



Лабораторная диагностика вирусных инфекций

План лекции

- Лабораторная диагностика острых вирусных и хронических гепатитов.
- Клинико-лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции.
- Прогнозирование прогрессии ВИЧ-инфекции и лабораторный контроль эффективности лечения

Диагностика острых гепатитов

- * Клиническая (эпиданамнез, динамика заболевания)
- * Функциональная (выявление печеночных синдромов – цитолиз, холестаз, воспаление, печеночноклеточная недостаточность)
- * Исследование серологических маркеров вирусных гепатитов
- * Пункционная биопсия печени – при атипичном течении болезни

Вирус гепатита А

- * Вирус гепатита А (HAV) открыли S. Freinstone и соавт. (1973).
- * Он относится к пикорнавирусам, входя в более узкую группу энтеровирусов.
- * Генетическим материалом вирионов является однонитчатая РНК, диаметр вирионов 27-30 нм.
- * В отличие от других энтеровирусов репродукция вируса гепатита А происходит медленно и измеряется многими днями и даже неделями.
- * Вирус обладает устойчивостью во внешней среде, сохраняется в течение нескольких месяцев при температуре 4 °С и несколько лет при -20 °С. Вирус инактивируется при кипячении в течение 5 мин.

Патогенез поражения печени при вирусных инфекциях

- * В патогенезе вирусных поражений печени важны два фактора:
 - * Вирусная репликация
 - * Иммунный ответ больного.

Стандарт лабораторной диагностики вирусного гепатита А

- Клинический анализ крови.
- Клинический анализ мочи и жёлчные пигменты (билирубин).
- Биохимический анализ крови: билирубин, АЛТ, АСТ, протромбиновый индекс, тимоловая проба.
- Иммунологическое исследование:
 - ✧ анти-HAV IgM;
 - ✧ HB_e Ag;
 - ✧ анти-HB_e IgM;
 - ✧ анти-HCV.

Дополнительная лабораторно-инструментальная диагностика ВГА.

- Холестерин, ЩФ, ГГТ, глюкоза, амилаза, общий белок и белковые фракции, ЦИК, криоглобулины, LE-клетки, РНК HAV, анти-HEV IgM, анти-ВИЧ.
- УЗИ брюшной полости.
- Рентгенография органов грудной клетки.

Гепатита В. Актуальность.

Инфекция HBV - одна из самых распространенных вирусных инфекций человека.

- * По данным ВОЗ, более 1/3 населения мира уже были инфицированы гепатитом В и 5 % из них, т.е. более 350 млн человек, являются носителями этой инфекции.
- * Ежегодно от заболеваний, связанных с этой инфекцией, умирает около 2 млн человек.
- * В России с середины 90-х годов прошлого века регистрировалась заболеваемость на уровне 18,1-21,9 случая на 100 000
- * Основная масса заболеваний связана с инструментальным заражением (шприцы, иглы, зубоврачебные инструменты, приборы и др.), значительно меньшая — с введением не проверенных на вирус гепатита В препаратов крови.

Патогенез гепатита В

- * HBV попадает в кровь, затем в гепатоциты, где происходит его репликация
- * **Клетками мишенями для вируса являются:**
 - * **Гепатоциты**
 - * **Внепеченочные клетки** –лимфоциты, моноциты, клетки поджелудочной железы, почек, клетки некоторых злокачественных образований (нейробластомы, эмбриональной карциномы) несут на мембране белки вируса гепатита В. О репликации HBV вне печени свидетельствует прежде всего реинфицирование HBV пересаженной печени.

Поражение печени при вирусном гепатите В

- * Непосредственное цитопатическое действие персистирующего в тканях вируса гепатита В в настоящее время подвергается сомнению.
- * В результате активной репликации вируса гепатита В (HBV) появляются вирусные антигены или вирусиндуцированные неоантигены на клеточной поверхности инфицированного гепатоцита, которые могут предстать как антигены-мишени для эффекторных клеток.
- * **Именно различие иммунного ответа на антигены HBV определяет исход инфекции : от бессимптомного носительства, ОВГ, хронического гепатита В, цирроза печени до гепатоцеллюлярного рака.**
- * При нормальном иммунном ответе инфекция заканчивается выздоровлением. У этих пациентов выражены реакции по Th1 типу

Серологические маркеры гепатита В.

