**Занятие 18**

**Микробиологическая диагностика вирусных гепатитов**

**Классификация вирусных гепатитов.** Вирусные гепатиты широко распространены среди населения всех стран мира. Они подразделяются на энтеральные – гепатиты A и E, парентеральные – гепатиты B, C, D, G и др. Несмотря на то, что возбудители вирусных гепатитов относятся к различным таксономическим группам, их объединяет *гепатотропность*.

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

***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

ВГА устойчив к высокой температуре, он сохраняется при 600C в течение часа , при высыхании – до одного месяца ,при -200C 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 A 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 A.** 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 реплицируется в цитоплазме гепатоцитов. Цитотоксические T-лимфоциты взаимодействуя с инфицированными гепатоцитами приводят к их лизису, в крови повышается содержание трансферазы и билирубина. Инкубационный период составляет 10-50 дней, чаще около месяца. Заболевание начинается остро с повышения температуры (380C 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.

**Микробиологическая диагностика гепатита A.** 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 A.** 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 B**

**HBs-антиген**

ВГВ имеет сложное антигенное строение. В липопротеиновой оболочке вируса находится *HBs-aнтиген* (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, HBх-антиген.** Сердцевинный *HBc-антиген* (от англ. *cоre* - сердцевина) никогда не обнаруживается в свободном состоянии в крови. Его можно обнаружить в зараженных вирусом гепатоцитах. *HBe-антиген* (от англ. *envelоpe* – оболочка) также является сердцевинным антигеном, производным HBc-антигена. Появление HBe-антигена в крови связано с репликацией вируса в гепатоцитах. *HBх-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.

**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.** BГВ 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.** BГВ отличается высокой устойчивостью к факторам окружающей среды и дезинфицирующим веществам. Температуру 370C выдерживает около часа, в высушенном состоянии при 250C стабилен в течение недели. Температуру -200C выдерживает более 10 лет. При нагревании до 1000C 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 B – 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. BГВ 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.

* **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 B приводит к острой печеночной недостаточности, циррозу и первичной карциноме печени, приводящими к летальному исходу.

**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. Обнаружение анти-HBc-IgM антител в период клинических симптомов заболевания указывает на репликацию вируса. HBe-антиген обнаруживается вскоре после появления клинических симптомов заболевания. При хроническом вирусоносительстве aнти-HBe-aнтитела циркулируют в сыворотке крови больного более чем 6 месяцев.

**Лечение.** Для противирусного лечения гепатита B используют рекомбинантный *aльфа-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 обсеменения). 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 B. 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

**Вирус гепатита D**

**Вирус гепатита D** является сателлитом вируса гепатита B, в отдельности не вызывает заболевания. Вирус можно обнаружить у некоторых пациентов с гепатитом B. НDV 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 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.

Источником инфекции являются носители вируса гепатита B, заражение аналогично инфицированию вирусом гепатита B . Инкубационный период длится 2-12 недель. Одновременное инфицирование HВV и НDV – ***коинфекция***  приводит к развитию умеренной формы болезни. Инфицирование НDV 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-НDV IgM) с помощью ИФА в сыворотке крови больного. РНК вируса выявляют методом ПЦР.

**Вирус гепатита C**

Вирус гепатита C (НCV) 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. *envelоpe* - 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

**Репродукция.** Репродукция вируса гепатита C 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.

**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 500C.

**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.* Призаражении*,* 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.

**Лечение**. В настоящее время для лечения гепатита C 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 E**

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

**Гепатит E (патогенез).** Источник инфекции – больные люди, также может передаваться через некоторых животных (грызуны, кошки, свиньи и др.).

**Эпидемиология** заболевания во многом аналогична гепатиту A , 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 HСV относится к семейству *Flaviviridae* роду *Hepacivirus*. Известно 5 генотипов вируса (A, B, C, D, E).**