

Занятие 28.

Микробиологическая диагностика вирусных гепатитов

prof. Akif Qurbanov

Обсуждаемые вопросы:

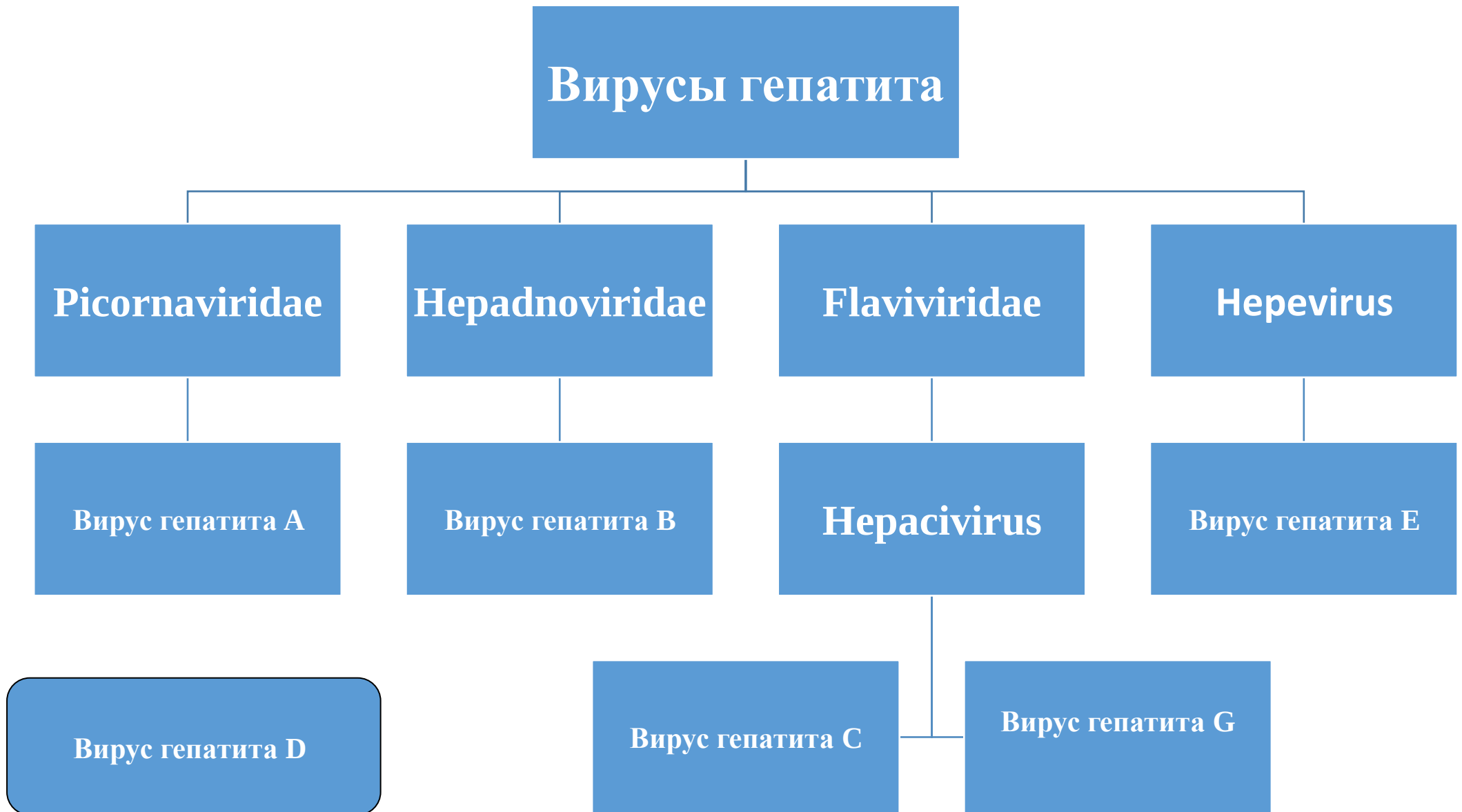
- 1. Проблема вирусных гепатитов
- 2. Классификация вирусных гепатитов.
- Вирус гепатита А. Таксономия. Структурные особенности вириона, культивирование, устойчивость, пути заражения. Патогенез заболевания, клиника. Микробиологическая диагностика, специфическое лечение и профилактика.
- Вирус гепатита В. Таксономия. Структурные особенности вириона, антигены - HBs, HBc, HBe, HBx, особенности репродукции, культивирование, персистенция, пути заражения. Патогенез заболевания, механизм персистенции, клиника. Иммунология. Микробиологическая диагностика, специфическое лечение и профилактика
- Вирус гепатита Д. Особенности строения вириона, антигены, культивирование. Особенности дельта-инфекции (коинфекция, суперинфекция), патогенез заболевания. Микробиологическая диагностика, лечение и профилактика
- Вирус гепатита С. Структурные особенности вириона, генотипы, антигенная изменчивость, культивирование, персистенция, пути заражения. Патогенез, клиника, хроническое течение болезни. Микробиологическая диагностика, лечение и профилактика
- Вирус гепатита Е. Структурные особенности вириона, геном, антигены, культивирование, персистенция, пути заражения. Патогенез, клиника, осложнения заболевания (во время беременности). Микробиологическая диагностика, основные маркеры инфекции, специфическое лечение и профилактика
- Вирус гепатита G. Структурные особенности вириона, геном, изменчивость, эпидемиология, клинические формы, осложнения. Микробиологическая диагностика и лечение.

Цель занятия:

- ознакомить студентов с проблемой вирусных гепатитов, предоставить информацию о морфобиологических особенностях вирусов гепатитов А, В, С, D, Е, G, ознакомить с методами микробиологической диагностики вирусных гепатитов.

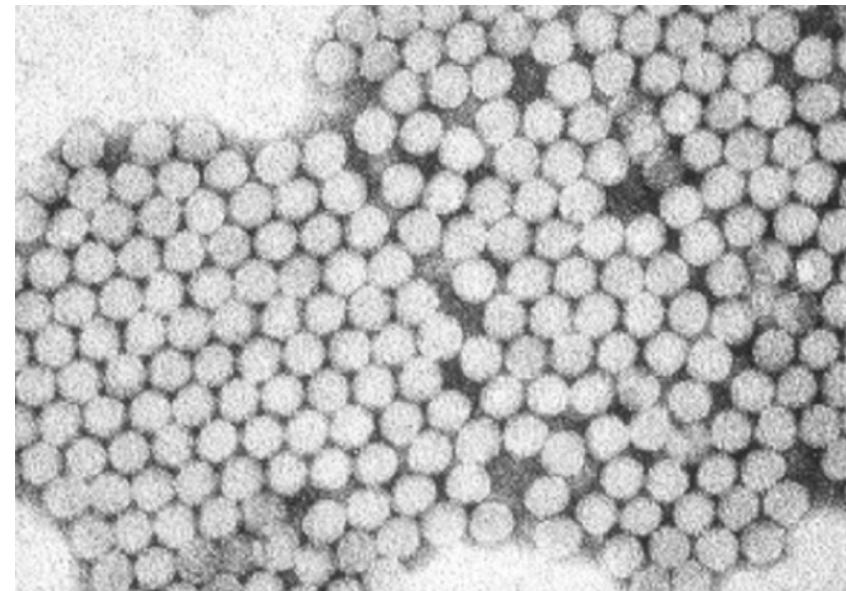
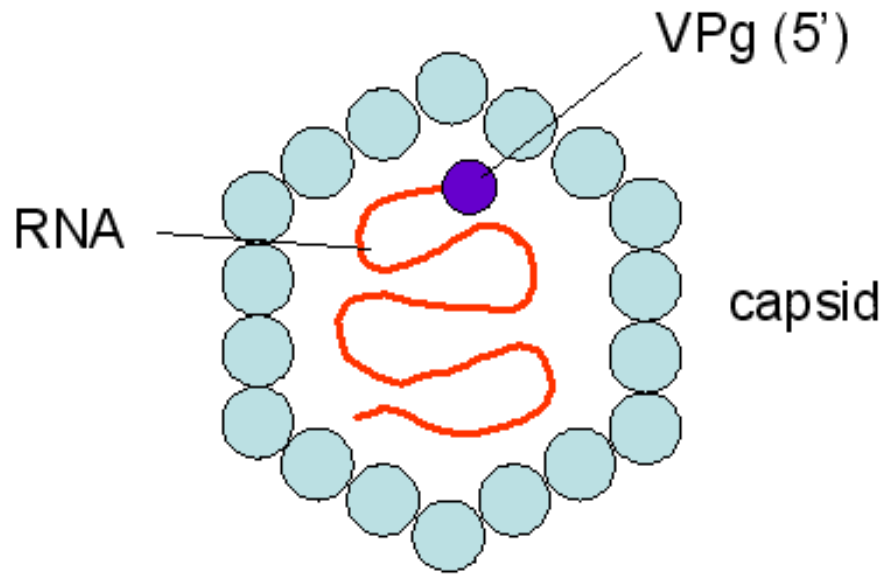
Классификация вирусных гепатитов

- Вирусные гепатиты широко распространены среди населения всех стран мира . Они подразделяются на энтеральные – гепатиты А и Е, парентеральные – гепатиты В, С, D, G и др.
- Несмотря на то ,что возбудители вирусных гепатитов относятся к различным таксономическим группам, их объединяет ***гепатотропность***.



