Лекція № 14

Загальна характеристика родини *Flaviviridae*

1. Класифікаційне положення родини
2. Загальна характеристика флавівірусів
3. Патогенез та епідеміологічні особливості інфекцій, спричинених флавівірусами
4. Вірус гепатиту С та його значення у патології людини

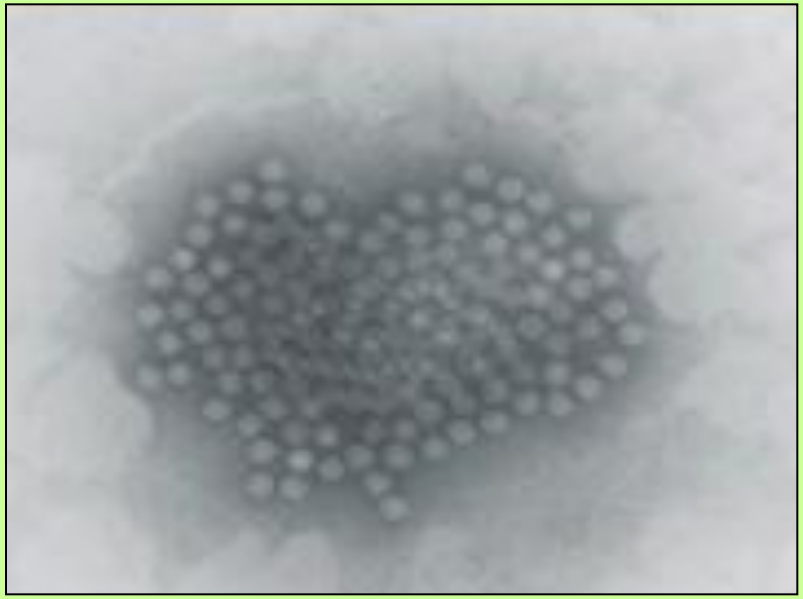
Родина *Flaviviridae*

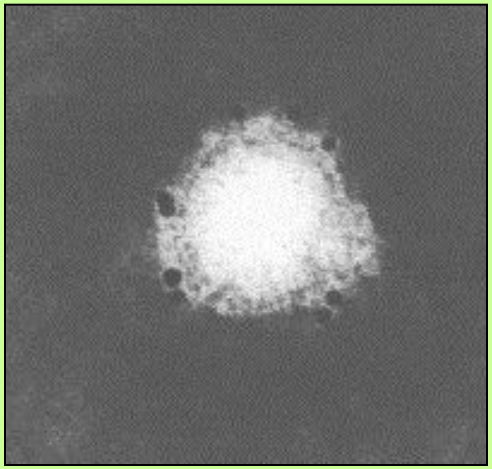
1. **Рід *Flavivirus*** – комплекс вірусів жовтої гарячки (вірус жовтої гарячки, віруси групи Уганда С, Зіка, віруси групи денге та ін.), віруси групи кліщового енцефаліту (європейські та східні субтипи, напр. весняно-літній російський кліщовий енцефаліт, вірус Омської геморагічної гарячки, вірус Кіассанурської лісної гарячки та ін), група вірусів Ріо-Браво, комплекс вірусів Японського енцефаліту (вірус долини Меррея, енцефаліту Сан-Луї, вірус Західного Нілу, вірус Іл'єус), віруси групи Тюленій, віруси групи Нтайа, віруси групи Модок та ін.

2. **Рід *Pestivirus*** – вірус класичної чуми свиней, вірус діареї ВРХ, вірус граничної хвороби (вівці).

3. **Рід *Hepacivirus* -** вірус гепатиту С, вірус гепатиту G.

Морфологія

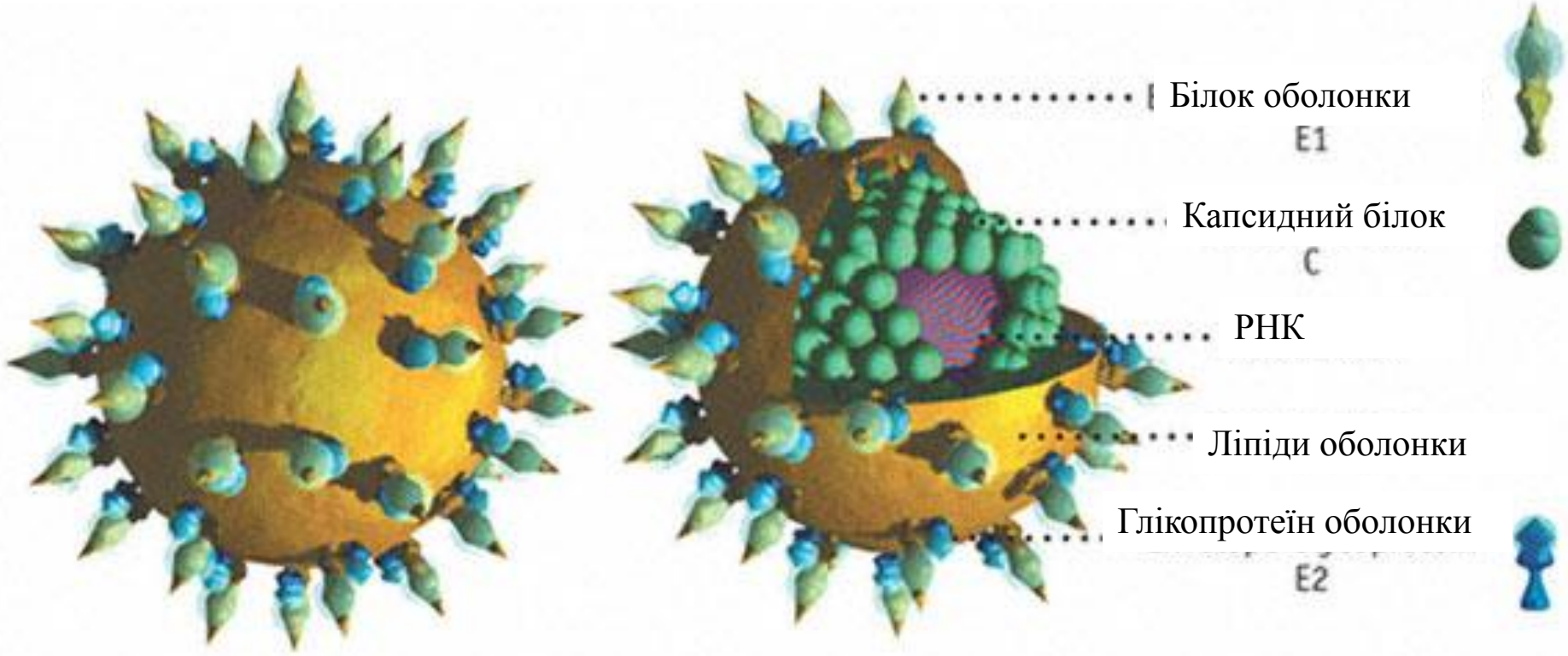




Віріони – сферичні, діаметром 40-60 нм, містять ліпропротеїнову оболонку, на поверхні якої присутні пепломери.

Серцевина віріону – ікосаедрична, діаметром 39 нм.

Схематична модель віріону ВГС



Загальний вигляд

Розріз

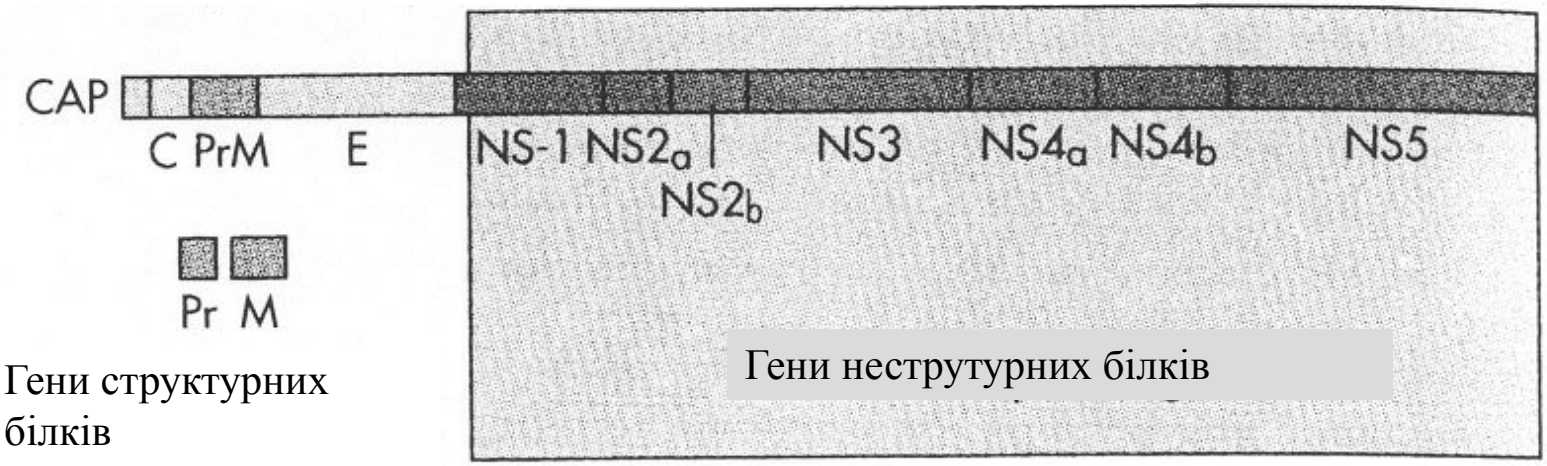
У флавірвірусів ліпідна оболонка оточена щільним шаром (6 нм), що складається з 2 білків: Е та преМ (у випадку вірусних часток асоційованих з клітинами) та Е та М (у випадку позаклітинних віріонів).

