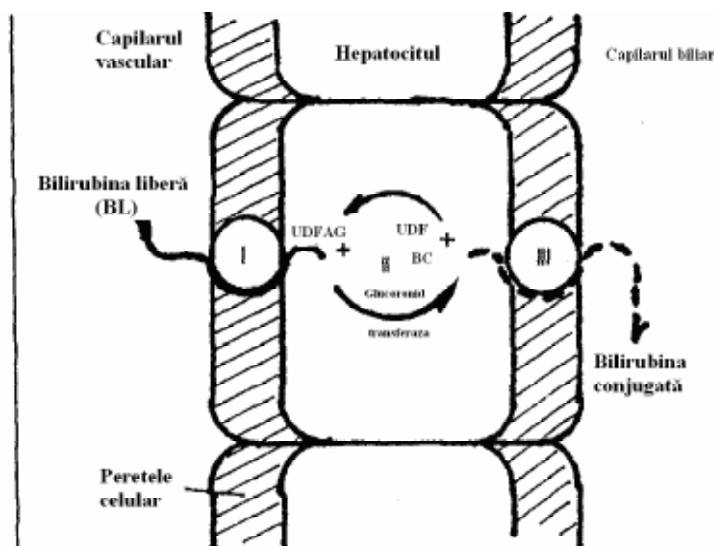
*Următoarele etape de transformare a bilirubinei neconjugate (indirecte) au loc în hepatocite:*

- ▲ întrînd în contact cu celula hepatică, bilirubina se detașează de albuminele plasmatică, fiind fixată de anumite proteine din membrana celulară notate Y (nimită „ligandină”) și Z și transportată în interiorul celulei. Prin complexarea bilirubinei de către cele două proteine este împiedicată atât ieșirea ei din hepatocite cât și pătrunderea în organele celulare; acest din urmă aspect are o mare importanță, deoarece bilirubina inhibă respirația mitocondrială, efect complet prevenit de prezența ligandinei.
- ▲ sub influența enzimei *glucuroniltransferaza*, localizată la nivelul microsomilor celulelor hepatice, bilirubina se conjugă cu *acidul glucuronic*. Se obțin bilirubinmonoglucuronidul și bilirubindiglucuronidul care la un loc poartă numele de bilirubina “conjugată”. Bilirubina conjugată (directă) este hidrosolubilă și este apoi eliminată din hepatocite în canaliculele biliare printr-un mecanism de transport energodependent. Capacitatea de transport este mică în raport cu cea de conjugare, astfel încât ea se constituie ca un mecanism limitativ cu răsfrângere asupra întregului metabolism al bilirubinei.



- ▲ De menționat că, fixarea bilirubinei pe albumină și implicit menținerea ei în compartimentul intravascular, captarea selectivă în hepatocite și glucuronoconjugarea au o deosebită importanță fiziologică întrucât bilirubina neconjugată produsă în macrofage, fiind *liposolubilă*, ar putea difuza prin membranele lipidice ale celulelor, exercitând efecte toxice în special asupra celulelor nervoase din nucleii cenușii de la baza creierului.

**Figura 21.** Schema metabolismului de conjugare a bilirubinei



**BNC** - bilirubina neconjugată;  
**BC** - bilirubina conjugată;  
**UDFAG**- acidul uridildifosfat glucuronic;  
**UDFGTF** - uridindifosfatglucuronid-transferaza;  
 Sistemele enzimice de transport a bilirubinei neconjugate:

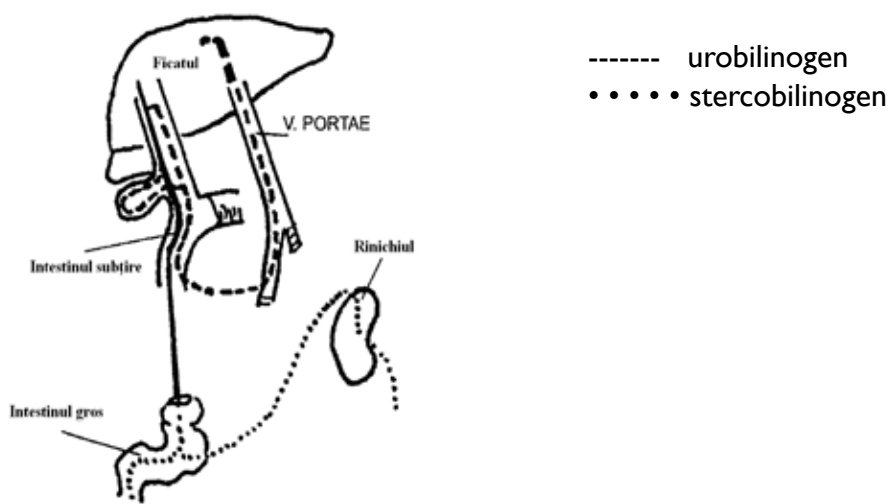
- ▲ prin membrana celulară în hepatocit;
- ▲ conjugarea bilirubinei;
- ▲ eliminarea bilirubinei conjugate din hepatocit.

#### Etapa intestinală de metabolizare a bilirubinei:

- ▲ Eliminată în intestin, **bilirubina conjugată** este supusă acțiunii microflorei bacteriene. Sub acțiunea unei b-glucuronidaze bacteriene în jejun și ileon are loc hidroliza bilirubindigluconidului, iar bilirubina eliberată este supusă unor reacții de reducere succesive catalizate de reductaze produse tot de bacterii. Primul compus obținut prin reducere este **mezobilirubina** (bilirubina + 4 H) și apoi **mezobilirubinogenul** numit destul de impropriu **urobilinogenul** (mezobilirubina + 4 H), care trece apoi în **stercobilinogen** (urobilinogen + 4 H).
- ▲ **Mezobilinogenul** (urobilinogenul) format în intestinul subțire se reabsoarbe parțial prin mucoasa intestinală și pătrunde în circulația portală. Ajuns în ficat este parțial distrus pînă la mono- și dipiroli. O mică parte de mezobilinogen ( $\approx 10\%$ ) este eliminată din hepatocite în canaliculele biliare și apoi în intestin, formînd un circuit entero-hepatic.
- ▲ Cea mai mare parte a mezobilinogenului trece apoi în intestinul gros și se elimină prin fecale sub formă de **stercobilinogen** care oxidîndu-se în stercobilină imprimă scaunelor culoarea brună (cantitatea de stercobilină în decurs de 24 de ore oscilează la subiecții normali între 50-280 mg).
- ▲ O cantitate mica din derivații de reducere ai bilirubinei resorbiți în sânge prin peretele intestinal scapă ciclului entero-hepatic și sunt excretați de rinichi sub formă de **urobilinogeni sau corpi urobilinici** în proporție de 0,6 mg/24 de ore. Această cantitate crește atunci când scade capacitatea ficatului de a capta din sânge și de a distruge urobilinogenul, de aceea exagerarea urobilinuriei este un semn de insuficiență hepatică.
- ▲ Principalele cauze ale **urobilinogenuriei** sunt însă reprezentate de hiperproducția de bilirubină în cursul icterelor hemolitice și de leziunile hepatice care limitează procesele de captare și eliminare prin bilă a urobilinogenilor reabsorbiți din intestin. Pe de altă parte, absența stercobilinogenului în fecale și urobilinogenilor în urină indică o **obstrucție completă** a canalului biliar.
- ▲ De menționat, că pigmentii biliari nu îndeplinesc careva funcții fiziologice. Organismul se debarasează de aceștia, ca de orice produs de deșeu, excepție făcînd doar **fierul**, care este recuperat de organism pentru a fi utilizat la sinteza hemoglobinei, proces ce se desfășoară încontinuu pe parcursul întregii vieți.



**Figura 22.** Schema metabolismului normal al D-urobilinogenului și stercobilinogenului



În pofida eficienței remarcabile a mecanismelor de captare, conjugare și eliminare în bilă a bilirubinei, aceste mecanisme pot fi depășite când aportul de bilirubină spre ficat este excesiv. De menționat, că suferința hepatocitelor perturbă mai rapid și în mai mare măsură procesele de excreție a bilirubinei și de formare a fluxului biliar apos decât procesul de glucuronoconjugare.

**În hepatitele virale acute anume funcția de eliminare, excreție este cea mai afectată, apoi se dereglează captarea, prelevarea bilirubinei de către hepatocite, iar funcția de conjugare se afectează în ultimul rând.**

**Tabelul 18.** Factorii ce influențează asupra nivelului bilirubinei în lipsa afecțiunii hepatice

FACTORII	MODIFICĂRILE	COMENTARII
De la zi la zi	Variațiile constituie 15-30%	-
Alimentația	Bilirubina crește în mediu de 1-2 ori după 48 ore și mai mult de postire	În mediu cu 20-25% mai mult după alimentația de seară comparativ cu alimentația de zi
Efortul fizic	Induce creșteri cu 30% mai mare la bărbați	Fără efecte semnificative la femei
Expunerea la lumină	Valorile descresc cu 50% timp de 1 oră de expunere la lumină	Lumina afectează bilirubina neconjugată mai mult decât cea conjugată.
Sarcina	Induce descreșterea valorilor cu 33% în trimestrul 2 al sarcinii	Modificări similare în trimestrul 2 și 3
Hemoliza	Reacții încrucișate în unele teste	Hemoglobina absoarbe lumina la aceeași lungime de undă ca și bilirubina
Contraceptivele orale	Valori cu 15% mai scăzute	-
Anemia hemolitică	Provoacă creșterea bilirubinei neconjugate	-



Acumularea pigmentilor biliari în sânge se soldează cu apariția **icterului** (colorația galbenă a pielii, mucoaselor și a sclerelor datorată pigmentilor biliari), însoțit de decolorarea materiilor fecale.

**Icterul devine vizibil când bilirubinemia este mai mare de 34-43 mkmol/l.** De menționat că creșterea bilirubinei conjugate (hidrosolubile) produce un icter mai intens de cât aceeași concentrație de bilirubină neconjugată, hidrofobă.

Creșterea bilirubinei conjugate este extrem de specifică pentru bolile hepatice sau a ducturilor biliare. Creșterea bilirubinei conjugate se poate, de asemenea, întâlni în dereglările excreției de bilirubină (proces energodependent) în sepsis, nutriție parenterală totală și după intervenții chirurgicale.

Cele mai mari creșteri ale bilirubinei totale se semnalează în hepatita acută virală, valoarea ei în serul sanguin putând atinge chiar 340 mkmol/l, în această boală paralelismul concentrației bilirubinei cu activitatea unor enzime serice (ALT, AST și GLDH) este evident: creșterea concentrației bilirubinei și a activității acestor enzime în perioada de 10-14 zile de la debutul bolii și revenirea treptată la normal după 6-8 săptămâni. Dacă hepatita virală este însoțită de fenomene colestatice pronunțate, scaunele devin palide și urobilinogenul dispare din urină (în lipsa colestazei el este decelabil la acest nivel). Reapariția urobilinogenului în urină coincide cu reluarea fluxului biliar și reflectă începutul vindecării.

Creșterile bilirubinei în puseele hepatice cronice și în ficatul gras de etiologie alcoolică sunt rareori peste 34,2-51,3 mkmol/l; în ciroză, bilirubina totală serică variază între valoarea normală și 51,3-68,4 mkmol/l.

Testele de laborator pentru explorarea bilirubinei în diagnosticul precoce a hepatitelor acute cedează testelor enzimatiche. O informație mai amplă poate fi obținută la determinarea fracțiilor bilirubinei: **neconjugate** și **conjugate** și calcularea **indicelui bilirubinic (IB)**, care constituie raportul dintre fracția bilirubinei conjugate la bilirubina totală și constituie 24-25%. S-a constatat, că la sfârșitul perioadei preicterice, conținutul bilirubinei totale poate fi în limitele normei fiziologice pe când fracția conjugată se majorează.

**Tabelul 19.** Metodele de laborator de control al diferitor verigi a metabolismului bilirubinei

Indicii cercetați	Metodele de determinare	Norma (mkmol/l)
Nivelul bilirubinei totale în serul sanguin	Metoda Iendrašec	8.5-20.5
Nivelul bilirubinei conjugate (directe)	Metoda Iendrašec	2.1-5.1
Nivelul bilirubinei neconjugate (indirecte)	Metoda Iendrašec	6.4-15.4
Indicele bilirubinic (IB)	-	Până la 25%
Testul la bilirubină în urină	Proba Rozina, Fușe	Negativ
Testul la urobilină în urină	Proba cu reactivul Erlih sau uroteste	Negativ
Testul la stercobilină în masele fecale	Proba cu reactivul Erlih sau uroteste	Negativ

**Notă:** Bilirubina neconjugată a fost numită "indirectă", iar cea conjugată "directă", după comportamentul în timpul reacției Van der Bergh (reacție pozitivă în prezența bilirubinei conjugate directe).

### RECOMANDĂRI:

Pentru bărbați și femei se vor utiliza valori de referință separate. Deoarece limitele superioare a valorilor de referință ale bilirubinei se micșorează la persoanele adulte odată cu vârsta, la copii se vor utiliza valori de referință separate.



Un rol important în diagnosticul precoce al hepatitelor virale aparține examinării urobilino-genilor în urină. Este important de menționat că, creșterea conținutului de urobilino-genii în urină poate fi stabilită până la apariția icterului.

Examinarea stercobilinei în materiile fecale prezintă un test valoros de diagnostic. În caz de obstrucție biliară bila nu pătrunde în intestin. Lipsa stercobilinei indică începutul fazei de acolie, pe când reacția pozitivă este un indice al dispariției acoliei.

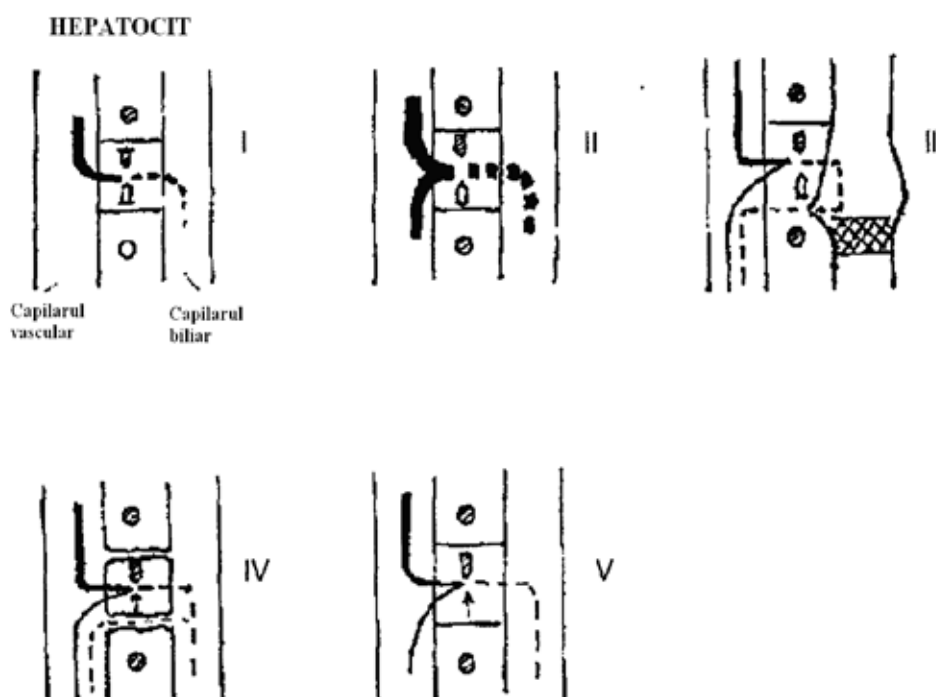
Pentru diagnosticul precoce a formelor icterice ale hepatitelor acute sunt importante de-terminarea în urină a urobilino-genilor și a bilirubinei, iar în sânge - creșterea bilirubinei conjugate. Controlul dinamic al indicilor metabolismului bilirubinei are o importanță primordială pentru depistarea sindromului colestatic, precum și diagnosticul diferențial al icterelor de diferită gene-ză (tabelul 20).

**Tabelul 20** Diagnosticul diferențiat al icterelor

Tipurile icterului	Hiperbilirubinemia			Biliru-binuria	Urobili-nogenuria	Lipsa stercobilinei în masele fecale (acolia)
	gene-rală	IB≥25%	IB≤25%			
Prehepatic (hemolitic)	+	-	+	-	++	-
Hepatic (parenchi-matos)	++	+	-	+	+/-	+/-
Posthepatic (obstructiv)	++	+	-	+	-	+

Notă: ++-majorare însemnată, +- majorare moderată, +/-se depistează în diferite faze ale hepatitei virale, -lipsește, IB-indicele bilirubinic.

**Figura 23.** Patogeneza hiperbilirubinemiilor.





I –conjugarea normală a bilirubinei. cea mai mare parte a bilirubinei neconjugate (săgeată plină) ajunsă în ficat este captată, glucoronoconjugată la nivelul microsomilor și eliminată în bilă sub forma bilirubinei conjugate (săgeată hașurată), fiind apoi îndepărtată din canaliculele biliare sub acțiunea fluxului biliar apos.

II - hiperbilirubinemia hemolitică (icterul hemolitic): bilirubină neconjugată produsă în exces depășește capacitatea de captare și glucuronoconjugare a ficatului și crește în sânge; întrucât aceste procese nu sunt deficitare, ci doar depășite, se produc cantități sporite de bilirubină conjugată care ajunge în bilă fără a crește în sânge.

III - hiperbilirubinemiile obstructive (icterele mecanice) - bilirubina conjugată ajunsă în canaliculele biliare nu poate fi eliminată din cauza obstacolului mecanic și se revarsă în sânge, ceea ce face să crească bilirubina conjugată.

IV - hiperbilirubinemia parenchimatooasă (icterul parenchimos): lezarea celulelor hepatice și reducerea funcționalității acestora face ca în sânge să crească atât bilirubina neconjugată cât și cea conjugată.

V - icterul fiziologic neonatal: activitatea micșorată a glucoroniltrasferazei și hemoliza accelerată corelată cu o "imaturitate" a ficatului de a prelua, conjuga și excreta bilirubina condiționează conjugarea numai a unei părți de bilirubină neconjugată și creșterea nivelului acesteia în sânge.

## DIAGNOSTICUL DIFERENȚIAT AL DIFERITILOR FORME DE ICTER

La prima etapă se efectuează diagnosticul diferențiat al icterului parenchimos cu icterul hemolitic, mecanic și bilirubinopatii ereditare, confirmându-se originea hemolitică a icterului. Rolul hotărâtor la această etapă aparține datelor de laborator.

### Icterul hemolitic

Icterele prehepatice (hemolitice) apar în anemiile hemolitice. Ele se manifestă nu numai prin ictericitate, dar și prin sindromul anemic. La toți pacienții cu acest sindrom în analiza sîngelui periferic se depistează micșorarea numărului de eritrocite și a concentrației de hemoglobină, asociate de reticulocitoză. O parte de eritrocite sunt policromatofile, se observă anizocitoză și poikilocitoză. În perioada crizelor hemolitice poate apărea o leucocitoză cu devieri în hemogramă de tipul reacțiilor leucemoide.

În analiza biochimică se depistează o hiperbilirubinemie pe seama bilirubinei neconjugate, urobilinogenurie. Cauza depășirii nivelului normal al bilirubinei serice - creșterea vitezei de formare a bilirubinei (deci a degradării hemoproteinelor). Testele enzimatiche ale ficatului sunt normale.

### Icterul parenchimos

Icterul parenchimos apare la pacienții cu hepatite virale. La pacienții cu icter parenchimos sindromul anemic lipsește. Reticulocitoza nu se depistează. Concentrația bilirubinei este majorată pe seama fracției conjugate. În icterul parenchimos sunt majorate testele enzimatiche hepatice. Dacă icterul parenchimos este însoțit de fenomene colestatice pronunțate, scaunele devin palide și urobilinogenul dispare din urină. Reaparitia urobilinogenului în urină coincide cu reluarea fluxului biliar și reflectă începutul vindecării.



## Icterul obstructiv

Icterele obstructive se întâlnesc în cazul blocării parțiale sau totale a canalelor biliare prin formarea de calculi (litiază biliară) sau datorită tumorilor, congestiilor în această zonă. În icterul obstructiv concentrația bilirubinei este majorată pe seama fracției conjugate. Crește activitatea fosfatazei alcaline, GGT, 5-NT. Dacă obstrucția canalului biliar este totală, în intestin nu se mai află urobilinogen, scaunul este decolorat. Acești derivați ai bilirubinei nu se elimină nici prin urină, de aceea urobilinogenuria lipsește. O altă particularitate a icterelor colestatice și în special a colestazelor extrahepatice este reprezentată de creșterea colesterolului liber și a fosfolipidelor care, nemaiputând fi eliminate prin bilă se acumulează în plasmă și formează un complex denumit lipoproteina X. Analiza generală a sângelui este normală.

## Bilirubinopatiile ereditare

Se va efectua diagnosticul diferențiat cu maladia Gilbert ce evoluează cu bilirubinemie neconjugată, care este unicul simptom de laborator. Enzimele hepatice și indicii hemoleucogramei sunt în limitele fiziologice normale.

## TESTELE PROTEICE

Probele de disproteinemie, utilizate ca probe hepatice în hepatitele virale acute au un caracter global de tipul inflamației, sunt lipsite de specificitate și nu sprijină clinicianul în formularea unui diagnostic specific de boală hepatică.

### Proteinele serice

Albumina și  $\alpha$ - și  $\beta$ -globulinele ca și alte multe proteine sunt sintetizate de hepatocite. Imunoglobulinele însă, sunt produse de plasmocite și nu vizează direct funcția hepatică. Dacă proteinele din prima categorie sunt adesea sintetizate în cantități reduse în prezența hepatopatiei, imunoglobulinele sunt variabile, fiind influențate de inflamație și infecții.

## ALBUMINA

*Valorile serice normale –*

- ▲ Adulți - 35 -50g/l, respectiv 500-725  $\mu$ mol/L
- ▲ Copii - 45-54 g/l

Albumina este o proteină plasmatică, cu masa moleculară de 69 kDa, cantitatea cea mai mare este produsă de către hepatocite. Sinteza hepatică de albumină este relativ constantă (în jur de 20 g/zi) putând fi însă dublată sau chiar triplată la nevoie, respectiv în caz de pierderi. Rata de sinteză depinde de un șir de factori, inclusiv suplimentarea cu aminoacizi, presiunea oncotică plasmatică, nivelele de citokine inhibitoare (în special IL-6) și numărul de hepatocite funcționale. Nu există o diferență semnificativă între valorile de referință la bărbați și femei.