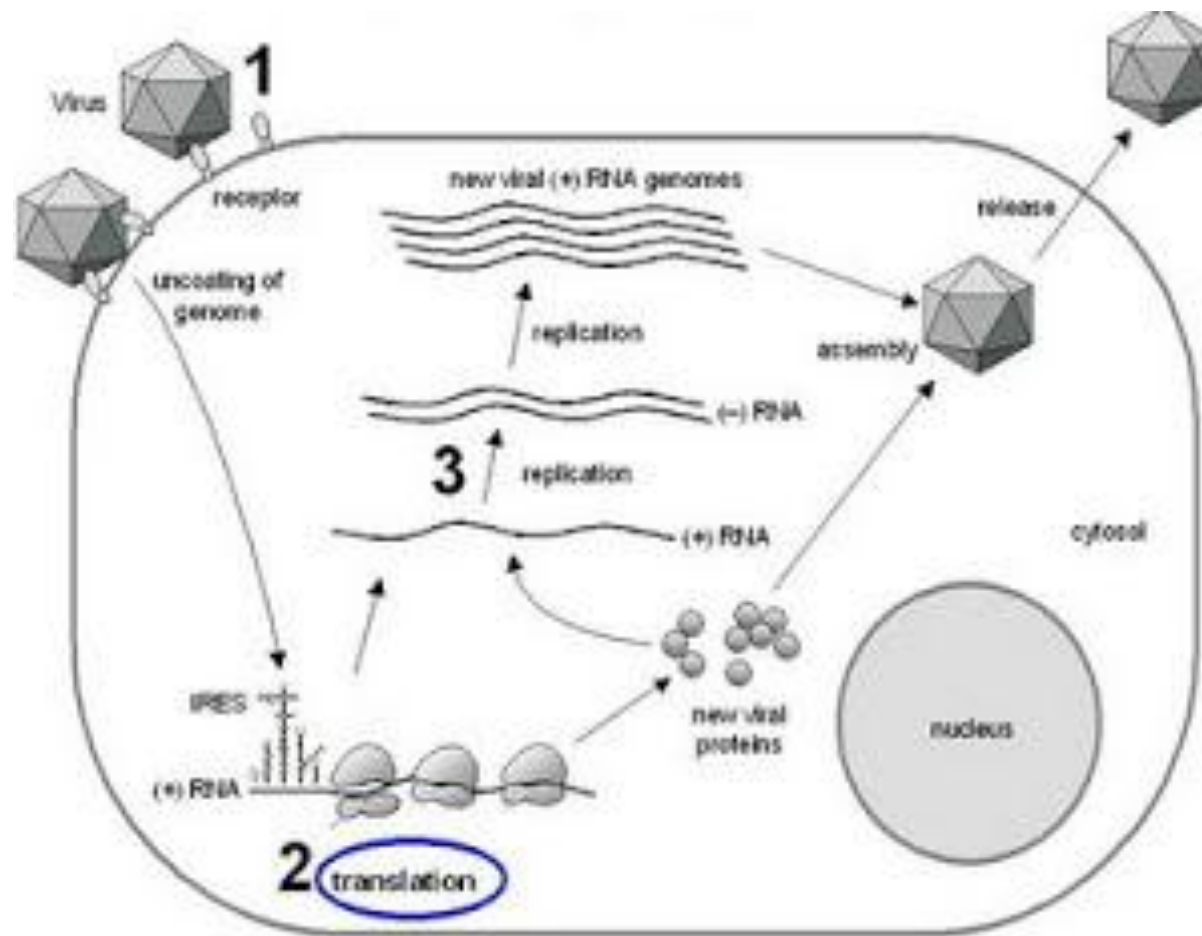
Вирус гепатита А

- ВГА относится к пикорнавирусам
- Это РНК-содержащий, просто организованный вирус диаметром 27-32 нм, сферической формы, имеет один серотип.



Вирус гепатита А

- *Репродукция вируса* схожа с репродукцией прочих пикорнавирусов.
- Вирус культивируют в различных культурах клеток приматов, но свежие изоляты с трудом развиваются в культуре клеток.
- Не вызывает цитопатического эффекта



Вирус гепатита А

- ВГА устойчив к высокой температуре, он сохраняется при 60°C в течение часа , при высушивании – до одного месяца ,при -20°C сохраняется годами.
- Устойчив в окружающей среде .Инактивируется при кипячении в течение 5 минут.
- Чувствительны к действию 1% раствора гипохлорита.

Источник инфекции и пути передачи

- Гепатитом А болеют преимущественно дети в возрасте от 4 до 15 лет. Источником инфекции является больной человек.
- Механизм заражения – фекально-оральный: передаются через воду, пищевые продукты, предметы обихода, грязные руки.
- Вирусы выделяются с фекалиями начиная со второй половины инкубационного периода и в начале клинических проявлений: в это время больные наиболее опасны для окружающих.
- С появлением желтухи интенсивность выделения вирусов снижается.

Патогенез и клинические проявления гепатита А

- После проникновения в организм человека энтеральным путем репродукция вируса происходит в кишечнике. Вирус гепатита А обладает гепатотропностью, через портальную вену они проникают в печень и реплицируются в цитоплазме гепатоцитов. Цитотоксические Т-лимфоциты взаимодействуя с инфицированными гепатоцитами приводят к их лизису, в крови повышается содержание трансаминаз и билирубина.
- Инкубационный период составляет 10-50 дней, чаще около месяца. Заболевание начинается остро с повышения температуры (38°C и выше), диспептических нарушений (тошнота, рвота и др.). Возможно появление **желтухи** на первой неделе заболевания. У детей обычно бессимптомное течение гепатита А, у взрослых заболевание протекает тяжело. Заболевание продолжительностью 2-3 недели заканчивается выздоровлением.

Гепатит



Микробиологическая диагностика гепатита А

- Вирусные антигены можно обнаружить в фекалиях больного с помощью иммунной электронной микроскопии . Выявить вирус в крови и фекалии возможно с помощью ПЦР.
- Антитела в крови выявляют с помощью ИФА. В начале заболевания в крови появляются IgM , которые сохраняются в организме в течение 3-6 месяцев.Появление антител IgG обеспечивает пожизненный иммунитет. Таким образом, определение антител IgM наиболее важный тест при диагностике гепатита А.

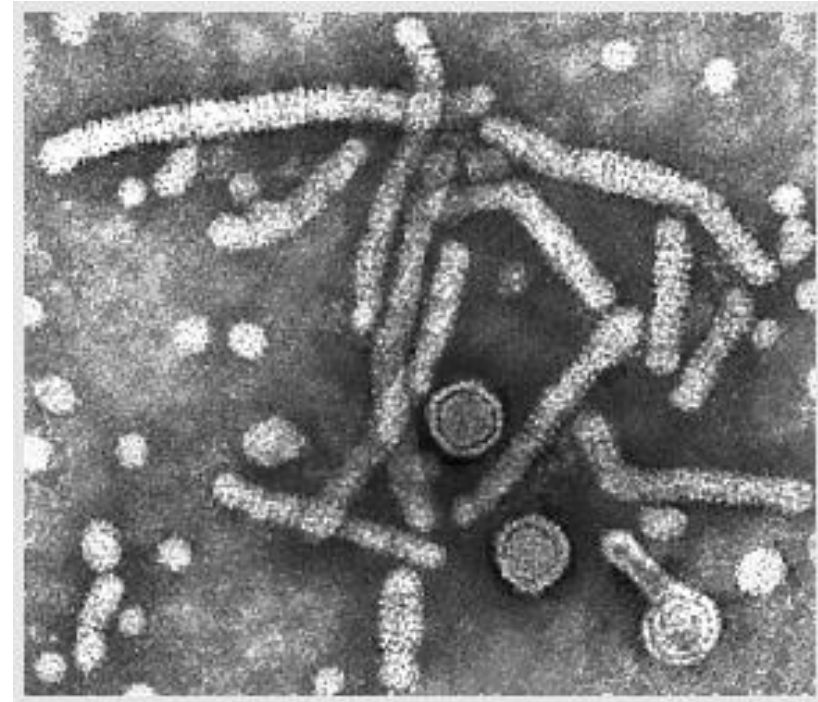
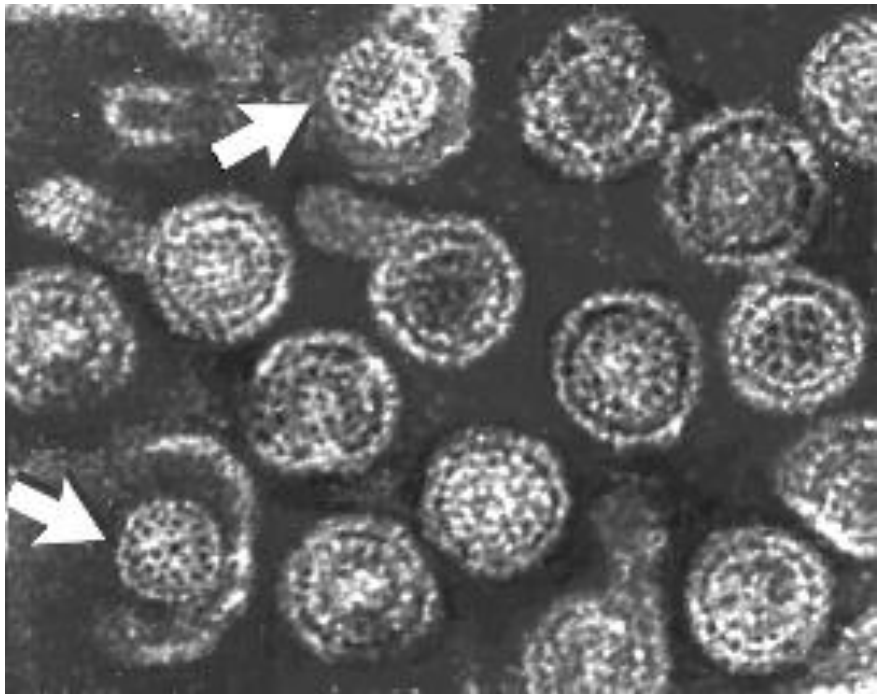
Лечение и профилактика гепатита А

- **Лечение** . Этиотропной терапии нет, проводят симптоматическое лечение .
- **Профилактика** . Для специфической пассивной профилактики используют в основном ***иммуноглобулин по эпидпоказаниям***. Иммунитет сохраняется около 3 месяцев. Для специфической активной профилактики разработана инактивированная культуральная концентрированная вакцина, а также ***рекомбинантная вакцина*** .