Геном

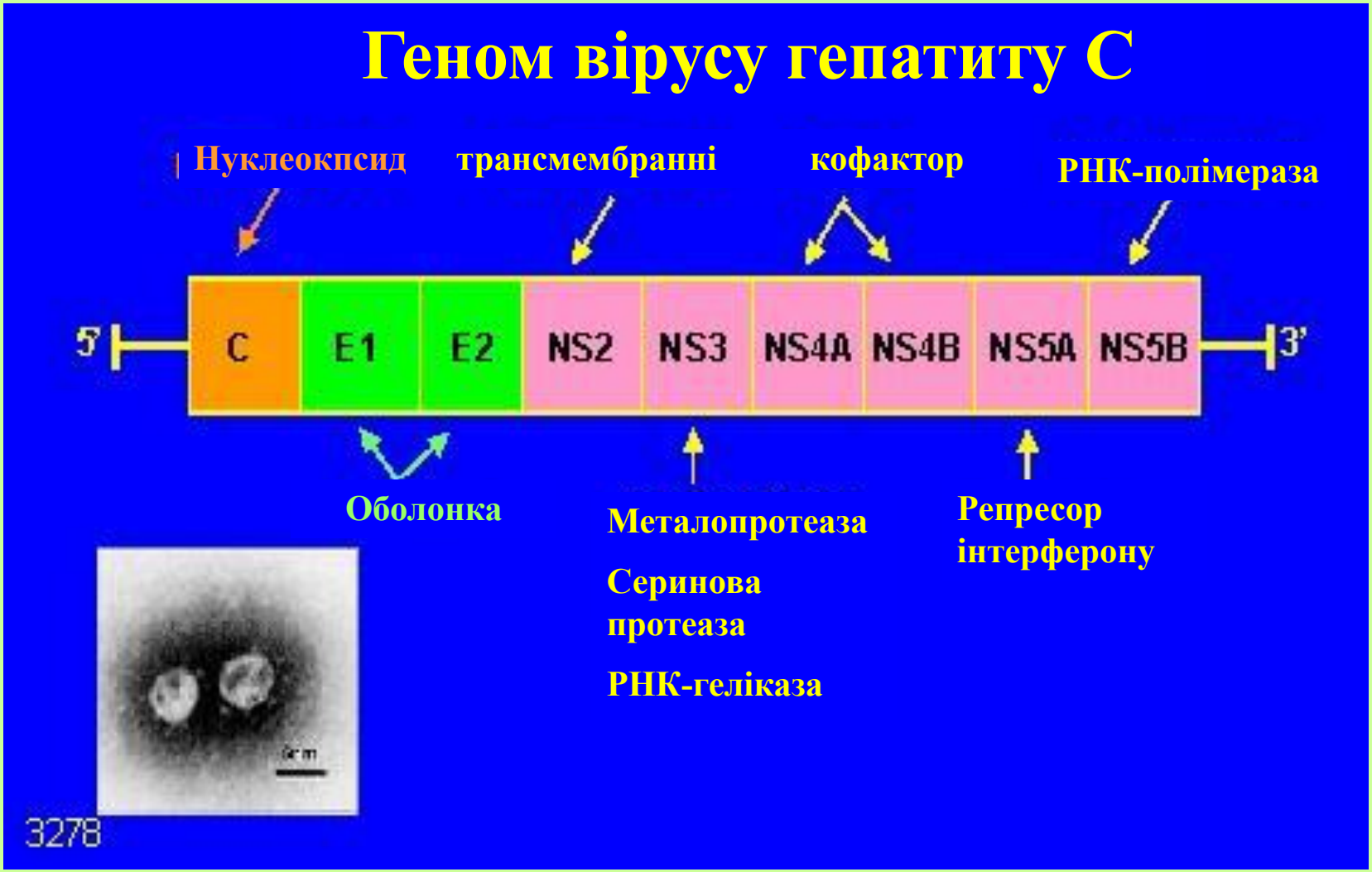
- Геном- 1 молекула лінійної одноланцюгової РНК, позитивної полярності.
- Розмір геному флавівірусів, пестивірусів та ВГС дорівнюють 10,7; 12,5 та 9,5 тис. нт, відповідно.
- Єдина відкрита рамка зчитування кодує білок, який нарізається протеолітичним ферментами на всі вірусні білки.
- Структурні білки знаходяться біля 5’-кінця, неструктурні включають протеази, хелікази полімерази, і закодовані біля 3’-кінця.

Геном

Вірус жовтої гарячки



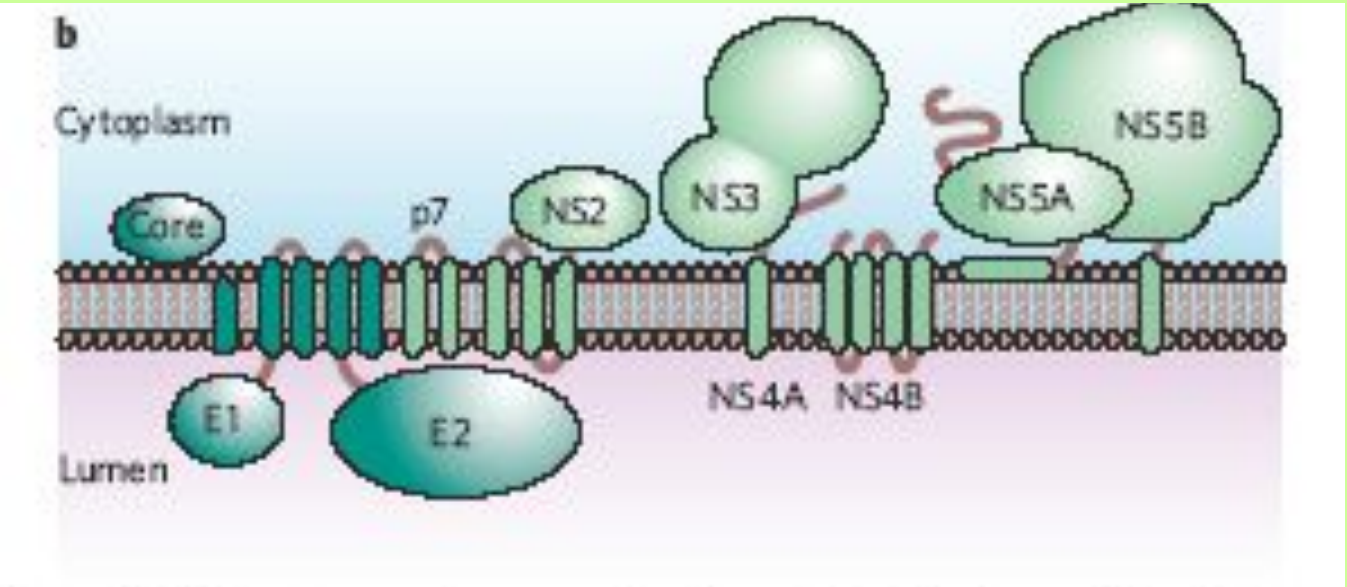
- У **флавівірусів** на 5’-кінці знаходиться cap-структура, а на 3’-кінці відсутня polyA.
- На 5-кінці знаходиться некодуючий регіон (118нт).
- На 3-кінці некодуючий регіон (511 нт), що містить послідовність з 87 нт, яка може формувати шпилькоподібну структуру (реплікація).



- У пестівірусів та ВГС біля 5’-кінця присутня IRES-структура (трансляція).

Структурні білки представників роду *Flavivirus*

- **E, M** - білки, асоційовані з ліпідною мембраною.
- білок **C** – внутрішній, пов’язаний з РНК.



Неструктурні білки представників роду *Flavivirus*

- **NS1** (виявляється на клітинній поверхні),
- **NS2A** (інтегральний мембранний білок),
- **NS2B** (інтегральний білок, пов’язаний з NS3),
- **NS3** (на N–кінці активність серинової протеази та на С-кінці - хелікази),
- **NS4A** (інтегральний мембранний білок),
- **NS4B** (інтегральний мембранний білок),
- **NS5** (периферійний мембранний білок, компонент РНК-зал-РНК-пол).
- **NS3** та **NS5** є компонентами РНК-полімерази.

Компонети віріону

- **Ліпіди** – походять з клітинної мембрани.
- Віріони містять **гліколіпиди** та **глікопротеїни.** Деякі з віріонів не містять гілкозильованих білків оболонки. Співвідношення та структура вуглеводів залежать від клітини-хазяїна.

Антигенні властивості

- Антигенні детермінанти флавівірусів пов'язані з білком Е. **HVR I** – гіперваріабельний регіон гену Е2 (в білку Е2 - основний віруснейтралізуючий епітоп).
- Представники кожного роду близькоспоріднені між собою, проте не з представниками інших родів.
- Типоспецифічні антигеннні детермінанти виявляються за допомогою РН.

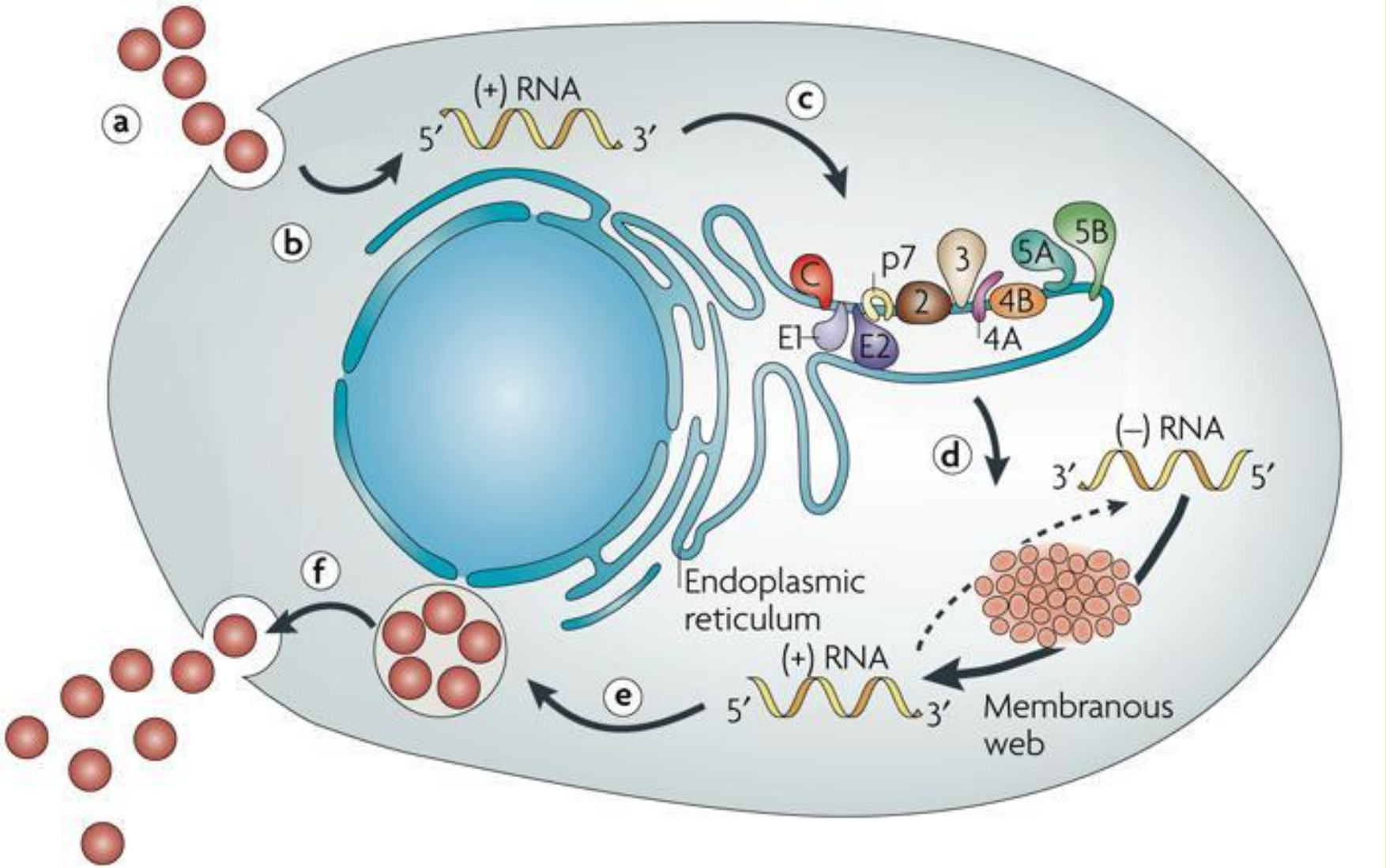
Фізико-хімічні та фізичні властивості

РНК – 8%, ліпіди 25% від сухої маси віріону а інше – білки. Мв=60х10^6Да.

Щільність у градієнті сахарози 1,1-1,23 г/$см^3$, у CsCl – 1,31-,34 г/см.

S_{20w}= 140-200S.

Віріони чутливі до нагрівання (втрачають інфекційність при нагрівання 56-60С протягом 10-30 хв.), низьких pH, органічних розчинників та детергентів.