Principala funcție constă în menținerea presiunii coloidosmotice a plasmei intervenind astfel în reglarea schimburilor între plasmă și lichidul interstițial. Albumina intervine și în transportul acizilor grași, bilirubinei, a unor **hormoni**, ioni metalici (Ca, Cu, Zn) precum și a unor medi-



camente. Totodată albumina constituie o importantă sursă de aminoacizi esențiali, utilizată în procesele de regenerare a țesuturilor.

Modificările nivelului de albumină:

- ▲ creșterea albuminei se datorează de obicei hemoconcentrației, cauzate fie de deshidratare, utilizarea îndelungată a garoului în timpul colectării, fie evaporării probei.
- ▲ micșorarea albuminei este cauzată de pierderile de proteine (sindrom nefrotic, combustii, enteropatiile cu pierdere de proteină), schimbul sporit de albumină (stări catabolice, glucocorticoizi), ingestia insuficientă de proteine (malnutriție, diete hipoproteice) și bolile hepatice.
- ▲ sinteza albuminei este inhibată în inflamația cronică, infecții, consum excesiv de alcool sau neoplazii.

Datorită timpului său mare de înjumătățire (17-23 zile), albumina plasmatică este rareori micșorată în hepatită acută, în hepatită cronică, însă, albumina descrește treptat odată cu progresarea spre ciroză. Hipoalbuminemia de cauză hepatică apare relativ târziu în cursul evoluției bolii, deoarece parenchimul hepatic are o capacitate deosebit de mare de amplificare a sintezei chiar și în condițiile unei reduceri a numărului de celule funcționale. Scăderea aportului de aminoacizi din malnutriție și malabsorbție constituie o altă cauză de reducere a sintezei hepatice de albumină.

Hipoalbuminemia apare în destrucția masivă (în multe boli hepatice) sau înlocuirea (prin fibroză) a parenchimului hepatic în ciroza hepatică. Concentrațiile de albumină sunt un marker de decompensare și pronostic în ciroză. Utilizarea clinică a valorilor de albumină în bolile hepatice este, în primul rând, pentru recunoașterea cirozei și pentru determinarea severității acestei patologii. O creștere cu 20-30 g/l în timpul tratamentului cirozei hepatice semnifică îmbunătățirea statusului general și un prognostic mai favorabil decât absența acestei evoluții sub tratament.

Dozarea albuminei cel mai frecvent se efectuează **prin metodele colorimetrice**, și anume, cu verde de bromcrezol și roșu de bromcrezol; actualmente, majoritatea laboratoarelor folosesc una din aceste metode. Aprecierea albuminei prin electroforeza proteinelor nu este recomandată din cauza supraestimării albuminei, datorate colorării mai intense. Există metode imunologice de determinare a albuminei, însă acestea sunt utilizate mai rar.

Concentrațiile diverselor proteine plasmatică se modifică în numeroase stări patologice. Interpretarea acestor modificări este facilitată de faptul că ele pot fi încadrate în câteva tipuri de disproteinemie, care la rândul lor pot fi diferențiate prin simpla electroforeză a proteinelor serice.

**Disproteinemia din afecțiunile hepatice** realizează aspecte diferite în funcție de etiologie și de stadiul evolutiv al hepatopatiei.

Modificările proteinogramei din **hepatita virală acută** sunt puțin exprimate și necaracteristice, având o valoare diagnostică redusă, mai ales în comparație cu creșterea impresionantă a transaminazelor ALT și AST.

**Hiperglobulinemia** reflectă adesea inflamația cronică și poate avea valori ridicate în **hepatita autoimună**; *α-2-globulinele* sunt crescute în hepatopatiile inflamatorii și neoplazice; *beta-globulinele* cresc adesea semnificativ în obstrucția biliară. Ca și în alte inflamații cronice, creșterea gama-globulinelor la bolnavii cu **hepatită cronică** poartă un caracter policlonal. De notat că, hipergamaglobulinemia policlonală nu este specifică hepatopatiilor cronice și se poate întâlni în orice proces inflamator cronic (de ex. în poliartrita reumatoidă, endocardita infecțioasă sau un proces tuberculos).

În **hepatita acută**, creșterea imunoglobulinelor și respectiv a fracțiunii electroforetice gama este variabilă, în funcție de durata bolii și de răspunsul individual la infecția virală. De regulă, astfel de creșteri nu sunt atât de accentuate ca într-o hepatită cronică și se caracterizează mai ales printr-un nivel ridicat de IgM.

Se consideră că în **hepatita cronică de natură virală** ar crește mai ales IgG. În cirozele biliare creșterea ar interesa cu predominanță IgM, iar în ciroza alcoolică ar surveni o creștere a IgA.

De notat că în **angiocolite** și în **cirozele biliare** se evidențiază o creștere moderată a *alfa-2 globulinelor* în timp ce creșterea *gama-globulinelor* este mai puțin exprimată decât în hepatitele cronice.





În stadiile de debut ale **neoplaziilor hepatice** electroforeza proteinelor serice are o valoare diagnostică redusă, dar în adenocarcinomul hepatic cu ciroză, scăderea albuminelor și creșterea gama-globulinelor se asociază o creștere exprimată a fracțiunii electroforetice alfa-I globulinelor. Metodele imunologice permit evidențierea unei alfa-I globuline fetale - *alfa-fetoproteina* care, dacă prezintă valori mult crescute sau atunci când cresc de la o examinare la alta, sugerează un carcinom hepatic primar.

Un rol important în patologia hepatitei îl joacă mediatorii endogeni, *citokinele* - interleukina-1 (IL-1), factorul de necroză tumorală (TNF) și interleukina-6 (IL-6) care intervin în declanșarea reacției de fază acută, iar ficatul stimulat de acești mediatori sintetizează și secretă așa-zisele proteine de fază acută: alfa<sub>1</sub>- antitripsină, fibrinogenul, proteina C reactivă și al. Deși gradul de contribuție al diferitor celule din ficat la producerea de citokine este diferit, s-au adus dovezi certe privind creșterea TNF, IL-6 și a altor citokine în plasma bolnavilor cu hepatită cronică, ciroză hepatică, precum și în cazuri de insuficiență hepatică fulminantă.

Astfel de creșteri pot fi cauzate atât de o producție sporită în cursul puseurilor inflamatorii, cât și de o scădere a proceselor de clearance hepatic al citokinelor, atunci când se instalează o insuficiență hepatică.

În pofida faptului că, multe laboratoare clinice au astăzi posibilitatea de a separa proteinele plasmatică prin metode electroforetice și a le doza diferențiat prin metode imunochimice, așa-zisele **teste de disproteinemie** sau de labilitate coloidală nu și-au pierdut o oarecare utilitate practică, fiind ușor de executat și furnizând rezultate în decurs de 15-30 de minute. Testul cu timol este mai puțin fundamentat biochimic și se pozitivează în caz de creștere a unor globuline cu migrare beta sau gama, precum și a unor lipoproteine care reduc stabilitatea coloidală a serului, dând rezultate fals pozitive în cazurile cu hipetrigliceridemie și plasmă lactescentă.

### RECOMANDĂRI:

Se consideră adecvată pentru uzul clinic atingerea următoarei performanțe la dozarea albuminei serice: eroarea analitică a valorii limitei de jos de referință  $\leq 10\%$ .

Determinarea albuminei la pacienții cu boli hepatice se va efectua utilizând verdele de bromcrezol. Dozarea albuminei cu roșu de bromcrezol și prin electroforeză poate fi inexactă la pacienții cu boli hepatice.

## AMONIACUL (NH<sub>3</sub>)

**Amoniacul seric** - 11-38  $\mu\text{mol/L}$ , respectiv  $< 0,65 \text{ mg/l}$   
*testul optic – 340 nm*

Amoniacul este un produs al metabolismului aminoacidic; cea mai mare parte a amoniacului (NH<sub>3</sub>), rezultat din dezaminarea acizilor aminați în ficat și în alte țesuturi și mai ales sub acțiunea bacteriilor intestinale este transformat în uree la nivelul hepatocitelor. Datorită eficienței procesului de ureogeneză, nivelul amoniacului sanguin se menține, în normă, în limite joase. În bolile hepatice nivelul sporit de NH<sub>3</sub> este, de obicei, un semn al insuficienței hepatice.

Hiperamoniemia poate apărea la orice pacient cu afecțiune hepatică severă (necroză hepatică severă, ciroză în stadiu terminal, după hepatectomie). În caz de insuficiență hepatică și mai ales în caz de șuntare a circulației portocave, nivelul amoniemiei poate depăși de 5 ori limita superioară a normalului, valorile putând fi mai ridicate atunci când la un bolnav cu ciroză hepatică survine o hemoragie digestivă superioară. Valorile sînt crescute în cele mai multe cazuri de comă hepatică, considerându-se că amoniacul ar avea un efect toxic asupra sistemu-



lui nervos central. Dar amoniacul nu este singurul și nici principalul compus toxic implicat în producerea manifestărilor neuropsihice la bolnavii cu ciroză hepatică. Așa de ex., aminele rezultate în intestin prin decarboxilarea aminoacizilor aromatici (tirozină, fenilalanină), nedegradate în ficat și având o structură similară catecolaminelor (de exemplu feniletanolamina), pot interfera cu acești mediatori chimici la nivelul receptorilor adrenergici, putând astfel explica, atât hipotensiunea, cât și fenomenele neuropsihice ale bolnavilor cu insuficiență hepatică.

**Tabelul 21.** Factorii ce influențează asupra nivelului amoniacului în lipsa afecțiunii hepatice

FACTORII	MODIFICĂRILE	COMENTARII
<b>Vârsta</b>	Valori de 4-8 ori mai mari la nou-născuți; de 2-3 ori mai mari la copiii < 3 ani; amplitudine mai mare la adulți decât la adolescenți	
<b>Proba de material biologic</b>	Cercetarea sângelui arterial oferă rezultate mai precise decât probele venoase; probele din sângele capilar pot induce creșteri false ale $\text{NH}_3$ din cauza perspirației în cazul prelucrării inadecvate a pielii.	Doar amoniacul din sângele arterial corelează cu modificările funcției ficatului. Aplicarea garoului strâns sau încleștarea puternică a pumnului poate provoca creșterea amoniacului din sângele venos.
<b>Efortul fizic</b>	Creșteri de 3 ori și mai mult după efortul fizic intens	Creșterea este mai evidentă la bărbați decât a femeii
<b>Fumatul</b>	Crește cu 10 $\mu\text{mol/L}$ după 1 țigară	
<b>Modul de păstrare</b>	Amoniaca crește cu 20% după 1 oră și cu 100% după 2 ore la păstrare la temperatura camerei.	Utilizarea gheții, centrifugarea și separarea rapidă a plasmei minimalizează creșterea amoniului la păstrare. Rata de creștere este mai mare în afecțiunile hepatice.
<b>Alți factori</b>	Creștere în leucemia acută, transfuzia sanguină, transplantul osos.	
<b>Preparatele medicamentoase</b>	Acidul valproic, glycina (utilizată în irigare la rezecția prostatei, endometriului) crește producerea amoniacului	

Hiperamoniemia este, de asemenea, caracteristică și pentru enzimopatiile ereditare și dobândite legate cu deficiența enzimelor ciclului ornitinic, Creșteri neînsemnate a  $\text{NH}_3$  în plasmă se constată la pacienții cu hepatită cronică, proporțional cu progresarea bolii.

În encefalopatia hepatică nivelul crescut al amoniacului se constată la 90% dintre pacienți, dar el nu reflectă gradul comei. Reducerea concentrației amoniemiei poate fi predictivă însă pentru evoluția favorabilă a manifestărilor neurologice ale encefalopatiei hepatice.

Cele mai bune rezultate pentru măsurarea amoniemiei se obțin din sângele arterial. Plasma va fi separată de celule în limitele unei ore de la colectare; la pacienții cu boli hepatice, este ideală separarea în limitele a 15 minute. Pentru măsurarea nivelului de amoniac se utilizează un șir de metode, cea mai precisă este metoda *enzimatică*.



### RECOMANDĂRI:

Dozarea amoniemiei nu este un marker sigur pentru stabilirea diagnosticului de rutină a encefalopatiei hepatice la pacienții cu boli hepatice acute sau cronice; ea poate fi utilă la pacienții cu encefalopatie de etiologie neclară.

Pentru măsurări mai exacte se vor utiliza probe de sânge arterial și nu venos. Pentru a preveni sporirea artificială a amoniacului plasma trebuie separată de celule în limitele a 15 minute de la colectare.

Se impune dozarea amoniacului în toate cauzele inexplicabile de encefalopatie sau la orice nou-născut cu deteriorare neurologică de cauză incertă.

## FACTORI DE COAGULARE. TIMPUL DE PROTROMBINĂ

**Factorii de coagulare.** Deosebit de importante sunt tulburările în sinteza factorilor de coagulare, care depind de ficat. Ficatul sintetizează următorii factori de coagulare: fibrinogenul (factorul I), protrombina (f. II), factorii V (proaccelerina), VII (proconvertina), IX (f. Christmas), XII (f. Hageman) și XIII (f. fibrinstabilizator). Dereglările în sistemul acestor factori reprezintă și un semn fidel și precoce de gravitate și prognostic grav imediat în hepatitele virale acute. Nivelul factorului V este folosit adesea ca martor al capacității de biosinteză în insuficiența hepatică acută/fulminantă. Cu acest scop uzual se determină timpul Quick (denumit în mod curent timp de protrombină).

Timpul normal de protrombină (TP) depinde atât de capacitatea normală de sinteză hepatică a protrombinei, fibrinogenului, factorilor V, VII și X, cât și de prezența unei cantități adecvate de vitamina K, deoarece factorii activi biologic (factorii II, VII, IX și X) necesită pentru sinteza lor vitamina K. Deficitul de vitamina K poate apărea în icterul obstructiv cu malabsorbția vitaminelor liposolubile, secundar la alterarea florei intestinale prin antibioticoterapie și în deficiențele de dietă. Modificările patologice ale TP nu sunt însă specifice numai pentru diverse hepatopatii; de pildă, deficiențele congenitale ale factorilor de coagulare (hemofilia sau boala Christmas) și consumul excesiv de factori de coagulare care survine în sindromul de coagulare intravasculară diseminată (CID). Cu scopul diferențierii cauzelor hepatice și nonhepatice ale prelungirii TP, se va administra parenteral vitamina K. Persistența TP prelungit orientează spre o afectare hepatică, mai ales dacă sunt modificate și alte teste coagulologice. TP este util și ca test de prognostic în hepatita alcoolică acută sau necroza hepatocelulară acută cu potențial de evoluție spre insuficiența hepatică fulminantă (de exemplu, hepatita virală sau intoxicația cu acetaminofen), dar și în hepatita cronică progresivă. Scăderea sub 50% a indicelui protrombinic (timpul Quick) constituie un criteriu sigur de hepatită severă, valori de 10-30% indică o hepatită foarte gravă, o scădere sub 10% indică o gravitate extremă cu exitus letale. TP prelungit care nu se corectează prin administrarea de vitamina K, indică un risc major chirurgical. Atunci când intervențiile invazive sunt necesare, pentru corectarea TP se va administra întotdeauna plasma proaspăt congelată. Pe lângă TP și timpul de tromboplastină parțial activat (TTPA) care reflectă activitatea factorilor I, II, V, VIII, IX, X, XI și XII, poate fi prelungit în hepatopatiile avansate.

Timpul de protrombină (TP) măsoară timpul necesar pentru coagularea plasmei după adăugarea de Factor tisular și fosfolipid; el este influențat de modificările în activitatea factorilor X, VII, V, II (protrombina) și I (fibrinogen). TP este deseori înregistrat în secunde și în comparație cu valorile de referință ale pacientului. Timpul necesar pentru coagularea unei probe este invers proporțional cu cantitatea Factorului tisular prezent în reagenți.

În hepatita acută ischemică și toxică, TP este mărit reproductibil, de obicei cu cel puțin 3 sec peste media din populație, în hepatita virală sau alcoolică, însă, TP este rareori mărit mai mult decât cu trei secunde. TP este deseori mărit în icterul mecanic, și poate răspunde la administrarea



parenterală de vitamină K. În hepatită cronică, TP se află, de obicei, în limitele de referință, dar sporește odată cu progresarea spre ciroză și este mărit la pacienții cirofici.

**Recomandări:** pentru exprimarea rezultatelor timpului de protrombină la pacienții cu boli hepatice, trebuie utilizat de preferință TP (în secunde).

**TULBURĂRILE METABOLISMULUI LIPIDELOR** se manifestă prin scăderea colesterolului total și mai ales a fracțiunii esterificate a acestuia. Trigliceridele cresc semnificativ la începutul bolii și revin la normal în a 4-a săptămână de boală. În formele colestatice apare în ser o lipoproteină anormală - lipoproteina X. Nivelul plasmatic de LpX este evident mai ridicat la bolnavii cu coleastăză extrahepatică decât la cei cu coleastăză intrahepatică.

**TULBURĂRILE METABOLISMULUI GLUCIDIC** se manifestă prin apariția de curbe patologice ale glicemiei, slabă utilizare a glucozei și afectarea utilizării galactozei, precum și o creștere a cetonemiei.

În cursul hepatitei virale crește **fierul seric** probabil prin leziunile hepatocitelor și cupremia.

**TULBURĂRILE METABOLISMULUI HIDRIC ȘI AL ELECTROLIȚILOR** se manifestă prin apariția unei retenții hidrice și sodice în perioada de stare “edem infraclinic”, care apare spre declinul bolii, când se produce o criză poliurică. Cazurile de edem frust (hepatită edematoasă) se întâlnesc rar în formele severe sau cu tendința de cronicizare. În forma uzuală nu se constată o retenție hidrică, apa totală rămânând nemodificată.

## MODIFICĂRILE ANALIZEI GENERALE A SÎNGELUI

Se constată o leucopenie cu limfocitoză ușoară, monocitoză, apariția de câteva celule plasmatice, și o ușoară eozinofilie. O parte din limfocite prezintă unele particularități: vacuole citoplasmice, bazofilia intensă și granulație azurofilă a citoplasmei (aspect de “virocite”). În formele severe se constată leucocitoză cu neutrofilie pronunțată, anemie și trombocitopenie (de genезă aplastică).

VSH este crescut. Este necesar de evidențiat o analiză de rutină cum ar fi **numărătoarea reticulocitelor**, fiind un indice foarte important în diferențierea tipului de icter.

## SINDROAMELE PRINCIPALE DE LABORATOR ÎN HEPATITA VIRALĂ ACUTĂ

**Tabloul biologic** poate fi mai mult sau mai puțin modificat. Astfel, există hepatite cronice cu un tablou biologic minim modificat, iar altele (de obicei formele active) au modificări evidente.

Sindroamele biologice cercetate în hepatita virală acută sunt reprezentate de:

**1. Sindromul de disproteinemie** (inflamator nespecific). Sindromul inflamator se traduce prin creșterea gama-globulinelor (IgA, IgM și IgG), proteinelor fazei acute a inflamației existând o oarecare corelație între nivelul lor și activitatea histologică a bolii.

Testele utilizate sunt aceleași ca și în hepatita virală acută A, deosebirea constând în prezența unor valori normale sau ușor crescute la debutul și în prima parte a perioadei de stare. Evoluția spre vindecare a hepatitei B se însoțește de o creștere moderată a valorilor la testul cu timol, la sfârșitul perioadei de stare și în prima parte a convalescenței, pentru ca, la 3-4-6 luni de la debutul bolii acute, acestea să revină în limite normale. Formele prelungite și infecția cronică cu VHB pot prezenta valori crescute ale acestor teste, oarecum superpozabile valorilor crescute ale gama-globulinelor în electroforeza proteinelor serice (testele de disproteinemie se pozitivează prin scăderea sintezei de albumină și creșterea concentrației serice a globulinelor, în special a Ig). Afară de aceste modificări se constată o leucocitoză cu neutrofilie, majorarea VSH.

**2. Sindromul de hepatocitoliză:** dozarea transaminazelor (AST, și ALT) în perioada de stare a hepatitei virale acute B duce la obținerea unor valori crescute (200-300 UI/l până la 1000-3000 UI/l, față de 12-35 UI/l valori normale). Nivelul seric al acestor enzime nu este direct proporțional cu extinderea proceselor de distrucție hepatocitară (enzimele pot trece în circulație și atunci când hepatocitele sunt integre din punct de vedere morfologic, dar au permeabi-



litate crescută prin expunere la hipoxie sau ischemie). Cu toate acestea, în formele severe, prin destrucția masivă a celulelor hepatice, titrul ALT poate ajunge la început la valori de 1000-3000 UI/l. Sunt însă și forme de hepatită fulminantă în care determinările repetate ale transaminazelor duc la obținerea unor valori de zeci până la 100 de UI/l, prăbușirea valorilor datorându-se probabil epuizării enzimatică a ficatului. Depistarea unei leziuni hepatice minime se poate face prin dozarea gama-glutamil-transpeptidazei (GGT). Valori crescute ale acestei enzime sunt descrise în toate tulburările hepato-biliare și mai ales în cursul hepatitei etanolice în care creșterea nivelului seric al GGT precede modificările tuturor celorlalte teste hepatice. Determinările altor enzime (LDH, OCT) nu este uzuală în clinica hepatitelor acute mai ales că acestea prezintă modificări și în afectarea altor țesuturi (mușchi, miocard, rinichi, intestin).

**3. Sindrom de retenție biliară:** Creșterea concentrației serice a bilirubinemiei (din conținutul fracției conjugate) determină apariția în urină a pigmentilor biliari (bilirubina directă trecând prin filtrul renal, în timp ce bilirubina neconjugată nu se regăsește în urină deoarece nu este solubilă). Formele colestatice de hepatită virală acută se însoțesc și de o creștere marcată a fosfatazei alcaline prin alterarea funcției excretoare a ficatului, GGT, 5-nucleotidazei, leucinaminopeptidazei, precum și de creșterea colesterolului, acizilor colici, trigliceridelor, fosfolipidelor, β-lipoproteidelor.