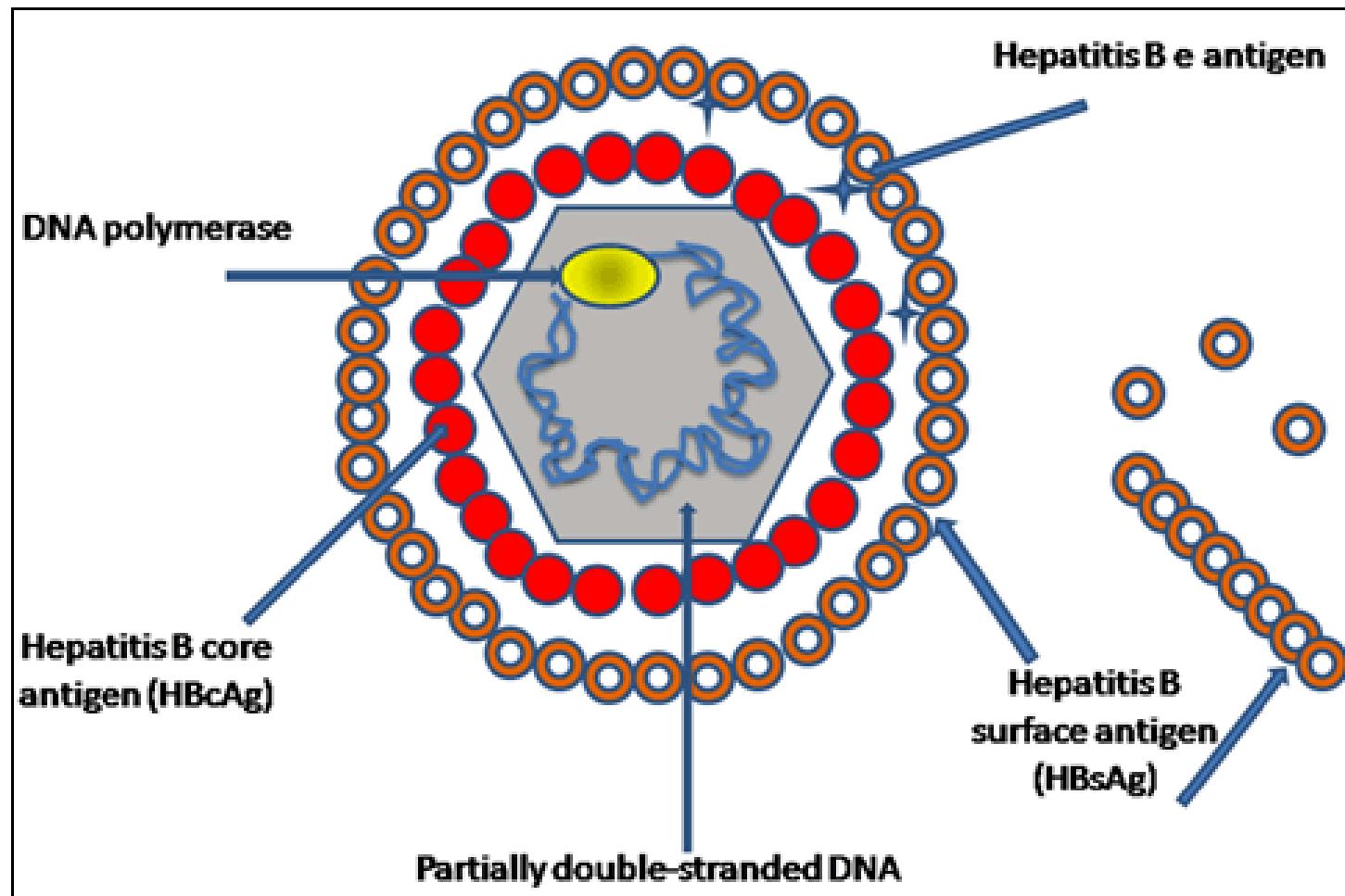
Вирус гепатита В

- Вирус гепатита В (ВНВ) относится ДНК-содержащим вирусам к семейству *Herpadnaviridae* роду *Orthoherpadnavirus*. Впервые был обнаружен под электронным микроскопом в 1970 г. Дейном, получив название «частица Дейна».
- **Морфология и антигенная структура.** ВНВ является сложноорганизованным ДНК-содержащим вирусом сферической формы диаметром 42 нм. Он состоит из сердцевины диаметром 28 нм, построенной по кубическому типу симметрии, состоящей из 180 белковых частиц, составляющих сердцевинный HBs-антиген, и липидсодержащей оболочки, содержащей поверхностный HBs-антиген. Внутри сердцевины находятся ДНК, фермент ДНК-полимераза, обладающая ревертазной активностью, и концевой белок HBe-антиген.
- Геном представлен двунитевой ДНК кольцевой формы, у которой одна цепь (плюс-цепь) укорочена. Таким образом, ДНК генома состоит из полноценной (минус-цепь) L-цепи (от англ., *long*) и укороченной (плюс-цепь) S-цепи (от англ., *short*). Полноценная минус-цепь ковалентно связана с ДНК-полимеразой, которая достраивает плюс-цепь до полноценной структуры. Геном записан на минус-цепи.

Вирус гепатита В



Структура частицы Дейна



HBs-антиген

- ВГВ имеет сложное антигенное строение. В липопротеиновой оболочке вируса находится **HBs-антиген** (от англ. *surface* - поверхностный) , который локализован в гидрофильном слое на поверхности вириона. HBs-антиген обнаруживается в крови не только в составе вирионов , но и в виде самостоятельных фрагментов.
- Впервые антиген был обнаружен в 1963 г. Б.Блумбергом в крови австралийских аборигенов, поэтому получил название «австралийского антигена».
- Присутствие HBs-антигена в крови свидетельствует об инфицированности организма ВГВ.

