

Лабораторная диагностика
вирусных гепатитов
Основные диагностические
маркеры вирусов

Шевченко Н.И.



Вопросы, разбираемые на лекции

- Классификация и основные характеристики вирусов, вызывающих острые и хронические гепатиты.
- Парэнтеральные гепатиты. Особенности строения и репродукции вируса гепатита В. Основные маркеры, обнаруживаемые в материалах от больных.
- Гепатит D. Особенности патогенеза и клиники коинфекции и суперинфекции вирусом гепатита D. Интерпретация результатов.
- Строение и репродукция вирусов гепатита С и G. Вирусные маркеры. Специфичность, чувствительность и прогностическое значение результатов отдельных методов.
- Энтеральные гепатиты: пути заражения, особенности патогенеза и клинических проявлений гепатитов А и Е. Отбор образцов для анализов. Основные вирусологические маркеры энтеральных гепатитов.

Вирусные гепатиты – группа
полиэтиологических
антропонозных вирусных
инфекций, характеризующихся
поражением печени.



Вирусные гепатиты

- Существуют и другие заболевания, характеризующиеся полиорганностью поражения ,и в том числе – поражением печени. Такие гепатиты не являются самостоятельными заболеваниями, а представляют собой лишь синдром основного заболевания

Эпидемиология

- По данным ВОЗ в 2001 году хронические заболевания печени были причиной 1,4 млн смертей, включая 796 тыс. случаев смерти от цирроза и 616 тыс.- от рака печени. Как минимум 20% этих смертей связывают с вирусом гепатита С (ВГС). Его распространенность составляет 170 млн человек. Приблизительно у 2 млрд человек во всем мире (т.е у одной трети мировой популяции) имеются серологические маркеры HBV- инфекции, из них маркеры хронической инфекции – у 350 млн.

Эпидемиология

- В республике Беларусь также отмечен неуклонный рост заболеваемости хроническими вирусными гепатитами с 8,8 на 100 тыс населения до 26,34 в 2005 году. Анализ возрастной структуры заболевших показывает, что наиболее поражаемыми возрастными группами являются подростки и взрослые от 15 до 40 лет, их удельный вес в РБ составляет 75%. Даже при использовании современных методов диагностики в 5-25% случаев природа острых и хронических гепатитов остается нераспознанной

Вирусные гепатиты

- Идентифицированы и детально охарактеризованы 6 типов вирусов, способных вызывать гепатиты у людей : А, В, С, D, Е, G. Ими вызываются 90% всех случаев гепатитов, тогда как для 10% заболеваний, напоминающих вирусные гепатиты, этиологические агенты пока не установлены

Вирусные гепатиты различаются по:

- механизму передачи возбудителей
- длительности инкубационного периода
- тяжести протекания заболевания
- способности давать осложнения и переходить в хроническую форму



Вирусные гепатиты

- Вирусы гепатитов А и Е вызывают только острые заболевания
- Вирусы В, С и D – острые и хронические формы гепатитов. Хронические формы часто прогрессируют с развитием циррозов печени и печеночно-клеточного рака, которые определяют инвалидизацию и смертность в этой группе инфекций. Хронический гепатит D прогрессирует с исходом в цирроз печени чаще и быстрее, чем гепатит С. Хронический гепатит В по частоте прогрессирования занимает промежуточное положение

С учетом эпидемиологических особенностей выделяют две группы вирусных гепатитов

- 1. Вирусные гепатиты с парентеральным (кровяно-контактным) механизмом передачи:

гепатиты **В, С, D, G и TTV.**

Характерно хроническое течение заболевания и вирусоносительство

□ 2. Вирусные гепатиты с энтеральным (фекально-оральным) механизмом передачи:

гепатиты **А, Е и F.**

Возбудители передаются пищевым, водным и контактными путями.