**4. Sindromul hepatopriv (de insuficiență hepato-celulară):** pune în evidență scăderea capacității de sinteză a ficatului, ca o consecință a necrozei hepatice. Se cunoaște faptul că albumina, fibrinogenul, protrombina, proaccelerina sunt proteine sintetizate exclusiv de hepatocite. Hipoalbuminemia se întâlnește mai ales în necrozele hepatice subacute masive, în hepatitele cronice active, ciroze hepatice, fiind un indice util în prognosticul și terapia acestor afecțiuni. În schimb, informațiile asupra capacității de sinteză a protrombinei, fibrinogenului și factorilor de coagulare V, VII și X prin determinarea timpilor de coagulare (timp Quick, timp de protrombină, timpul de proaccelerină și de proconvertină) orientează asupra evoluției și prognosticului imediat în formele severe, precomatoase sau comatoase. Prelungirea marcată a acestor timpi se întâlnește în necroza hepatică acută gravă (diferența între pacient și martori depășind 10-20 sau chiar 100 de secunde). O creștere moderată a timpului de coagulare (5-10 secunde) se poate întâlni și în hepatitele B colestatice (colestaza intrahepatică prelungită împiedicând absorbția intestinală a vitaminei K) și în hepatitele cronice active sau cirozele hepatice AgHBs pozitiv (prin existența unui deficit de sinteză hepatică a acestor proteine, paralelă cu scăderea sintezei de albumină).



## 4. METODE DE DIAGNOSTIC DE LABORATOR

### 4.1 METODA ELISA

**Metoda ELISA** (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) este o tehnică imunohistochimică, utilizată cel mai des în imunologie pentru detecția prezenței antigenului sau anticorpului în proba testată. Tehnica ELISA este utilizată, atât cu scop de diagnostic în medicină, cât și în alte domenii industriale pentru detecția diverselor substanțe.

**Metoda ELISA reprezintă o metoda în faza solidă, la care se folosește un ligand marcat cu o enzimă (peroxidaza, fosfataza alcalina), complexul format fiind identificat colorimetric după adăugarea unui substrat specific enzimei.**

Pe un suport (de obicei microplășete de polystyrene) este adsorbit, fie un antigen, fie un anticorp cunoscut. La antigenul imobilizat se adaugă anticorpul necunoscut, se formează complexul Ag-Ac. Detecția lui se poate face, fie cu ajutorul anticorpilor marcați cu enzime, sau el însuși poate fi detectabil prin utilizarea unui anticorp secundar, unit covalent prin bioconjugare cu o enzimă. După fiecare etapă microplășetele sunt spălate cu o soluție slabă de detergent pentru a îndepărta toate proteinele sau anticorpii care nu s-au unit specific. După ultima etapă de spălare, complexul format se detectează prin adăugarea substratului enzimatic pentru producerea unei reacții vizibile, care este direct proporțională cu cantitatea antigenului/anticorpului din proba testată.

Utilizarea metodei în fază solidă, dă posibilitate de a simplifica procesul de separare a componentelor reacției prin imobilizarea unui component pe faza solidă și îndepărtarea componentelor în exces prin spălare, care nu participă la reacție.

**ELISA reprezintă o tehnică prin care se poate identifica substanța necunoscută, atât calitativ, cât și cantitativ, dar în ambele cazuri sunt necesari ANTICORPI înalt specifici și înalt sensibili pentru antigenii particulari.**

### Aplicarea

Aceste criterii au contribuit la utilizarea tehnicii ELISA în toate domeniile medicinei cu scop diagnostic, profilactic și științific pentru detecția prezenței și/sau concentrației anticorpilor și antigenelor hepatitelor virale A, B, C și D; produse de diverse firme comerciale, în diverse variații și modificări.

### Istoria

Tehnica ELISA a evoluat din metoda RIA (analiza radioimună) prin care s-a observat că antigenul sau anticorpul poate fi absorbit pe un substrat solid și în paralel poate participa în uniri specifice de înaltă afinitate cu alți componenți. Cu toate că metoda RIA este o tehnică înalt sensibilă, însă pe motiv că ea prezenta un anumit pericol pentru medicină, s-a impus găsirea unei alte metode neradioactive pentru detecția Ag sau Ac din mostrele testate. Ulterior, ca alternativă, s-au găsit unele enzime (de tipul peroxidaza), care pot reacționa cu un substrat apropiat (ex. ABTS sau 3,3',5,5' – Tetramethylbenzidine), reacția fiind urmată de schimbarea culorii soluției, proprietate ce poate fi considerată ca un semnal chimic și citită de anumite aparate. Însă acest semnal trebuia asociat cu complexul Ag-Ac format, de aceea enzima va fi unită de anticorpul de detecție prin bioconjugare. Acest proces de unire a Ac cu o anumită enzimă a fost descoperit independent de către Stratis Avrameas și G.B. Pierce

Pe motiv, că este necesară înlăturarea oricărei particule neunită (AG sau Ac) era necesar, ca complexul Ag sau Ac să fie fixat pe o suprafață solidă pentru a nu fi îndepărtat la spălare. Un astfel de imunosorbent, a fost propus de către Wide și Porath în 1966. În practică, metoda ELI-



SA pentru prima a fost introdusă în 1971 de către Eva Engvall și Peter Perlmann (Universitatea din Stockholm, Suedia) și publicată independent ca o metodă/tehnică nouă de către Shuurs and Bauke van Weemen din Olanda. Inițial, a fost aplicată pentru determinarea IgE, apoi extinsă și pentru identificarea anti-HBs.

#### **Avantajele ELISA comparativ cu alte metode:**

- sensibilitate înaltă, posibilitate de detecție a concentrației de până la 0,05 ng/ml. Aceasta reiese din capacitatea unei molecule de ferment să catalizeze transformarea a mai multor molecule de substrat;

- ▲ posibilitatea utilizării unei cantități minime de materialul studiat (ser, plasma);
- ▲ stabilitate la păstrarea tuturor ingredientelor, necesare pentru efectuarea ELISA (până la un an și mai mult);
- ▲ ușurința executării reacției;
- ▲ posibilitatea vizualizării rezultatului reacției, atât instrumental (variante cantitativă și calitativă), cât și vizual;
- ▲ posibilitatea automatizării tuturor etapelor reacției;
- ▲ comparativ, un preț destul de redus al reagenților de diagnostic.

#### **Dezavantajele**

Una din limitele tehnicii ELISA este că ea furnizează informații doar despre prezența sau absența substanței cercetate, dar nu ne poate oferi informație privind proprietățile biomedicale, precum greutatea moleculară sau distribuția spațială a substanței cercetate în țesuturi. Pentru a afla aceste lucruri este nevoie de efectuat și alte metode de laborator. Ex. imunoblottul este o metodă combinată de detecție a prezenței sau absenței markerului studiat, cât și de studiere/ analiză a proprietăților fizice a substanței (greutatea moleculară, etc), însă este mai costisitoare ca ELISA.

**Figura 24.** Test sistemele pentru metoda ELISA.



### **Variantele tehnicii ELISA**

Virtual, toate virusurile și microbiile au cel puțin un antigen unic, specific doar speciei, tulpinii date. Acest antigen, poate fi purificat (obținut separat de celelalte componente a virusului) și utilizat pentru generarea anticorpilor monoclonali specifici. Ambele, atât antigenul purificat, cât și anticorpul monoclonal propriu Ag dat pot reacționa între ei formând un complex stabil, care servește ca criteriu de diagnostic.



**ELISA** reprezintă un test serologic care permite identificarea antigenului sau anticorpului necunoscut.

Există 2 variante a tehnicii ELISA

**I. Metoda ELISA directă** care utilizează Ac monoclonali pentru detecția prezenței antigenelor particulare în probele de testare.

În metoda ELISA directă Ac monoclonali sunt absorbiți din start pe suprafața internă a godeurilor microplășetelor.

- ▲ În godeuri se adaugă serul testat.
- ▲ Dacă Ag specific este prezent în serul testat el se va uni complementar cu Ac monoclonali imobilizați pe peretele intern al godeului.
- ▲ Se spală godeurile pentru a fi înlăturate componentele nelegate.
- ▲ Se adaugă o soluție cu anticorpi monoclonali secundari. Acești anticorpi sunt alipiți cu o enzimă. Această enzimă produce colorarea soluției când reacționează cu substratul său specific.
- ▲ Din nou se spală godeurile pentru a fi înlăturate componentele nelegate. Dacă Ag din proba de testare este prezent, atunci pe suprafața godeului se formează un complex din: Ac, imobilizați de godeu – Ag cercetat din proba pacientului - Ac conjugat cu enzimă. Dacă Ag nu este prezent, atunci Ac cuplat cu enzima va fi spălat și înlăturat.
- ▲ Se adaugă substratul specific enzimei. Schimbarea culorii demonstrează unirea Ac marcați cu enzimă de Ag cercetat, indică un **rezultat pozitiv**. Lipsa culorii indică lipsa Antigenului din proba testată - **rezultat negativ**.

**I. Metoda ELISA indirectă**, utilizată pentru detecția anticorpilor necunoscuți din proba de testare.

- ▲ În acest caz, Ag specific este absorbit pe suprafața internă a godeurilor microplășetelor ELISA.
- ▲ În godeuri se adaugă serul testat.
- ▲ Dacă Ac specific este prezent în serul testat el se va uni complementar cu Ag imobilizat pe peretele intern al godeului. Dacă proba va conține anticorpi nespecifici, ei nu se vor uni cu Ag de pe godeuri.
- ▲ Se spală godeurile pentru a fi înlăturate componentele nelegate, anticorpii care nu s-au unit specific cu Ag din godeuri.
- ▲ Dacă Ac s-a unit cu Ag specific, ei pot fi detectați cu ajutorul anticorpilor secundari conjugați cu o enzimă. Acești Ac se vor uni cu imunoglobulinele (de obicei, clasa IgG) din serul testat. Ca Ac secundari se utilizează IgG anti-specie (anti-uman) conjugat cu o enzimă. Această enzimă produce colorarea soluției, când reacționează cu substratul său specific.
- ▲ Din nou se spală godeurile pentru a fi înlăturate componentele nelegate.

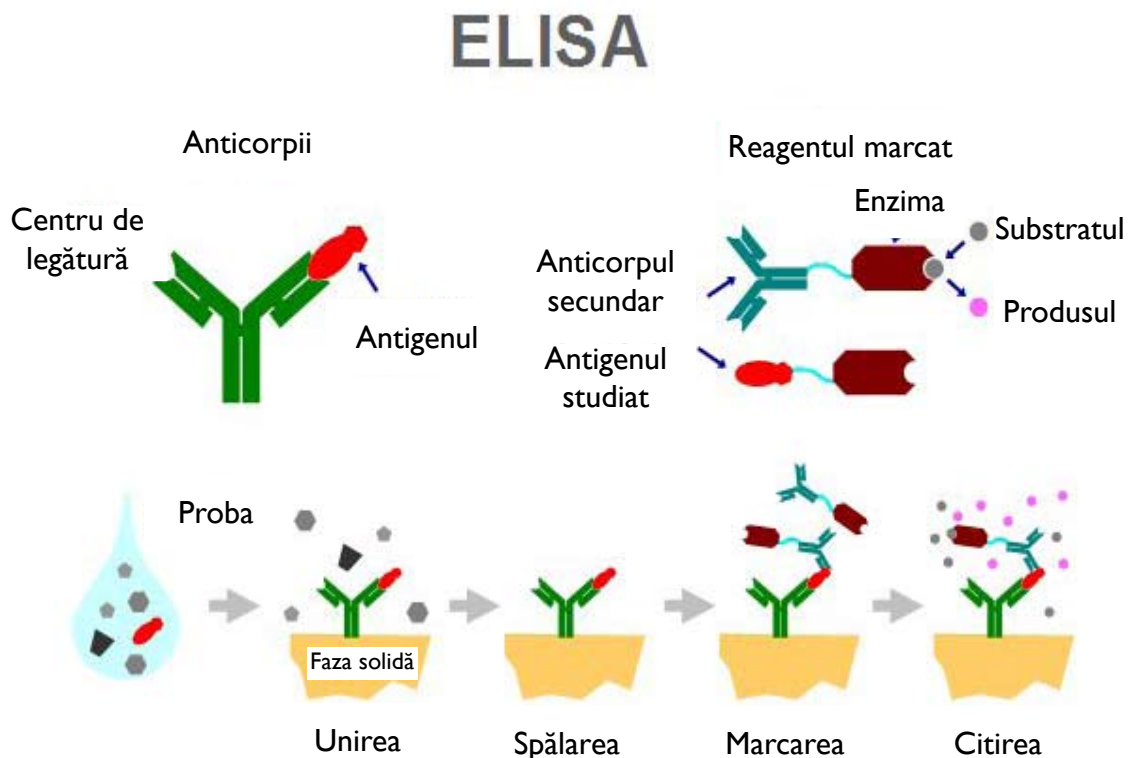
Dacă în proba de testare este prezent Ac, atunci pe suprafața godeului se formează un complex din Ag, imobilizați de godeu – Ac din serul probă – Ac anti-specie conjugați cu o enzimă. Dacă Ac nu este prezent atunci toate componentele necuplate vor fi spălate și înlăturate.

Se adaugă substratul specific enzimei. Schimbarea culorii demonstrează prezența Ac din serul testat, indică un **rezultat pozitiv**. Lipsa culorii indică lipsa Anticorpului în proba testată - **rezultat negativ**.





Figura 25. Etapele tehnicii ELISA



## ECHIPAMENTUL NECESAR

**Cititor ELISA** – cititor automat de plăci ELISA Spectrofotometric multicanal cu filtru de 492 nm.

**Spălător** - Spălător automat de plăci ELISA cu rezervor pentru soluția de spălare și rezervor pentru deșeuri.

**Incubator sau termostat** – orice tip de incubator care poate menține temperatura în limitele 37°C - 39°C.

**Agitator**

**Pipete multicanal** – ajustabile pentru volume mai mici de 50 μl și volume reglabile între 50 și 200 μl.

**Pipete monocanal** – ajustabile pentru volume mai mici de 50 μl și volume reglabile între 50 și 200 μl.

**Distilator de apă (purificator de apă)** – minimum 1 pahar de apă distilată sau deionizată

**Placi ELISA de microtitru cu suprafața plată**

**Hârtie de absorbție**

**Benzi adezive**

**Refrigerator** - orice tip de refrigerator care poate menține temperatura în limitele 2°C - 6°C.

**Congelator** – ce poate menține temperatura de -20°C, preferabil -70°C.

## REACTIVII, REAGENȚI

**Anticorpi monoclonali:** (furnizat sub forma de supernatant de cultură tisulară hybridoma);

**Conjugat:** globulină antispecie (iepure, șoarece), conjugată cu peroxidaza din hrean și păstrată la loc întunecos la +4°C;

**Substrat și cromogen:** 0,2 g de ortofenil diamină (OPD), divizată în alicote de 25 ml sau pastile și păstrate la loc întunecos la temperatura de +4°C,

**ATENȚIE!** A se utiliza OPD cu atenție, a se purta mănuși din cauciuc, produs suspect de a fi mutagen.

**Soluție de stopare a reacției** - acid sulfuric de 1 mol

**Control pozitiv** – supernatant de cultură tisulară infectată cu antigenul respectiv, calibrat



și standardizat. Este inactivată contagiozitatea, dar se vor păstra toate precauțiile de procesarea materialului dat ca presupus material contagios.

**Control negativ** – proba ce nu conține markerul studiat. Este negativ, testat și la alte infecții înalt periculoase (Hepatite virale, HIV, sifilis).

**Buffer de adsorbție** - bufer fosphate saline 0.01 M pH 7.4 (PBS).

**Buffer de blocare** - PBS suplimentat cu 0.05% Tween-20.

**Soluție de spălare** -PBS diluat 1/5 în apă distilată suplimentată cu 0.05% Tween-20.

Notă! *Sunt prezentate doar câteva variante de reactivi, ei pot varia în dependență de producător.*

### Prepararea reagenților

**Reagenții ce necesită păstrare la îngheț** vor fi resuspendați (dizolvați) în 1 ml de apă distilată sau deionizată și păstrați la  $-20^{\circ}\text{C}$  până la utilizare.

**Substratul și cromogenul.** Orthophenylene diamine (OPD) este dispus în pastile. Resuspendați pastilele de OPD tablete în 75 ml de apă distilată, astfel obțineți soluția de OPD. Soluția OPD neutilizată poate fi păstrată la  $-20^{\circ}\text{C}$  până la 1 lună.

**Acid Sulfuric.** Pentru prepararea 1 M de acid sulfuric, atent adăugați 55 ml de acid la 945 ml de apă distilată. Notă: Tot timpul adăugați acid în apă și nu invers.

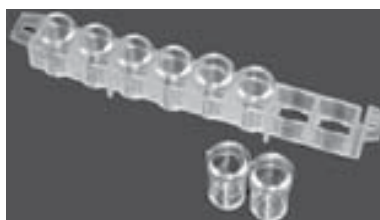
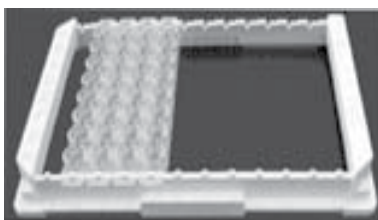
### Tipul planșetelor pentru ELISA

Pentru montarea ELISA în fază solidă în majoritatea truselor comerciale se utilizează planșete de polysterene sau derivați de polysterene obținuți prin modificări chimice sau prin iradierea suprafeței. Configurația expusă de producători cel mai des sunt planșete cu 96 godeuri, organizate /divizate în 8 bare/strip-uri separate a câte 12 godeuri fiecare. Aceasta permite ca să fie utilizate în dependență de necesități: fie planșeta integră, fie strip-uri separate. Fiecare godeu are un volum de aproape 350  $\mu\text{l}$  și o suprafață internă de cca 2,5  $\text{cm}^2$ . Recent, au început a se produce planșete a câte 384 și 1536 godeuri, cu dimensiuni și volume identice, ca și planșetele cu 96 de godeuri, utilizate într-un număr mare de analize concomitent. Alte modificări recente: planșete cu 96 godeuri cu  $\frac{1}{2}$  din volumul tradițional; planșete cu godeuri, fundul godeului fiind în unghi de 90 grade, pentru o spălare a godeurilor mai eficientă.

**Condițiile principale** pentru utilizarea lor sunt:

- ▲ rezistența planșetelor la diverși solvenți, utilizați în reacție;
- ▲ prezența unui volum înalt specific, adică posibilitatea de sorbție la suprafața godeurilor de polysterene a Ag și Ac în cantități suficiente pentru montarea reacției corelată cu sorbția minimă nespecifică a altor proteine din materialul examinat și din conjugat.

**Figura 26.** Planșete utilizate la montarea reacției ELISA



**Planșetele din polysterene sunt conductori de temperatură foarte slabi. Asigurați-vă că planșetele și toți reagenții au aceeași temperatură, preferabil temperatura camerei.**

### Adsorbția

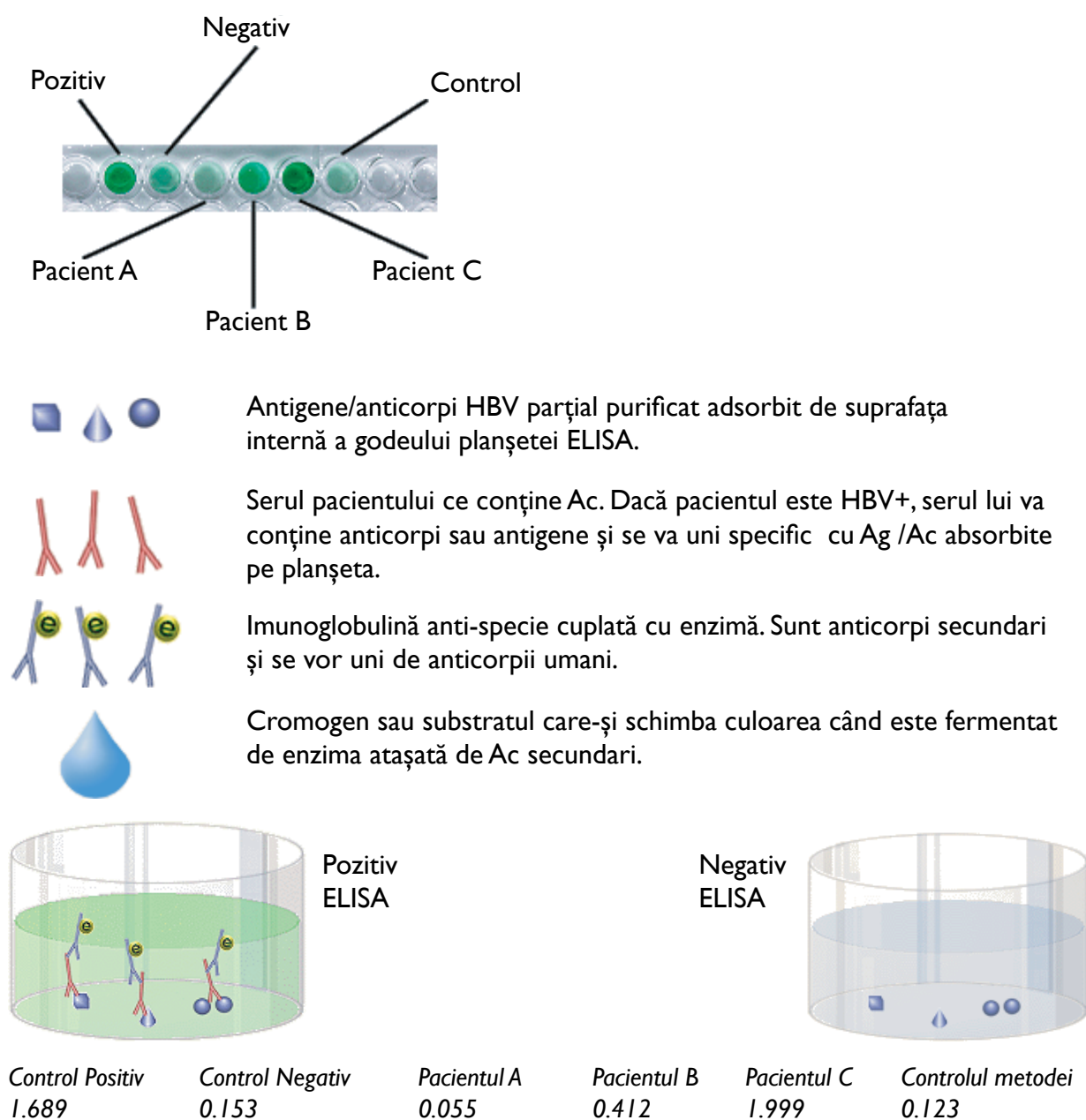
Polysteren-ul are capacitatea de adsorbi pe suprafața sa diverse tipuri de particule, substanțe, adsorbția fiind în dependență de concentrația substanței din soluția supusă adsorbției. Adsorbția are loc pe contul interacțiunilor hidrofobice, forțelor van der Waals, legăturilor ionice și legăturilor hidrogenice prin care



particulele se alipesc de suprafața solidă a polysterene-ului. Pentru marcarea fermentativă a Ag și Ac se pot utiliza diferite tipuri **de fermenți**: peroxidaza de hrean, fosfataza alcalină, beta-galactozidaza, ș.a. De fapt, practic în toate test sistemele se utilizează peroxidaza de hrean, alegerea ei este dictată de activitatea catalitică foarte înaltă, disponibilitate, stabilitate și ușurința detecției. În calitate de reagenți pentru **substrat** se utilizează orto-fenilendiamin (OFD) cu peroxid de hidrogen, produsele de oxidare ale cărora se citesc și se înregistrează instrumental prin citire fotometrică. Pentru **stoparea reacției** de fermentare se utilizează „stop-reagenți”, care se introduc, atât în probele testate, cât și probele control în cantități egale. Cel mai des se utilizează acidul sulfuric. **Citirea** se efectuează spectrofotometric la lungimea de undă 490 nm.

