

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

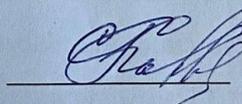
Кафедра биохимии и биофизики

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ ТЕЧЕНИЯ ГЕПАТИТОВ В И С
У БЕРЕМЕННЫХ И НОВОРОЖДЕННЫХ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ
Студентки 3 курса 341 группы
Направления подготовки магистратуры 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Мурашевой Анастасии Андреевны

Зав. кафедрой:

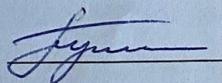
профессор, док. биол. наук



С. А. Коннова

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук



Е. С. Тучина

Саратов 2024

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Вирусные гепатиты человека – класс инфекционных заболеваний печени, которые вызываются рядом самостоятельных инфекционных агентов с весьма разнообразными характеристиками. Эти агенты отличаются друг от друга по типу и виду вирусной частицы и её генетического материала, механизму заражения и путям передачи, патогенезу и иммуногенезу, клиническим проявлениям, тяжести течения и исходам, вероятности перехода в хроническую форму и раковые заболевания, способам лабораторной диагностики. Он проявляется как хроническое заболевание печени, имеет более высокий риск цирроза печени и даже прогрессирования до гепатоцеллюлярной карциномы [1].

Вирусные гепатиты В и С представляют значительную угрозу для здоровья беременных женщин и новорожденных. Вертикальная передача вирусов от матери к плоду может привести к развитию тяжелых форм заболеваний печени у ребенка, а у матери – к осложнениям беременности и родов. Ранняя и точная диагностика, а также оценка активности инфекционного процесса являются критическими факторами для успешного лечения и профилактики неблагоприятных исходов. В настоящем обзоре мы рассмотрим клинико-иммунологические критерии, используемые для диагностики и оценки течения гепатитов В и С у беременных и новорожденных [2]. Наличие коинфекций усугубляет течение гепатитов, повышая риск неблагоприятных исходов для матери и ребенка. Отсутствие единых стандартов диагностики и оценки тяжести заболевания в условиях коинфекций требует разработки и внедрения новых клинико-иммунологических критериев [3].

ВГВ представляет собой двухцепочечный ДНК-вирус, относящийся к семейству гепаднавирусов. Основными белками, образующимися во время инфекции, являются поверхностный антиген (HBsAg), сердцевинный антиген и е-антиген. Core и е-антигены образуются из одного и того же белка-предшественника pre-Core [1]. Вирус имеет две примечательные особенности в своем жизненном

цикле. Во-первых, он образует замкнутую кольцевую хромосому ДНК (кзкДНК), которая существует в ядре инфицированной клетки и служит матрицей для транскрипции РНК. Это место защищено от противовирусных агентов или клеточного иммунного ответа., поэтому кзкДНК представляет собой убежище, где инфекция ВГВ может существовать без внешних воздействий. Во-вторых, ВГВ имеет стадию репликации РНК в ДНК, опосредованную вирусной полимеразой в конце своего жизненного цикла, которая аналогична обратной транскриптазе истинных ретровирусов. Этот шаг является причиной того, что многие противовирусные препараты, используемые против ВГВ, также используются для лечения ВИЧ-инфекции.

ВГС представляет собой одноцепочечный РНК-содержащий вирус, принадлежащий к семейству Flaviviridae. Описано шесть основных генотипов, и все они могут передаваться от матери ребенку. Внутри инфицированного человека также существуют различные вирусные геномы, которые развиваются в ответ на иммунное давление, явление, называемое «квазивидами». Эта поразительная генетическая изменчивость способствует неспособности иммунного ответа хозяина уничтожить вирус и представляет собой серьезное препятствие в разработке эффективной вакцины. Специфичные для ВГС Т-клеточные ответы также могут влиять на персистенцию инфекции у тех лиц, которые не могут избавиться от вируса. У взрослых и детей чем сильнее клеточный ответ, тем больше вероятность, что инфекция исчезнет [1,4].