Диагностика

- Различные виды острых и хронических гепатитов не имеют патогномоничных характеристик клинического течения и гистологической картины поражения печени

Основа лабораторной диагностики вирусных гепатитов

- знания об их возбудителях и репликации
- информация о появлении и исчезновении маркеров инфицирования
- современные иммунохимические и молекулярно- биологические методы детекции антигенов, антител и нуклеиновых кислот

Диагностика

- Лабораторная идентификация этиологического агента важна :
- для определения прогноза заболевания
- при количественном определении вирусных нуклеиновых кислот – для оценки эффективности специфической противовирусной терапии

Сравнительная характеристика гепатотропных вирусов

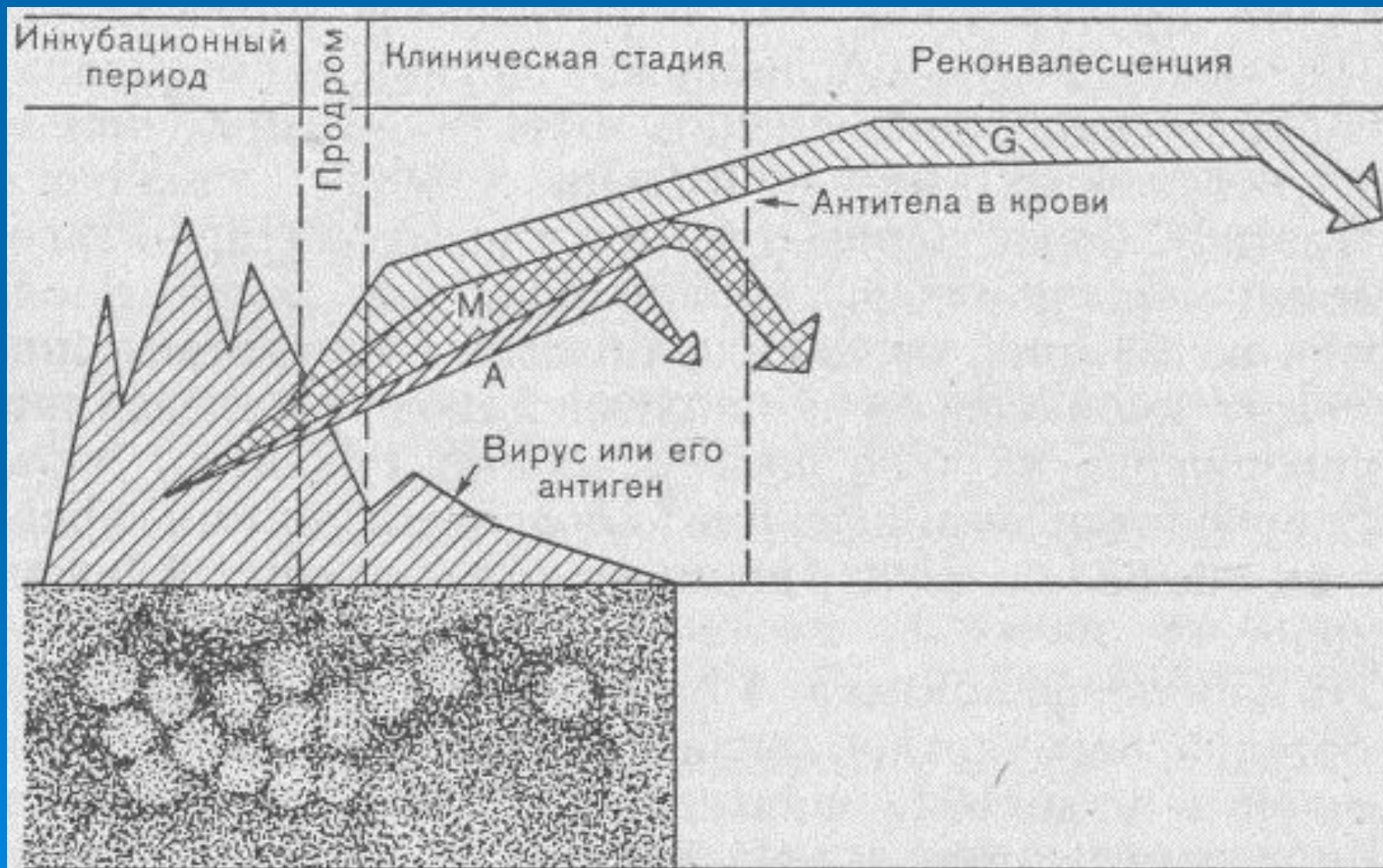
Вирус	Семейство	Род	Геном
А (HAV)	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepatovirus</i>	1Н + РНК
В (HBV)	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>	2Н циркулярная ДНК
С (HCV)	<i>Flaviviridae</i>	<i>Hepacivirus</i>	1Н нефрагментированная + РНК