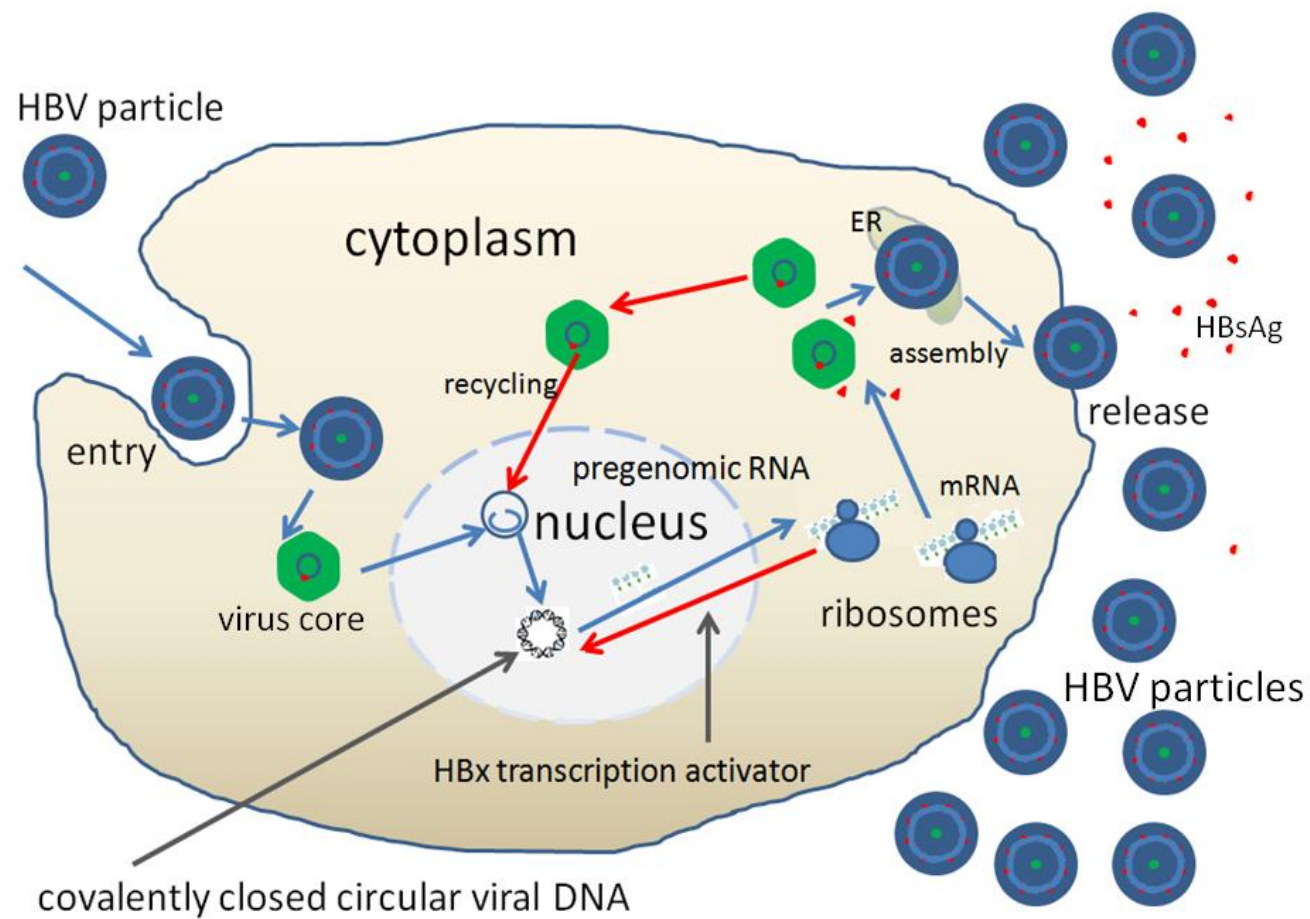
HBc-антиген, HBe-антиген, HBx-антиген

- Сердцевинный **HBc-антиген** (от англ. *core* - сердцевина) никогда не обнаруживается в свободном состоянии в крови. Его можно обнаружить в зараженных вирусом гепатоцитах.
- **HBe-антиген** (от англ. *envelope* – оболочка) также является сердцевинным антигеном, производным HBc-антигена. Появление HBe-антигена в крови связано с репликацией вируса в гепатоцитах .
- **HBx-антиген** – опосредует злокачественную трансформацию клеток печени и можно обнаружить в крови. Этот антиген связывает белок p53, который выполняет функцию супрессора опухолевого роста.

Репродукция

- После адсорбции на поверхности гепатоцитов через HBs- антиген вирус проникает в клетку посредством эндоцитоза
- После депротеинизации, вирусная ДНК-проникает в ядро гепатоцита, где происходит достраивание неполной плюс-нити ДНК и формирование двухцепочечной вирусной ДНК
- На двухцепочечной вирусной ДНК происходит синтез мРНК и прегеномной РНК
- Полимераза вируса за счет ревертазной активности синтезирует на прегеномной РНК полноценную минус-нить ДНК. В дальнейшем минус-нить служит матрицей для синтеза неполной плюс-нити ДНК.
- Сердцевина вируса приобретает оболочку и HBs-антиген при отпочковывании через мембрану комплекса Гольджи
- Вирион выходит из клетки экзоцитозом

Схема репродукции вируса гепатита В



Интеграция

- Интегративная инфекция сопровождается интеграцией кольцевой ДНК вируса в хромосому гепатоцита с образованием **провируса**
- При этом наблюдается синтез HBs-антигена и обнаружение его в крови. В крови также обнаруживаются **HBsAg**-содержащие **сферические** (диаметром 22нм) или **нитевидные** (длиной 50-330нм) частицы. Они не обладают инфекционностью, но высокоиммуногенны

Культивирование

- ВГВ не культивируется на куриных эмбрионах и некоторых культурах клеток .
- ВГВ культивируется только в культуре клеток , полученной из ткани первичного рака печени, в виде персистирующей инфекции, без оказания цитопатического эффекта и с малым накоплением вирионов.
- К вирусу чувствительны приматы: шимпанзе, гориллы, орангутанги, которые используются в качестве экспериментальной модели .

Резистентность к условиям внешней среды

- ВГВ отличается высокой устойчивостью к факторам окружающей среды и дезинфицирующим веществам.
- Температуру 37°C выдерживает около часа, в высушенном состоянии при 25°C стабилен в течение недели. Температуру -20°C выдерживает более 10 лет. При нагревании до 100°C в течение 5 мин сохраняет инфекционную активность.
- Под действием 0,5% гипохлорита инактивируется в течение 3 мин. Термоустойчивость вируса повышается если он находится в крови, т.к. вирус защищен белками крови. В связи с этим, для обеззараживания крови используют гипохлорит в высоких концентрациях (5%) .

Источник инфекции и пути передачи

- Источником инфекции являются вирусоносители и больные люди.
- Основной путь передачи вируса гепатита В – парентеральный. У инфицированных пациентов вирус встречается во всех биологических жидкостях.
- Заражение происходит при парентеральных манипуляциях, переливании крови и при введении препаратов из крови, а также при половых контактах.
- ВГВ передается трансплацентарно от матери плоду и при прохождении плода через родовые пути.

Патогенез заболевания

- Инфекционный процесс наступает после проникновения вируса в кровь. Инкубационный период 3-6 месяцев. Место первичной репликации точно не установлено. Размножение вируса в гепатоцитах происходит через две недели после инфицирования.
- ВГВ из крови эндоцитозом проникает в гепатоцит. После проникновения вируса в гепатоцит начинается его репликация за счет достраивания плюс-нити ДНК до полноценной структуры, после чего возможно развитие интегративной и продуктивной типов инфекций.

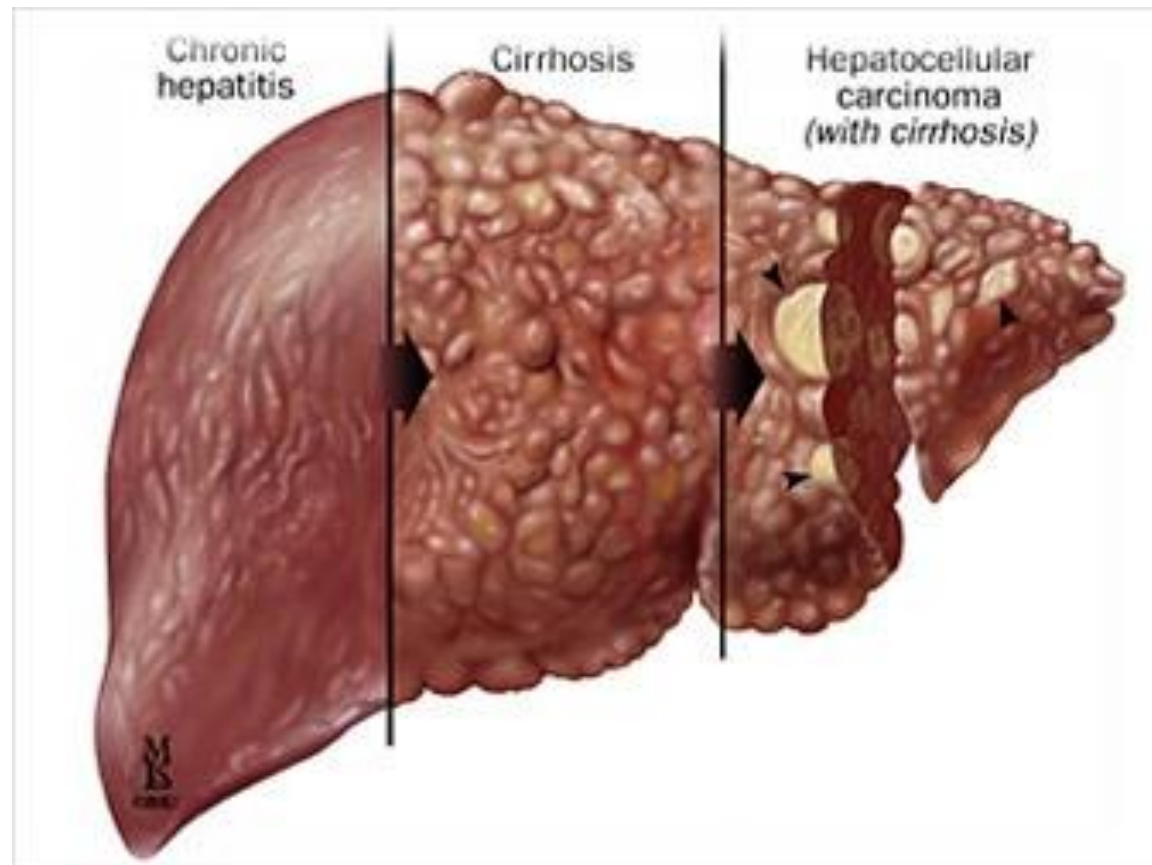
Патогенез заболевания

- **Интегративная инфекция** сопровождается интеграцией кольцевой ДНК вируса в хромосому гепатоцита с образованием **провируса**. При этом наблюдается синтез HBs-антигена. Клинически это проявляется **вирусоносительством**, показателем которого является обнаружение в крови HBs-антигена.
- **В процессе продуктивной инфекции** происходит формирование новых вирусных частиц. Клинически это проявляется активным инфекционным процессом в виде острого или хронического гепатита. Вирус сам не обладает цитолитическим эффектом и не разрушает гепатоцит. Повреждение опосредуется Т-лимфоцитами, которые взаимодействуя с инфицированными гепатоцитами, вызывают их лизис.

Клиника заболевания

- **Острая форма.** К основным клиническим симптомам относятся поражения печени, диспептические нарушения, головная и мышечная боль, повышение уровня желчных пигментов в крови и моче и в большинстве случаев развитие желтухи. Возможны также безжелтушные формы заболевания.
- Острый гепатит в 5-10% случаев переходит в хроническое течение, с развитием цирроза и пожизненного носительства вируса гепатита В.
- **Хроническая форма.** Различают две формы: персистирующий и хронический активный гепатит. Хронический персистирующий гепатит характеризуется умеренным течением и сопровождается незначительным повышением в крови печеночных ферментов. Для хронического активного гепатита характерно тяжелое течение, в некоторых случаях проявляется в виде острого гепатита. Хроническая форма гепатита В приводит к острой печеночной недостаточности, циррозу и первичной карциноме печени, приводящими к **летальному исходу**.