HBs-Ag

Первые серологические маркеры вирусемии могут выявляться уже через 2 нед, особенно при массивном парентеральном заражении.

- * **HBsAg** начинает определяться в сыворотке в период от 2 нед до 2 мес до клинических проявлений заболевания (в инкубационном периоде).
- * Частота обнаружения – 80% больных с острым гепатитом В
- * Продолжительность наличия положительного HBsAg варьирует от нескольких дней до 2-3 мес; персистенция более нескольких месяцев может указывать на хронический процесс.
- * HBsAg перестает определяться перед появлением анти-HBs. Эти антитела наблюдаются у 80-90 % больных, особенно в период реконвалесценции, и указывают на относительный или абсолютный иммунитет. Их обнаружение свидетельствует об адекватном иммунном ответе на инфекцию.

Серологические маркеры гепатита В.

Анти-НВсor, НВсorAg

- * При остром гепатите **Анти-НВс** обнаруживаются приблизительно одновременно с клиническими симптомами и подъемом трансаминаз сыворотки.
- * **Анти-НВс-IgM** – самый достоверный показатель ОГВ – появляются в конце инкубационного периода, персистируют в сыворотке от нескольких месяцев до 1 года. У 10-20% больных – это единственный маркер острого гепатита В
- * Через 4-6 месяцев появляются **анти-НВс IgG**. Они могут персистировать в течение нескольких лет или пожизненно. Они не несут защитной функции, а скорее служат маркером перенесенной HBV-инфекции.
- * **Антиген НВсor** при остром гепатите в крови не выявляют, он обнаруживается только в гепатоцитах при биопсии

Маркеры активной репликации вируса гепатита В

- * HBeAg
 - * ДНК-полимераза
 - * ДНК-HBV
- * - обычно выявляются в сыворотке до подъема активности трансаминаз.

Стандарт обследования при вирусном гепатите В

- * Печеночные пробы
- * ОАК, ОАМ
- * Серологические маркеры гепатита В
- * Серологические маркеры гепатита С
- * Серологические маркеры гепатита D
- * Серологические маркеры ВИЧ инфекции
- * Протромбиновый индекс
- * Глюкоза крови, холестерин, липидные фракции, белковые фракции, электролиты, КЩС
- * Маркеры аутоиммунных заболеваний (АНФ, СРБ, ЦИК)

Вирус гепатита D

- * Гепатит D вызывается дефектным вирусом, репликация которого возможна только при наличии HBsAg
- * Антиген вируса был обнаружен в 1977 году у больных гепатитом В. Предполагали, что этот антиген относится к гепатиту В, поэтому его называли дельта антигеном (по аналогии с HBs, Hbcor, HBe). Далее было выяснено, что это новый вирус.
- * HDV представляет собой неполный РНК-вирус, оболочкой которого служит HBsAg. При этом в геноме вируса нет участков, кодирующих HBsAg. Поэтому, инфекция HDV требует предшествующего или одновременного инфицирования гепатитом В, который выступает как вирус-хелпер.
- * HDV имеет размер 36 нм, это наименьший вирус животных
- * Вирус очень устойчив к внешним воздействиям (температура, кислоты). Инактивируется щелочами, протеазами

Эпидемиология вирусного гепатита D

Более 5 % из 350 млн носителей HBV-инфекции в мире инфицированы также HDV (около 17,5 миллионов человек).