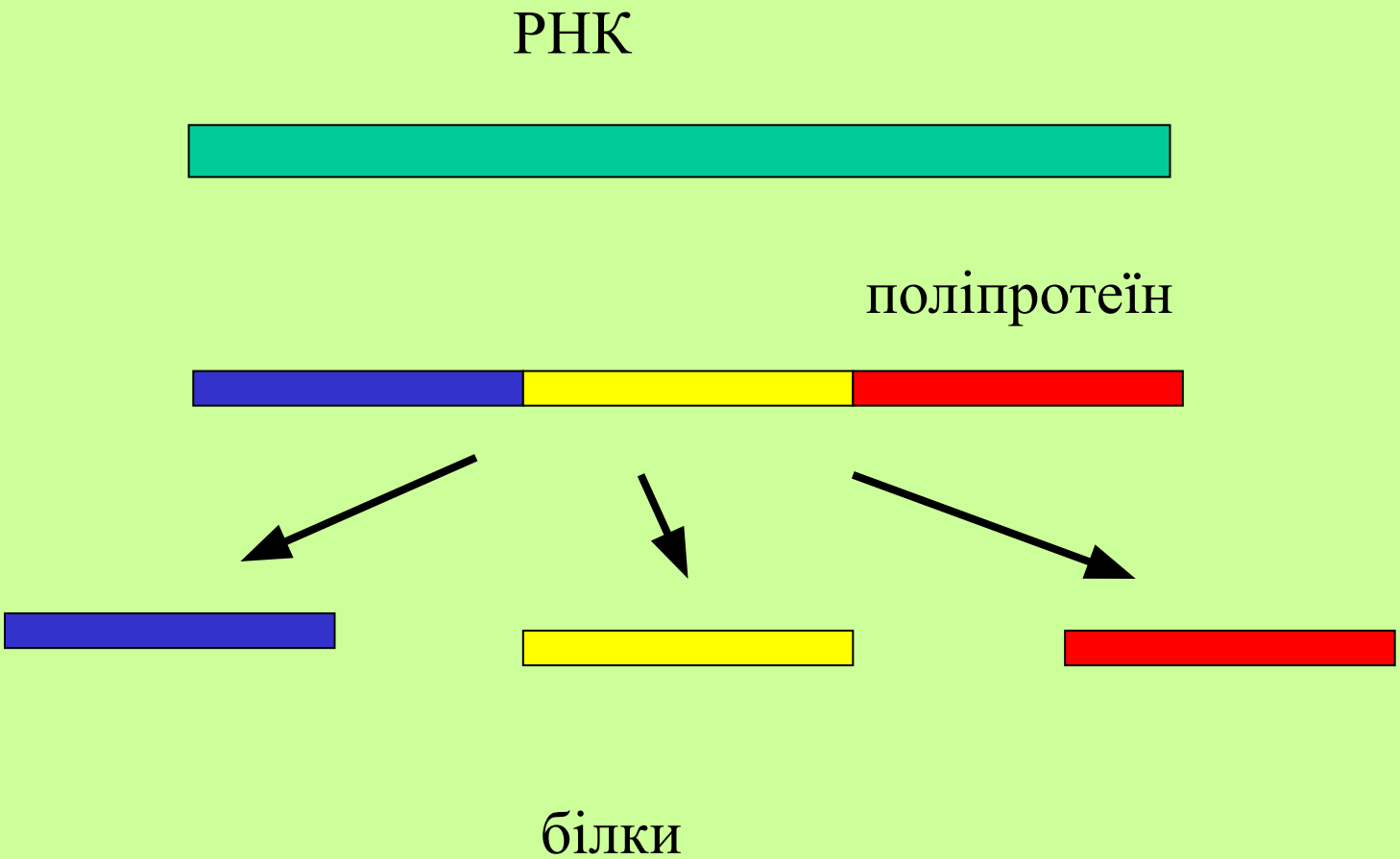


Цикл репродукції ВГС

Nature Reviews | Microbiology

Цикл репродукції ВГС

- a – проникнення вірусу у клітину (рецепторний ендоцитоз, з наступним злиттям оболонки вірусу та мембрани ендосоми);
- b – роздягання;
- c- IRES-опосередкована трансляція та процесинг білків;
- d – реплікація РНК;
- e- збирання та упаковка;
- f – дозрівання віріонів та вихід з клітини.



Поліпротеїн, з якого утворюються індивідуальні білки шляхом автокаталітичного нарізання.

http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/virus.htm

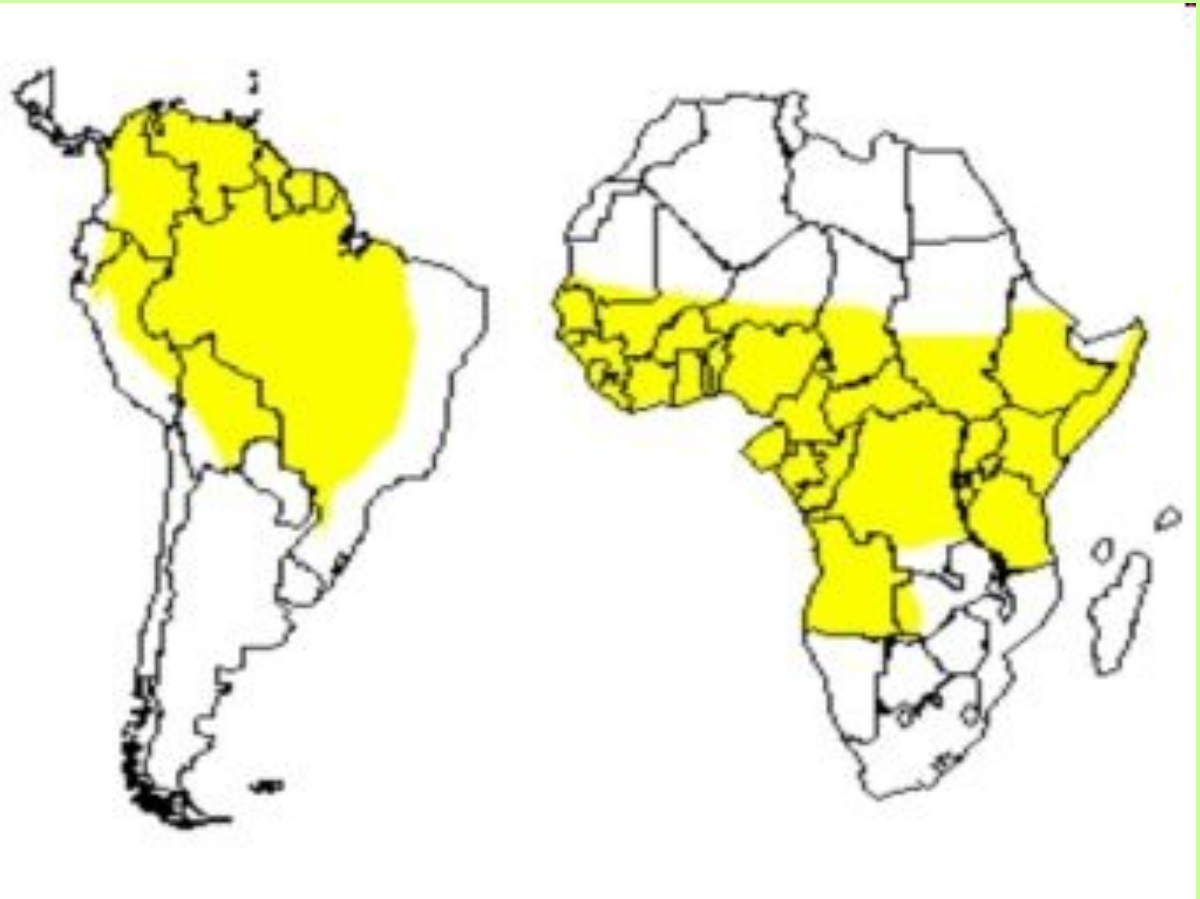
Представники родини Flaviviridae

Рід	Вірус	Хазяїн	Хвороба
Flavivirus	Вірус жовтої гарячки	Мавпи, люди	Геморагічна гарячка (ГГ)
	Вірус денге (1-4)	Мавпи, люди	Гярячка, артралгія висип, ГГ
	Вірус Японського енцефаліту	Птахи, свині, люди	Енцефаліт
	Вірус західного Нілу	Птахи, люди	Гарячка, артралгія, висип
	Вірус кліщового енцефаліту	Гризуни, птахи, люди	Енцефаліт
Pestivirus	Вірус діареї ВРХ	Копитні	Персистентна інфекція, ураження слизових обол.
	Вірус гранична хвороба	Вівці, кози	Гострі та хр. геморагічні симптоми
	Вірус класичної чуми свиней	Свині	
Hepacivirus	Вірус гепатиту С	Люди	Гострий та хронічний гепатит

Жовта гарячка

- Вірус жовтої гарячки
- Здавна поширена на Африканському континенті, у XVII-XVIII ст. – занесена в Америку під час работоргівлі.
- Щороку хворіє від 500 до 5000 осіб.
- Останній спалах у 2003 р. у Південному Судані.

Зони поширення жовтої гарячки



- Ендемічні р-ни в зоні дощових лісів в екваторіально-субекваторіальному поясі Африки між 10-16 півд.ш., в Америці – між 10 півн.ш. та 30 півд.ш.

Жовта гарячка

- Дві епідемічні форми – міська та джунглева.
- Природні вогнища в дощових лісах – циркуляція вірусу між мавпами та комарами *Aedes africanus* (Африка) та *Haemogogus janthinomys* (Америка).
- Синантропний комар *Aedes simposoni* може нападати і на людей і на мавп.
- Міська форма – комар *Aedes aegypti* – виникнення епідемій.

Жовта гарячка

Інкубаційний період 3-6 (рідко 10) днів.

Летальність серед госпіталізованих 40-50%, з урахуванням безсимпомних форм – 1-5%.

Форми

- - безсимптомна;
- - дуже легка з короткочасною гарячкою;
- - легка з 2-3 денною гарячкою, головним болем, нудотою, незначною альбумінонурією та підвищенням температури;
- - середня, близько тижня, головний, поперековий біль, нудота, блювота, двохвилевий перебіг, у другій хвилі – жовтяниця, альбумінонурія, білірубінемія, чорна блювота, олігурія, піхвові кровотечі;
- - злоякісна – виражені всі класичні симптоми, загибель на 6-8 добу.

Жовта гарячка

- Діагностика –ІФА.
- Карантинна інфекція.
- Профілактика – вакцинація (жива вакцина з штаму 17 D).

Вірусна діарея ВРХ

- Вірус діареї ВРХ-1 типу.
- Контагіозна хвороба, переважно молодих тварин, що характеризується ерозивно-виразковим запаленням слизових оболонок твравного тракту.
- Часто виникає респіраторний синдром, ерозивно-виразковий стоматит з хромотою, також латентна інфекція корів, що призводить до гострої інфекції плоду, викликає його мумуфікацію, аборти, вроджені дефекти та діарею новонароджених телят.

Вірусна діарея

- Сприйнятливі тварини – корови, буйволи, кози, вівці, косулі, олені. У свиней - безсимптомна інфекція.
- Хворі тварини, що виділяють збудник зі слиною, сльозами, носовим секретом, сечею, фекаліями, спермою та молоком.
- Основним джерелом збудника інфекции є тварини-вірусоносії з хронічним та латентним перебігом хвороби.
- Механізм зараження – повітряно-крапельний, аліментарний (контамінований корм), внутрішньоутробний та через молоко хворих матерів.

Вірусна діарея ВРХ

- Форми хвороби: ентеральна, респіраторна, генітальна, абортивна.
- Ураження шкіри у вигляді дерматиту в ділянці щілини між копитами і навколо вінчика, виразок на лицьовій частині голови та по всій поверхні тіла.
- Аборти у корів, діарея у новонароджених та респіраторні захворювання у телят старше 3-4 місяців.
- У дорослих корів вірусна діарея протікає в основному в хронічному та субклінічному проявах та супроводжується абортами, імуносупресією, персистентною інфекцією, появою слабкого потомства.

Діагностика

- Діагноз ставлять комплексно на основі клініко-епізоотичних даних, паталого-анатомічних змін та лабораторних досліджень.
- Лабораторна діагностика - виявлення специфічного антигену убіологічному матеріалі методом ІФА, МФА, виділення вірусів на КК та його ідентифікація у РН та РГНГА. А також РЗК, ІФА.
- Ретроспективна діагностика – РНГА, ІФА, РН, РЗК.