## INTERPRETAREA REZULTATELOR

**Figura 27.** Interpretarea rezultatelor metodei ELISA.



*Exemplu:* Orice probă care are valoarea DO mai mare ca proba control pozitivă standard este considerată pozitivă Valoarea DO este citită la 450 nm. Valorile pozitive certe vor fi repetate suplimentar sau confirmate prin alte metode de diagnostic de laborator.



## 4.2. DIAGNOSTICUL MOLECULAR BIOLOGIC AL HEPATITELOR

### REAȚIA DE POLIMERIZARE ÎN LANȚ

Depistarea și izolarea agentului patogen în bolile infecțioase este una din problemele de bază a microbiologiei medicale contemporane. Folosind investigațiile microbiologice se creează situații, când metodele tradiționale culturale și de asemeni metodele contemporane imunochimice nu sunt suficiente, ceea ce impune implementarea metodelor noi de identificare și izolare a agentului patogen.

În ultimul timp are loc dezvoltarea intensă a metodelor genetice de diagnostic a bolilor infecțioase, bazate pe depistarea consecutivității nucleotidice specifice a agentului infecțios.

Lider printre aceste metode este reacția de polimerizare în lanț (PCR) și modificările ei. Ea face posibil în mare măsură mărirea eficacității depistării agentului patogen, majorând posibilitățile diagnosticului de laborator și stabilirea diagnozei clinice corecte.

Reacția de polimerizare în lanț, adică sinteza moleculelor noi de ADN cu ajutorul enzimei ADN-polimeraza în celulă a fost descoperită mai mult de 30 de ani în urmă de A. Kronberg, care împreună cu alt laureat al premiului Nobel D. Lederberg a presupus că cineva va putea primi cantități mari de ADN cu ajutorul acestei reacții. Această idee a fost realizată peste 20 de ani de K. Miulis, laureat al premiului Nobel în chimie anul 1993. K. Miulis, bazându-se pe procesul natural de replicare a ADN-ului, a elaborat metoda datorită cărei putem primi copii ale genelor în cantități mari în eprubetă. A numit această metodă - **reacția de polimerizare în lanț**. Ea a devenit una dintre cele mai comode și desăvârșite metode de diagnosticare a ADN-ului, ARN-ului microorganismelor.

#### Caracteristicile principale a metodei PCR:

- ▲ sensibilitate înaltă
- ▲ specificitate înaltă
- ▲ metodă directă de determinare a agentului patogen

#### Principiul metodei:

PCR este modelul „*in vitro*” al replicării ADN-ului în celulă, repetă destul de exact principiile replicării naturale a ADN-ului în celula vie.

La baza acestei metode este procesul care constă din mai multe cicluri, ce amintește replicarea naturală a acizilor nucleici, totodată fiecare ciclu constă din câteva etape succesive, are loc multiplicarea artificială a ADN-ului microorganismului prezent în proba testată.

#### Etapele reacției de polimerizare în lanț

##### I. Extragerea ADN-ului/ARN-ului

La această etapă se extrage ADN-ul sau ARN-ul din materialul biologic testat. În final primim soluție de ADN/ARN purificat. Putem folosi metoda manuală, semiautomată sau automată de extragere.

##### II. Amplificarea

Este un proces ciclic în care are loc clonarea (multiplicarea) unui fragment de ADN testat ce face posibil identificarea lui de mai departe. Fiecare ciclu, la rândul său, constă din câteva etape:

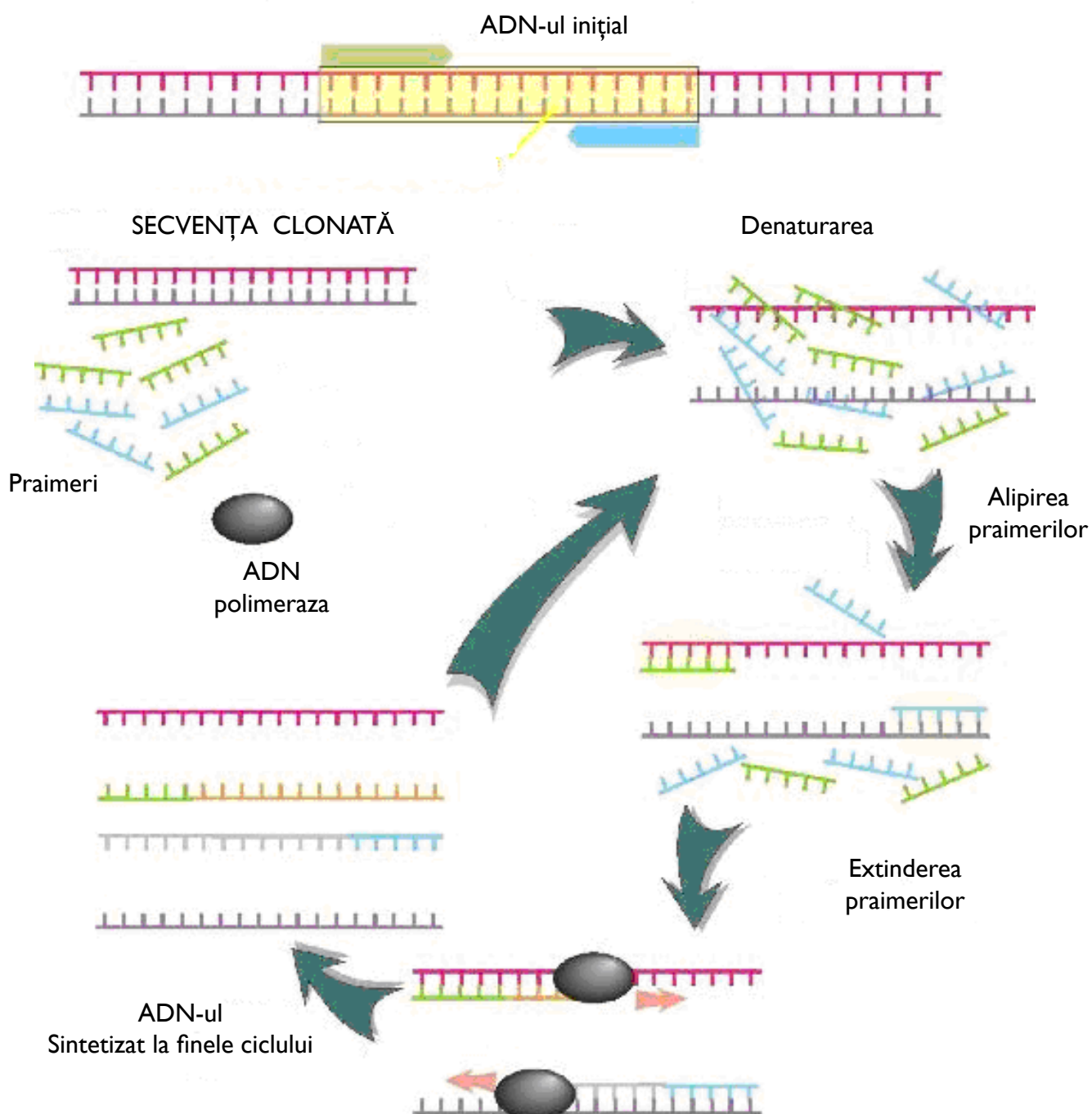
- ▲ Denaturarea ADN-ului la temperatură înaltă.
- ▲ Alipirea la lanțurile unicateenare de ADN a așa numitor primeri – oligonucleotide complementare succesivității nucleotidice cunoscute a ADN-ului testat.
- ▲ Sinteza fragmentelor noi de ADN cu ajutorul fermentului ADN-polimeraza. (fig.28).

În cadrul unui ciclu din o catenă de ADN se sintetizează două catene, complementare ADN-ului testat. Repetarea ciclurilor reacției de mai multe ori (numărul de cicluri poate fi programat) duce la acumularea fragmentelor de ADN (fig.29).



III. Detecția fragmentelor acumulate pot fi detectate prin diferite metode: electroforeză, tehnici ELISA, fluorometrie etc.

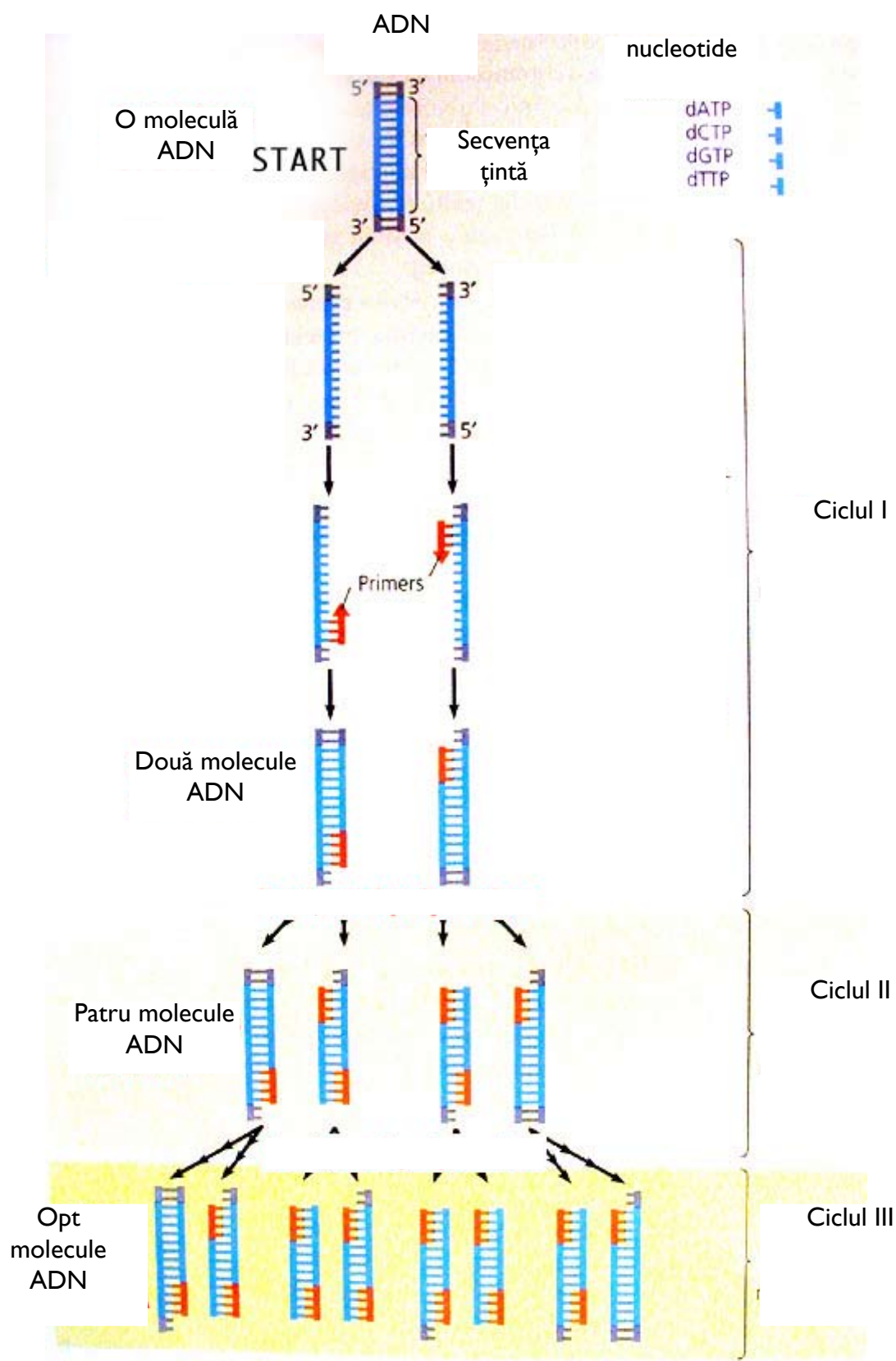
**Figura 28.** Strategia PCR



Sursa: [webpage http://www2.mtroyal.ab.ca/~tnickle/3311/supplement/PCR\\_and\\_sequencing.html](http://www2.mtroyal.ab.ca/~tnickle/3311/supplement/PCR_and_sequencing.html)



**Figura 29.** Acumularea fragmentelor de ADN



Sursa: webpage <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/genetic-engin/pcr.html>



## Rezumat

PCR – metodă în trei etape (denaturarea ADN-ului, alipirea praimerilor la catenele de ADN, sintetiza moleculelor noi de ADN), poate fi repetat de mai multe ori. Acest proces PCR se numește amplificare, deoarece are loc copierea succesivității nucleotidice inițiale și apoi fiecare copie, la rândul său, se multiplică din nou, până când numărul lor atinge milioane. Fiecare catenă nouă de ADN servește ca matrice pentru sinteza fermentativă (cu ajutorul fermentului ADN-polimeraza) a catenelor noi în ciclul următor.

Teoretic, fiecare ciclu dublează numărul de copii ADN; în primul ciclu se sintetizează două catene din una, apoi patru, apoi opt etc., are loc creșterea exponențială a cantității de copii. PCR permite obținerea cantității suficiente de ADN pentru identificarea lui de mai departe.

În dependență de tehnica de executare și de modul de detecție a ADN-ului diferențiem mai multe modificări PCR:

1. **Reacția de polimerizare în lanț calitativă** – prin această metodă se determină prezența sau absența ADN-ului, ARN-ului în probă.

Proba se compară cu setul de controale pozitive și negative. Se consideră pozitive acele probe care au migrat la electroforeză (în cazul identificării prin electroforeză) la fel ca și controlul pozitiv.

2. **Reacția de polimerizare în lanț cantitativă** – permite determinarea concentrației ADN-ului, ARN-ului (încărcătura virală).

Determinarea concentrației ADN/ARN în hepatitele virale, la momentul actual, este un test obligator la inițierea tratamentului antiviral. Acest test permite:

- ▲ stabilirea gravității bolii
- ▲ aprecierea pronosticului bolii
- ▲ monitorizarea eficacității tratamentului, cu posibilitatea schimbării preparatelor medicale în cazul răspunsului neadecvat la tratament.

Calculul încărcăturii virale se efectuează automat, la compararea cu setul de standarde cu diferite concentrații cunoscute.

**PCR cantitativ în regim Real time** – este una dintre variantele de perspectivă înaltă a metodei cantitative de determinare a agentului patogen. În reacție se folosesc sonde speciale (praimer), marcate cu coloranți fluorescenți. Alipirea sondelor la catenele de ADN produce un semnal fluorescent care este detectat de canalul de citire și transmis pe calculator. O particularitate deosebită a PCR Real time este posibilitatea de a primi informația despre cantitatea ADN-ului în proba testată nemijlocit în timpul reacției. Calculul rezultatelor se efectuează automat, comparând semnalul fluorescent produs de proba testată cu curba de calibrare construită după semnalele fluorescente primite de la setul de standarde, prezente în trusele de detecție, cu concentrații diferite, cunoscute.

### NECESITATEA TESTĂRII:

1. Soluționarea rezultatelor suspecte la testarea serologică.
2. Diagnosticul diferențial al hepatitelor virale.
3. Identificarea perioadelor acute a bolii, în comparație cu infecția suportată
4. Identificarea agentului patogen în perioada de incubare a bolii, până la apariția antigenelor și anticorpilor specifici, la persoanele cu risc major de infectare, persoanelor care au fost în contact cu bolnavii.
5. Monitorizarea eficacității tratamentului antiviral.
6. Se consideră criteriu de finalitate posibilă și credibilă a terapiei.

**Tabelul 23.** Avantajele PCR în comparație cu alte metode de diagnostic

Parametrii	Caracteristica
Sensibilitate înaltă	Metoda este bazată pe principiul exponențial de acumulare a produsului amplificat, pentru identificare este suficientă prezența în proba testată a unui singur virus.
Specificitate înaltă	Bazată pe identificarea secvențelor de material genetic unic pentru microorganism, ce determină particularitățile de clasă, toxicitate și alte particularități specifice ale agentului patogen.
Timp scurt de efectuare	2-6 ore de la începutul examinării.
Procedură universală de executare	Procedura de efectuare a reacției este standard practic pentru toți agenții patogeni.
Materialul biologic	Agentul patogen poate fi identificat în orice lichid biologic al organismului uman și de asemeni în materialele primite în urma biopsiei. Nu este necesară creșterea culturii pe medii, sau izolarea culturii curate de agent patogen.
Diagnosticul diferitor procese patologice	Este posibil diagnosticul formelor acute, cronice, trenante, forme seronegative.
Diagnosticul oricărui tip de microorganism	Identificarea microorganismelor ce pot fi cultivate, microorganisme ce nu pot fi cultivate, forme persistente.
Perioada bolii	Este posibil identificarea agentului patogen nu numai în perioada de stare sau cronică, dar și în perioada de incubare a bolii – „fereastra imunologică”, perioada dintre momentul infectării și apariția anticorpilor sau antigenelor specifice (depistarea ADN-ului,ARN-ului după o săptămână sau două de la momentul infectării).
Cantitatea agentului patogen în proba testată	Este suficientă prezența unui singur microorganism în materialul testat.
Metoda	Este metodă directă de identificare a agentului patogen, bazată pe modalitatea universală de păstrare și transmitere a informației genetice la materia vie.

Importanță majoră în asigurarea calității PCR prezintă colectarea corectă a materialului biologic și pregătirea materialului biologic.

Reguli generale de recoltare și transportare a materialului biologic pentru investigațiile PCR

- ▲ Recoltarea probelor se efectuează cu instrumentar steril, de unică folosință, în eprubete, containere etc.
- ▲ Imediat după recoltarea probelor, eprubetele cu materialul biologic se închid, fără să fie atinsă partea internă a capacului cu mâinile.
- ▲ La transferarea materialului biologic din eprubete, containere se folosesc vîrfuri cu bară de unică folosință.
- ▲ Probele se păstrează în frigider, congelator. Nu se permite congelarea repetată a probelor.
- ▲ Eprubetele, containerele trebuie să fie etichetate.
- ▲ Transportarea materialului biologic se efectuează în termocontainere cu elemente de răcire sau în termos cu gheață, închise etanș, impermeabile pentru lichide și etichetate corespunzător conținutului. Containerelor trebuie să fie rezistente la dezinfectanți, autoclavabile. Trebuie să fie decontaminate după fiecare utilizare.
- ▲ Toate materialele care au fost în contact cu proba se vor evacua în containere pentru deșeuri medicale, ce urmează să fie autoclavate.





## CONTROLUL CALITĂȚII TEHNICII PCR

Controlul intern al calității în reacția de polimerizare în lanț este asigurat, în primul rând, de utilizarea pentru fiecare probă în parte a controlului intern – preparat de ARN sau ARN sintetizat artificial, cu aceleași unități structurale recunoscute de praimerii ca și ADN-ul sau ARN-ul microorganismului, dar care se deosebește după lungimea părții de amplificare, temperatura de topire, consecutivitatea nucleotidică. Controlul intern parcurge toate etapele reacției de polimerizare în lanț împreună cu proba testată.

Controlul intern este elementul obligator al etapei de prelucrare a materialului biologic (izolarea ADN-ului, ARN-ului). El face posibil controlul asupra :

- ▲ eficacității izolării ADN-ului, ARN-ului din proba biologică testată
- ▲ eficacității înlăturării inhibitorilor reacției de polimerizare în lanț
- ▲ controlul calității lucrului personalului

Numai folosirea controlului intern în această reacție permite monitorizarea izolării calitative a ADN-ului, ARN-ului agentului patogen din proba testată.

Controlul calității este asigurat și de utilizarea serurilor de control pozitive și negative, folosite pentru fiecare etapă a reacției, prezente în trusele PCR și de asemenea de utilizarea panourilor standarde, elaborate de firmele producătoare de truse de diagnostic.

## METODA HIBRIDIZĂRII

Metoda hibridizării in situ – metodă directă de identificare a acizilor nucleici în structurile celulare, ce permite în același timp studierea morfologiei lor.

Această metodă a fost elaborată în anul 1969 de Pardiu și Goll, și independent de Djons.

Metoda este bazată pe legarea sondelor marcate de hibridizare (structuri moleculare genoingerice sau sintetice, care sunt formate din consecutivități de nucleotide complementare fragmentelor de ADN sau ARN).