- * В областях с высокой частотой инфицированности HDV (более 20 % хронических HB-носителей) — Африке, Южной Италии, Южной Америке - передача происходит в основном контактным путем, в то время как в областях с низкой инфицированностью (от 0 до 2 % носителей HB) - США, передача инфекции наблюдается среди лиц, получающих гемотрансфузии или через зараженные иглы (больные гемофилией, наркоманией).
- * Отмечается неожиданно низкая встречаемость HDV-инфекции среди гомосексуалистов и больных, находящихся на гемодиализе.
- * Перинатальная передача не играет большой роли.

Клинические особенности вирусного гепатита D. Коинфекция.

- * Одновременное инфицирование HBV и HDV (коинфекция) приводит к развитию острого гепатита смешанной этиологии.
- * Является острым гепатитом смешанной этиологии
- * **Чаще имеет острое самолимитирующее течение**
- * Длительность инкубационного периода такая же, как при HB (1,5-6 мес).
- * Преджелтушный период характеризуется более коротким острым течением с ранними симптомами интоксикации.
- * Особенностью являются **клинико-ферментативные или только ферментативные обострения на 15-32-й день болезни**. При этом активность АсАт выше, чем активность АлАт; одновременно повышается тимоловая проба, что несвойственно острому гепатиту.

Диагностика вирусного гепатита D.

Специфическая диагностика основана на определении **маркеров вирусов гепатитов В и D**

- * Почти во всех случаях в сыворотке присутствуют также HBsAg и анти-HBcIgM.
- * **С первых дней желтухи в крови обнаруживают HDAg**
- * Обнаруживаются **анти-HDV класса IgM**. Высокий титр держится 1-3 недели Персистенция анти-HDV IgM коррелирует с активностью HDV-инфекции и повреждением печени.
- * **Анти-HDV IgG** появляются позднее 3-й недели заболевания.
- * **У 20% больных анти-HDV IgM не обнаруживаются, а анти-HDV IgG появляются поздно – через 30-60 дней.** В этом случае диагностика возможна на основании повторного определения анти-HDV IgG в крови
- * **РНК вируса** обнаруживают методом ПЦР в течение 1-3 недели от начала желтушного периода

Вирус гепатита С

- Выделен в 1989 г. Houghton и соавт.
- * Представляет собой РНК-содержащий флавивирус около 50 нм в диаметре, покрытый липидной оболочкой.
- * На 5'-м конце РНК вируса расположен терминальный участок, содержащий 329-341 нуклеотид, на 92 % гомологичный у различных типов HCV.
- * Консервативность этого участка позволяет использовать его для выявления вируса в реакции ПЦР
- * Вирусный геном также содержит:
 - * Ядерный (core) локус, E1 и E2/NS1 кодирует структурные белки
 - * Локус, отвечающий за синтез неструктурных белков, не входящих в состав вириона (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), но нужных для репликации вируса (протеаза, хеликаза, РНК-зависимая РНК полимераза)

Эпидемиология вирусного гепатита С

- * Распространенность заболевания – около 3% населения
- * В структуре хронических заболеваний печени доля ВГС составляет 40%
- * В России заболеваемость составляет около 20 случаев на 100.000 населения.
- * Основная группа заболевших – лица в возрасте 20-29 лет
- * Возбудитель обычно переносится при массивном заражении, например гемотрансфузиях, и существенно менее вероятны пути переноса, характерные для HBV-инфекции (перинатальный, половой, семейный контакты).
- * Риск заражения среди медицинских работников составляет
- * от 4 до 10 %.
- * Группа риска – наркоманы, пациенты на гемодиализе, вводящие препараты плазмы, пациенты после трансплантации органов

Патогенез вирусного гепатита С

- * Имеется ряд косвенных данных о прямом цитопатическом действии вируса на инфицированные клетки.
- * Другой механизм – повреждение гепатоцитов иммунными клетками
- * Концентрация вируса достигает максимум через 1-й недели после инфицирования
- * Клеточный иммунный ответ опаздывает на 1 месяц, гуморальный – на 2 месяца. При этом вирусная нагрузка снижается.
- * Исчезновение вируса из крови не означает его полной элиминации
- * Элиминация вируса происходит при выраженном Т-клеточном ответе (около 20% случаев)

Клинические особенности вирусного гепатита С

- * Инкубационный период после заражения составляет от 5 до 7 нед.
- * Клинические симптомы и лабораторные показатели гепатита С неотличимы от других вариантов острого гепатита.
- * Для острого гепатита С характерен высокий удельный вес безжелтушных форм (более 80 %), протекающих чаще всего бессимптомно.
- * В целом острый гепатит С протекает значительно легче, чем другие острые вирусные гепатиты.