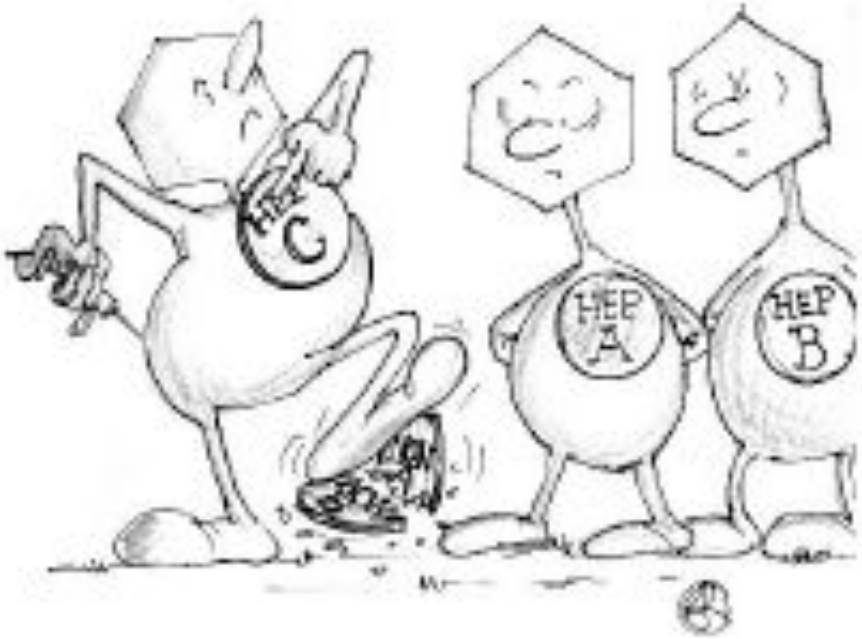
Терапія

- Гіперімунні сироватки та сироватки реконвалесцентів.
- Симптоматичне лікування.

Профілактика

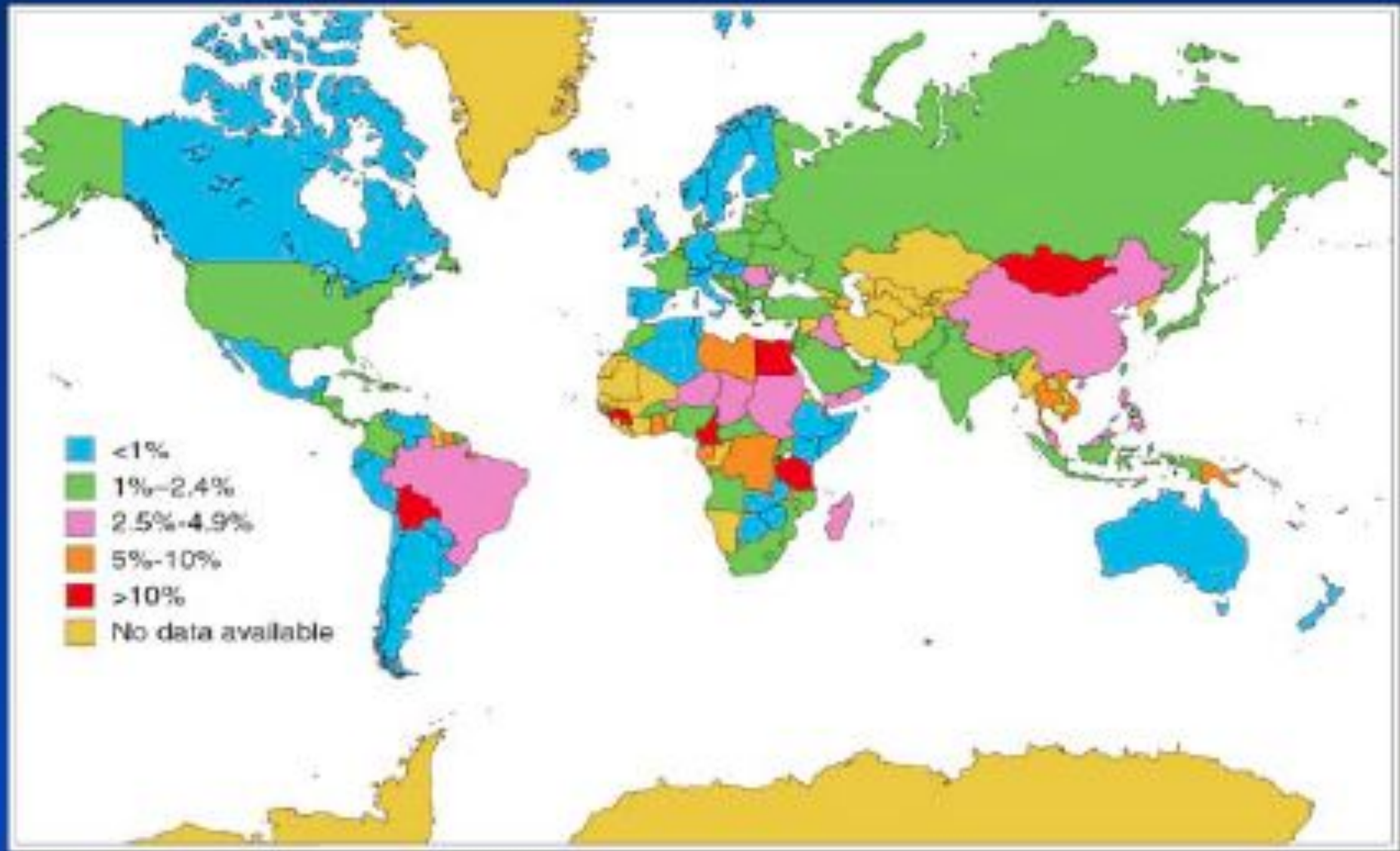
- Живі та атенуйовані вакцини (моно- та асоційовані).
- Ліквідація вогнища – загальні протиепізоотичні заходи (карантин, дезинфекція, обмеження пересування худоби.

1989р.



Вірус гепатиту С

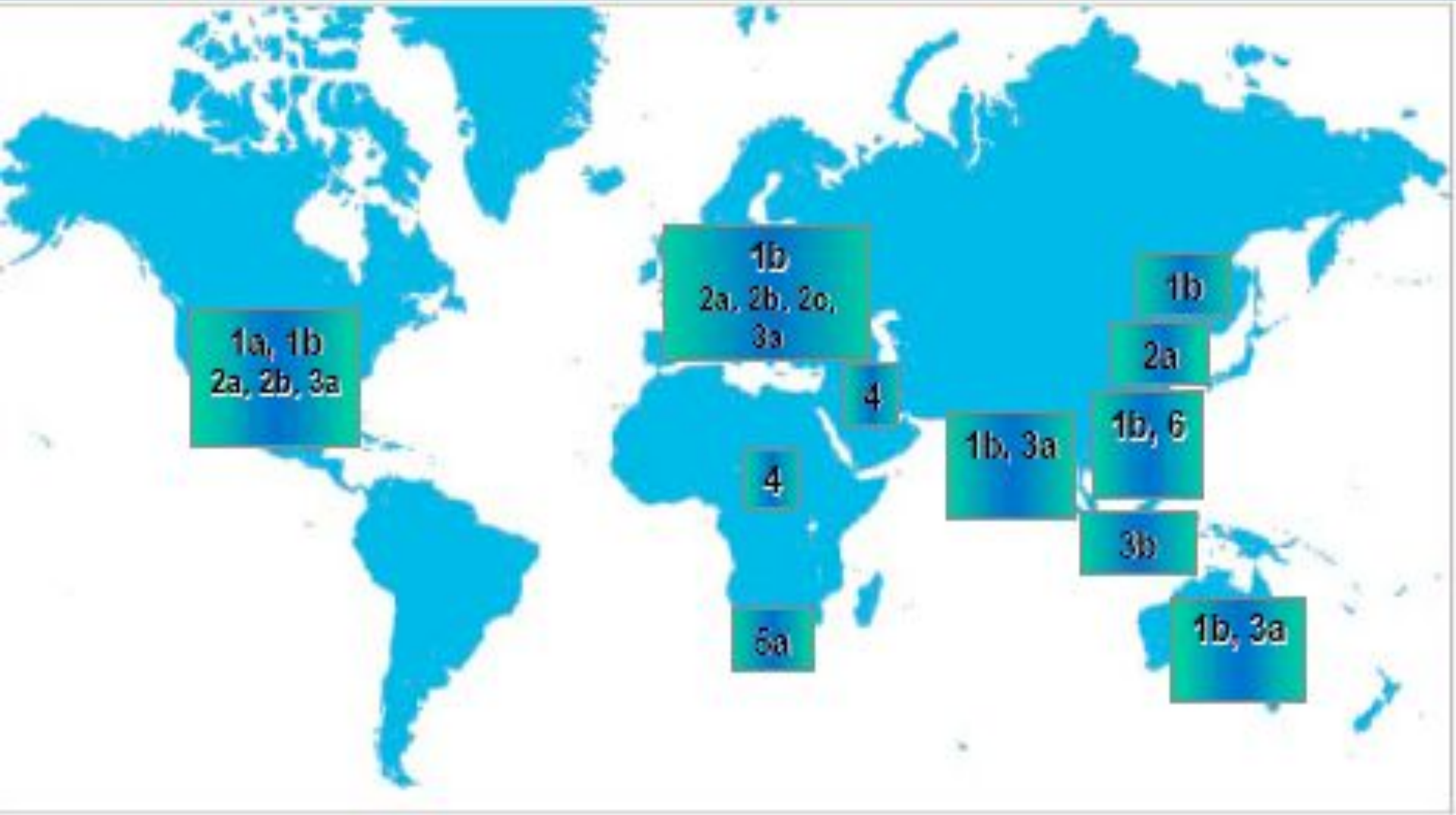
Загальна кількість інфікованих на ВГС близько 500 млн. (3% населення земної кулі)



Генотипи ВГС

- 1 – підтипи 1a, 1b;
- 2 – підтипи 2a, 2 b;
- 3 – підтипи 3a, 10a;
- 4 – підтип 4a;
- 5 – підтип 5a;
- 6 – підтипи 6a, 11a.

Розповсюдження різних типів ВГС



Епідеміологія

Механізм зараження

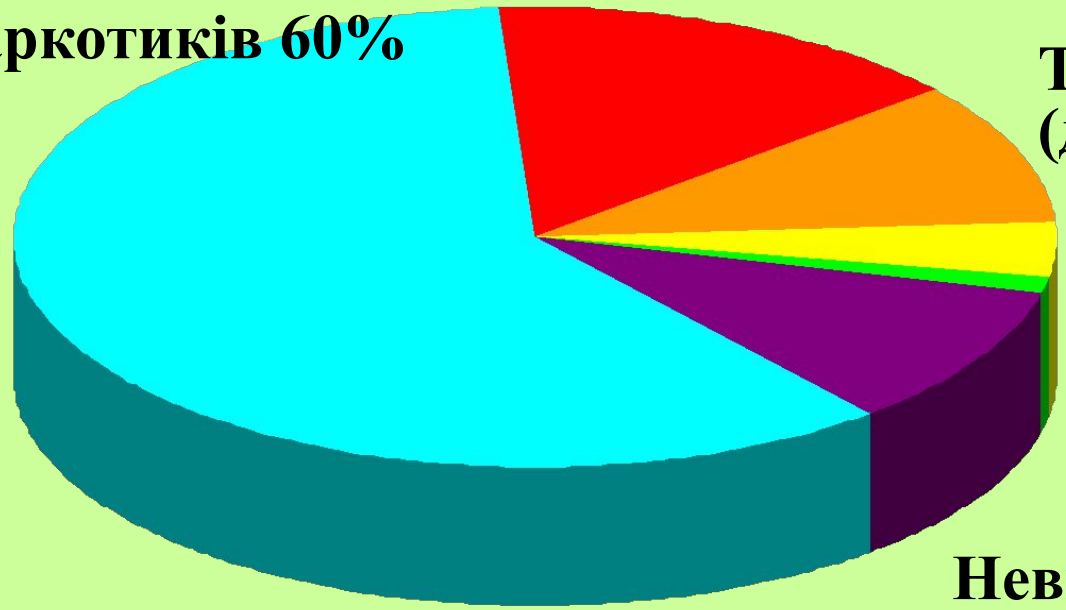
горизонтальний:

- парентеральний (50%),
  шляхи передачі множинні – штучні та природні;
- статевий (травми).