### Principiul:

Sondele de hibridizare marcate cu radioizotopi sau marcheri neradioactivi se leagă specific cu ADN-ul sau ARN-ul din proba testată.

Calculul rezultatelor se efectuează după intensitatea semnalului emanat de marcherul sondei de hibridizare din complexul format.

Astăzi, metodele de hibridizare completează cu succes metodele de rutină de diagnostic, permițând identificarea diferitor microorganisme în culturi celulare și țesuturi.

**Figura 30.** Echipament pentru detecția moleculară





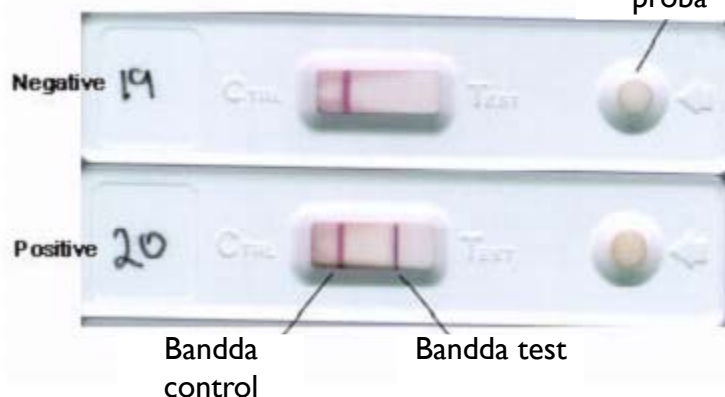
### 4.3. METODE DE TESTARE RAPIDĂ

(Metode expres, metode imunocromatografice)

#### 1. ADVANCED QUALITY™ One Step HBsAg Test (Bionike Inc.)

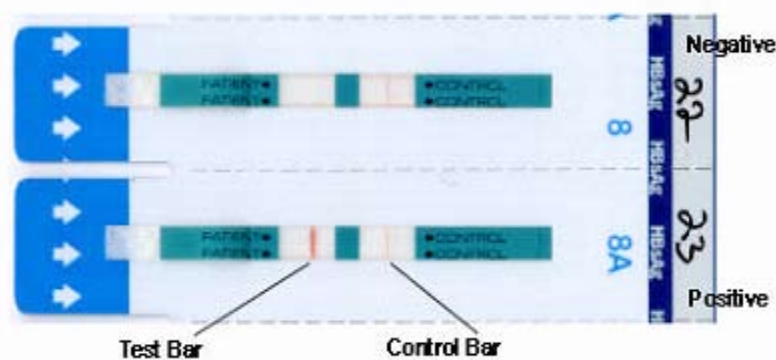
- ▲ Metodă imunocromatografică pentru determinarea Ag HBs din ser într-o singură etapă. Metodă calitativă.

Godeu pentru probă



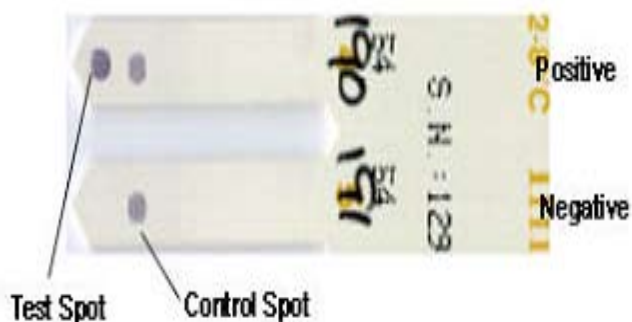
#### 2. Determine™ HBsAg (Abbott Laboratories)

- ▲ Metodă calitativă de determinare a Ag HBs in serul, plasma și sângele integrău.



#### 3. ImmunoComb® II 90' (Orgenics)

- ▲ Metodă calitativă, 1 singură etapă, pentru detecția Ag HBs în ser și plasma.



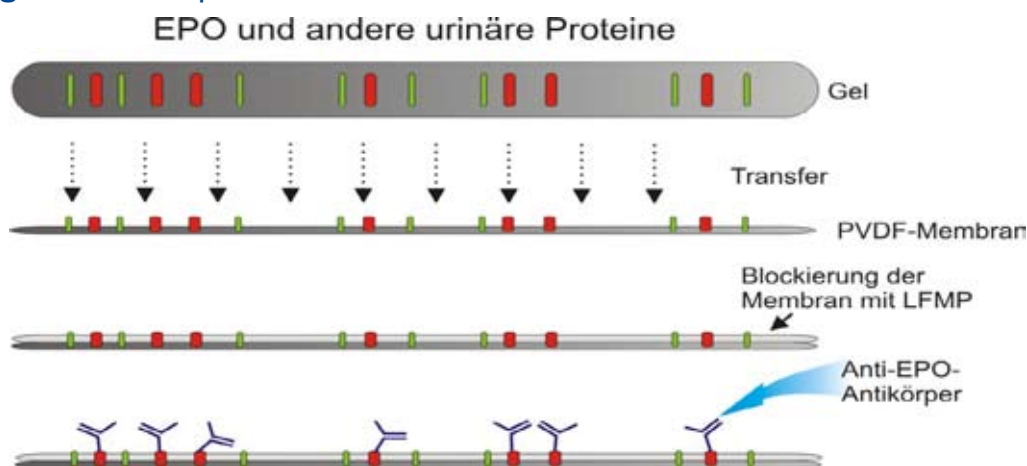
## 4.4. TESTE DE CONFIRMARE

### TESTUL WESTERN BLOT

Testul Western Blot determină mai mulți anticorpi din sânge care s-au format contra anumitor componente proteice a virusului Hepatitelor virale. Testul Western-Blot este mai complicat și mai scump decât testul ELISA, acestea fiind unele din motivele pentru care este aplicat doar ca o confirmare a unui test pozitiv ELISA, efectuat anterior.

- 1) Proteinele sunt separate electroforetic în gel poliacrilamid. Sub acțiunea câmpului electric are loc difuzia proteinelor conform greutatei moleculare a proteinelor, aranjându-se în zone liniare subțiri. Ele se repartizează în modul următor: mai aproape de start se aranjează proteinele cu masă moleculară mare (120-150 kDa), la final se aranjează proteinele cu masă moleculară mică (5-10kDa).
- 2) Apoi lamela de gel este transferată pe o foaie de nitroceluloză amplasată între electrozii unei surse de curent continuu. Sub acțiunea câmpului electric are loc trecerea proteinelor din gel pe nitroceluloză, unde se fixează foarte bine pe hârtie. Proteinele fixate sunt marcate cu o enzimă (e.g. alkaline phosphatase sau peroxidase) incoloră. Apoi hartia se taie în fâșii scurte care vor conține toate fracțiile proteice. Procedura ulterioară de montare a reacției este similară tehnicii ELISA.

**Figura 31.** Principiul metodei Western Blots



**RIBA-HCV** – metoda recombinantă de imunoblot, produsă de firma “Ortho Diagnostic Systems” și menită pentru confirmarea rezultatelor pozitive la detecția anticorpilor VHC. Pe măsura acumulării informației privind hepatita C au fost elaborate și produse 3 variante de teste: RIBA-VHC I generație (2 proteine recombinante: c100-3 și 5-1-1), II generație (4 proteine recombinante: 5-1-1; c100-3; c33c și c22) și a III generație la care suplimentar au fost adăugate proteinele, codificate în zona virusului ARNVHC - NS 5. Proteinele recombinante sunt plasate pe membrana de nitroceluloză sub formă de striuri.

**Schema generală a reacției:** incubarea materialului examinat cu striul de nitroceluloză (are loc interacțiunea dintre Ac cercetați cu proteinele recombinante de pe membrana de nitroceluloză); incubarea cu conjugat – anticorpi contra IgG uman, marcat cu peroxidaza de hrean; incubarea cu soluția de substrat. Citirea rezultatului se face vizual. La apariția benzilor colorate identice locului adsorbției proteinelor recombinante testul se consideră pozitiv.

**TEST DE CONFIRMARE AgHBs (Confirmatory test)** Testul de confirmare se utilizează pentru confirmarea AgHBs, decelat prin metoda ELISA, RIA. Principiul constă în neutralizarea AgHBs din proba testată cu ser anti HBs, după care AgHBs își pierde capacitatea de a fi detectat prin metodele imunofermenative sau RIA.

**Schema generală a reacției:** testarea serului ce conține AgHBs se face paralel în 2 eprubete: în I se adaugă serul bolnavului cu ser ce conține anti-HBs, în a II-doar materialul de cercetat, fără anti-HBs. După incubare și detecția AgHBs conform instrucțiunii din trusele comerciale, se analizează rezultatele obținute. Dacă valoarea reacției din proba în care au fost adăugați anticorpi anti-HBs este de 50% mai mică decât valoarea probei nr. 2, această probă se determină ca pozitivă.



## 4.5. METODE DE DIAGNOSTIC CLASICE

### REAȚIA DE IMUNOFLOURESCENȚĂ (RIF)

În 1979 Curry R.E, Heizmann H și colaboratorii (Clinical Chem, 1979, 25/9, 1591), propun o altă alternativă neizotopică a metodei RIA și anume **imunofluorescență**. Aceasta a fost printre primele metode care au utilizat markeri luminoși pentru marcarea anticorpilor sau a liganzilor în sistemul de dozare.

#### Fluorocromii:

- ▲ se leagă covalent de proteine (imunoglobuline) = conjugat
- ▲ emit fluorescență dacă se expun la raze UV
- ▲ izotiocianatul de fluoresceină (galben-verzui), rodamină (portocalie)
- ▲ nu sunt stabili în timp

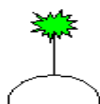
#### I.1 Metoda directă

Preparatul de examinat se montează pe lamă. Se adaugă conjugatele. În cazul în care se găsesc Ag corespunzătoare anticorpilor marcați, se formează complexe imune. Prin spălare se îndepărtează conjugatele nelegate. Preparatul se examinează la microscopul cu fluorescență. Puncte fluorescente pe fond întunecat: în preparatul examinat au fost prezente antigenele căutate (**rezultat pozitiv**).

- Absența punctelor fluorescente: în preparat nu au fost prezente antigenele căutate (**rezultat negativ**).



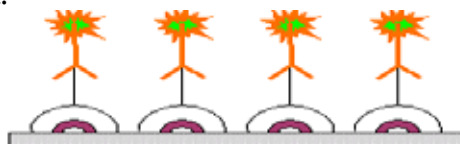
antigen din preparatul montat pe lamă (preparat histologic sau suspensie de pe culturi de celule infectate)



anticorp marcat cu fluorocrom

#### I.2 Metoda indirectă

La preparatul montat și fixat pe lamă se adaugă anticorpi specifici nemarcați. În cazul în care există Ag corespunzătoare anticorpilor, se formează complexe imune. Prin spălare se îndepărtează Ac nelegați. Se adaugă anticorpi antioglobulinici marcați cu fluorocrom. Dacă există în preparat complexe imune, conjugatele se vor lega de imunoglobuline. **Examinarea:** identic ca și metoda directă.



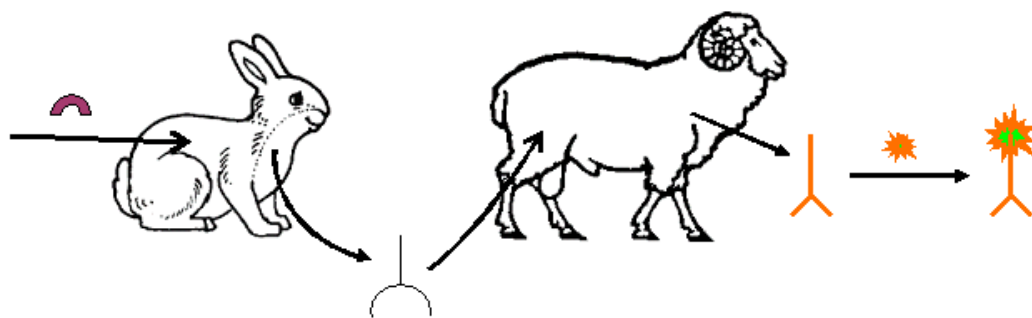
anticorp antioglobulină marcat cu fluorocrom



anticorp specific antigenului căutat în preparat



### Obținerea anticorpilor antiglobulină



**MICROSCOPIA IMUNOELECTRONICĂ (Immune electron microscopy)** Reprezintă metoda de vizualizare propriu-zisă a interacțiunii dintre Ag-Ac. A fost propusă pentru prima dată de J. Almeida și A. Wotwerson în 1969. Etapele

1. Materialul patologic în care se presupune prezența virusului căutat se amestecă și se incubează cu serul imun standardizat.
2. Complexul Ag-Ac se precipită/sedimentează prin centrifugare.
3. La sedimentul obținut se adaugă substanța de contrast și preparatul se studiază la microscopul electronic.

**Test pozitiv** – vizualizarea agregatelor caracteristice formate din particule virale unite între ele prin punți de anticorpi. Sensibilitatea metodei date nu este prea înaltă. Decelarea virusului din preparatul studiat se face în cazul concentrației virale din materialul patologic nativ de  $10^4$ —  $10^6$  particule virale /ml. **Avantaje** – se poate vizualiza forma, dimensiunile, configurația. Această metodă a fost utilizată în primele etape de studiere a virusurilor hepatice în scop de diagnostic și științific. Prin metoda dată a fost identificat VHA și VHE. După apariția metodelor noi care permit investigarea unui număr mare de pacienți această metodă și-a pierdut din utilitatea practică, fiind utilizată în continuare doar în cercetări științifice cu studierea morfostructurii antigenelor.

**CONTRAIMUNOELECTROFOREZA (Counter immunoelectrophoresis)** – metoda de identificare a Ag și Ac, bazată pe formarea precipitatului vizibil în gel agar la locul de întâlnire și legare a Ag și Ac specifici, care difundează în gel unul față de altul sub acțiunea câmpului electric. Metoda dată are multiple modificări, fiind diferite după timpul de executare a electroforezei, a soluțiilor bufer, intensitatea câmpului electric, etc. La sfârșitul anilor 60-70 contraimmunoelectroforeza era o metodă foarte utilizată în detecția HBsAg. După sensibilitate metoda dată întrece reacția de precipitare în gel de 2-4 ori. Rezultatele reacției se pot citi după 1,5-2 ore de la începutul electroforezei. La moment are o utilizare limitată.

**REAȚIA DE HEMAGLUTINARE INDIRECTĂ (Indirect hemagglutination test)** – metoda detecției Ag sau Ac, bazată pe proprietatea eritrocitelor la suprafața cărora sunt prealabil absorbite Ag sau Ac să se aglutineze în prezența serurilor omologe sau antigenelor respective. La identificarea Ag reacția se numește *reacția de hemaglutinare pasivă indirectă RPHAI* (reversed passive hemagglutination test). RPHAI a fost larg utilizată pentru identificarea marcherilor serologici a hepatitei B, în special al Ag HBs. La moment, sunt diferite metode de obținere a diagnosticurilor eritrocitare, ce se pot deosebi, atât după metoda de sensibilizare (cu ajutorul taninei, aldehidei de glutarat, rivanolului), după apartenența de specie (eritrocite de om, berbec, curcan, ș.a.), după varianta de montare a reacției (microplanșete, macroplanșete, eprubete, ș.a.) cât și după citirea rezultatului (vizual sau instrumental). Se comercializează diagnosticuri eritrocitare, atât pentru detecția AgHBs, cât și a anti HBs. **Avantaje** – costuri mici pentru aparatură și teste, simplitate în executare, rapiditate. Sensibilitate mai mare față de testele RFC,



RPG de 200-400 ori. Prin metoda dată se poate determina AgHBs în concentrații de 6-10 ng/ml. **Dezavantaje** - sensibilitate mult mai mică ca ELISA. Necesită metode de confirmare. La moment utilizare limitată.

**RIA – REACȚIA RADIOIMUNOENZIMATICĂ (Radioimmunoassay)** – metoda de detecție a Ag și Ac, bazată pe determinarea complexului Ag-Ac în baza introducerii la unul din componente a marcăului prin izotop radioactiv și detecția ei ulterioară în aparate speciale.

#### Rezumat

Primele aplicații ale radioizotopilor sunt legate de principalele etape în istoria descoperirii izotopilor iodului, a cercetării metabolismului lui și folosirii radioiodului în scop diagnostic și terapeutic. Metoda a fost pusă la punct în a. 1960.

În 1959 R. Yalow și S. Berson au efectuat cercetări pentru introducerea unei metode directe de imunoanaliză. Ei au preparat un ser anti-insulină pe care l-au incubat cu insulina marcată cu  $^{131}\text{I}$  și insulina nemarcată obținută de la cobai și au pus acest complex să migreze cromatografic, urmărind curba “doza-efect”. Această lucrare și experimentele celor doi au pus bazele radio-imunoanalizei (RIA).

Metodele RIA au fost precursorii metodelor ELISA, Chemiluminiscența, imunofluorescente, etc., care astăzi sunt larg utilizate.

Până la 1975, sistemele RIA, utilizau anticorpi policlonali, de bună calitate, dar cu o specificitate nu foarte mare. În 1975, Kohler și Milstein (Nature, 1975, 256, 495) obțin *in vitro* anticorpi monoclonali formați dintr-o populație moleculară omogenă având o monospecificitate pentru un epitop determinat. Ei pot fi obținuți într-o manieră aproape nelimitată ceea ce dă o reproductibilitate mare în timpul dozărilor imunologice. Producerea de anticorpi monoclonali a determinat:

- ▲ creșterea specificității și sensibilității sistemelor RIA.
- ▲ apariția unor noi tehnici imunometrice neizotopice de tip “sandwich” care astăzi sunt foarte mult utilizate.

**Tabelul 24. Avantajele metodei RIA**

Metoda	Marcher	Avantaje	Dezavantaje
<b>RIA:</b> competiție între Ag ce se studiază și Ag marcat pentru legare la același Ac specific.	<b>Izotopi radioactivi</b> $^{125}\text{I}$ $^{131}\text{H}^3$	<b>Sensibilitate: mare</b> <b>Specificitate: mare</b> <b>Preț: mic/mediu</b> <b>Sistem: deschis</b>	<i>Timp de viață: scurt</i> <i>Produx: radioactiv</i> <i>Deșeuri: radioactive</i> <i>Costuri analizor (gamma counter): mare</i> <i>Condiții de lucru: speciale, autorizate</i>

**REAȚIA DE PRECIPITARE ÎN GEL, RPG (Gel precipitation test)** — metoda detecției Ag și Ac bazată pe principiul difuziei componentelor date în stratul de gel agar cu formarea liniilor specifice vizibile de precipitare în sectoarele unde interacționează și se obține o concentrație echivalentă de componente. Cel mai des se utilizează metoda de difuziune după O. Ouchterlony în 1948, după care Ag și Ac se pun în godeuri unul față de altul făcute în stratul de gel, după o perioadă în grosimea pe gel se formează niște linii de precipitare corespunzătoare numărului de Ag și Ac specifici. Metoda a fost larg utilizată pentru detecția AgHBs în anii 60-70. Prin această metodă s-a decelat pentru prima dată prezența AgHBe.



## 5. CONTROLUL CALITĂȚII ÎN LABORATOARELE MEDICALE

„Laboratorul trebuie să elaboreze un sistem de control intern al calității care să verifice îndeplinirea performanțelor de calitate a rezultatelor. Sistemul de control trebuie să ofere colectivului laboratorului informații clare și ușor de înțeles pe care să-și poată baza deciziile tehnice și medicale” (ISO 15189)

Controlul Intern de Calitate cuprinde tehnici și activități operaționale din cadrul unui laborator care sunt folosite pentru a îndeplini cerințele calității.

### **Scopul controlului intern de calitate:**

1. Rezultatele măsurărilor sunt suficient de sigure pentru a fi eliberate.
2. Permite eliminarea neconformităților care apar la anumite etape ale managementului calității.

**CALITATE** (Uniunea Europeană) referită către serviciile furnizate de laboratoarele medicale este:

- ▲ indicarea corectă și oportună a unui sau mai multor teste;
- ▲ executarea testelor într-o sistemă analitică sigură;
- ▲ eficiența informației de laborator prin interpretarea și aplicarea adecvată

## ASIGURAREA CONTROLULUI INTERN DE CALITATE

### **Etapele procesului de cercetare:**

I. Etapa pre-analitică – 57,3%

- ▲ extralaborator – 20,2%
- ▲ intralaborator – 37,1%

II. Etapa analitică – 25,1%

III. Etapa post-analitică – 17,3%

- ▲ intralaborator – 13,6%
- ▲ extralaborator – 3,7%

## I. ETAPA PRE-ANALITICĂ

În asigurarea calității la etapa pre-analitică vor servi realizarea unor măsuri bazate pe conlucrări între serviciile clinico-sanitare și laboratoarele medicale.

1. Respectarea regulamentelor de obținere și îndreptare a materialelor biologice pentru investigare.
2. Asigurarea condițiilor standardizate de colectare, păstrare și transportate a biomaterialelor pentru prevenirea contaminării sau degradării acestora.

Măsuri de asigurare a calității la etapa pre-analitică:

1. Elaborarea algoritmului de testare
2. Respectarea condițiilor de recoltare a biomaterialelor pentru investigare.
3. Asigurarea calității completării documentației de înregistrare:
  - ▲ completarea formularelor de îndreptare la investigații
  - ▲ elaborarea registrelor de evidență a biomaterialelor expediate
  - ▲ elaborarea formelor de marcare a recipientelor
4. Respectarea condițiilor de păstrare și transportare.
5. Elaborarea criteriilor de acceptare a probelor pentru testare.