Вирусные гепатиты В, С передаются следующими путями:

- парентеральный;
- вертикальный (от матери — плоду);
- половой;

Самым важным вопросом для большинства беременных, состоящих на учёте с хроническими вирусными гепатитами, был вопрос о возможности перинатальной

трансмиссии вирусов гепатита В и С плодам и новорожденным. Рассматривается несколько возможных механизмов передачи вируса, которые включают в себя:

- 1) Инфицирование плаценты и трансплацентарная передача вирусного гепатита.
- 2) Транс-плацентарные инфузии материнской крови.
- 3) Амниоцентез.
- 4) Кормление грудью.

Вирусный гепатит может вызывать как острый, так и хронический гепатит. Первые 6 месяцев после контакта с ВГ называют острой инфекцией ВГ. Острая инфекция ВГ в 75% случаев протекает бессимптомно [1]. Продолжительность инкубационного периода гепатита В колеблется от 30 до 180 дней. В большинстве случаев первичная инфекция имеет бессимптомное течение. Тем не менее у некоторых пациентов возникают острые состояния с выраженными симптомами, которые сохраняются в течение нескольких недель и включают в себя желтушное окрашивание кожи и склер глаз, потемнение мочи, сильную слабость, тошноту, рвоту и боли в брюшной полости. В редких случаях острый гепатит может привести к развитию острой печеночной недостаточности с риском летального исхода [2].

Обнаружение антител к ВГС возможно через 4-6 недель после заражения. После излечения антитела длительно сохраняются, поэтому их нельзя использовать для подтверждения эффективности лечения. Выявление антител является инструментом первичной диагностики и выявления бессимптомных больных, а также для ретроспективной диагностики гепатита С. Лица, у которых выявлены антитела к ВГС, подлежат обследованию на наличие РНК ВГС или Core-антигена ВГС, которые являются маркерами текущей инфекции.

Специфическая лабораторная диагностика вирусных гепатитов основывается на применении иммунохимических и молекулярно-биологических методов

исследований. Основными иммунохимическими методами являются радиоизотопный или радиоиммунный (РИА) и иммуноферментный (ИФА). В основе иммунохимических методов диагностики лежит специфическое взаимодействие антиген — антитело с последующим выявлением комплекса при помощи специальных меток. Наиболее распространенным является иммуноферментный анализ.

ПЦР - более быстрый и точный метод, что направлен на поиск возбудителя заболевания, путем существенного повышения части ДНК вируса гепатита в образце. Анализ проводится путем забора крови, которую в последующем помещают в специальные реактивы, в которых происходит клонирование клеток. Из одной клетки получается две, и так далее. В итоге появляются сотни ДНК, благодаря которым можно диагностировать возбудитель и выявить вирус на ранней стадии.

Все решения о лечении инфекций во время беременности должны включать анализ риска и пользы для матери и плода. Основной проблемой, касающейся матери, является влияние лечения на краткосрочные и долгосрочные исходы заболевания печени. Главной проблемой для плода является риск воздействия потенциально тератогенных препаратов на раннем этапе эмбриогенеза. Ранняя диагностика позволяет предотвратить развитие осложнений, связанных с инфекцией, и дальнейшую передачу вируса. ВОЗ рекомендует проводить тестирование на ВГС и ВГВ всем пациентам не менее одного раза в год, особенно среди лиц повышенного риска инфицирования [5].

Цель и задачи исследования.

Цель работы - выявить клинико-иммунологические критерии для оценки особенностей течения и влияния хронических вирусных гепатитов В и С на здоровье беременных и новорожденных.

Исходя из цели данной работы, были поставлены следующие задачи:

- 1) изучить этиологию, патогенез клинические особенности протекания гепатитов В и С у планирующих беременность, беременных и новорожденных,
- 2) сравнить эффективность диагностики гепатитов В и С у планирующих беременность, беременных и новорожденных методами ИФА и ПЦР,
- 3) провести анализ биохимических показателей крови у пациентов с хроническим течением гепатитов В и С на основании лабораторных данных за 2021-2022 гг.
- 4) выявить частоту встречаемости коинфекции (сифилис, ВИЧ) при хроническом носительстве гепатитов В и С у беременных.

Материал и методы исследования.