Изменения в печени при гепатите В



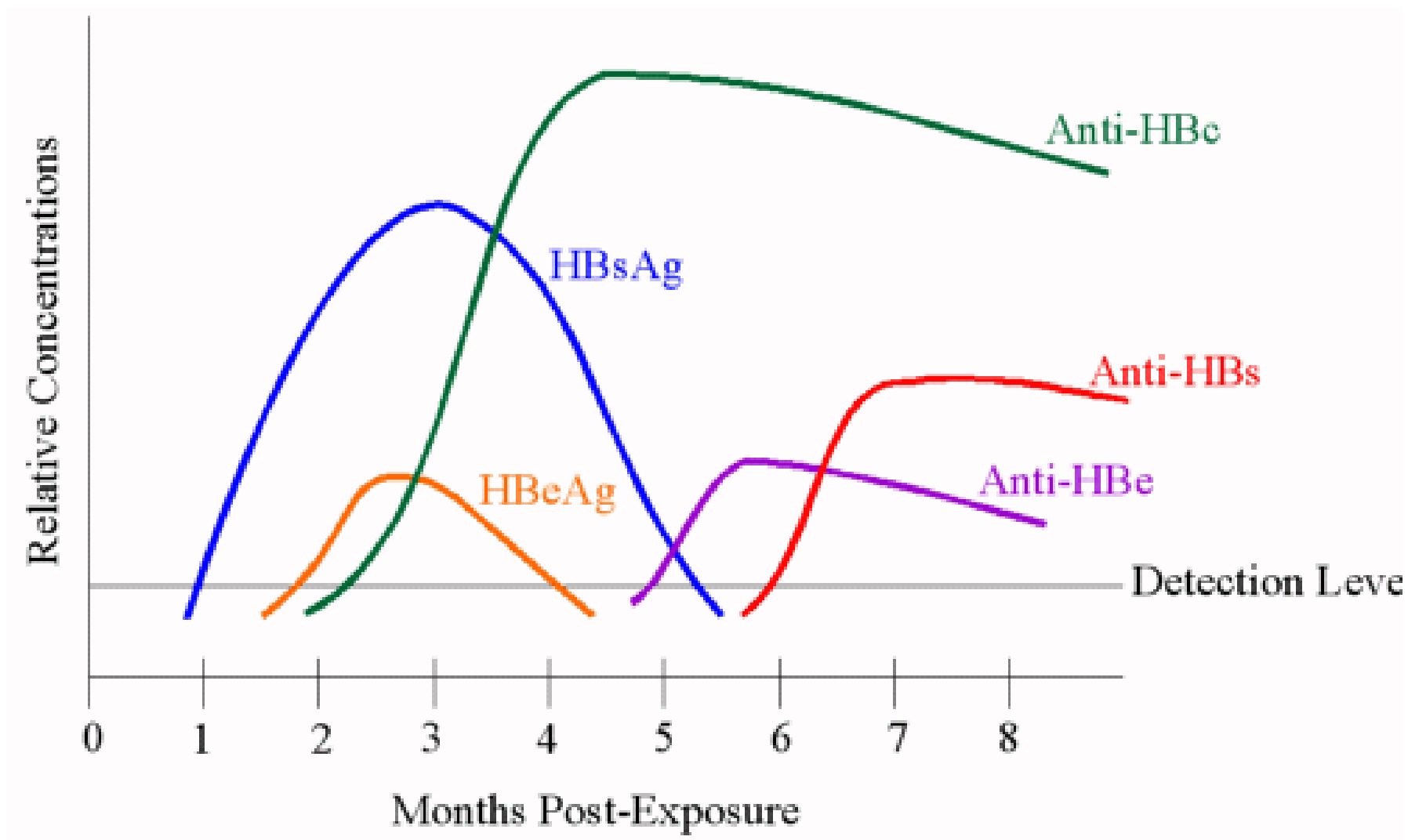
Микробиологическая диагностика

- **Микробиологическая диагностика** основана на выявлении в сыворотке крови больного гепатитом В антигенов и антител с помощью ИФА, а также обнаружения вирусной ДНК методом ПЦР.
- HBs-антиген определяется в крови через 2-6 недель после проявления клинических и биохимических признаков заболевания и обычно исчезает через 6 месяцев.
- При хроническом вирусоносительстве HBs-антиген присутствует в сыворотке крови больного дольше 6 месяцев - в течение многих лет

Микробиологическая диагностика

- Обнаружение анти-НВс-IgM антител в период клинических симптомов заболевания указывает на репликацию вируса.
- НВе-антиген обнаруживается вскоре после появления клинических симптомов заболевания.
- При хроническом вирусоносительстве анти-НВе-антитела циркулируют в сыворотке крови больного более чем 6 месяцев.

Динамика серологических маркеров при гепатите В



Worldwide Rates of Chronic Hepatitis B



Лечение

- Для противовирусного лечения гепатита В используют рекомбинантный **альфа-интерферон**, однако этот препарат обеспечивает длительную ремиссию только у 35% пациентов
- Несмотря на то, что **ламивудин**, являющийся ингибитором ревертазы, уменьшает уровень ДНК вируса, после прекращения его приема или в результате развившейся резистентности может наблюдаться возобновление репликации вируса

Профилактика

- Важнейшей и наиболее эффективной мерой профилактики гепатита В является **предотвращение** попадания вируса при парентеральных манипуляциях и переливаниях крови (применение одноразовых шприцев, систем переливания крови, инструментов, проверка на гепатит В по наличию HBs-антигена в крови доноров крови, органов и тканей, используемых для трансплантации и искусственного оплодотворения).
- Специфическая профилактика осуществляется рекомбинантной генно-инженерной вакциной, содержащей HBs-антиген. Вакцинации подлежат все новорожденные в первые 24 часа, далее – по календарю прививок. Среди взрослого населения трехкратной вакцинации подвергаются лица, относящиеся к группе высокого риска заражения гепатитом В. Длительность поствакцинального иммунитета – не менее 7 лет.
- В случае риска заражения (при контакте с инфицированным материалом) используется **содержащий высокий титр антител против ВГВ специфический иммуноглобулин**, обычно в комбинации с вакциной

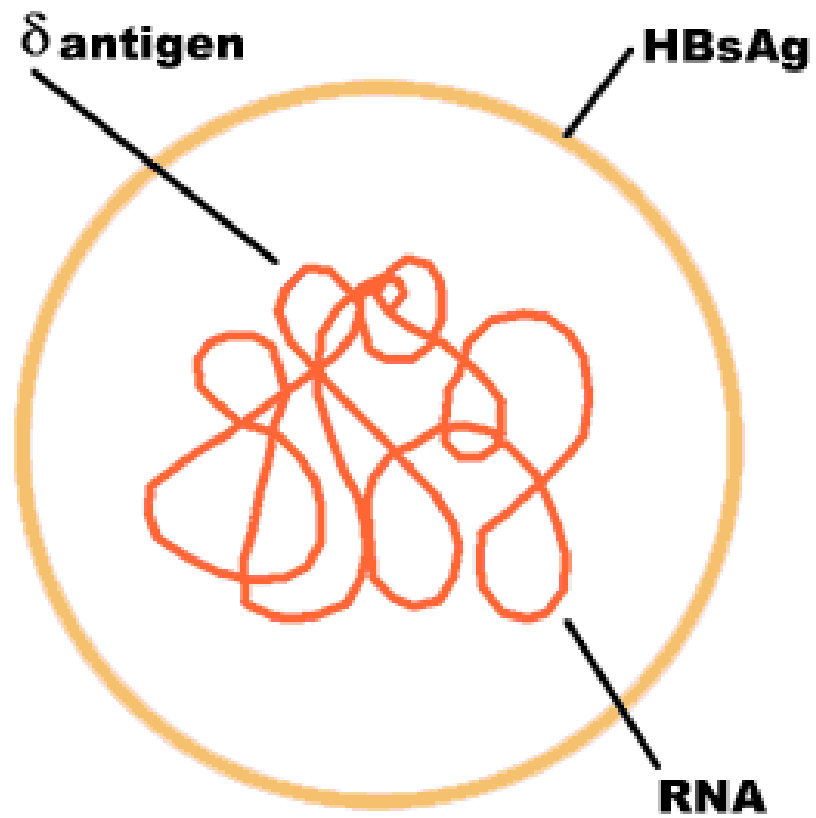
Рекомбинантная вакцина



Вирус гепатита D

- **Вирус гепатита D** является сателлитом вируса гепатита В, в отдельности не вызывает заболевания. Вирус можно обнаружить у некоторых пациентов с гепатитом В.
- HDV не классифицирован
- Вирион сферической формы диаметром 35-37 нм. Поверхностный HBs-антиген формирует его наружную оболочку.
- Геном вируса образует однонитевая кольцевая минус-РНК. РНК-геном вируса гепатита D очень мал и кодирует только **сердцевинный** белок, называемый дельта-антиген.

Вирус гепатита D



Вирус гепатита D

- Вирус является сателлитом, не способным к самостоятельной репродукции.
- Вирус может реплицироваться только в клетке, уже инфицированной вирусом гепатита В, поскольку вирус гепатита D использует поверхностный HBs-антиген вируса гепатита В.
- Соответственно, моноинфекция вирусом гепатита D абсолютно невозможна. При одновременном инфицировании гепатит протекает значительно тяжелее.