**Condiții de recoltare:**

- ▲ starea fizică a pacientului
- ▲ timpul de recoltare
- ▲ recipientele: tuburi de plastic sau sticlă, prezența aditivilor
- ▲ instrumentar pentru recoltare – sisteme de unică folosință

**Standardizarea condițiilor de recoltare a probelor biologice primare:**

- ▲ O perioadă standard de post de 12 ore (min-4 ore);
- ▲ O perioadă de 12 ore de efort fizic redus;
- ▲ 30 min repaus fizic înainte de recoltare;
- ▲ Aceiași poziție a pacientului la recoltare;
- ▲ Același interval de timp al recoltării (7-9);
- 1. Se aplică garoul pe ante-  
braț. Se palpează vena cubitală și se dezinfectează.  
garoului (max – 1-2 min);
- ▲ Evitarea închiderii și deschiderii repetate a pumnului;
- ▲ În timpul perfuziilor și transfuziilor recoltarea se va face de la celălalt braț;
- ▲ Dacă este necesar să se repete flebotomia, recoltarea se va face de la celălalt braț;
- ▲ Pe formularul de solicitare trebuie specificată medicația administrată: cu ce, de când, cât timp;

**Calitatea completării documentației:**

- ▲ completarea formularelor de îndreptare la investigații
- ▲ elaborarea regi 2. Se introduce acul în venă și se extrage sângele în tub. 3. Se astupă etanș tubul cu dop. Se marchează eticheta de pe tub conform registrului.
- ▲ elaborarea forr

**Formularul de îndreptare va include următoarele pun**

- ▲ Informație ce permite identificarea unică a pacientului;
- ▲ Data și ora când a fost colectată proba;
- ▲ Tipul probei;
- ▲ Investigațiile solicitate;
- ▲ Data și ora când proba a fost recepționată de laborator;
- ▲ Informație clinică relevantă
- ▲ Localul unde urmează a fi trimise rezultatele;
- ▲ Numărul de acces în laborator
- ▲ Persoana responsabilă de testele solicitate

**Transportarea probelor**

Trebuie să existe proceduri pentru transportul probelor colectate, incluzând temperatura optimă, protecția împotriva luminii, precauții la staționare, intervalul de timp permis înainte de pre-examinare (centrifugare, deproteinizate), în cazuri speciale condiții de depozitare.

Pentru minimalizarea riscului de încurcare a probelor trebuie să existe proceduri pentru trimiterea probelor la alte laboratoare cu respectarea completării formularelor și acordurilor necesare.

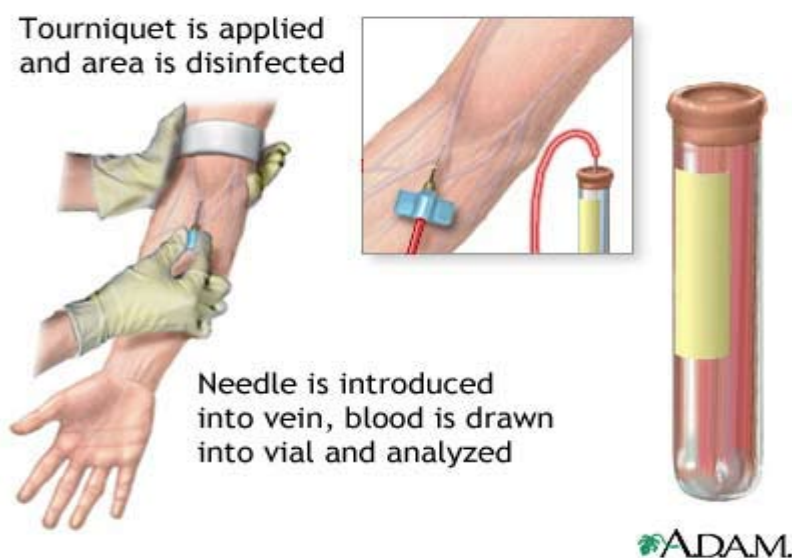
- ▲ Toate probele se transportă în ambalaje perfect închise;
- ▲ Probele biologice transportate se etichetează „Probe diagnostice / pericol infecțios”;
- ▲ Dacă distanțele sunt mari se preferă sângele recoltat pe anticoagulant și pe gel separator;



- ▲ Se evită expunerea la lumină (condiționează micșorarea conținutului de bilirubină, vitamina C, porfirinele, creatinkinazei);
- ▲ Poziția verticală a tuburilor în timpul transportului accelerează coagularea;
- ▲ Se evită agitarea probelor de sânge, risc de hemoliză;
- ▲ Se evită păstrarea sângelui integru.

Pentru a face posibilă repetarea examinării după raportarea rezultatelor sau pentru examinări adiționale, probele primare trebuie păstrate pentru un interval de timp în care se asigură stabilitatea proprietăților acestora.

**Figura 32.** Prelevarea probelor de sânge



### Obținerea probelor:

1. Recoltarea sângelui cu respectarea regulamentelor de securitate și antisepctică
2. Asigurarea condițiilor de obținere a serului:
  - ▲ poziție verticală
  - ▲ păstrarea tuburilor cu sânge la t- 22 - 24°C - până la 2 ore  
la t- 4-8 °C - până la 48 ore
  - ▲ regim de centrifugare: 1000- 1500 rot/min – 10 min

### Acceptarea probelor și asigurarea calității

Inspectarea probelor la primirea în laborator.

Se verifică:

- ▲ Concordanța dintre marcajul tubului, flaconului, containerului și datele din formularul de solicitare.
  - ▲ Acceptarea duratei dintre recoltarea și primirea probei în laborator.
  - ▲ Dacă proba a fost răcită sau au fost adăugați conservanți în cazul în care transportul a fost întârziat.
  - ▲ Integritatea tuburilor, containerului și condiția în care se află.
  - ▲ Volumul materialului suficient pentru testările solicitate.
  - ▲ Prezența sau absența conservanților chimici, indicate pentru testele solicitate.
  - ▲ Probele primare se verifică dacă nu sunt hemolizate, lipemice, etc.
- Dacă proba primară nu satisface condițiile necesare personalul responsabil:



- ▲ comunică unității corespunzătoare;
- ▲ notează incidentul în registrul corespunzător;
- ▲ returnează proba primară.

***Nu se aruncă proba inacceptabilă înainte de a consulta personalul clinic și a stabili o decizie de comun acord.***

Personalul laboratorului la recepționarea probelor:

- ▲ le atribuie un număr de identificare în laborator;
- ▲ transferă identificarea și testele solicitate în registrul de primire a probelor și/sau în listele de lucru;
- ▲ documentează listele de lucru;
- ▲ distribuie probele pe departamente.

**Sursele de erori la etapa pre-analitică:**

- ▲ neidentificarea corectă a pacientului
- ▲ neidentificarea corectă a probei
- ▲ date eronate în formularele de însoțire
- ▲ hemoliză, contaminarea probei
- ▲ devierea activității specifice a componentului cauzată de nerespectarea condițiilor de recoltare, transportare și păstrare

## II. ETAPA ANALITICĂ

Obiectivul de bază a controlului calității la etapa analitică este dirijarea calității analizelor pentru asigurarea rezultatelor exacte și veridice.

Controlul calității sistemelor analitice:

- ▲ Utilizarea test-sistemelor cu caracteristici performante
- ▲ Utilizarea utilajului metrologic testat
- ▲ Personal instruit

Monitorizarea calității investigațiilor:

- ▲ Utilizarea materialelor de control cu valori predeterminate, după rezultatele cărora poate fi apreciată calitatea examinărilor efectuate și exactitatea rezultatelor obținute.

Pentru implementarea controlului intern de calitate la etapa analitică sunt necesare:

1. Material de control
2. Cerințe de organizare
3. Metode de control
4. Reguli de apreciere

**Material de control**

- ▲ Caracteristici de calitate: stabil la păstrare, omogen la diluție, valabil la t 2-8° C nu mai puțin de 1 an, după diluție valabil timp de 4-8 ore la t 20-25° C, timpul de reconstituire - nu mai puțin de 30 min, comod și simplu în utilizare
- ▲ preferabil de origine umană
- ▲ cu valori predeterminate
- ▲ minimum 2 nivele de concentrații (normal și patologic)

**Cerințele în organizarea Controlului Intern de Calitate:**

- ▲ testarea materialelor de control trebuie să fie inclus în regimul obișnuit de lucru;
- ▲ testarea materialelor de control se va efectua de persoana care înfăptuiește zilnic metoda de cercetare;
- ▲ materialele de control se vor testa prin aceleași metode de cercetare care sunt utilizate în laborator



pentru investigarea probelor biologice;

- ▲ laboratorul va fi asigurat cu materiale pentru controlul zilnică în cantitate suficientă.

## METODELE CONTROLULUI INTERN DE CALITATE

### Metode cu aplicarea materialelor de control

- ▲ Hărților de control
- ▲ Criteriilor Westgard

### Metode cu aplicarea rezultatelor pacienților

- ▲ Probelor paralele
- ▲ Prin amestec
- ▲ Prin adaus
- ▲ Mediei normale
- ▲ Compararea metodelor
- ▲ Delta control

### Strategia controlului statistic:

I. Stabilirea limitelor de control:

- ▲ testarea materialului de control în câteva serii (preferabil nu mai puțin de 20 de valori);
- ▲ aprecierea limitelor de control prin calcularea: mediei  $X_m$ ;  $\pm DS$ ; CV

$$X_m = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$DS = \pm \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_m)^2}{n - 1}}$$

$$CV (\%) = \frac{DS}{X} \cdot 100$$

Unde:  $X_m$  - media valorilor determinate

$n$  - numărul de determinări

$\sum X_i$  - suma valorilor determinate

DS - deviația standard

CV – coeficientul de variație

Limita controlului nu poate fi mai mare de  $X_m \pm 3DS$

După ce sunt efectuate calculele rezultatele se pot reprezenta pe Harta Levey – Jennings.

### Regulile Westgard (6 reguli)

**$1_{2S}$  : un rezultat al unui singur nivel de control se situează dincolo de medie  $\pm 2DS$**

Este un semnal de alarmă care imune analiza și a altora rezultate și reguli. În absența altor semnale de alarmă, nu se impune rejectarea controlului și a rezultatelor pacienților. Este un indice de eroare întâmplătoare.

**$1_{3S}$  : un singur rezultat se situează dincolo de limitele  $\pm 3DS$**

Semnifică o eroare întâmplătoare, dar poate să fie începutul unei erori sistematice grave.

**$2_{2S}$  : două rezultate consecutive se situează dincolo de medie  $\pm 2DS$**

Semnifică o începutul unei erori sau prezența unei erori sistematice care afectează curba.

 **$R_{4S}$  : un rezultat dincolo de medie + 2DS, celălalt dincolo de medie – 3DS**

Deci, o diferență de 4 DS, semnifică eroare întâmplătoare.

 **$4_{1S}$  : patru rezultate consecutive dincolo de 1 DS**

Semnifică eroare sistematică. Se disting 2 situații:

- ▲ când ambele nivele de control se situează de 2 ori consecutiv, pe aceeași parte a mediei, dincolo de 1 DS
- ▲ când cel puțin un nivel de control se situează de 4 ori consecutiv, de aceeași parte a mediei, dincolo de 1 DS

 **$10_x$  : 10 rezultate de aceeași parte a mediei, indiferent de dimensiunea deviației**

Semnifică eroare sistematică. Se disting 2 situații:

- ▲ când ambele nivele de control se situează de 5 ori consecutiv de aceeași parte a mediei
- ▲ când cel puțin un nivel de control se situează de 10 ori consecutiv pe aceeași parte a mediei.

**Oricare din situațiile  $1_{3S}$ ,  $2_{2S}$ ,  $R_{4S}$ ,  $4_{1S}$ ,  $10_x$  semnifică rezultate inacceptabile pentru controlul intern și impun rejectarea seriei de analize. Analizele pacienților se refac după ce sunt înlăturate cauzele ce au generat erori și recontrolarea s-a dovedit acceptabilă.**

Sursele și tipurile de erori analitice:

## a. Erori grave:

- ▲ s-au încurcat reagenții
- ▲ s-a omis sau exclus unul din reagenți
- ▲ deteriorarea, afectarea neprevăzută a aparatajului
- ▲ deconectarea neprevăzută a sursei de energie
- ▲ un reagent necalitativ din completul test-sistemei

## b. Erori întâmplătoare:

- ▲ erori la pipetare
- ▲ erori de oboseală, neatenție
- ▲ instabilitatea funcționării aparatajului
- ▲ instabilitatea a parametrilor de calitate a test-sistemelor

## a. Erori sistematice:

- ▲ nerespectarea sistematică a etapelor procesului tehnologic de investigare
- ▲ eroare permanentă la calcularea rezultatelor
- ▲ afectarea curbei de calibrare în urma instabilității funcționării aparatajului
- ▲ afectarea curbei de calibrare în urma utilizării calibratorilor necalitativi
- ▲ aplicarea unui lot de test-sisteme necalitative

**III. ETAPA POST-ANALITICĂ**

1. Forma de eliberare a rezultatelor.
2. Obținerea rezultatelor în interval de timp optimal și informarea specialiștilor.
3. Interpretarea corectă a rezultatelor.
4. Utilizarea adecvată a rezultatelor (diagnosticare sau monitorizare).



## 6. CERINȚE DE SECURITATE BIOLOGICĂ PENTRU LABORATOARE MEDICALE

*Laboratory biosafety manual. Third edition. World Health Organizations. Geneva 2004*

Toate laboratoarele medicale trebuie concepute conform unui nivel de biosiguranță 2 sau mai mare. Deoarece nici un laborator nu are un control complet asupra probelor pe care le primește, personalul din laborator poate fi expus la microorganisme din grupuri de risc superioare celor anticipate. Această posibilitate trebuie luată în considerare când se elaborează planurile și politicile de biosiguranță. De regulă, precauțiile standard trebuie adoptate și aplicate întotdeauna.

### 6.1. CODUL DE PRACTICI

Acest cod este o listă a celor mai importante practici și proceduri de laborator care stau la baza **practicilor microbiologice corecte** (good microbiological techniques = **GMT**). În multe laboratoare și programe naționale în care acestea participă, acest cod se poate utiliza pentru elaborarea de reguli și proceduri scrise pentru efectuarea în siguranță a operațiunilor în laborator.

Fiecare laborator trebuie să adopte un manual de siguranță sau de operațiuni care să identifice pericolele cunoscute sau potențiale precum și procedurile și practicile specifice pentru eliminarea sau reducerea la minimum a acestor pericole. GMT sunt fundamentale pentru siguranța activităților de laborator. Echipamentul special de laborator este un element suplimentar, care nu va putea însă niciodată să înlocuiască aplicarea procedurilor corecte. Cele mai importante concepte sunt enumerate mai jos.

#### Accesul

1. Sigla internațională de avertizare și inscripția «Pericol biologic» trebuie să fie afișate pe ușile încăperilor unde sunt manipulate microorganisme aparținând grupului de risc 2 sau mai mare.
2. Numai persoanele autorizate vor fi lăsate să intre în zonele de lucru ale laboratorului.
3. Ușile laboratorului trebuie să stea închise.
4. Copiii nu trebuie autorizați sau lăsați să intre în zonele de lucru ale laboratorului.
5. Accesul în biobaze trebuie să se facă numai pe baza unei autorizații speciale.
6. Nu se admite accesul altor animale în afara celor folosite pentru activitățile de laborator

#### Protecția individuală a personalului

1. Salopetele de laborator, halatele sau uniformele trebuie purtate tot timpul cât se lucrează în laborator.
2. Mănuși corespunzătoare de protecție trebuie purtate în timpul tuturor procedurilor care pot implica contactul direct sau accidental cu sânge, cu alte umori sau fluide ale organismului, cu alte materiale potențial infecțioase sau cu animale infectate. După utilizare, mănușile se scot aseptice și se spală mâinile.
3. Personalul trebuie să se spele pe mâini după manipularea materialelor infecțioase și a animalelor infectate și înainte de părăsirea zonei de lucru a laboratorului.
4. Ochelarii de protecție, ecranele de protecție facială sau alte dispozitive de protecție trebuie purtate ori de câte ori este necesară protecția ochilor și a feței de stropi și surse artificiale de radiații ultraviolete.
5. Este interzisă purtarea îmbrăcăminteii protectoare de laborator în afara laboratorului, de exemplu în cantine, camere de oficiu, biblioteci, toalete, etc.
6. Încălțăminte decupată în partea din față (sandale) este improprie purtării în laborator.
7. Consumul de alimente, băuturi, machiajul și manipularea lentilelor de contact sunt interzise în zonele de lucru ale laboratorului.
8. Depozitarea de alimente sau băuturi oriunde în zona de lucru a laboratorului este interzisă.
9. Îmbrăcăminte și încălțăminte de protecție ce a fost utilizată în laborator nu trebuie să fie depozitată în aceleași dulapuri cu îmbrăcăminte și încălțăminte de stradă.



## Procedurile

1. Pipetarea cu gura este strict interzisă.
2. Nici un material nu trebuie dus la gură. Etichetele nu trebuie umectate cu limba înainte de lipire.
3. Toate procedurile tehnice trebuie efectuate într-un mod care să reducă la minimum formarea de aerosoli și picături.
4. Folosirea acelor și seringilor hipodermice trebuie limitată. Ele nu trebuie folosite ca substituenți ale dispozitivelor de pipetare sau pentru oricare altă manoperă ce nu reprezintă injecții parenterale sau aspirarea de fluide de la animalele de laborator.
5. Toate stropirile accidentale și expunerile evidente sau posibile cu material infecțios trebuie raportate responsabilului laboratorului. Se va păstra o evidență scrisă a acestor accidente și incidente.
6. Se va elabora și aplica o procedură scrisă pentru curățarea-inactivarea substanțelor vărsate.
7. Lichidele contaminate trebuie decontaminate (chimic sau fizic) înainte de evacuarea lor în rețeaua de canalizare. În funcție de riscul evaluat se poate dezvolta un sistem de tratare a acestor lichide.
8. Documentele ce urmează a fi scoase din laborator trebuie să fie protejate pe toată perioada cât se află în laborator, pentru a nu fi contaminate.

## Zonele de lucru ale laboratorului

1. În laborator trebuie păstrată curățenia și ordinea, eliminându-se toate materialele care nu sunt necesare pentru munca desfășurată în laborator.
2. Suprafețele de lucru trebuie decontaminate după fiecare vărsare de materiale potențial periculoase precum și la sfârșitul zilei de lucru.
3. Toate materialele contaminate, probele și culturile, trebuie decontaminate înainte de a fi îndepărtate sau curățate pentru re folosire.
4. Ambalarea și transportul trebuie să respecte reglementările naționale și/sau internaționale în vigoare.
5. Ferestrele ce pot fi deschise trebuie prevăzute cu plase/ecrane pentru insecte.

## Managementul biosiguranței

1. Șeful de laborator (persoana care poartă în mod direct responsabilitatea laboratorului) are obligația să asigure elaborarea și adoptarea unui plan de management al biosiguranței și ale unui manual de siguranță și operațiuni.
2. Responsabilul cu activitatea laboratorului (subordonat șefului laboratorului) trebuie să asigure instruirea periodică a personalului laboratorului în domeniul siguranței.
3. Personalul trebuie avertizat asupra pericolelor speciale și are obligația să citească manualul de siguranță și operațiuni și să respecte procedurile și practicile standard. Responsabilul laboratorului trebuie să se asigure că toți membrii personalului și-au însușit aceste reguli. O copie a manualului de siguranță și operațiuni trebuie să existe permanent în laborator pentru a putea fi consultată în orice moment.
4. Trebuie să existe un program de dezinfecție și deratizare.
5. Trebuie asigurate, în caz de necesitate, pentru toți membrii personalului, o evaluare medicală adecvată, supraveghere și tratament, și trebuie ținute evidențe medicale adecvate.



## 6.2. ECHIPAMENTELE DE LABORATOR

Împreună cu procedurile și practicile corecte, utilizarea echipamentelor de siguranță contribuie la reducerea riscului. Acest capitol tratează principiile de bază legate de echipamentele utilizate în toate laboratoarele, indiferent de nivelul de biosiguranță. Exigențele legate de echipamentul de laborator pentru nivelele superioare de biosiguranță sunt tratate în capitolele respective.

Șeful de laborator are obligația ca, după consultarea cu responsabilul cu biosiguranța și colectivul de siguranță, să asigure ca echipamentul adecvat să fie procurat și folosit corespunzător. Echipamentul va fi ales luând în considerare câteva principii generale, de exemplu:

1. Să fie conceput astfel încât să prevină sau să limiteze contactul dintre operator și materialul infecțios
2. Să fie confecționat din materiale impermeabile la lichide, rezistente la coroziune și corespunzătoare ca structură.
3. Să fie confecționat astfel încât să nu aibă asperități, margini ascuțite și părți mobile neprotejate
4. Să fie proiectat, construit și instalat pentru a facilita operarea simplă și întreținerea, curățarea, decontaminarea și testarea în vederea certificării; ori de câte ori este posibil, se va evita utilizarea sticlăriei și a altor materiale casante.
5. Este util să se consulte în detaliu documentația privind performanțele și specificațiile de construcție ale echipamentelor pentru a dobândi convingerea că prezintă caracteristicile de siguranță necesare.

### **Echipamente esențiale pentru asigurarea biosiguranței**

1. Dispozitive de pipetare, pentru a evita pipetarea cu gura. Sunt disponibile diverse modele.
2. Hotele de biosiguranță, ce trebuie folosite ori de câte ori se manipulează materiale infecțioase; aceste materiale pot fi centrifugate în spațiul deschis al laboratorului dacă se folosesc cupe de centrifugă cu dispozitiv de securizare și dacă sunt introduse și descărcate într-o hotă de biosiguranță există risc crescut de infecții aerogene se folosesc proceduri cu potențial ridicat de producere de aerosoli: centrifugarea, mojararea, secționarea, agitarea sau mixarea viguroasă, dezintegrarea sonică, deschiderea containerelor cu material infecțios cu presiune internă diferită de presiunea ambiantă, inocularea intranasală a animalelor și recoltarea de țesuturi infectate de la animale și ouă, etc.
3. Anse de transfer de unică folosință din plastic. Alternativ, în scopul reducerii producerii de aerosoli, în interiorul hotei de biosiguranță se pot folosi incineratoare electrice în scopul reducerii producerii de aerosol.
4. Tuburi și flacoane cu capace prevăzute cu filet.
5. Autoclave sau alte mijloace folosite pentru decontaminarea materialului infecțios
6. Pipete Pasteur de unică folosință din plastic, ori de câte ori este posibil, evitând utilizarea celor din sticlă
7. Echipamentele precum autoclavele și hotele de biosiguranță trebuie validate cu metode adecvate înainte de a fi introduse în uz. Acestea trebuie recertificate la intervale regulate de timp, în acord cu instrucțiunile producătorului.