Вирус	Семейство	Род	Геном
D (HDV)	Не классифицирован		Кольцевая 1Н +РНК
E (HEV)	<i>Caliciviridae</i>	<i>Hepacivirus</i>	1Н нефрагментирова нная + РНК
F (HFV)	Фактически не изучен		
G (HGV)	<i>Flaviviridae</i>	<i>Hepacivirus</i>	1Н нефрагментирова нная + РНК
TTV	Не классифицирован, похож на парвовирусы		1Н ДНК

Гепатит А

- ВГА не имеет наружной оболочки, но состоит из наружной белковой капсулы, или капсида, содержащего внутри положительную одноцепочную РНК, который действует в качестве матрицы для выработки вирусных белков внутри клетки-хозяина. **Лабораторная диагностика** ГА основана на выявлении маркеров вируса ГА – антигена ВГА, антител (анти-ВГА класса IgM и IgG), а также РНК ВГА

Специфические маркеры гепатита А



Специфические маркеры гепатита А

- РНК НВА. Выявляется в сыворотке, фекалиях, воде, пищевых продуктах методом ПЦР. Выявление в сыворотке коррелирует с максимальным уровнем антител. Обнаружение РНК в стуле указывает на инфицированность больного, в воде и пищевых продуктах – на зараженность вирусом.

Специфические маркеры гепатита А

- Антигены ВГА выявляются ИФА в фекалиях через 10-20 дней после инфицирования, в самом начале разгара болезни могут быть обнаружены только у 15-20% больных.

Специфические маркеры гепатита А

- IgG. Выявляются ИФА в сыворотке или плазме в начале заболевания. Максимальная концентрация в течение нескольких недель, отсутствие их в разгаре болезни позволяет исключить гепатит А. Наличие IgG при отсутствии IgM указывает на перенесенную в прошлом болезнь

Специфические маркеры гепатита А

- После выздоровления IgG обнаруживаются пожизненно и рассматриваются как показатель иммунной защиты против гепатита А. Сейчас определяют количественно для оценки динамики поствакцинального иммунного ответа



Специфические маркеры гепатита А

- Антитела к ВГА класса М - выявляются ИФА и РИА в сыворотке или плазме в начале болезни независимо от наличия или отсутствия клинических симптомов. Титр Ат быстро нарастает, максимальная концентрация через 1,5-6 мес. после начала болезни, через год после выздоровления уже не обнаруживаются

Специфические маркеры гепатита А

- Интерпретация. Выявление IgM указывает на острую болезнь и позволяет проводить серологическую дифференциацию: обнаружение IgM и IgG указывает на острую инфекцию. При перенесенном в прошлом заболевании отсутствуют IgM, но обнаруживаются IgG.

Лабораторная диагностика гепатита Е (ГЕ)

- При постановке диагноза ГЕ необходимо принять во внимание несколько диагностических аргументов:
- наличие у больного симптомокомплекса острого, и предположительно инфекционного гепатита
- надежное исключение этиологического участия вирусов ГА и ГВ, основанное на отрицательных результатах серологических тестов - анти-ВГА класса IgM и анти-НВс класса IgM
-

Лабораторная диагностика гепатита Е (ГЕ)

- тщательный анализ данных
эпидемиологического анамнеза,
включая указания на недавние выезды
в эндемичные регионы
- исследование (по возможности)
фекалий больного на присутствие
частиц вируса ГЕ методом
иммуноэлектронной микроскопии, ПЦР

Лабораторная диагностика гепатита Е (ГЕ)

- Существуют диагностические методы, основанные на применении иммунофлюоресцирующих антител (МФА) для определения антигена ВГЕ в фекалиях и иммуноферментного анализа (ИФА) для определения антител к ВГЕ - анти-ВГЕ класса IgM и IgG.

Лабораторная диагностика гепатита Е (ГЕ)

- Наличие анти-ВГЕ класса IgM с высокой частотой определяются в сыворотках больных ГЕ в острой стадии заболевания и в период ранней реконвалесценции
- выявление анти-ВГЕ класса IgG свидетельствуют о перенесенной в прошлом ГЕ - инфекции
- Для диагностики ГЕ определяют также РНК ВГЕ

Острый гепатит Е.

Специфические маркеры

- РНК вируса. Появляется в крови через 2-3 недели после заражения, вирусемия длится около 2 недель и свидетельствует о факте инфекции
- IgM появляются после заражения через 3-4 недели и исчезают через несколько месяцев, свидетельствуют об острой фазе болезни

Острый гепатит Е.