вертикальний:

- пренатальний (4-5,7%).

Шляхи зараження ВГС



* Нозокоміальне, ятрогенне, перинатальне

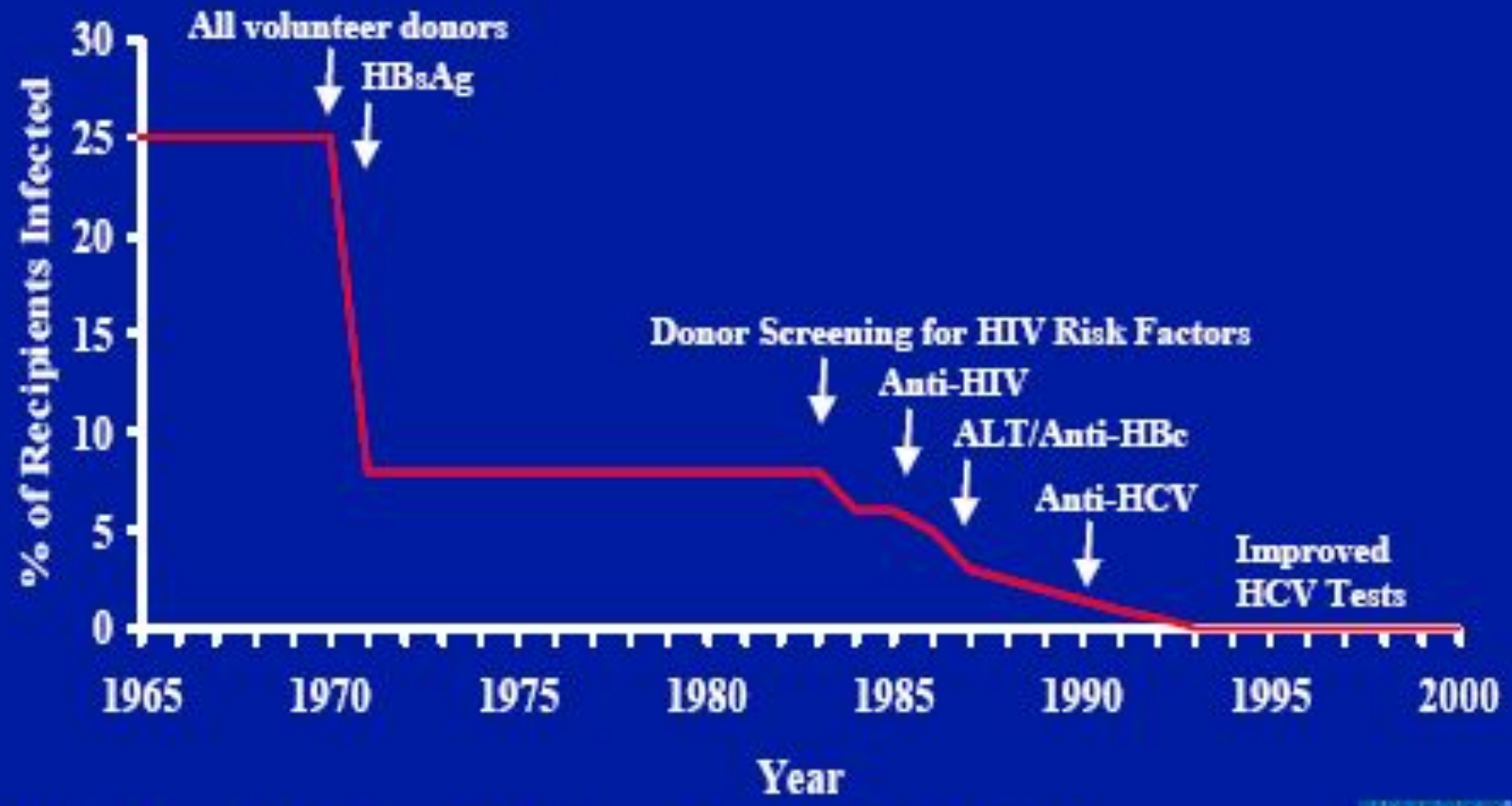
Source: Centers for Disease Control and Prevention

Source: Sentinel Counties, CDC

Групи ризику ураження на ВГС

СІН	80%
Хворі на гемофілію (реципієнти фактора згортання крові) до 1987 р.	85%
Реципієнти органів при трансплантаціях до 1992р.	5%
Пацієнти, яким часто роблять переливання крові	10-40%
Особи,що мають багато сексуальних партнерів	5%

Постранфузійний гепатит С



Adapted from HJ Alter and Tobler and Busch, Clin Chem 1997

CDC

Характеристика інфекції, спричиненої ВГС

Інкубаційний період 6-8 тижнів (2-26 тижнів)