Гепатит D

- Источником инфекции являются носители вируса гепатита В, заражение аналогично инфицированию вирусом гепатита В .
- Инкубационный период длится 2-12 недель. Одновременное инфицирование HBV и HDV – **коинфекция** приводит к развитию умеренной формы болезни.
- Инфицирование HDV больных хронической формой гепатита – **суперинфекция** утяжеляет течение инфекции, приводя к развитию острой печеночной недостаточности и цирроза печени (фульминантный гепатит).

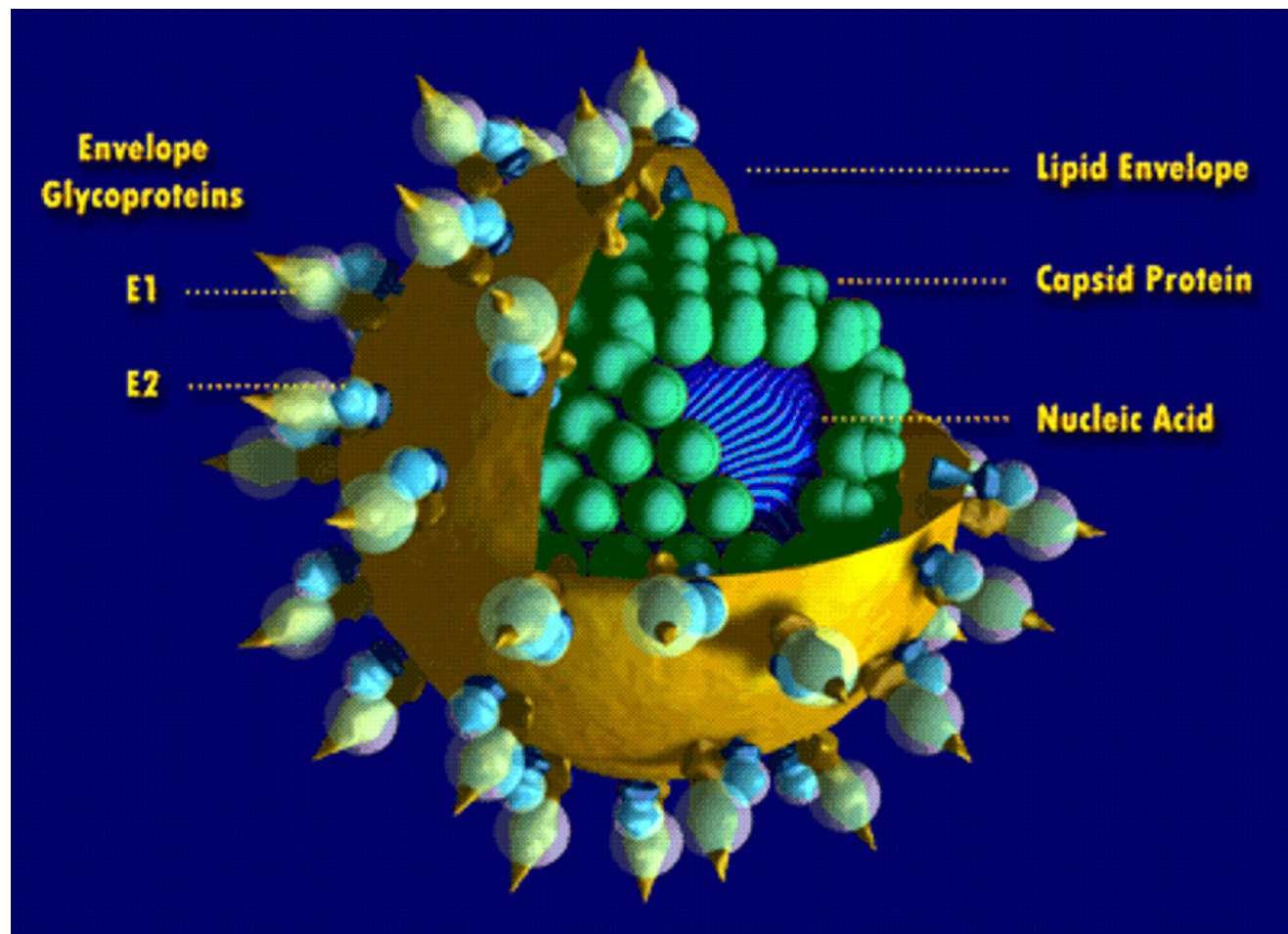
Диагностика гепатита D

- Диагностика основана на определении дельта-антигена и антител (анти-HDV IgM) с помощью ИФА в сыворотке крови больного.
- РНК вируса выявляют методом ПЦР.

Вирус гепатита С

- Вирус гепатита С (HCV) относится к семейству *Flaviviridae* роду *Hepacivirus*.
- Вирус гепатита С, схожий по структуре с другими вирусами семейства *Flaviviridae*, сложноустроенный сферической формы диаметром 50-60 нм. Геном образует однонитевая плюс-РНК. Нуклеокапсид снаружи окружен двухслойной липопротеиновой оболочкой, которая содержит на своей поверхности гликопротеины E1 и E2 (от англ. *envelope* - оболочка).
- Выделяют **6 генотипов**, которые в свою очередь подразделяются на 100 субтипов. По последовательности нуклеотидов генотипы отличаются между собой более чем на 25%, а субтипы - на 15-25%
- Наиболее часто распространены 1-4-ый генотипы вируса гепатита С

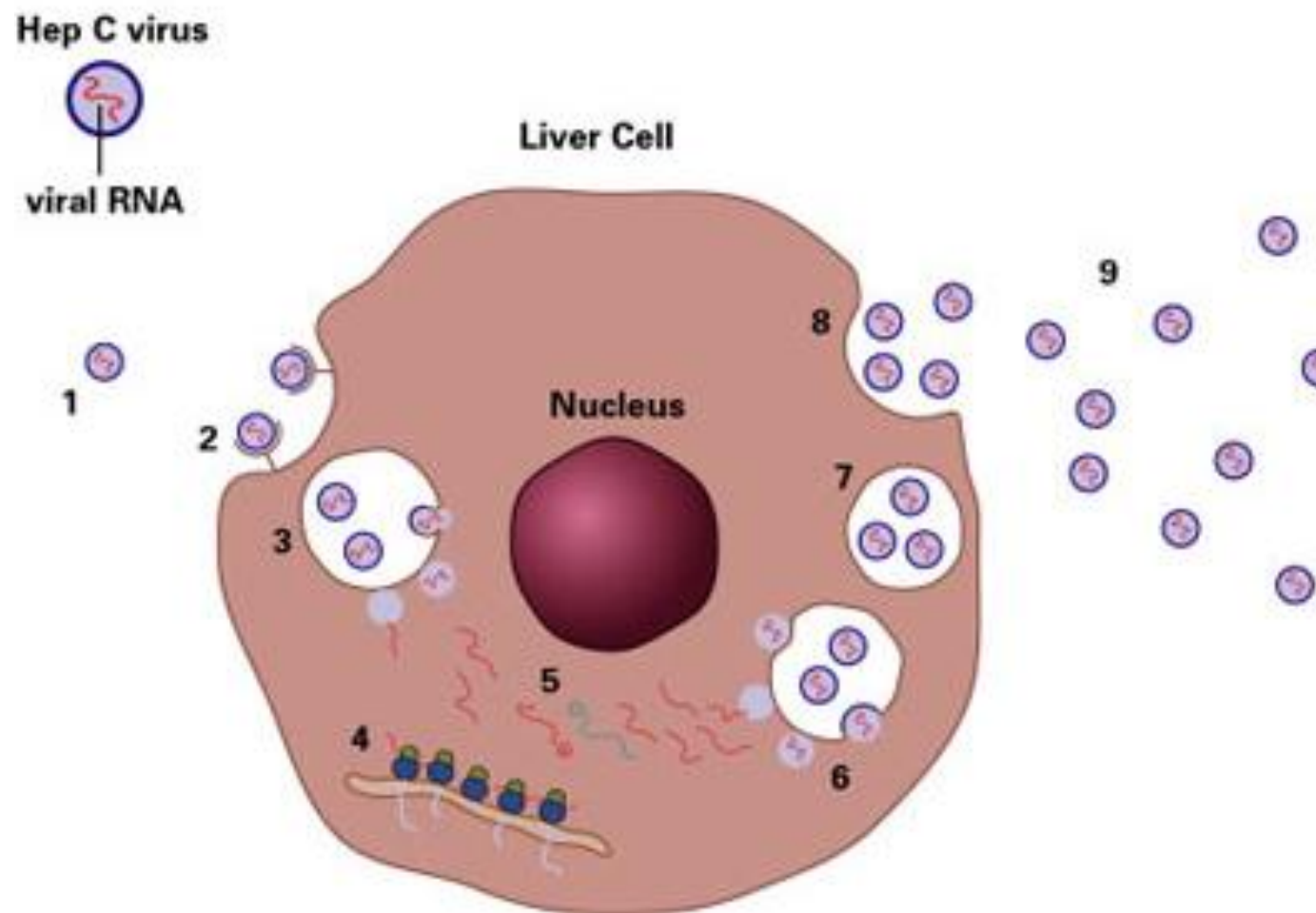
Вирус гепатита С



Репродукция

- Репродукция вируса гепатита С происходит в цитоплазме гепатоцитов клетки-хозяина. Вирус проникает в клетку путем **рецептор-зависимого** эндоцитоза. В последующем происходит слияние вирусной оболочки с **мембраной эндосомы**. **Геномная РНК** участвует в синтезе полипротеина. В результате расщепления полипротеина вирусными и клеточными протеазами происходит **формирование структурных и неструктурных белков вируса**. Созревание происходит путем почкования не через плазматическую мембрану, а через мембраны эндоплазматической сети. Зрелые вирионы собираются во **внутриклеточных** вакуолях.