Диагностика вирусного гепатита С

- * Скрининг – изменение печеночных проб (рост АлАТ более чем в 10 раз)
- * Специфическими серологическими маркерами, подтверждающими наличие острого гепатита С, являются антитела к вирусу гепатита С (anti-HCV). Появляются через 4-6 и позднее недель после инфицирования.
- * Тест системы 3 поколения позволяют выявить антитела через 7-10 дней от начала желтухи
- * ПЦР выявление РНК гепатита С - абсолютно надежный тест. Положительный через 7-10 дней после начала заболевания
- * Подтверждающим тестом является иммуноблоттинг (RIBA),

Вирус гепатита E

- * Вирус гепатита E (HEV) был идентифицирован в 1983 г. при проведении эксперимента с заражением добровольца материалами, полученными от больных, у которых был заподозрен гепатит E
- * HEV - частица сферической формы диаметром 27-34 нм с одноцепочечной РНК, не покрытая оболочкой.
- * HEV предварительно классифицирован как член семейства калицивирусов.
- * Пока есть данные о единственном серотипе HEV
- * Вариации в нуклеотидных последовательностях выявляют у 15-20 % у штаммов, выделенных в разных географических районах
- * Предполагается, что вирус обладает прямым цитопатическим эффектом

Гепатит Е. Диагностика и исходы.

- * Острый гепатит Е может быть заподозрен в эпидемических случаях у лиц с острым не А ни В гепатитом.
- * Иммуноферментный анализ позволяет выявить анти-HEV IgM и/или IgG.
- * Антитела класса IgM присутствуют в сыворотке от 2 до 24 нед после острого начала болезни, исчезают через несколько месяцев.
- * Анти-HEV IgG также появляются через 2 нед, и обычно их титр начинает снижаться после 2 лет, хотя иногда высокие титры могут наблюдаться в течение многих лет.
- * Заболевание протекает остро и заканчивается спонтанным выздоровлением через 2-3 нед. Смертность от гепатита Е достаточно высока (1-2%), достигая 20% у беременных в 3 триместре

Гепатит G

- * В 1995 году F.Deinhardt и соавт. обнаружили, что сыворотка крови хирурга с острым гепатитом и с исключенными диагнозами гепатит А, В, С вызывает при внутривенном введении острый гепатит у тамаринов — маленьких южноамериканских обезьян.
- * В 1995-1996 гг было обнаружено, что геном данного возбудителя подобен геному представителей семейства флавивирусов со структурной организацией, близкой к гепатиту С.
- * В отличие от ВГС и вируса отсутствует участок, ответственный за разнообразие генотипов
- * Чаще болеют пациенты, инфицированные вирусами гепатита В и С, заболеваемость повышена среди лиц, соприкасающихся с препаратами крови

Вирус гепатита G. Лабораторная диагностика.

- * Заражение вирусом может определяться:
 - * Методом ПЦР (определение вирусной РНК)
 - * Создан ИФА тест, с помощью которого можно определить присутствие в сыворотке анти-HGV класса IgG к белку E2, который вероятно является главной мишенью для иммунного ответа.
 - * Частота выявления анти-HGV класса IgG к белку E2 у доноров составляет 3-8%, у наркоманов – 85,2%
 - * Эти данные говорят о высокой частоте спонтанного выздоровления от этой формы гепатита
 - * Тест систем для определения антител класса IgM пока нет



Вопросы?