Гостре захворювання

(жовтяниця) ≤20%

Смертність висока

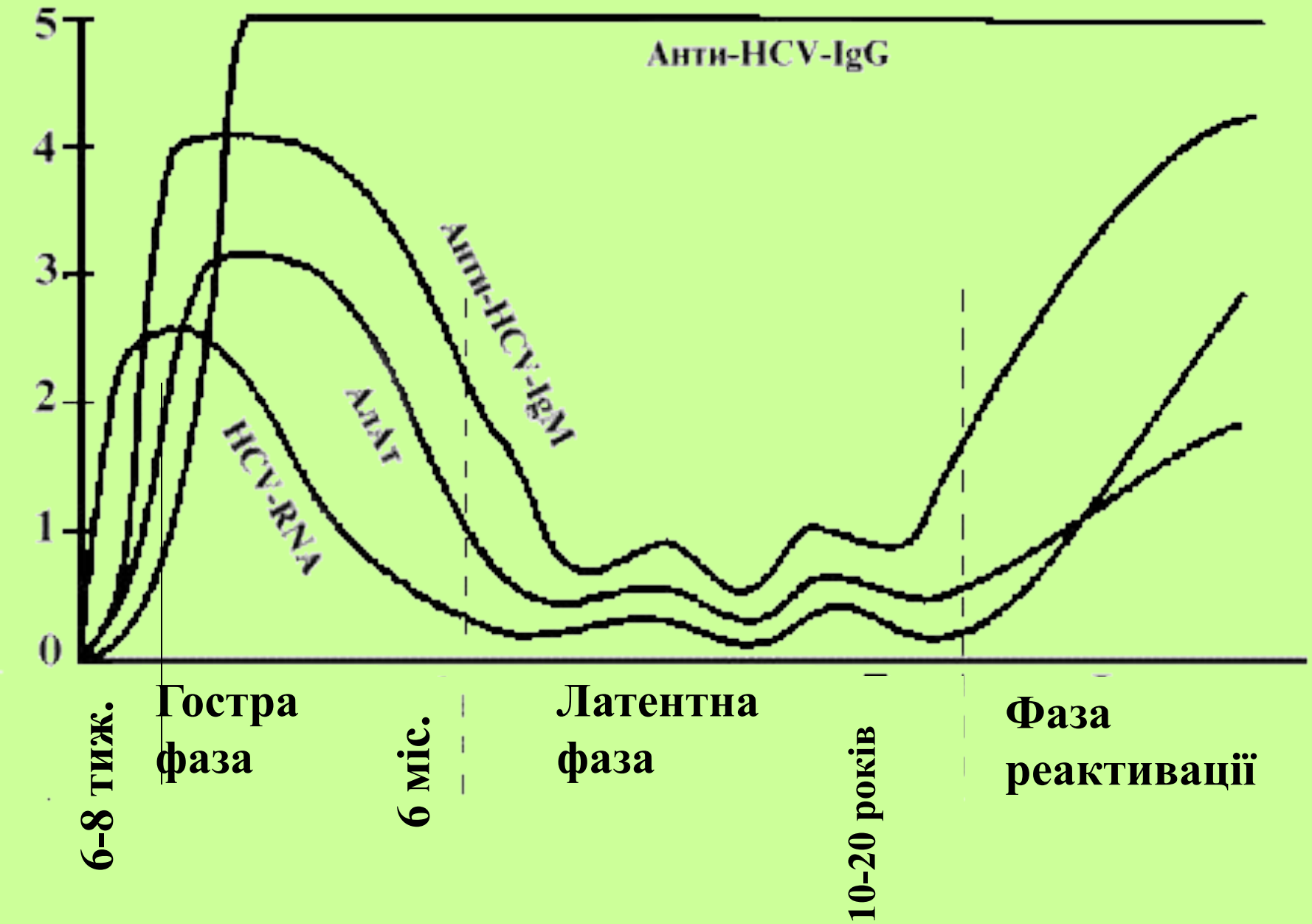
Хронізація інфекції 60%-85%

Хронічні гепатити 10%-70%

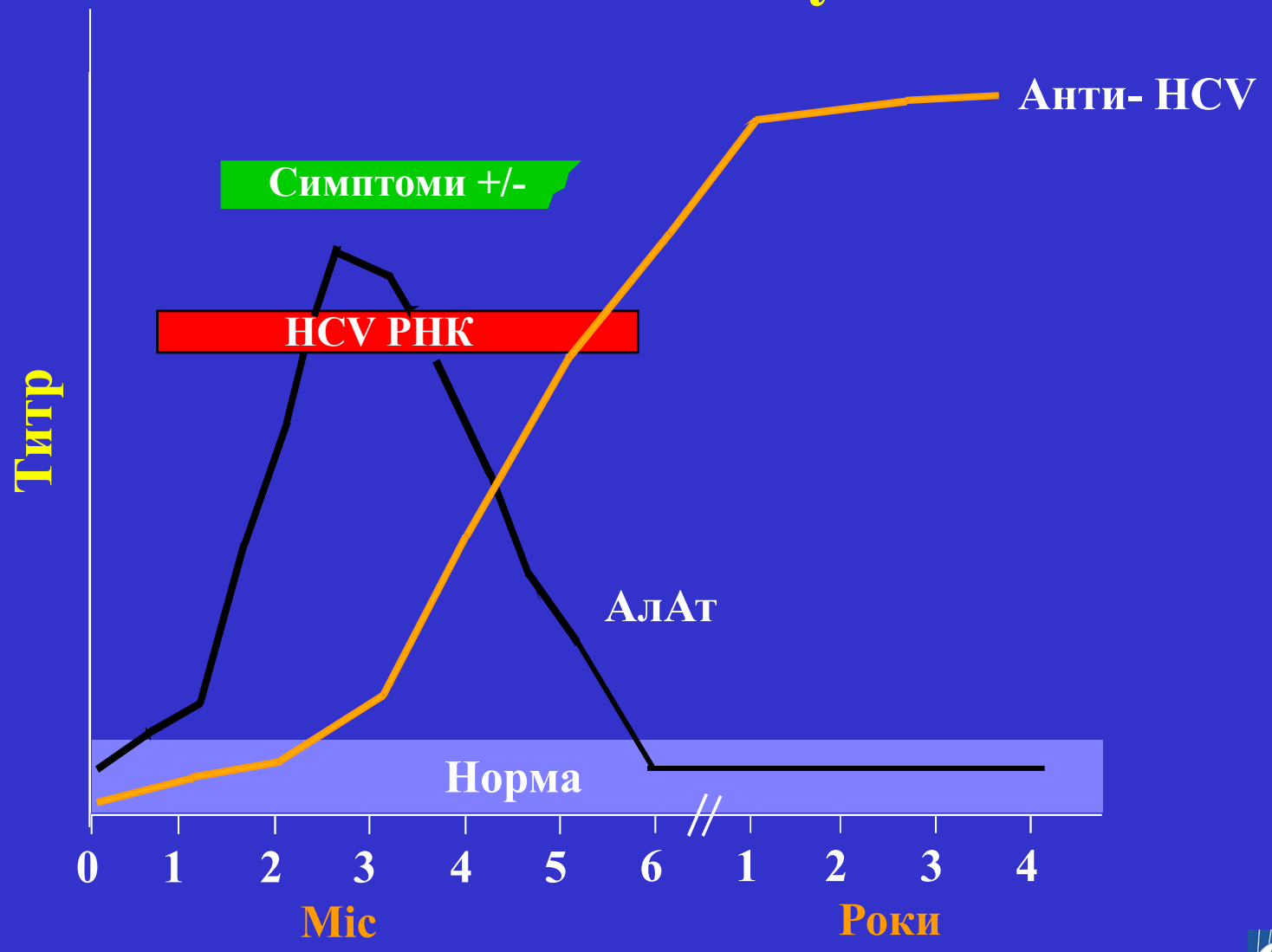
Цироз <5%-20%

вік

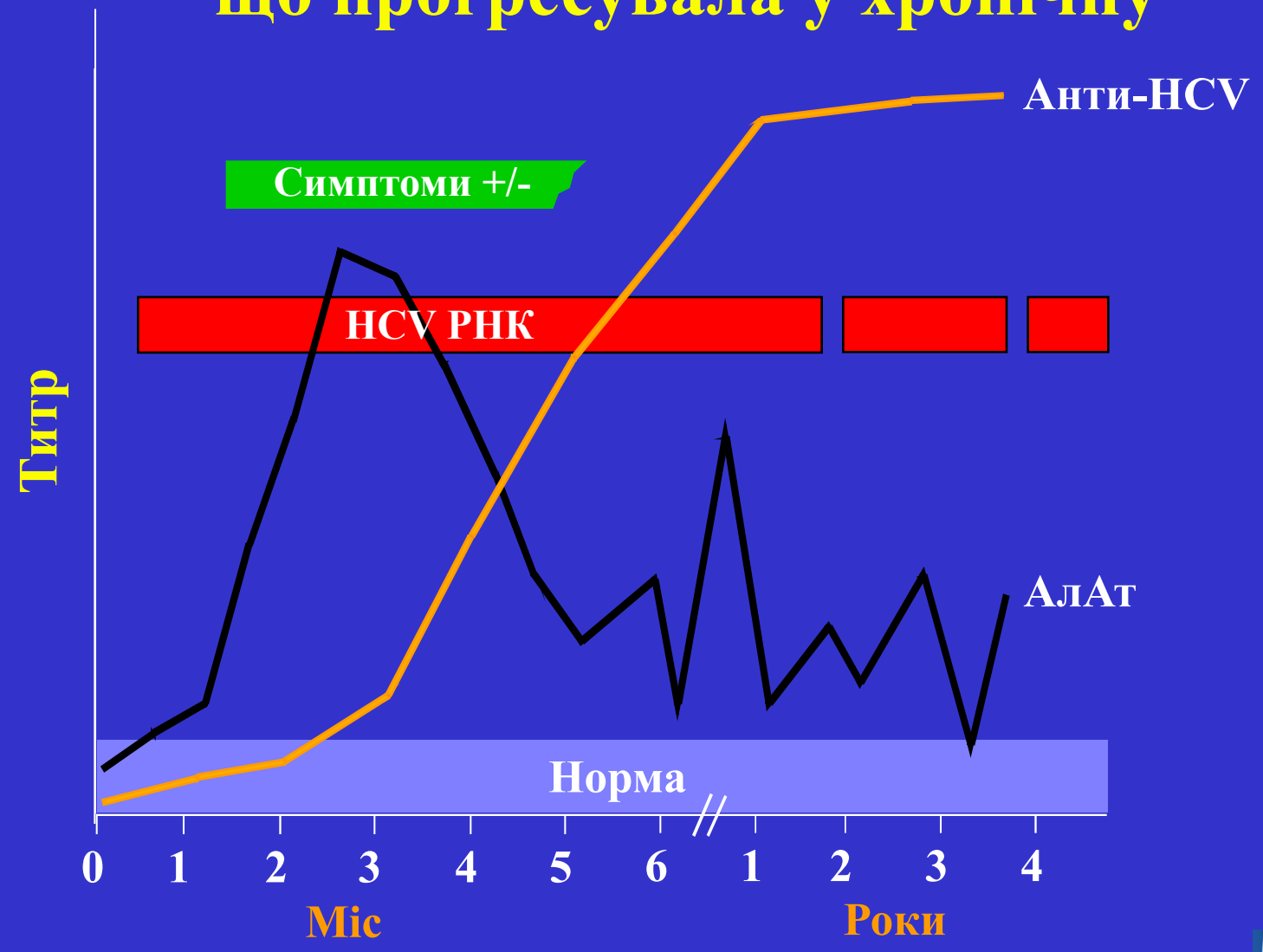
Перебіг ВГС-інфекції



Серологічні профілі гострої HCV – інфекції, що закінчилася видужанням



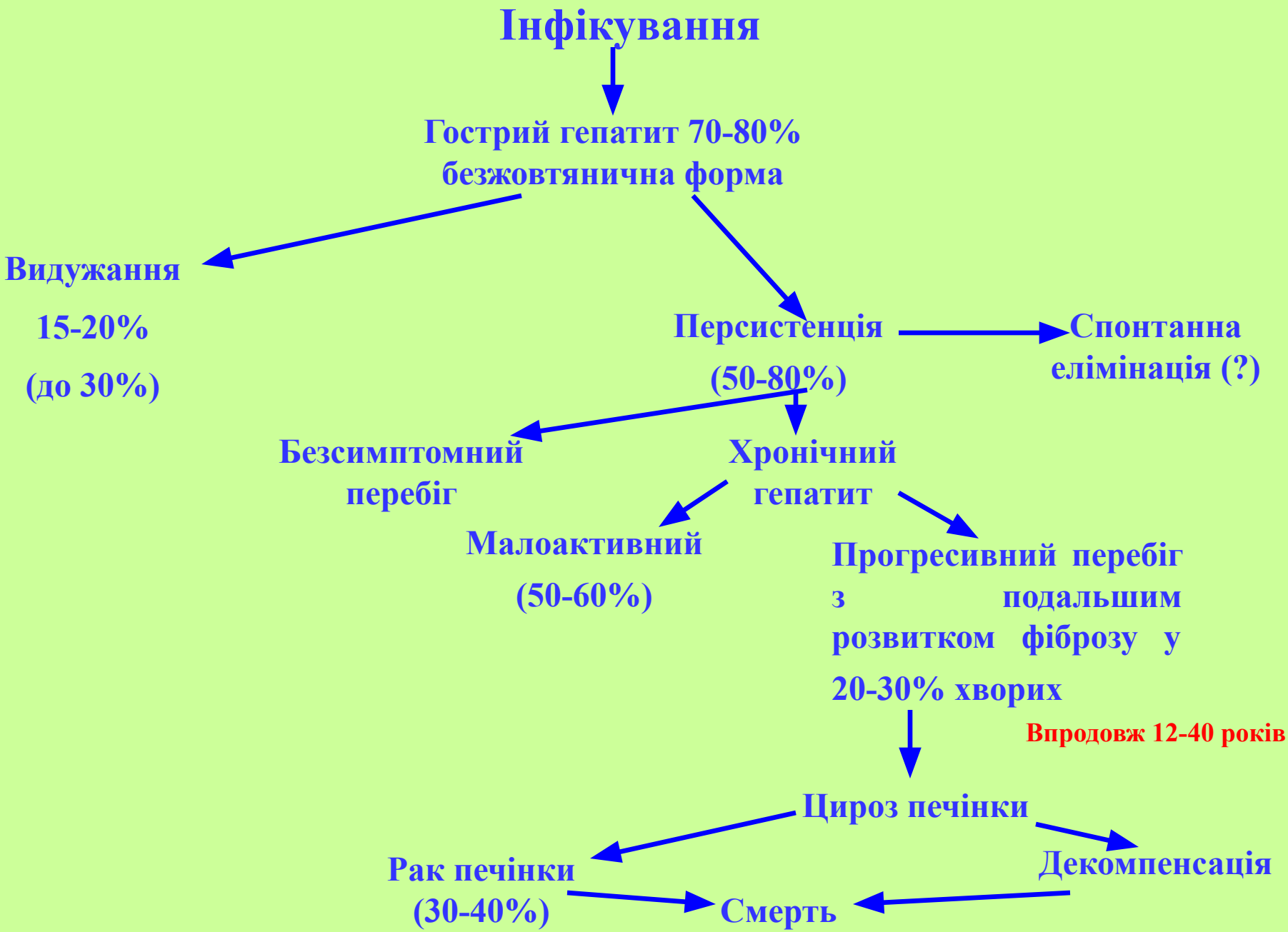
Серологічні профілі гострої HCV – інфекції, що прогресувала у хронічну



Фактори ризику хронізації ВГС

- Підвищений рівень вживання алкоголю
- вік > 40 первинного зараження
- Ко-інфекція ВІЛ
- інші
  - Чоловіча стать
  - Хронічна ко-інфекція ВГВ

Природній перебіг гепатиту С



Імунна відповідь

Ефективність гуморального імунітету низька:

-стійкість вірусних варіантів до нейтралізації антитілами;

-повільна поява віруспецифічних антитіл;

-слабка імуногенність білків ВГС;

-низькі титри антитіл.

При *гострій* ВГС-інфекції потужна відповідь Т-лімфоцитів сприяє елімінації вірусів, а при *хронічній* інфекції Т-клітинна відповідь послаблена, або відсутня.

Імунна відповідь

При *хронічній* інфекції спостерігаються дефекти Т-клітинної ланки імунітету (зниження кількості дозрілих Т-лімфоцитів, Т-хелперів-індукторів і імунорегулюючого індексу), а також неспецифічної резистентності (зменшення концентрації природних кілерів) на фоні підвищення вмісту ліпідів та активності неспецифічної естерази в лімфоцитах та здатності лімфоцитарних клітин до проліферації.

Пригнічення імунної відповіді

Можливість реплікації ВГС окрім печінки в мононуклеарних лейкоцитах периферійної крові (контроль за проникнення чужорідної інформації, а також генетичною однорідністю генетичних популяцій організму).

- Блокування процесингу та презентації антигенів;
- “Мімікрія” власних антигенних детермінант;
- Накопичення мутацій “імунного” вислизання;
- Високе вірусне навантаження, в результаті чого розвивається виснаження та порушення функції Т-клітинної ланки.