Специфические маркеры

- IgG преобладают на стадии выздоровления с нарастанием титра до высоких значений в течение нескольких месяцев. Наличие только IgG без IgM не является подтверждением диагноза гепатита Е на данный момент. Диагноз выставляется только при одновременном обнаружении обоих классов иммуноглобулинов. Неясно, предохраняют ли IgG от повторного заражения?

Вирусный гепатит ни А ни Е

- У части больных с типичными симптомами вирусного гепатита не удается выявить специфические маркеры известных гепатитов. Возможная этиологическая роль гепатита G, трансфузионного вируса TTV в возникновении ни А ни Е не подтвердилась. Возможно, это вирус SEN. Он обнаружен у 92% больных трансфузионным гепатитом ни А ни Е. SEN характеризуется хронизацией, фекально-оральный путь передачи редок.

Лабораторная диагностика гепатита В

- основана на выявлении специфических для ГВ антигенов и соответствующих антител в крови, а также вирусных нуклеиновых кислот. Основными тестами являются:
- HB sAg - анти-HB s
- анти-HBc класса Ig M и IgG
- HBe Ag - анти-HBe
- ДНК ВГВ

В составе вириона HBV есть четыре основных антигена:

- HBsAg - поверхностный (superficial) антиген.
- HBcAg - сердцевинный антиген (cor-антиген)
- HBeAg (антиген e) - локализован в сердцевине вириона и циркулирует в крови в свободном виде или в виде комплекса с антителом анти-HBe
- HBxAg (оболочечный) - расположен вблизи оболочки вириона. Его роль в патогенезе изучается

**Поверхностный антиген - HBsAg -
существует в виде трех морфологически
различных вариантов:**

- суперкапсид цельного вириона
- в виде частиц диаметром 20 нм,
имеющих сферическую форму
- в виде нитей длиной 230 нм



Сочетание лабораторных маркеров при различных стадиях / формах вирусного гепатита В



Специфические маркеры гепатита В без D- агента.

- HBV ДНК выявляется ПЦР, означает вирусемическую стадию процесса и свидетельствует о высокой репликативной активности. При о.гепатите быстро нарастает в течение инкубационного периода, достигая максимума в начале периода разгара. Обнаружение ДНК свыше 5-6 мес после заболевания – неблагоприятный признак (хронизация процесса).

Специфические маркеры гепатита В без D- агента

- HBsAg – поверхностный антиген, самый ранний маркер, появляющийся еще в инкубационном периоде. При о.течении процесса циркулирует 5-6 мес., свыше этого времени- хронизация процесса. Определяют методом ИФА.

Специфические маркеры гепатита В без D- агента

- Если HBsAg+, то образец перепроверяется в 2 параллельных пробах. Если результат вновь положительный хоть в одной пробе – первично положительный образец (скрининговое исследование). Затем этот образец исследуют подтверждающим тестом с нейтрализующим компонентом. Если результат отрицательный – у обследуемого отсутствует гепатит В, но полностью диагноз гепатита В не исключают.

Специфические маркеры гепатита В без D- агента

- 1.наличие сероконверсионного окна
- 2.инфекция может быть латентной
- 3.чувствительность тест-системы недостаточна.

Специфические маркеры гепатита В без D- агента

- AntiHBs. Обнаружение антител является или показателем иммунитета к гепатиту В или иммунного ответа на вакцинацию. Если после вакцинации, то титр к HBs Ag нарастает постепенно и при этом не образуются антитела к HBc – антигену.

Специфические маркеры гепатита В без D- агента

- HBs Ag- сердцевинный антиген. Является сильным иммуногеном и вызывает образование специфических антител. Эти антитела появляются через 1,5 – 2 мес.с начала периода разгара и могут циркулировать годами. Могут быть единственным маркером
- - перенесенного гепатита В
- - стадии серологического окна между исчезновением HBsAg и появлением к нему антител

Специфические маркеры гепатита В без D- агента

- HBcM- особая роль, т.к. появление их подтверждает о.период гепатита В. Обнаружение их важно, когда
- 1.специфическая диагностика гепатита В проводится поздно, т.е. HBs Ag в крови уже отсутствует
- 2. у больного есть клиника острого гепатита при наличии установленного хронического гепатита- низкий титр HBcM (подтверждение суперинфекции)

Специфические маркеры гепатита В без D- агента

- 3. антитела к HBs могут быть после вакцинации, HBs G являются маркерами перенесенной инфекции
- 4. HBs G могут присутствовать в стадии серонегативного окна
- 5. Ат к HBsAg в 15% случаев могут вообще не появиться
- 6. в течение 6 лет после о.гепатита В у пятой части HBs Ag людей антитела к HBsAg могут исчезнуть, а антитела к HBs Ag остаются пожизненно.