Схема репродукции вируса гепатита С



Культивирование

- Вирус не культивируется на куриных эмбрионах, не обладает гемолитической и гемагглютинирующей активностью.
- В качестве экспериментальной модели заражают шимпанзе. Вирус трудно адаптируется к культивированию в культуре клеток.
- Чувствителен к эфиру, детергентам, УФ-лучам, нагреванию до 50°C.

Источник инфекции и пути передачи

- Источник инфекции – вирусоноситель и инфицированный человек.
- Заражение вирусом гепатита С аналогично заражению ВГВ.
- Трансплацентарное заражение ВГС происходит реже (3-10% случаев), не установлено случаев заражения через материнское молоко.
- Приблизительно 7-8% случаев заражения приходится на половой путь передачи.

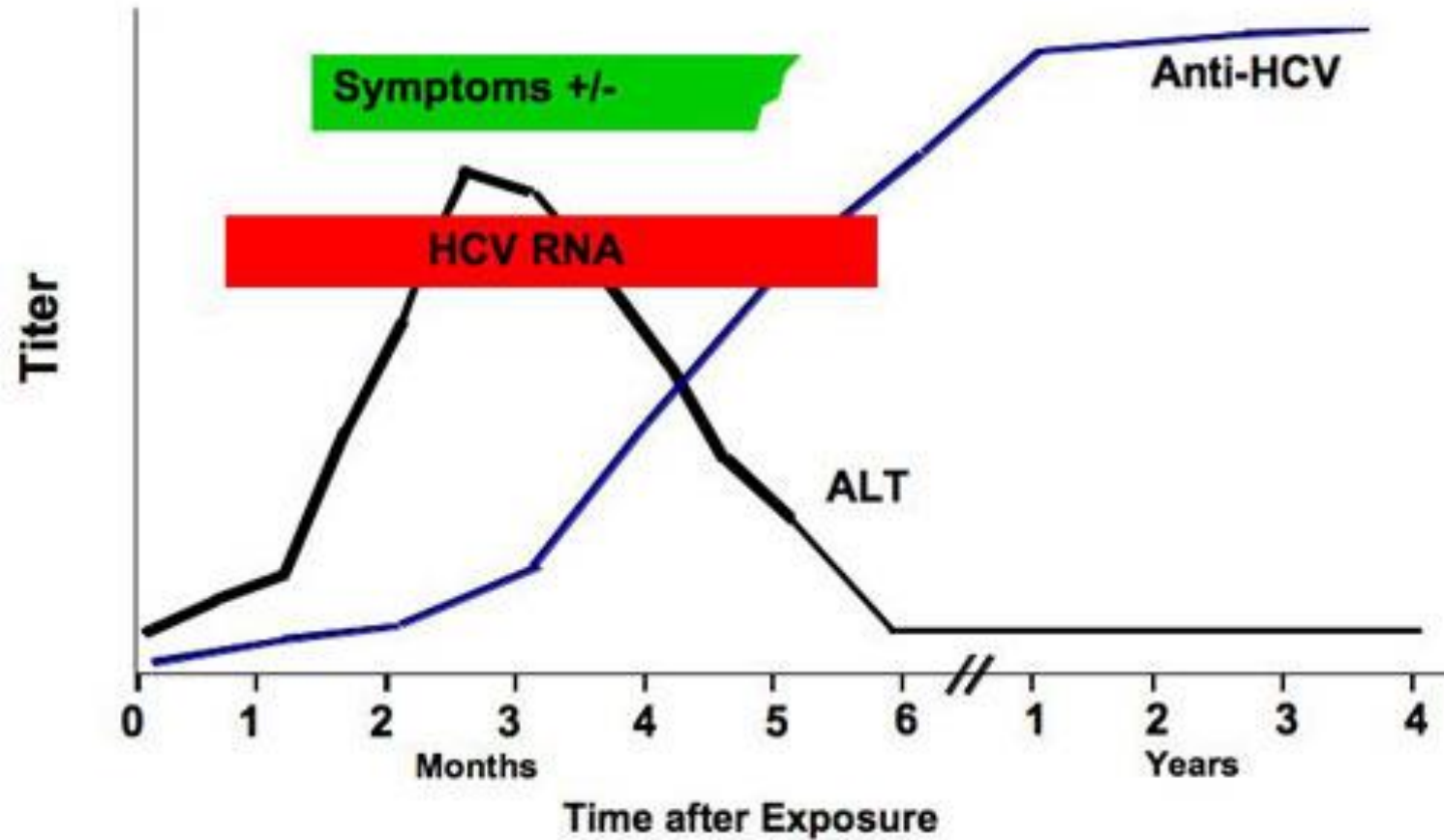
Патогенез и клинические проявления заболевания

- Инкубационный период составляет 6-7 недель. Патогенез гепатита С связан с поражением печени вследствие размножения вируса в гепатоцитах. Клиническое течение гепатита С более легкое, чем гепатита В. Заболевание часто протекает в субклинической форме.
- В 20-30% случаев заболевание сопровождается желтухой, в 10-20% - развиваются неспецифические симптомы: температура, анорексия, слабость, боли в области живота.
- Часто встречаются безжелтушные формы, выявить которые можно по увеличению аланинтрансаминазы в крови. У 70-90% больных развивается **хронический гепатит**, среди которых отмечается **хронический активный гепатит** и приблизительно в 10-20% случаев **цирроз**, реже развивается **гепатоцеллюлярная карцинома**.
- При заражении, вызванном **3 генотипом** наиболее часто наблюдаются случаи самоизлечения. **4 генотип** вызывает острое заболевание, склонное к переходу в хроническую форму

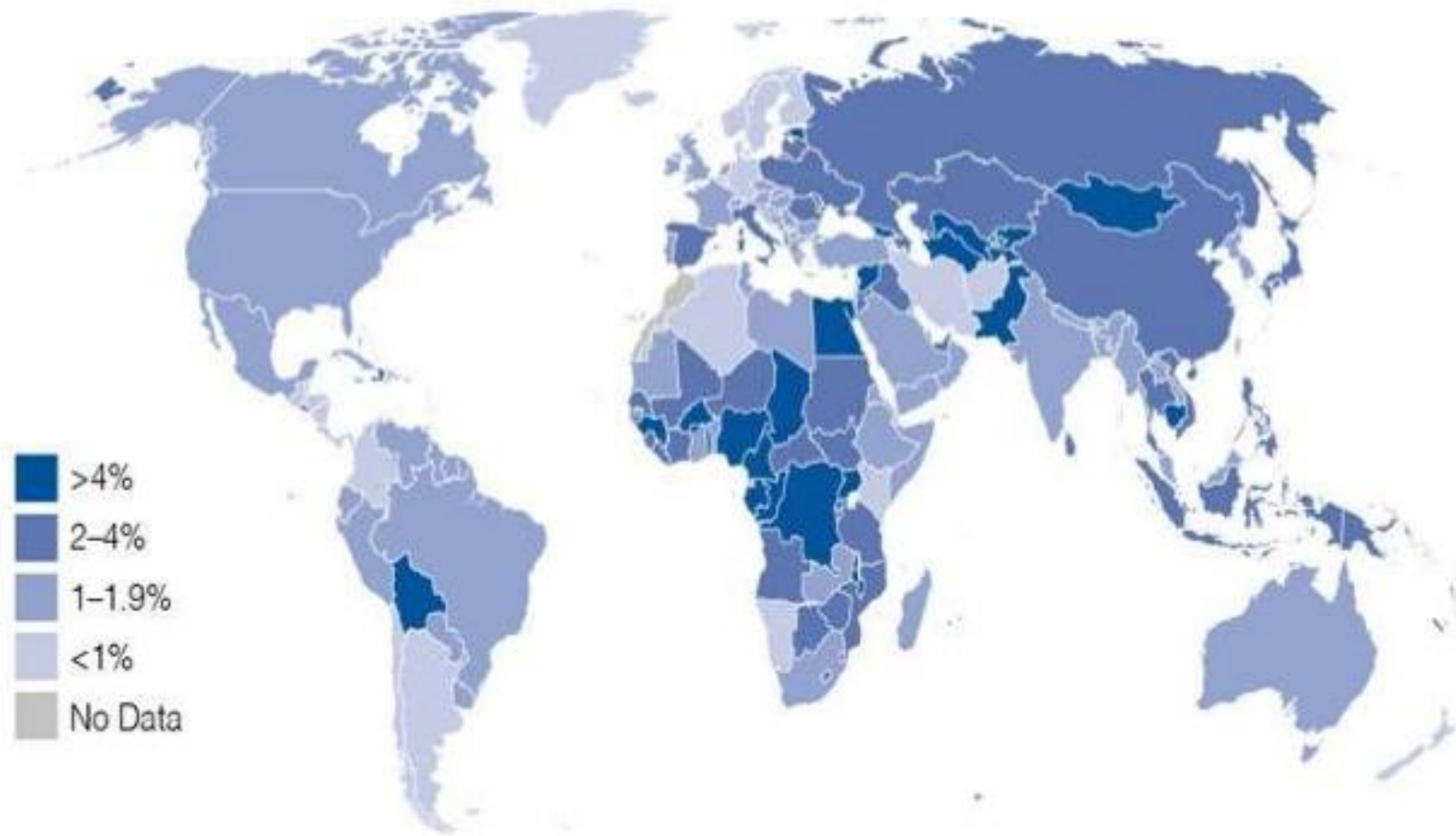
Микробиологическая диагностика

- Серологическое исследование направлено на определение антител с помощью ИФА.
- У 50-70% лиц антитела к ВГС появляются одновременно с развитием клинических признаков, в остальных случаях они появляются спустя 3-6 недель и сохраняются в крови очень долго (более 25 лет)
- Обнаружение в крови больного вирусной РНК проводят с помощью реал-тайм ПЦР. Этим методом возможно определить генотип вируса гепатита С .