Тести, спрямовані на виявлення ВГС

- ***Серологічні тести*** (анти-ВГС)

– ІФА (EIA-2)

– Рекомбінантний імуноблотинг (Recombinant immunoblot assay – RIBA, Inno-Lia)

- ***Молекулярні методи***

– Кількісна ПЛР

– Кількісний метод виявлення РНК ВГС (вірусне навантаження)

– Генотипування (штами ВГС)

Порівняння різних поколінь діагностичних імуноферментних тест-систем для виявлення антитіл до ВГС

Тест-система	**Шифр фрагментів**	**Білок, що містить даний фрагмент**
1 покоління	с 100-3, 5-1-1	NS4
2 покоління	с 100-3, с 22-3, с 33 с	NS4, кор, NS3
3 покоління	с 100-3, с 22-3, с 33 с, NS5	NS4, кор, NS3, NS5
4 покоління*	с 100-3, с 22-3, с 33 с, NS5	NS4, кор, NS3, NS5
RIBA-3	с 100-3, с 22-3, с 33 с, NS5, е1, е2	NS4, кор, NS3, NS5, E1, E2

*Тест-системи 4-го покоління містять синтетичні та рекомбінантні вірусні антигени, розміри яких можуть відрізнятися від фрагментів 3-го покоління.

Типові поєднання маркерів гепатиту С та відповідна клінічна картина (діагноз)

анти IgM	анти-core IgG	анти-NS-Ig G	Інтерпритація результатів ІФА
+	+	-	Можливо гострий гепатит С
-	+	-	1. Видужання 2. Стадія переходу у ХГС (латентну фазу)
-	+	+	1. Видужання 2. Латентна фаза ХГС
+	+	+	1. Загострення в латентну фазу ХГС 2. Фаза реактивації

Визначення РНК ВГС - RT-PCR

Праймери до консервативної ділянки РНК у 5'-нетрансльованій області.

В рідкісних випадках можливі невірні результати, тому визначення РНК ВГС методом ПЛР не повинно використовуватися як єдиний лабораторний тест для постановці діагнозу.

Аналіз дуже інформативний для підтвердження сумнівних даних імунологічних тестів, при контролі ефективності специфічної противірусної терапії та при можливості перинатальної передачі вірусу.

До недавнього часу найчутливішим кількісним тестом при визначенні РНК ВГС вважали тест **Amplicor HCV фирми *Roche* (700 копій РНК в 1 мл).**

Але за допомогою нового набору ***Abbott*** **LCx можно визначити 200 копий РНК/мл.**

Менш чутливий, але широко поширеним є тест **bDNA Quantiplex (*Chiron Corp*.).**

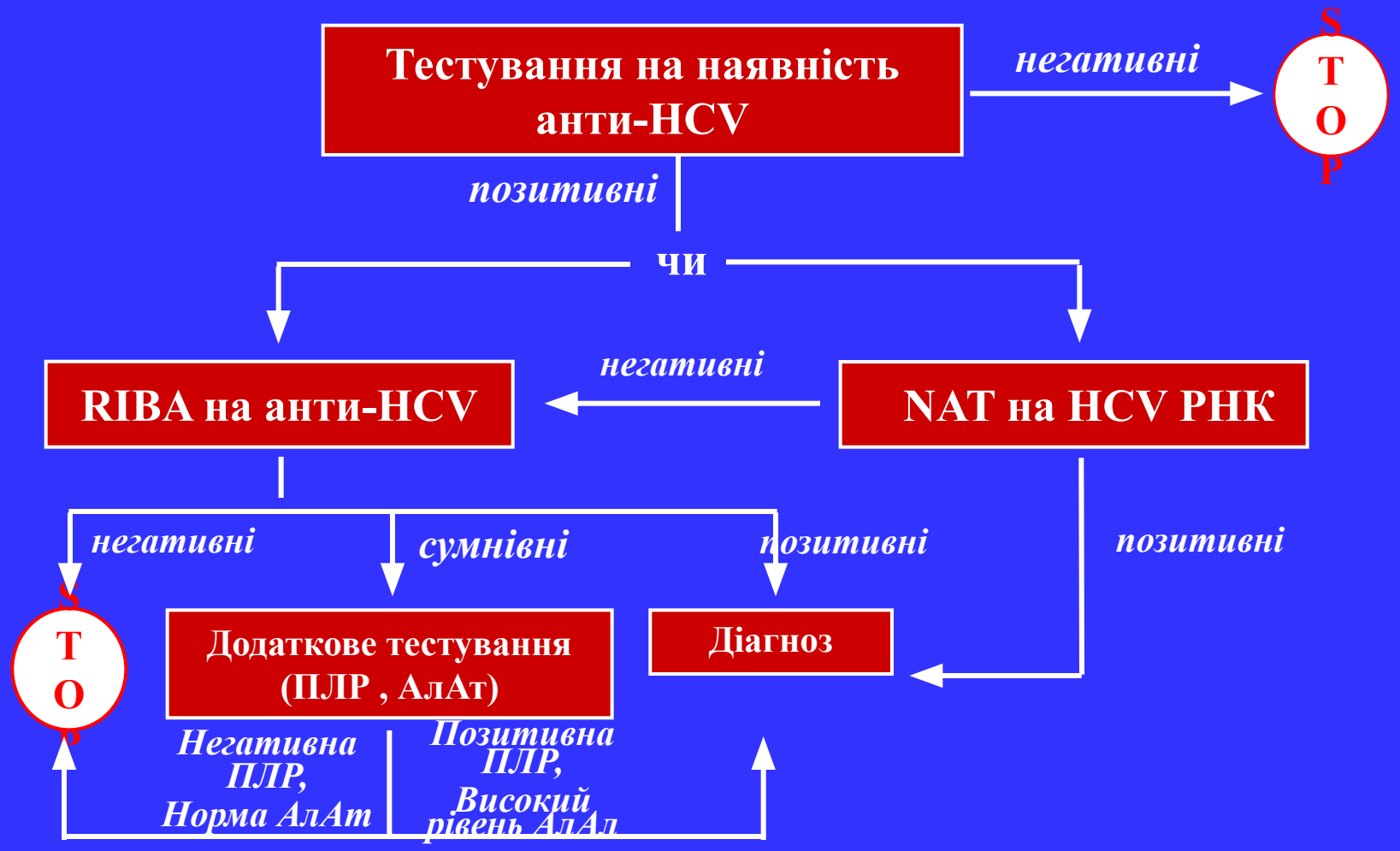
Нові тести

Фірма *Ortho Clinic Diagnostic* розробила новий набір для визначення кор-антигену ВГС. цей тест зручний на ранній стадії ВГС-інфекції, коли ще не з'явилися вірус-специфічні антитіла.

Фірми *Chiron* та *Gen-Probe* пропонують новий ампліфікаційний тест – **NAT assay** – для визначення РНК не тільки ВГС, а й ВІЛ.

Фірми *Gen-Probe* та *Bayer Diagnostics* опубликували дані щодо кількісного визначення РНК ВГС методом ТМА (*transcription-mediated amplification*) з рівнем детекціи – 50 копий/мл.

Алгоритм тестування асимптоматичних носіїв на наявність ВГС



Source: MMWR 1998;47 (No. RR 19)

Терапія

препарати альфа-інтерферону (рекомбінантний ІФН-а,ПЕГ ІФН-а)

аналоги нуклеозидів (рибавірин)

пригнічення активної реплікації вірусу, припинення інфекційного процесу і на цій основі досягнення регресії патологічних змін в печінки, попередження формування цирозу та загрози малігнізації.

Монотерапія – формування стійких форм вірусів.

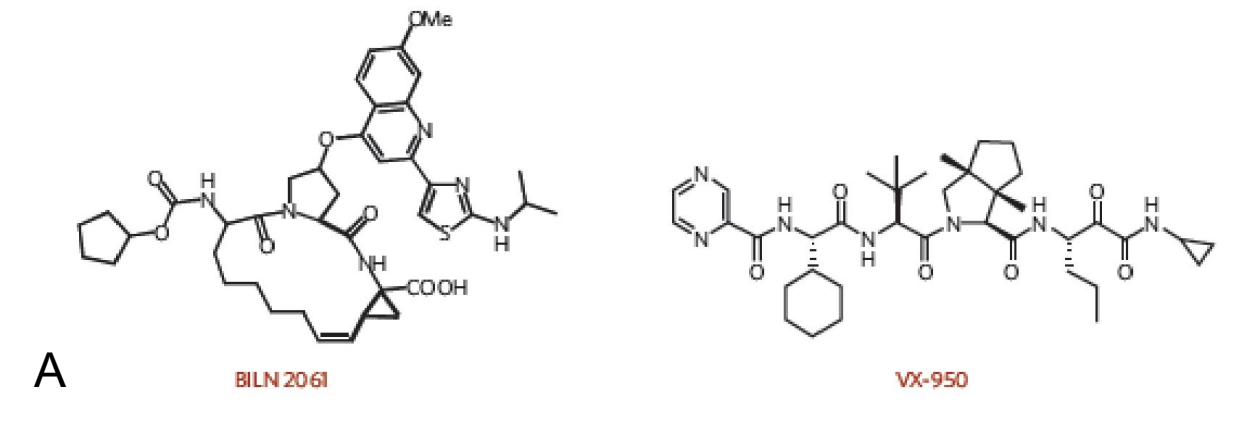
Комплексна терапія – ІФН + рибавірин

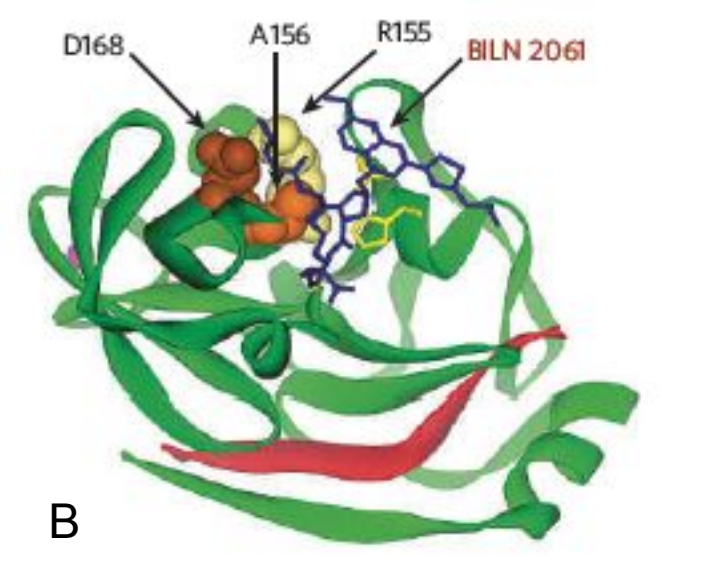
інгібітори полімерази (NS5) – совалді (софосбувір), R7128,

інгібітори протеази - VICTERELIS (боцепревір), INCIVEK (телапревір),совред (симепрревір), тощо.