Специфические маркеры гепатита В без D- агента

- Ат HBeAg. Мнение о наличии антител , как благоприятном исходе заболевания неоднозначно. При о.гепатите В благоприятное прогностическое значение имеет сероконверсия, т.е. исчезновение HBeAg и появление антител к нему, особенно при проведении терапии.

- Неоднозначность интерпретации является следствием открытия дефектного вируса, имеющего мутацию в зоне генома- прекор-мутанты. Они не могут синтезировать HBeAg, но при инфекции в крови длительно обнаруживаются к нему антитела. Этот вариант гепатита является хроническим, протекает длительно, бессимптомно, и эти периоды характеризуются обострением с вирусемией и некротическими изменениями в печени.

Маркеры репликации вируса

- положительные результаты определения ДНК HBV в ПЦР
- HBeAg
- анти-HBc IgM
- HBsAg

состояние после вакцинопрофилактики

- ДНК-, HBsAg-,
- a-HBc(M)-, HBeAg-,
- a-HBs+, a-HBe-,
- a-HBc(G)-

анти-HBs выявляются:

- у реконвалесцентов,
- после вакцинации,
- после введения препарата иммуноглобулина, содержащего анти-HBs.

анти-HBs не определяются:

- при ОГВ,
- на ранней стадии разрешения вирусного гепатита В.

Анти-НВс класса G обнаруживаются:

- у больных ОГВ
- при молниеносных формах инфекции
- у хронических больных
- у носителей HBsAg
- у реконвалесцентов
- у перенесших в прошлом инфекцию, которая завершилась элиминацией вируса

Анти-НВс класса G не выявляются:

- на ранних стадиях ОГВ
- после вакцинации против гепатита В и пассивной иммунизации

Предикторы хронизации инфекции

- Высокие уровни ДНК ВГВ в сыворотке крови на начальной стадии инфекции
- Высокие концентрации HBsAg и HBeAg на начальной стадии инфекции
- Персистенция HBsAg (>6 месяцев) и HBeAg (>10 недель)

Предикторы хронизации инфекции

- Анти-HBs не появляются после перенесенной инфекции
- Персистенция анти-HBs IgM (>2 месяцев).
- Инфекция, вызванная HBeAg-негативным мутантом вируса
- Наличие иммунодефицита (первичного, вторичного) у инфицированных

острый гепатит В

- ДНК+, HBsAg+
- a-HBc(M)+
- HBeAg+, a-HBs-, a-HBe-
- a-HBc(G)-

ранняя фаза разрешения гепатита В

- ДНК-, HBsAg-
- а-HBc(M)-, HBeAg-
- а-HBs-, а-HBe-
- а-HBc(G)+

стадия реконвалесценции после гепатита В

- ДНК-, HBsAg-
- а-HBc(M)-, HBeAg-
- а-HBs+, а-HBe+/-
- а-HBc(G)+

здоровое носительство

- HBsAg+, a-HBc(M)-
- HBeAg-, a-HBs-/+
- a-HBe-, a-HBc(G)+

Последовательность тестирования на маркеры В-инфекции

1. HBsAg
2. анти-HBc IgM
3. HBe-Ag
4. анти-HBs тотальные
5. анти-HBc тотальные

Лабораторная диагностика гепатита Д (ГД)

- Вирус гепатита Д (ВГД) – это дефектный вирус, содержащий одно-спиральную РНК, которому для репликации необходимо помощь вируса ГВ для синтеза оболочечных белков, состоящих из HBsAg, который используется для инкапсуляции генома ВГД. ВГД не принадлежит ни к одному из известных семейств вирусов животных, по своим свойствам ВГД наиболее близок к вирионам и сателлитным вирусам растений.

D- вирусная инфекция.

Специфические маркеры

- РНК – определяют ПЦР, обнаружение свидетельствует об активности процесса и коррелирует с максимумом некротических процессов в печени. Тест нужен при наблюдении больных хроническим гепатитом.
- HDV Ag-выявляют ИФА, РИА, иммуноблотом. Обнаружение антигена указывает на активную репликацию вируса в тканях печени.