### 6.3. MANIPULAREA DEȘEURILOR

Se consideră deșeuri toate materialele care se aruncă.

În laboratoare, în desfășurarea activității cotidiene, decontaminarea deșeurilor și eliminarea finală a acestora sunt strâns legate. Un număr foarte mic de materiale contaminate necesită îndepărtarea efectivă din laborator sau distrugerea. Majoritatea sticlăriei, instrumentelor și articolelor de îmbrăcăminte sunt refolosite sau reciclate. Principiul general ce trebuie să funcționeze este că toate materialele infecțioase vor fi decontaminate, autoclavate sau incinerate în laborator.

Principalele probleme care se pun, înainte de eliminarea oricărui obiect sau material din laboratoarele ce lucrează cu microorganisme potențial infecțioase sau țesuturi de la animale, sunt:

1. Au fost obiectele sau materialele respective eficient decontaminate sau dezinfectate printr-o procedură autorizată.
2. Dacă nu, au fost ele ambalate într-un mod autorizat pentru incinerare imediată la fața locului sau pentru transfer într-o altă locație cu posibilități de incinerare.
3. Aruncarea obiectelor sau materialelor decontaminate implică eventual alte pericole adiționale, biologice sau de alt tip, pentru cei care îndeplinesc procedurile de eliminare sau care ar putea veni în contact cu obiectele eliminate în afara perimetrului respectiv.

#### **Decontaminarea**

Autoclavarea cu abur este metoda de elecție pentru toate procesele de decontaminare. Materialele care urmează să fie decontaminate și eliminate vor fi puse în containere adecvate (ex. saci din plastic autoclavabil, cu coduri de culori care indică destinația conținutului acestora pentru autoclavare și/sau incinerare). Pot fi luate în considerație și metode alternative doar dacă acestea îndepărtează și/sau omoară microorganismele.

#### **Procedurile de manipulare și eliminare a materialelor contaminate și a deșeurilor**

Trebuie adoptat un sistem de identificare și de separare a materialelor infecțioase și a containerelor respective. Vor fi obligatoriu respectate reglementările naționale și internațional în domeniu. Categoriile care se includ sunt următoarele:

1. Deșeurile necontaminate (neinfecțioase) care pot fi refolosite, reciclate sau eliminate ca deșeuri generale sau menajere
2. Obiectele ascuțite (tăietoare-înțepătoare) contaminate (ex. ace hipodermice, bisturie, cuțite și cioburi de sticlă); acestea vor fi întotdeauna colectate în containere rezistente la înțepare-tăiere, prevăzute cu capace și vor fi tratate ca infecțioase.
3. Materialul contaminat destinat decontaminării prin autoclavare urmată de spălare și refolosire sau reciclare.
4. Materialul contaminat destinat autoclavării și eliminării.
5. Materialul contaminat destinat incinerării directe.

#### **Obiectele ascuțite**

După utilizare, acele hipodermice nu trebuie reacoperite, tăiate sau detașate din seringile de unică folosință. Întregul ansamblu trebuie plasat în containerul pentru obiecte ascuțite. Seringile de unică folosință, folosite separat sau cu ace, trebuie plasate în containere și incinerate, cu autoclavare prealabilă dacă este necesar.

Containerele pentru obiecte ascuțite (tăietoare-înțepătoare) trebuie să fie rezistente la înțepare-tăiere și nu trebuie umplute la capacitatea maximă. Când sunt umplute pe 3/4, aceste containere trebuie plasate în containere pentru “deșeuri infecțioase” și incinerate, cu autoclavare prealabilă dacă practica laboratorului o necesită. Containerele pentru obiecte tăietoare-înțepătoare nu trebuie aruncate în mediul înconjurător.



## Surse bibliografice de bază:

1. World Health Organisation. Hepatitis B Geneva, WHO, Department of Communicable Diseases Surveillance and Responce 2002; <http://www.who.int/emc>
2. CDC. Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus // Recommendations and Reports MMWR Report, February 7, 2003 / Vol. 52 / No. RR-3 [www.cdc.gov/hepatitis](http://www.cdc.gov/hepatitis)
3. Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis Surveillance Report No. 58. Atlanta, GA: U.S Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2003 [2003CDC\\_2003\\_Surveill58.pdf](http://www.cdc.gov/2003CDC_2003_Surveill58.pdf)
4. CDC. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. MMWR 1998; 47(RR:19), [www.cdc.gov/hepatitis](http://www.cdc.gov/hepatitis)
5. WHO. HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN ASSAYS: OPERATIONAL CHARACTERISTICS (Phase I) REPORT 2, 2003. [www.who.int/eht](http://www.who.int/eht)
6. Foundation For Liver Research. Hepatitis B: Out of the shadows. A report into the impact of hepatitis B on the nation's health. October 2004, [www.ucl.ac.uk/liver-research](http://www.ucl.ac.uk/liver-research)
7. Elvira Sînzeana Ciufecu. Virusologie medicală. Editura Medicală Națională, 2003, București, România
8. The National Academy of Clinical Biochemistry. Laboratory Guidelines for Screening, diagnosis and monitoring of hepatic injury. Laboratory medicine practice guidelines. Volume 12/2000
9. Technical Guide for ELISA Where Better Science Begins [www.kpl.com](http://www.kpl.com)
10. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing reporting of antibody to hepatitis C virus. MMWR 2003;52(No.RR-11): 1-15 [2003CDC\\_2003\\_LabTestingResultReportingAnti-HCV.pdf](http://www.cdc.gov/2003CDC_2003_LabTestingResultReportingAnti-HCV.pdf)

## Surse bibliografice suplimentare:

1. World Health Organisation. *Hepatitis B* Geneva, WHO, Department of Communicable Diseases Surveillance and Responce 2002; <http://www.who.int/emc>
2. CDC. *Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus* // Recommendations and Reports MMWR Report, February 7, 2003 / Vol. 52 / No. RR-3 [www.cdc.gov/hepatitis](http://www.cdc.gov/hepatitis)
3. Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis Surveillance Report No. 58. Atlanta, GA: U.S Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2003 [2003CDC\\_2003\\_Surveill58.pdf](http://www.cdc.gov/2003CDC_2003_Surveill58.pdf)
4. CDC. *Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease*. MMWR 1998; 47(RR:19), [www.cdc.gov/hepatitis](http://www.cdc.gov/hepatitis)
5. WHO. HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN ASSAYS: OPERATIONAL CHARACTERISTICS (Phase I) REPORT 2, 2003. [www.who.int/eht](http://www.who.int/eht)
6. Foundation For Liver Research. Hepatitis B: *Out of the shadows. A report into the impact of hepatitis B on the nation's health*. October 2004, [www.ucl.ac.uk/liver-research](http://www.ucl.ac.uk/liver-research)
7. Elvira Sînzeana Ciufecu. *Virusologie medicală*. Editura Medicală Națională, 2003, București, România
8. The National Academy of Clinical Biochemistry. *Laboratory Guidelines for Screening, diagnosis and monitoring of hepatic injury*. Laboratory medicine practice guidelines. Volume 12/2000
9. *Technical Guide for ELISA Where Better Science Begins* [www.kpl.com](http://www.kpl.com)
10. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing reporting of antibody to hepatitis C virus. MMWR 2003;52(No.RR-11): 1-15 [2003CDC\\_2003\\_LabTestingResultReportingAnti-HCV.pdf](http://www.cdc.gov/2003CDC_2003_LabTestingResultReportingAnti-HCV.pdf)
11. Генодиагностика инфекционных болезней. Всероссийская Научнопрактическая конференция. РАМН В.И.Покровский, Москва, 2004.
12. Полимеразная цепная реакция и ее применение для диагностики в дерматовенерологии. А.А.Воробьев, Москва, 2004.



13. Hepatologie bazată pe dovezi. Ghid practic național. V.-T. Dumbaravă, Chișinău, 2005.
14. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. Г.И. Назаренко,
15. Glebe D. *Recent advances in hepatitis B virus research: A German point of view.* World J Gastroenterol 2007; 13(1):8-13 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/8.asp>.
16. Locarnini S. HBV drug resistance. Abstracts of the XV International Drug Resistance Workshop; June 13-17, 2006; Sitges, Spain. Abstract P2.
17. Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. Semin Liver Dis. 2005;25(suppl 1):9-19. Abstract
18. Centers for Disease Control & Prevention: Hepatitis A vaccination coverage among children aged 24-35 months--United States, 2003. MMWR 2005;54:141-4
19. Finelli L, Miller JT, Tokars JI, et al. National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States, 2002. Semin Dial 2005;18:52-61.
20. Centers for Disease Control & Prevention: Hepatitis C Virus Transmission from an Antibody-Negative Organ and Tissue Donor – United States, 2000-2002. MMWR 2003; 52:273-276. (Barna Tugwell, Priti Patel)
21. Centers for Disease Control and Prevention. Global progress toward universal childhood hepatitis B vaccination, 2003. MMWR 2003;52(36):867-868. 2003CDC\_2003\_GlobalProgressHBVacc.pdf
22. Centers for Disease Control and Prevention. Transmission of hepatitis B and C Viruses in outpatient settings—New York, Oklahoma, and Nebraska, 2000-2002. MMWR 2003 52(38) 901-904, 906. 2003CDCTransHB HCVoutpatients.pdf
23. Gilbert LK, Bulger J, Scanlon K, et al. Integrating Hepatitis B Prevention Into Sexually Transmitted Disease Services: U.S. Sexually Transmitted Disease Program and Clinic Trends - 1997 and 2001. Sexually Transmitted Diseases 2005; 32(6); p. 346-350.
24. Nainan OV, Armstrong GL, Han X-H, et al. Hepatitis A molecular epidemiology in the United States: sources of infection and implications of vaccination policy. J Infect Dis 2005;191:957-63.
25. Shepard CW, Finelli L, Fiore AE, et al. Epidemiology of Hepatitis B and Hepatitis B Virus Infection in United States Children. Pediatric Infectious Disease Journal 2005; 24(9):755-760.
26. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. Lancet Infect Dis 2005; Vol. 5: 558-567.
27. Comstock RD, Mallonee S, Fox JL, et al. A large nosocomial outbreak of hepatitis C and hepatitis B among patients receiving pain remediation treatments. Infect Control Hosp Epidemiol 2004;25:576-83.
28. Garfein RS, Bower WA, Loney CM, et al. Factors associated with fulminant liver failure during an outbreak among injection drug users with acute hepatitis B. Hepatology 2004;40:865-73.
29. Hauri AM, Armstrong GL, Hutin YJF. The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. Int J STD AIDS. 2004;15:7-16.
30. Luman ET, Fiore AE, Strine TW, Barker LE. Impact of thimerosal-related changes in hepatitis B vaccine birth-dose recommendations on childhood hepatitis B vaccination coverage in the United States. JAMA 2004;291:2351-8.
31. Mast EE, Mahoney F, Kane M, Margolis H. Hepatitis B vaccine. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, editors. Vaccines. Philadelphia: Saunders, 2004: 299-337.
32. Samandari T, Bell BP, Armstrong GA. Quantifying the impact of hepatitis A immunization in the United States, 1995-2001. Vaccine 2004;22:4342-50.
33. Vong S, Bell BP. Chronic liver disease mortality in the United States, 1990-1998. Hepatology 2004;39:476-83
34. Alter MJ. Epidemiology and prevention of hepatitis B. Semin Liver Dis 2003; 23(1):39-46.
35. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. Journal of Hepatology 2003; 39:S64-S69.
36. Alter MJ. Management of HCV-infected health care workers. Hepatology 2003; 37(6):1498-1499.
37. Alter MJ. Do patients who fail to complete a hepatitis A or hepatitis B vaccination series have to restart it? Cleve Clin J Med 2003; 70(3):234.



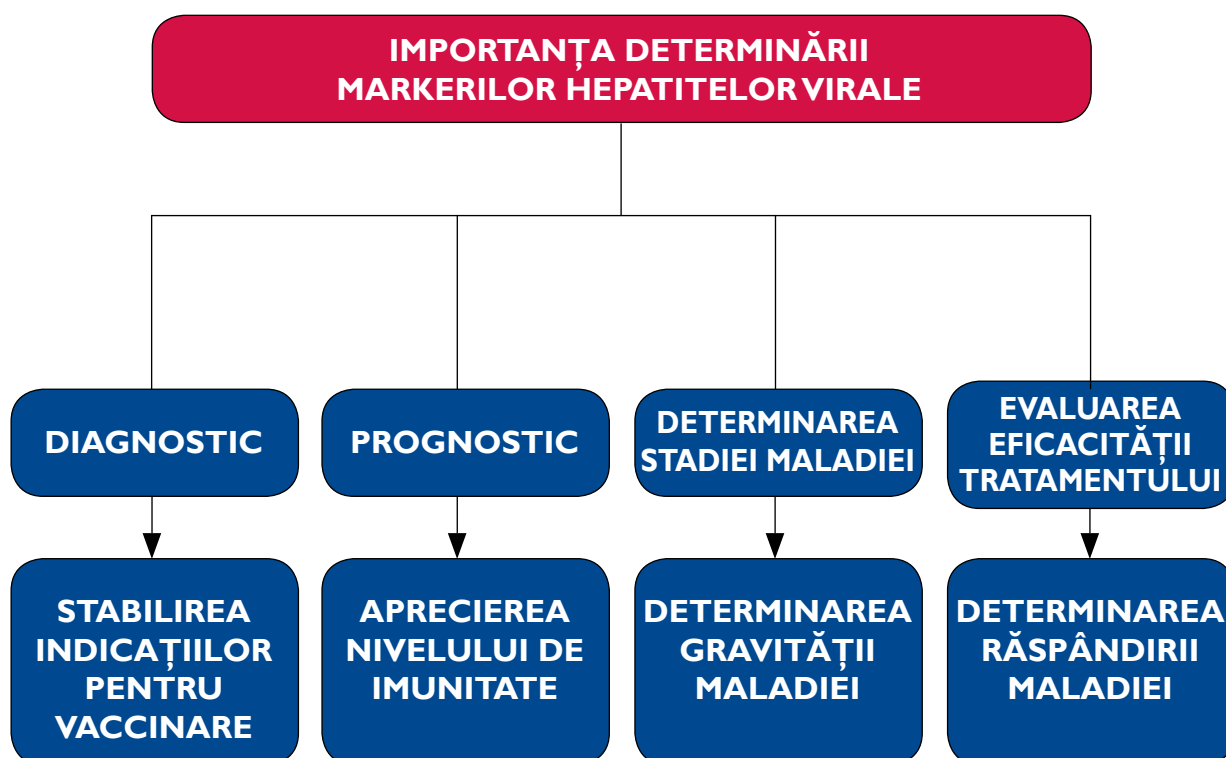
38. Armstrong GL. Commentary - Modeling the epidemiology of hepatitis C and its complications. *Int J Epidemiol* 2003;32:725-6
39. Armstrong GL, Perz JF, Alter MJ. Perinatal hepatitis C virus transmission--role of human immunodeficiency virus infection and injection drug use. *J Infect Dis* 2003; 187(5):872-874.
40. Bardenheier B, Gonzalez IM, Washington ML, et al. Parental knowledge, attitudes, and practices associated with not receiving hepatitis A vaccine in a demonstration project in Butte County, California. *Pediatrics* 2003; 112(4):e269.
41. Bell BP, Shapiro CN. Hepatitis A virus. In: Long S, Prober C, Pickering L, editors. *Principles & Practice of Pediatric Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 2003: 1188-1192.
42. Bower, WA, Goldstein ST. Hepatitis delta virus. *Principles & Practice of Pediatric Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 2003: 1097-1101.
43. Datta SD, Armstrong GL, Roome AJ, Alter MJ. Blood exposures and hepatitis C virus infections among emergency responders. *Arch Intern Med* 2003; 163:2605-2610.
44. Fiore AE, Goldstein ST. Hepatitis B virus. In: Long S, Prober C, Pickering L, editors. *Principles & Practice of Pediatric Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 2003: 1086-1097.
45. Gunn RA, Murray PJ, Brennan CH, et al. Evaluation of screening criteria to identify persons with hepatitis C virus infection among sexually transmitted disease clinic clients: results from the San Diego Viral Hepatitis Integration Project. *Sex Transm Dis* 2003; 30(4):340-344.
46. Navarro VJ, St Louis TE, Bell BP. Identification of patients with hepatitis C virus infection in New Haven County primary care practices. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36(5):431-435.
47. Schrag SJ, Fiore AE, Gonik B, et al. Vaccination and perinatal infection prevention practices among obstetrician-gynecologists. *Obstet Gynecol* 2003; 101(4):704-710.
48. Williams IT, Goldstein ST, Tufa J. Long term antibody response to hepatitis B vaccination beginning at birth and to subsequent booster vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(2):157-163.
49. CDC. Update: recommendations to prevent hepatitis B virus transmission---United States. *MMWR* 1999;48:33--4.
50. CDC. National, state, and urban area vaccination coverage among children aged 19--35 months---United States, 2004. *MMWR* 2005;54:717--21.
51. Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1):S93-S98.
52. Alter MJ. Hepatitis C: fact versus fiction. In: Margolis HS, Alter MJ, Liang J, Dienstag J, editors. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Atlanta: International Medical Press, 2002: 310-315.
53. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83(Pt 8):2059-2073.
54. Fraser MR, Buffington J, Lipson L, Meit, M. Hepatitis C prevention Programs: Assessment of Local Health Department Capacity. *J Public Health Management Practice* 2002; 8:46-9.
55. FitzSimons D, Van Damme P, Emiroglu N, et al. Strengthening immunizations systems and introduction of hepatitis B Vaccine in central and eastern Europe and the Newly Independent States. *Vaccine* 2002; 20:1475-9.
56. Goldstein ST, Alter MJ, Williams IT, et al. Incidence and Risk Factors for Acute Hepatitis B in the United States, 1982-1998: Implications for Vaccination Programs. *J of Infect Dis* 2002; 185:713-9.
57. Hutin YJ, Stilwel B, Hauri AM, et al. Transmission of bloodborne pathogens through unsafe injections and proposed approach for the Safe Injection Global Network. *Viral Hepatitis and Liver Disease* 2002:219-27.
58. Kamili S. Immunity to hepatitis E Virus: new insights and future challenges. *Indian Journal of Gasroenterol* 2002; 21: 136-138.
59. Kamili S, Spelbring J, Krawczynski k. DNA vaccination against hepatitis E virus infection in cynomolgus macaques. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:S365-9.



60. Kapadia F, Vlahov D, Des Jarlais D. Does bleach disinfection of syringes protect against hepatitis C infection among young adult injection drug users? *Epidemiology* 2002; 13(6):738-741.
61. Khan, AJ, Cotter SM, Schulz B, et al. Nosocomial transmission of hepatitis B virus infection among residents with diabetes in a skilled nursing facility. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23(6):313-8.
62. Khudayakov YE, Dou X-G, Chang J, et al. Impact of sequence heterogeneity on antigenic properties of hepatitis C virus proteins. *Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*; 2000 April 9-13; Atlanta. International Medical Press; 2002. p.369-373.
63. Krawczynski K, Kamili S, Aggarwal R. Clinical spectrum and epidemiology of hepatitis E virus infection. *Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*; 2000 April 9-13; Atlanta: International Medical Press; 2002. p.90-6.
64. Margolis HS. Hepatitis update: The role of primary care practitioners in prevention, treatment, and vaccination. *Ethn Dis* 2002; 12:33-5.
65. Masalova OV, Lakina EI, Abdulmedzhidova AG, et al. Characterization of monoclonal antibodies and epitope mapping of the NS4 protein of hepatitis C virus. *Immunol Lett* 2002; 83:187-196.
66. Meng J, Dai X, Rak J, et al. Mapping of the neutralizing antigenic epitope(s) of the hepatitis E virus. *Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*; 2000 April 9-13; Atlanta. International Medical Press; 2002. p.108-111.
67. Murrill CS, Weeks H, Castrucci BC, et al. Age-specific seroprevalence of HIV, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infection among injection drug users admitted to drug treatment in 6 US cities. *Am J Public Health* 2002; 92(3):385-7.
68. Nainan OV, Khristova ML, Byun K, et al. Genetic variation of hepatitis B surface antigen coding region among infants with chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 2002; 68(3):319-327.
69. Obriadina A, Meng J, Lopareva E, et al. Antigenic properties of recombinant proteins of hepatitis E virus. In: Margolis HS, Alter MJ, Conlon R, Dienstag J, Liang J, editors. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Atlanta: International Medical Press, 2002: 119-123.
70. Obriadina A, Meng J, Ulanova T, et al. A new enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl 3:S360-S364.
71. Pisu M, Meltzer MI, Lyerla R. Cost-effectiveness of hepatitis B vaccination of prison inmates. *Vaccine* 2002; 21(3-4):312-321.
72. Roberts EA, Yeung L. Maternal-Infant Transmission of Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology*; 36(5): s106-s113.
73. Robertson BH, Margolis HS. Primate hepatitis B viruses - genetic diversity, geography and evolution. *Rev Med Virol* 2002; 12(3):133-141.
74. Thorpe LE, Ouellet LJ, Hershov R, et al. Risk of hepatitis C virus infection among young adult injection drug users who share injection equipment. *Am J Epidemiol* 2002; 155(7):645-653.
75. Tokars JL, Frank M, Alter MJ, et al. National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States, 2000. *Semin Dial* 2002; 15(3):162-171.
76. Williams IT, Gretch D, Fleenor ME, et al. Hepatitis C virus RNA concentration and chronic hepatitis in a cohort of patients followed after developing acute hepatitis C. In: Margolis H.S., Alter MJ, Liang TJ, Dienstag JL, editors. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Atlanta: International Medical Press, 2002: 341-344.
77. Yokosawa J, Ulanova T, Ioshimoto LM, et al. Antigenic properties of wild-type and mutant hepatitis B virus surface antigens. In: Margolis HS, Alter MJ, Dienstag J, Liang J, editors. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Atlanta: International Medical Press, 2002: 155-159.
78. National Committee for Quality Assurance. State of health care quality report, 2003: adolescent immunization status. Washington, DC: National Committee for Quality Assurance; 2005. Available at [http://www.ncqa.org/sohc2003/adolescent\\_immunization\\_status.htm](http://www.ncqa.org/sohc2003/adolescent_immunization_status.htm).
79. Laboratory biosafety manual. Third edition. World Health Organization. Geneva 2004