Експериментальні препарати

Інгібітори ферментів вірусів





A. Структура інгібіторів BILN2061 та VX-950

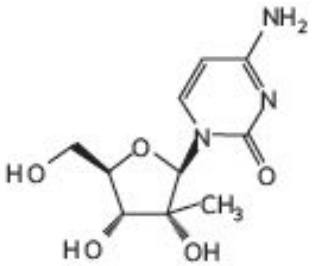
B. Комплекс домену серинової протеази NS3 (зелений) та центральногго домену NS4A (червоний)

Експериментальні препарати

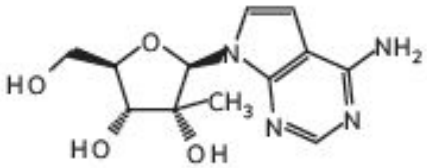
Інгібітори РНК-полімерази ВГС

a **Аналоги нуклеозидів**

NM283

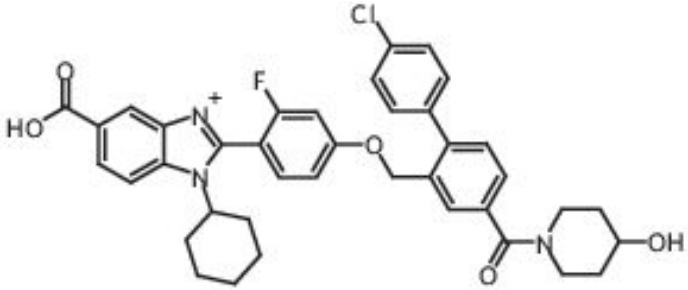


2′-C-methyl cytidine

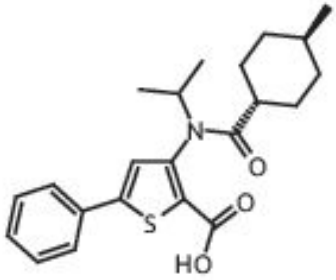


7-deaza-2′-C-methyl-adenosine

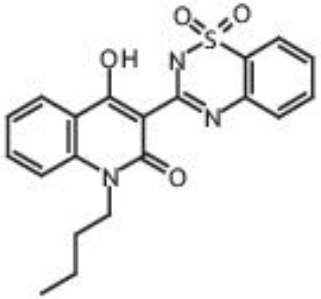
b **Ненуклеозидні інгібітори**



Benzimidazole derivative



Thiophene derivative



Thiadiazine derivative

Нові експериментальні препарати для терапії ВГС (в розробці)

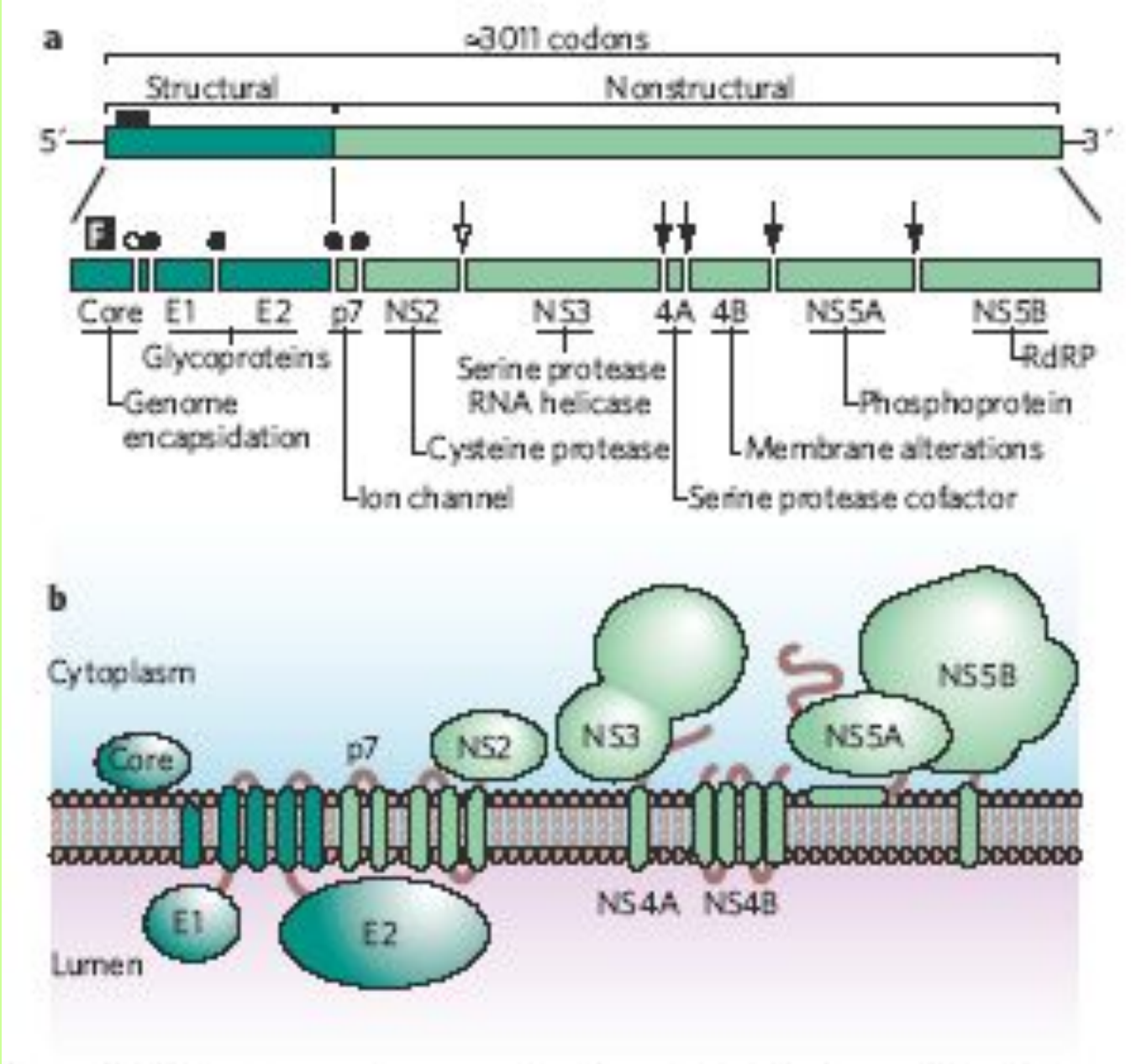
a HCV-targeted drugs				
Compound name(s)	Company	Clinical phase	Target	Mechanism of action
BILN 2061 (Ciluprevir)	Boehringer-Ingelheim	Phase II*	NS3-4A protease	Product-derived serine protease inhibitor
VX-950	Vertex/Mitsubishi	Phase Ib	NS3-4A protease	Serine protease reversible covalent inhibitor
NM283 (Valopicitabine)	Idenix/Novartis	Phase II	NS5B polymerase	Nucleoside analogue (chain terminator)
JTK-103	Japan Tobacco	Phase II	NS5B polymerase	Non-nucleoside allosteric inhibitor
HCV-796	ViroPharma/Wyeth	Phase Ia	NS5B polymerase	Non-nucleoside allosteric inhibitor
*Development halted due to cardiotoxicity in monkeys				
b Host targets/immunomodulators				
Actilon (CpG-10101)	Coley Pharmaceutical Group	Phase Ib	Toll-like receptor-9	Immunomodulator
ANA245 (Isatoribine)	Anadys Pharmaceuticals	Phase Ib	Toll-like receptor-7	Immunomodulator
ANA975	Anadys Pharmaceuticals	Phase Ia	Toll-like receptor-7	Immunomodulator (prodrug of ANA245)

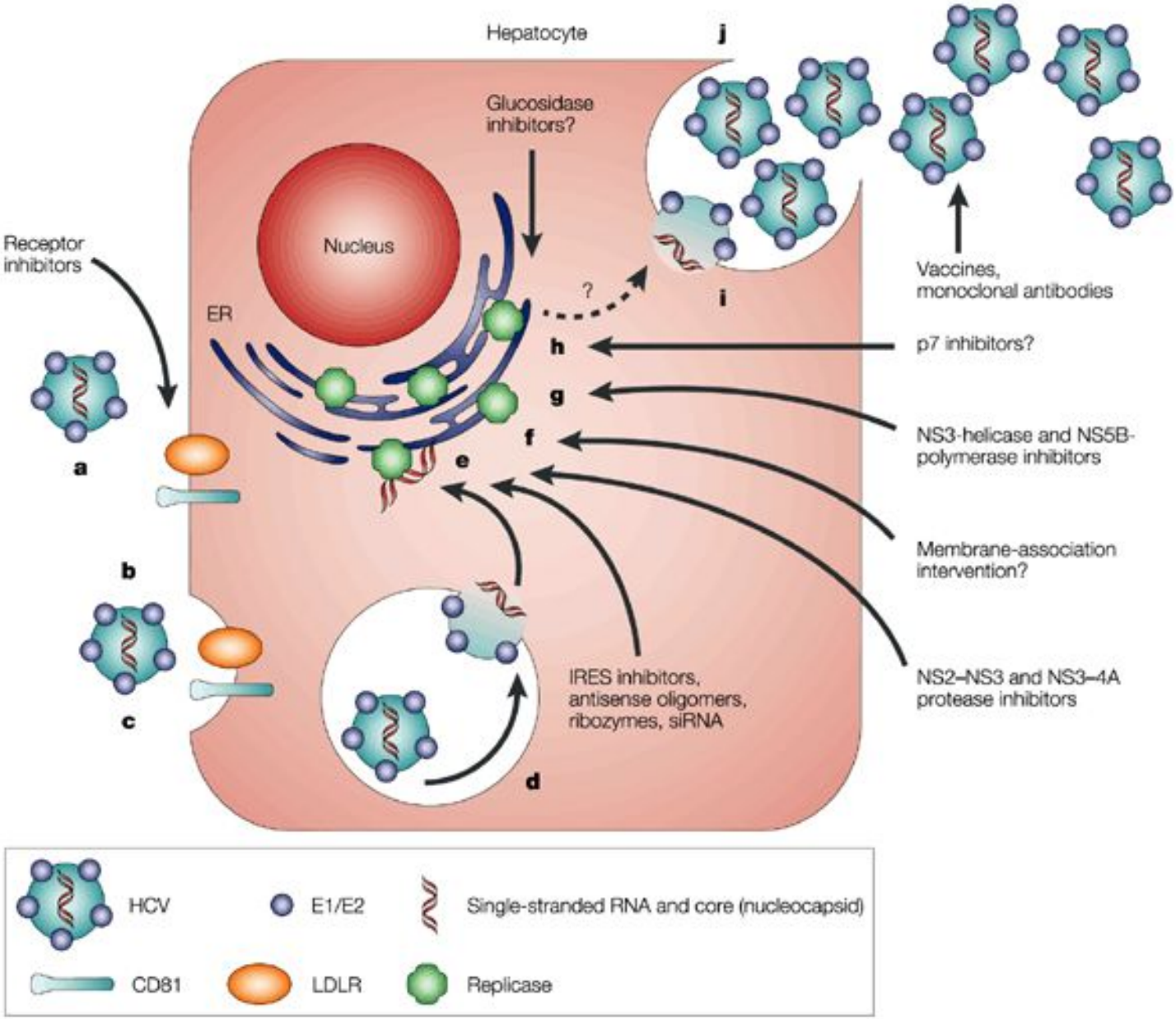
Профілактика

Неспецифічна (переривання парентеральних штучних медичних та немедичних шляхів передачі вірусу).

Специфічна – відсутня.

Дякую за увагу!


a
≈3011 codons
Structural
Nonstructural
5′
3′
Core
E1
E2
p7
NS2
NS3
4A
4B
NS5A
NS5B
Glycoproteins
Genome encapsidation
Ion channel
Cysteine protease
Serine protease
RNA helicase
Serine protease cofactor
Membrane alterations
Phosphoprotein
RdRP
b
Cytoplasm
Core
p7
NS2
NS3
NS5A
NS5B
NS4A
NS4B
E1
E2
Lumen


Hepatocyte
j
Glucosidase inhibitors?
Nucleus
Receptor inhibitors
ER
?
i
Vaccines, monoclonal antibodies
h
p7 inhibitors?
g
NS3-helicase and NS5B-polymerase inhibitors
f
e
a
Membrane-association intervention?
b
IRES inhibitors, antisense oligomers, ribozymes, siRNA
NS2–NS3 and NS3–4A protease inhibitors
c
d
HCV
E1/E2
Single-stranded RNA and core (nucleocapsid)
CD81
LDLR
Replicase

Virus binding and internalization (a); cytoplasmic release and uncoating (b); IRES-mediated translation and polyprotein processing (c); RNA replication (d); packaging and assembly (e); virion maturation and release (f). The topology of HCV structural and non-structural proteins at the endoplasmic reticulum membrane is shown schematically. HCV RNA replication occurs in a specific membrane alteration, the membranous web. Note that IRES-mediated translation and polyprotein processing, as well as membranous web formation and RNA replication, which are illustrated here as separate steps for simplicity, might occur in a tightly coupled fashion. IRES, internal ribosome entry site.