D- вирусная инфекция. Специфические маркеры.

- Ат HDV M –являются маркерами активной инфекции. При о.гепатите В с D-агентом эти антитела исчезают из кровотока в течение 2 мес.с начала инфекции. При суперинфекции циркулируют месяцами.
- Ат HDV G являются маркерами перенесенного гепатита D,обнаруживаются в крови многие месяцы.

Острый гепатит В с D-агентом. Специфические маркеры.

- Лабораторная диагностика: выявление HBsAg, HBcM, HDV M ,которые циркулируют на протяжении всего заболевания.
- Коинфекция (одновременное инфицирование вирусом гепатита В и D).

Острая D-суперинфекция вирусоносителя гепатита В

- К специфическим маркерам относятся :
- HBsAg ,HDV M ,HDV G при отсутствии HBcM.

Вирусный гепатит G

- Не вызывает стойкого иммунного ответа , и серологические тесты не используются для диагностики. Единственный метод – обнаружение РНК вируса.

Лабораторная диагностика гепатита С (ГС)

- Открытие возбудителя ГС стало возможным благодаря методам молекулярной биологии в 1989-1991 гг. Сначала путем клонирования был получен из сыворотки больных с гепатитом “ни-А, ни-В” вирусный геном, а затем была установлена и структура самого вируса. Геном вируса ГС (ВГС) представлен однонитчатой позитивной РНК, состоящих из 10 000 нуклеотидных оснований, образующих регионы, которые кодируют три структурных белка (С, Е1, Е2) и пять неструктурных (NS2, NS3, NS4, NS5).

Лабораторная диагностика гепатита С (ГС)

- Особенностью ВГС является чрезвычайно высокая гетерогенность его генома. Анализ нуклеиновых кислот РНК-ВГС различных изолятов выявил существенные отличия в их первичной структуре. На основании этих данных была построена классификация ВГС, разделяющая их на варианты (их 6-9) и субтипы- генотипы, одни из которых присутствуют во всех регионах мира, а другие только в отдельных странах.

Гепатит С

- Отличительная особенность – значительная изменчивость с образованием множества одновременно существующих, иммунологически различающихся антигенных вариантов – квазивидов. Квазивиды – генетически близкородственные варианты одного и того же изолята ВГС, которые возникают в результате мутаций в ходе репликации вируса в организме - хозяина.

Гепатит С

- В Дальнейшем образование квазивидов в течение всего периода заболевания приводит к ускользанию от иммунного ответа, а также к формированию резистентности к противовирусным препаратам и персистенции ВГС.

Специфические маркеры гепатита С

- РНК- определяют методом ПЦР, подтверждает факт активной инфекции. Количественное определение важно для оценки эффективности противовирусной терапии. Выявление РНК – установление диагноза гепатита С в случае серонегативности. Обнаружение РНК вируса гепатита С является основанием для постановки диагноза у пациентов с иммуносупрессией.

Определение антител к HCV: интерпретация результатов

- В острой фазе гепатита С через 2-3 недели после появления анти-HCV-IgM к С-белку в сыворотке крови начинают выявляться анти-HCV IgG к С-белку. При этом не удастся определить анти-HCV-IgG к неструктурным (NS) белкам.
- Латентная фаза гепатита С характеризуется наличием анти-HCV-IgG как к структурным, так и неструктурным белкам при отсутствии анти-HCV-IgM.

Определение антител к HCV: интерпретация результатов

- В фазе реактивации при сохранении анти-HCV-IgG к С-белку и NS-белкам вновь начинают определяться анти-HCV-IgM
- В сыворотке крови реконвалесцентов могут длительное время присутствовать анти-HCV-IgG к С-белку при отсутствии анти-HCV-IgM

Специфические маркеры гепатита С

- АtHВс определяют методом ИФА. Диагностически значимыми являются IgG, т.к. нет данных за большую значимость IgM. Обнаружение IgG говорит о контакте пациента с вирусом и обнаруживается у больных о. и хр. гепатитом. У 5% больных хроническим гепатитом С РНК может обнаруживаться при отсутствии антител

Специфические маркеры гепатита С

- При скрининговом обнаружении антител IgG методом ИФА образцы должны быть исследованы в 2 параллельных пробах. Если хоть 1 образец дает положительный результат, то образец считают первично положительным. Для диагностики гепатита С ИФА является подтверждающим тестом.