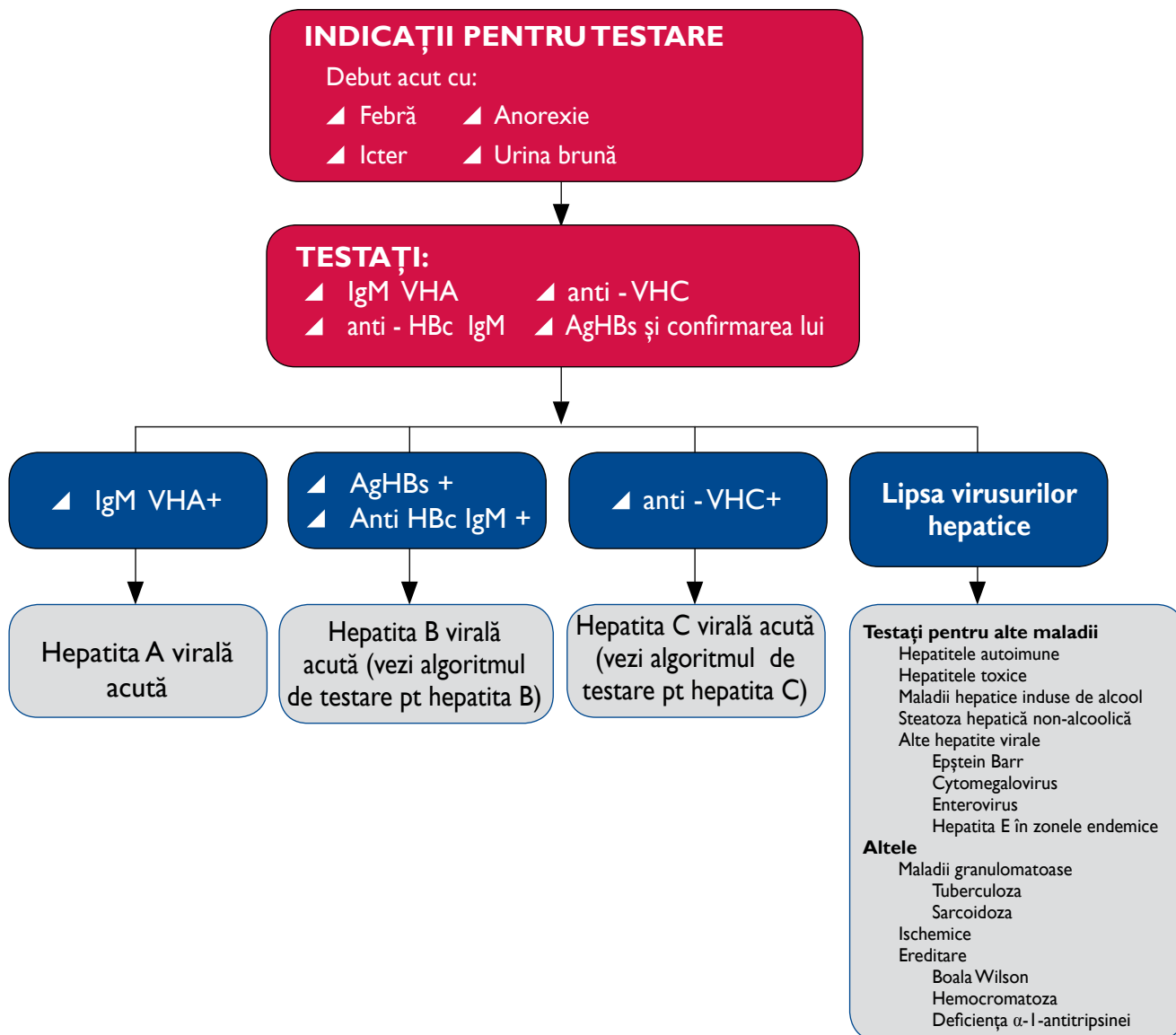
**ANEXA****ALGORITMUL DE TESTARE A HEPATITELOR VIRALE**

(recomandări CDC, OMS)

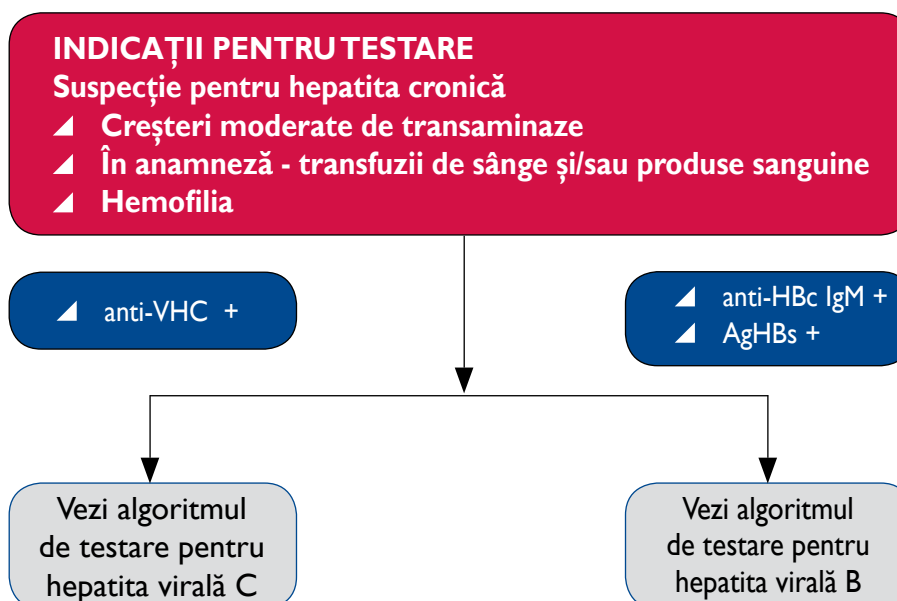




## I. ALGORITMUL DE TESTARE PENTRU HEPATITA ACUTĂ

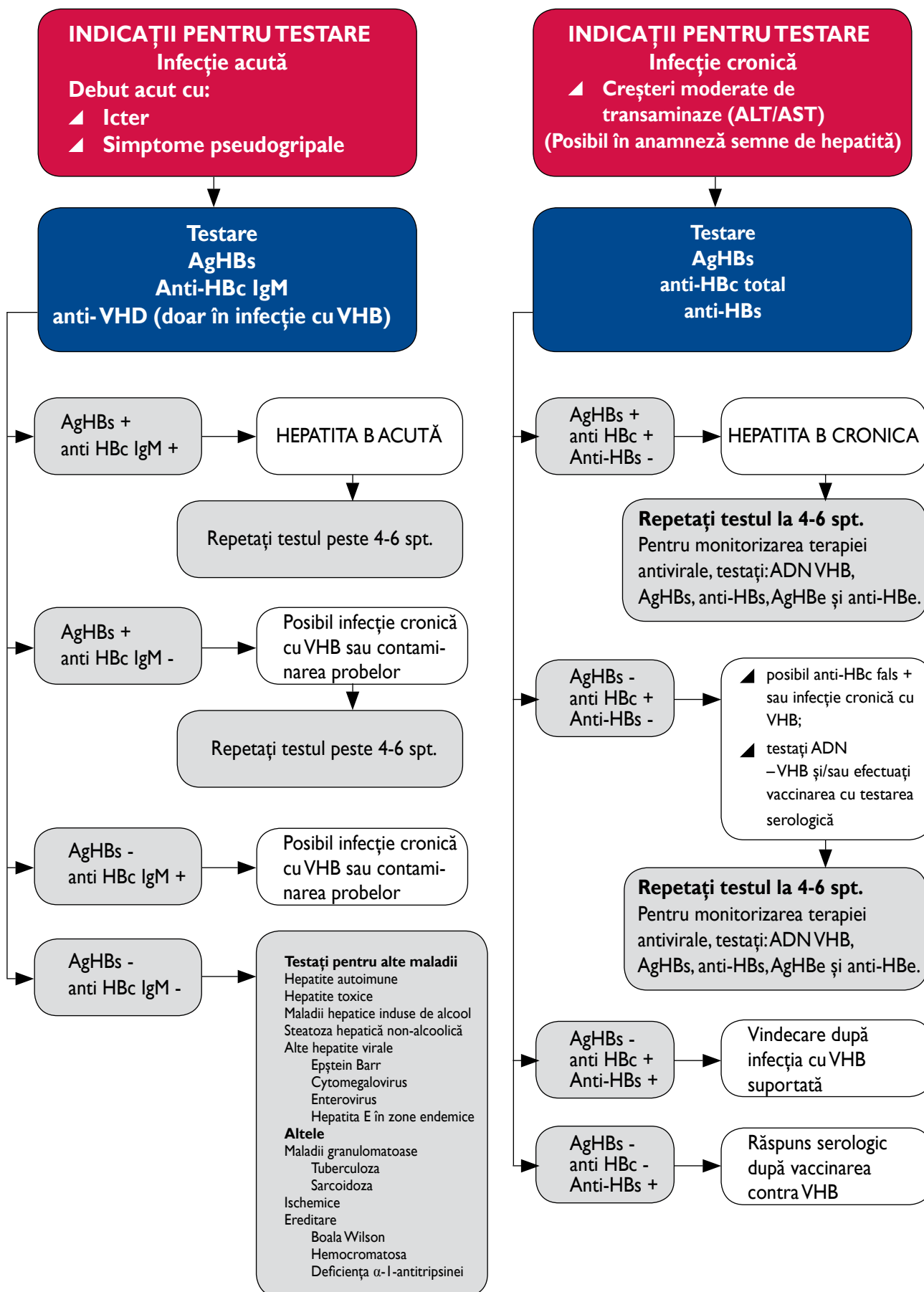


## 2. ALGORITMUL DE TESTARE PENTRU HEPATITA CRONICĂ





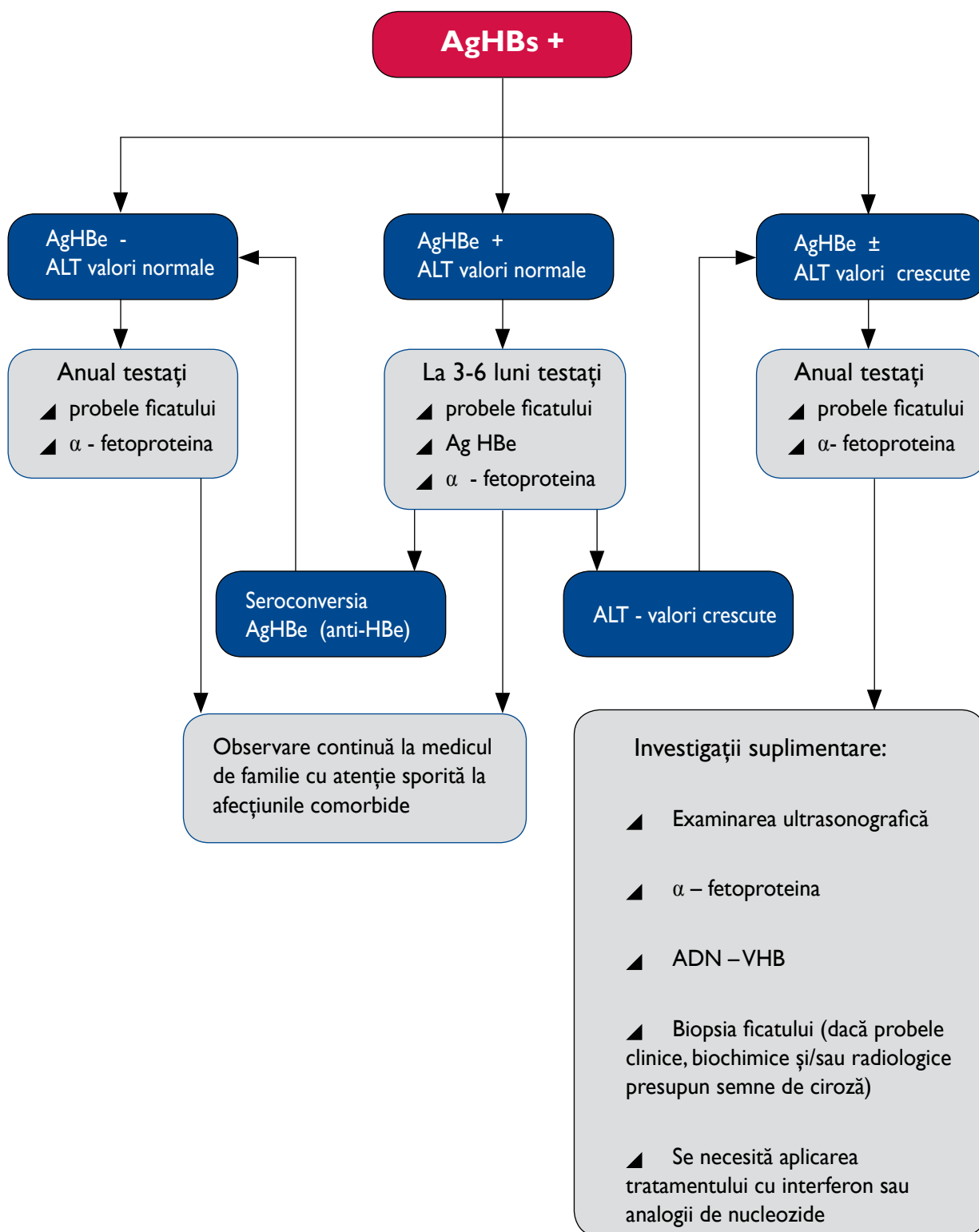
### 3. ALGORITMUL DE TESTARE PENTRU HEPATITA VIRALĂ B





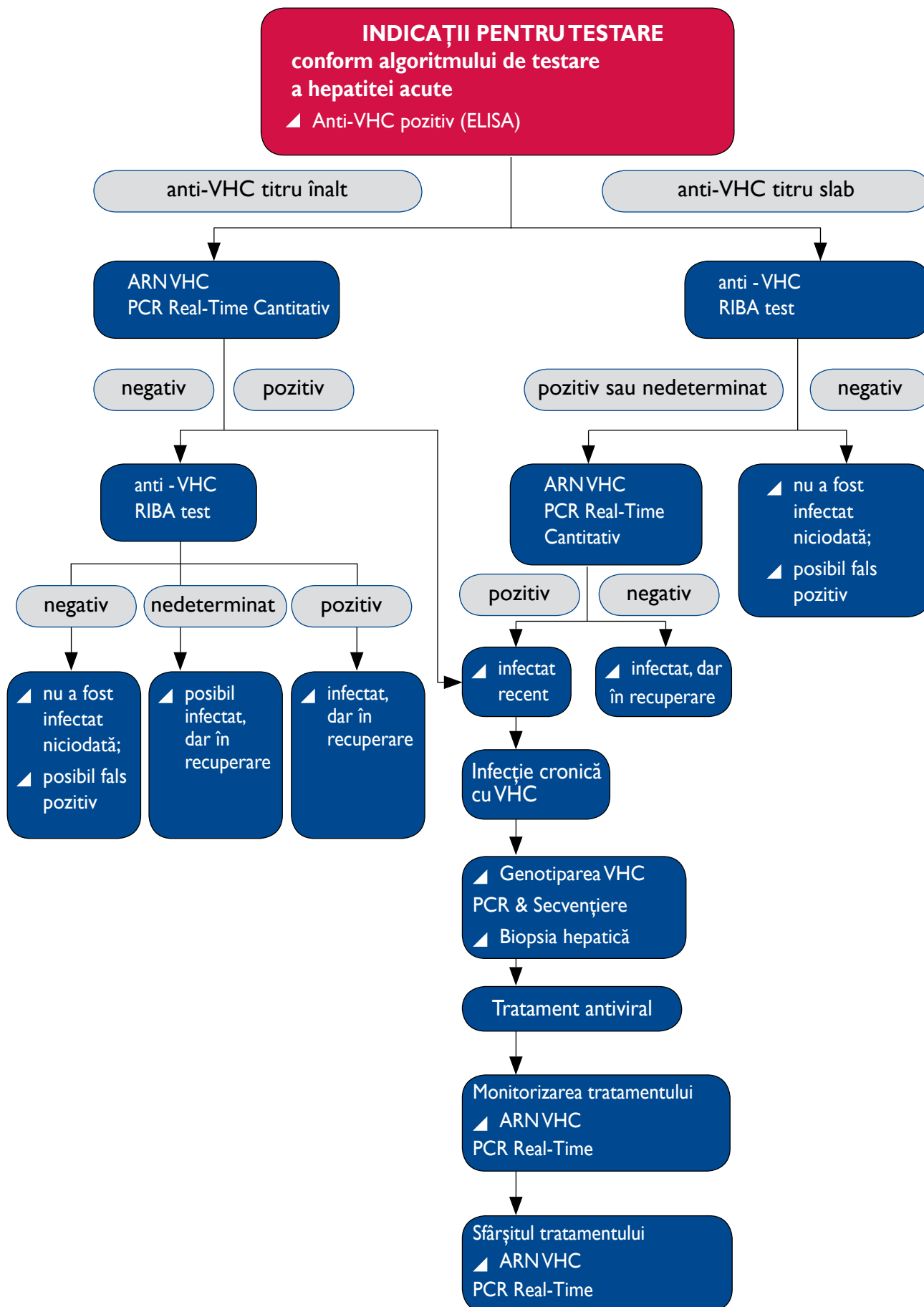


## 4. ALGORITMUL DE TESTARE A PERSOANELOR CU AgHBs POZITIV



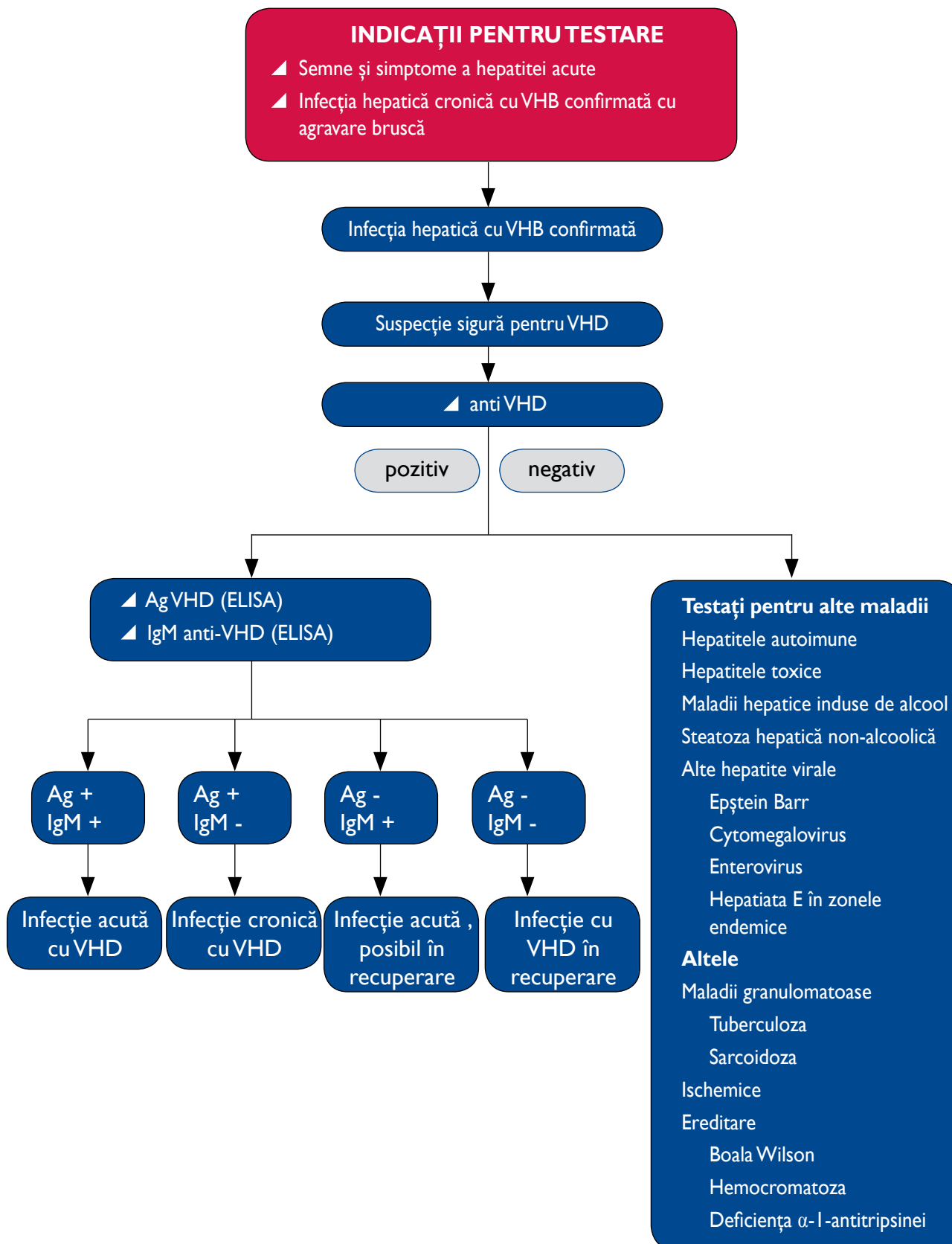


## 5. ALGORITMUL DE TESTARE PENTRU HEPATITA VIRALĂ C





## 6. ALGORITMUL DE TESTARE PENTRU HEPATITA VIRALĂ D







**Proiectul USAID “Prevenirea HIV/SIDA si Hepatitelor B si C”**

Date de contact:

**202 Stefan cel Mare Ave, 8th floor  
Chisinau MD-2004  
Republic of Moldova**

**Tel.: (+373 22) 755 536**

**Fax.: (+373 22) 755 510**

**E-mail: [office@phh.md](mailto:office@phh.md)**

**USAID Preventing HIV/AIDS and Hepatitis B&C Project**

Contact information:

**202 Stefan cel Mare Ave, 8th floor  
Chisinau MD-2004  
Republic of Moldova**

**Tel.: (+373 22) 755 536**

**Fax.: (+373 22) 755 510**

**E-mail: [office@phh.md](mailto:office@phh.md)**