В исследование включено 2540 беременных женщин, женщин планирующих беременность, а также их детей проходивших наблюдение в ГУЗ «Клинический перинатальный центр Саратовской области».

Работу проводили в лаборатории ГУЗ «Клинический перинатальный центр Саратовской области». Объектом исследования является биологические жидкости (сыворотка/ плазма крови) пациентов. Для биохимического и иммуноферментного анализа использовалась сыворотка крови пациентов. В качестве материала для ПЦР-анализа на наличие вируса гепатита В применялась ДНК, выделенная из образцов сыворотки крови, собранных с использованием антикоагулянта К2-ЭДТА. Для ПЦР-диагностики вируса гепатита С использовалась РНК, выделенная из сыворотки крови (К2-ЭДТА).

В качестве стандарта использованы рекомбинантные цитокины, входящие в состав тест-наборов. По данным титрования стандартных образцов строили калибровочные графики для каждого цитокина, по которым определяли его уровень в диапазоне детектируемых концентраций.

Для иммуноферментного выявления поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке, плазме крови женщин и детей использовали набор «Вектогеп В-НВs-антиген» (г. Новосибирск). Принцип метода заключается во

взаимодействии HBsAg с монолокальными антителами, иммобилизованными на поверхности лунок полистиролового планшета. Комплекс антиген-антитело выявляют с помощью конъюгата поликлональных антител с пероксидазой хрена.

Для подтверждения мы использовали набор «Вектогеп В-HBs-антиген подтверждающий тест» (г. Новосибирск), который предназначен для иммуноферментного выявления поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке, плазме крови, препаратах крови человека (иммуноглобулины, интерфероны, криопреципитат, альбумин). Принцип метода заключается в проведении реакции нейтрализации (конкурентный ИФА) HBsAg в исследуемом образце с помощью поликлональных антител, содержащих в растворе подтверждающего агента.

При проведении качественного исследования методом ПЦР для определения ДНК вируса гепатита В использовали набор реагентов «HEPA-B-тест-Q».

Для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов классов G и M к вирусу гепатита С в сыворотке крови у женщин и детей наблюдающихся в ГУЗ «Клинический перинатальный центр Саратовской области» использовался набор реагентов «Бест анти-ВГС» (г. Новосибирск) предназначенный для качественного определения иммуноглобулинов классов G и M к вирусу гепатита С. Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантных антигенов ВГС, соответствующих вирусным антигенам Core, NS3, NS4, NS5. Во время первой инкубации, при наличии в исследуемых образцах антител к ВГС, они связываются с рекомбинантными антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок планшета. Во время второй инкубации смесь пероксидазных конъюгатов антител к IgG человека и антител к IgM человека связывается с антителами, иммобилизованными в ходе первой инкубации. Далее, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина, происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы «антиген-антитело». Интенсивность окрашивания зависит от количества содержащихся в исследуемом образце антител IgG и IgM к ВГС. После остановки реакции добавлением в раствор

стоп-реагента результаты ИФА регистрируются измерением оптической плотности (ОП) в лунках планшета.

Для подтверждения исследования использовали набор реагентов «Бест анти-ВГС – подтверждающий тест» (г. Новосибирск). Перед проведением анализа подготовили необходимое количество стрипов и растворы к работе. В лунках стрипов в рядах А, С, Е, G, иммобилизован антиген, кодируемы структурной областью генома ВГС (core), в рядах В, D, F, H иммобилизована смесь антигенов, соответствующих неструктурной области генома ВГС (NS3, NS4, NS5).

Для качественное выявления РНК вируса гепатита С в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени использовали набор реагентов «ГепАЭК С» (Московская обл., г. Электрогорск).

Биохимический анализ крови исследуемых включал в себя обследование: общий билирубин, конъюгированный билирубин, АЛТ, АСТ, общий белок, креатинин, мочевины, глюкоза и холестерин. Общий билирубин определялся реакцией с солью 3,5-дихлорфенилдиазония. Билирубин определялся конъюгированным методом с диазотированной сульфаниловой кислотой. АЛТ и АСТ - IFCC без пиридоксальфосфата, общий белок – биуретовым, креатинин - ферментативным ПАП, мочевины - ферментативным кинетическим, УФ метод, глюкоза - глюкозооксидазным методом, холестерин - ферментативным колориметрическим методом.