Динамика серологических маркеров при гепатите С



Global Hepatitis C Prevalence



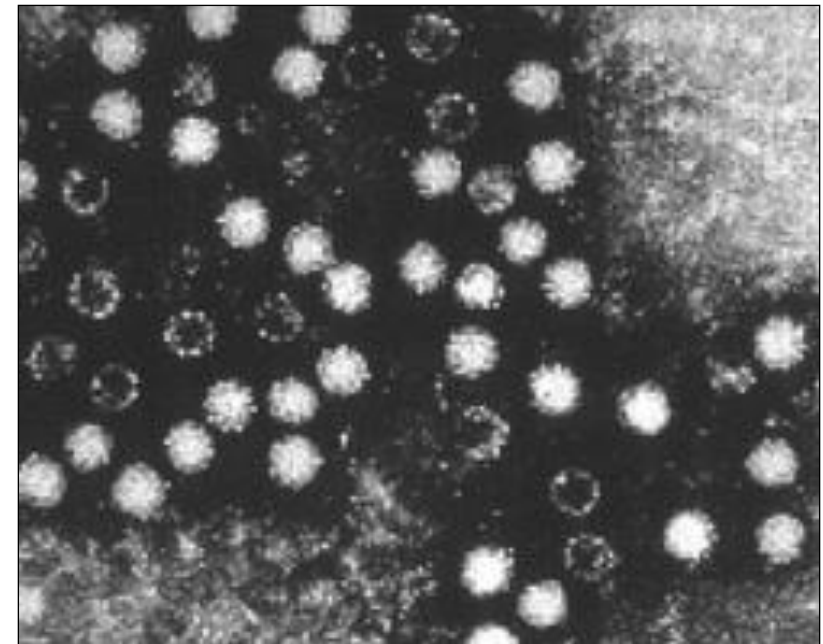
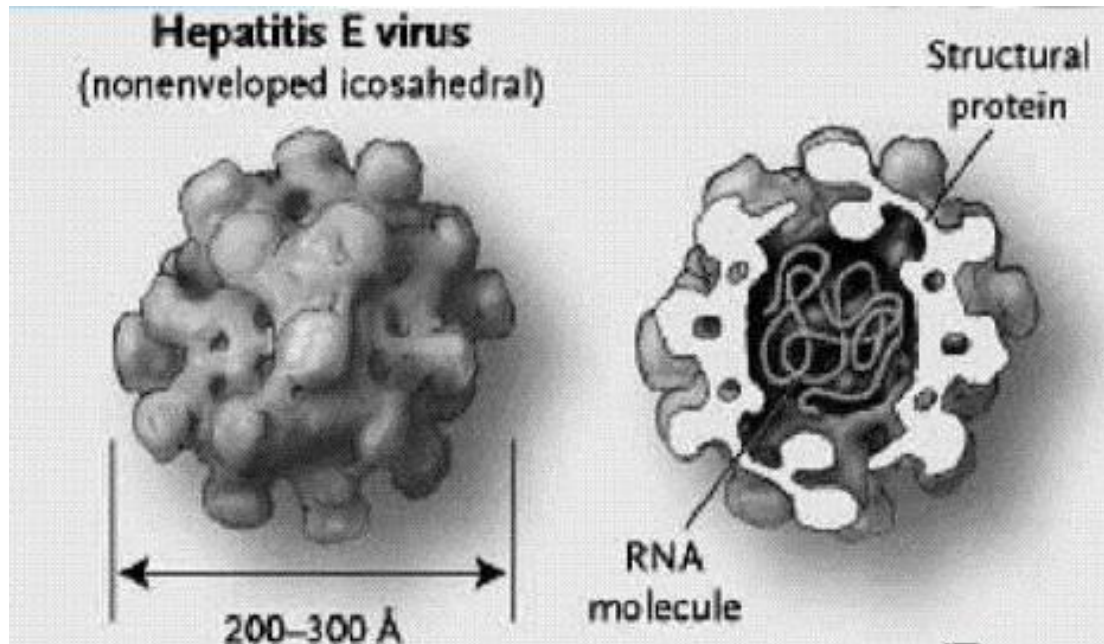
Source: Lavanchy, D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. Clin Microbiol Infect. 2011; 17:107–115.

Лечение

- В настоящее время для лечения гепатита С применяют комбинацию ***альфа-интерферона и рибавирина***.
- У некоторых пациентов такое лечение является эффективным (50%). Вирус гепатита С ***1 генотипа*** в меньшей степени реагирует на воздействие интерферона и рибавирина.
- Пациенты, инфицированные вирусом гепатита ***2-генотипом*** С несколько легче поддаются лечению.

Вирус гепатита Е

- Вирус гепатита Е (HEV) относится к неизвестному семейству, роду *Hepevirus*.
- Вирус безоболочечный, сферической формы диаметром 30-40 нм.
- Геном – однонитевая плюс-РНК.

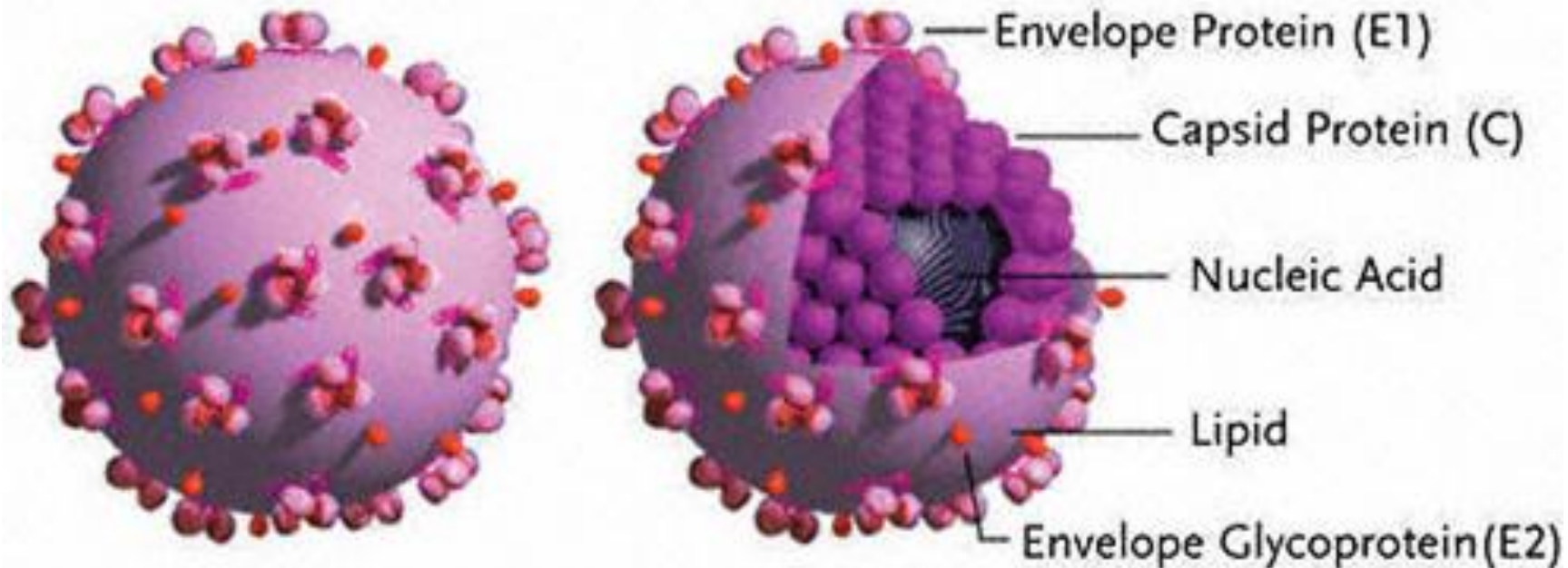


Гепатит Е (патогенез)

- Источник инфекции – больные люди , также может передаваться через некоторых животных (грызуны, кошки, свиньи и др.).
- Эпидемиология заболевания во многом аналогична гепатиту А , путь передачи – алиментарный, в основном через воду. Инкубационный период не превышает 2-6 недель. Заболевание сопровождается умеренным поражением печени, интоксикацией, реже желтухой.
- Инфицирование беременных может закончиться летально. После перенесенного заболевания формируется стойкий иммунитет.

Вирус гепатита G

- **Вирус гепатита G** как и HCV относится к семейству *Flaviviridae* роду *Hepacivirus*. Известно 5 генотипов вируса (A, B, C, D, E) .



Гепатит G

- Гепатит G может вызывать хроническую инфекцию, длящуюся десятилетиями. Приблизительно 60-70% инфицированных излечиваются и у них вырабатывается иммунитет.
- ВГГ в основном передается при половом контакте и через кровь .
- В США возбудитель находят у 2% обследованных доноров крови, 15% инфицированных HBV и 35% инфицированных ВИЧ.
- У пациентов, одновременно инфицированных ВИЧ и гепатитом G, летальность ниже, а также уровень ВИЧ в крови ниже , чем у пациентов, **зараженных** только ВИЧ.