Структура и объём работы. Работа, изложенная на 73 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Исследование проиллюстрировано 24 рисунками и содержит 4 таблицы. Список использованных источников включает в себя 41 наименования.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных о вирусных гепатитах В и С. Изложена информация об этиологии и патогенезе

вируса. В главе описывались пути передачи вируса, клинические проявления, современные методы диагностики и профилактики вирусного гепатита В и С у беременных и новорождённых.

В главе «Результаты исследования» представлены результаты биохимических, иммунологических и молекулярно-биологических исследований, в ходе которых было определено количество зараженных ВГВ и ВГС. Рассчитаны качественные и количественные показатели.

Изложены результаты исследования на наличие вирусного гепатита В у женщин и новорожденных за 2021 и 2022 гг., всем исследуемым проводился иммуноферментный анализ с целью определения антигена HBsAg, далее проводилось подтверждение результатов. Следующим этапом исследования было качественное выявление ДНК вируса гепатита В в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Результаты показали, что в 2021г. носительство гепатита В было обнаружено у 8 (100%) планирующих беременность женщин. При проведении ПЦР исследования у беременных женщин было выявлено, что 1 (6%) ПЦР тест дал отрицательный ответ, а подтвердился анализ у 15 (94%) женщин. При исследовании новорожденных с положительным ИФА было обнаружено, что у 1 (6%) ребенка ПЦР тест отрицателен, также, как и у матери, а у 15 (94%) детей результат был положительным. В 2022 г. ПЦР тест позволил определить носительство гепатита В у 5 (71%) планирующих беременность женщин, а 2 (29%) женщины получили отрицательный результат. При проведении ПЦР исследования у беременных было обнаружено, что у 3 (14%) женщин ПЦР тест отрицательный. Это говорит о том, что они являются носителем HBsAg вируса гепатита В. Подтвердился анализ у 19 (86%) женщин. При исследовании новорожденных с положительным ИФА было обнаружено, что у 3 (14%) детей ПЦР тест отрицателен, также, как и у матери, а у 19 (86%) детей результат был положительным.

В ходе исследования на наличие вирусного гепатита С у женщин и новорожденных за 2021 и 2022 гг., всем исследуемым проводился иммуноферментный анализ с целью определения антител к HCV, далее

проводилось подтверждение результатов. Следующим этапом исследования было выявление качественного РНК методом полимеразной-цепной реакцией в режиме реального времени. На основе анализа мы установили, что в 2021 г. наличие гепатита С было выявлено у 12 (100%) планирующих беременность женщин, из 22 беременных в 86% случаях, 19 женщин. В ходе исследования новорожденных с положительным ИФА было выявлено, что у 3 (14%) детей ПЦР тест отрицателен, а у 19 (86%) детей результат был положительным. В 2022 г. мы определили, что 2 (14%) женщины из отделения ВРТ являются носителями HCV антител и имеют отрицательный ПЦР тест, а 12 (86%) женщин получили положительный ПЦР. После проведения ПЦР теста у беременных, подтвердился анализ у 23 (96%) женщин, у 1 (4%) женщины ПЦР-тест был отрицательным. При исследовании новорожденных с положительным ИФА на наличие антител к вирусу гепатита С было выявлено, что у 1 (4%) ребенка ПЦР тест отрицателен, у 23 (96%) детей результат был положительным.

Изложена информация о длительности инфекционного процесса, был проведен анализ исходов беременностей. Как дополнительная нагрузка и возможность усугубления заболевания определялось наличие коинфекций: ВИЧ и сифилис.

Особое внимание уделялось мониторингу биохимических показателей активности гепатита В и С - определению уровня общего и прямого билирубина, активности АЛТ, АСТ, общий белок, креатинин, мочевины, глюкоза в сыворотке крови. Определение биохимических показателей является неотъемлемой частью ведения беременности и наблюдения за новорожденными с ВГВ и ВГС. Это позволяет своевременно выявлять осложнения, снижать риск развития тяжелых форм заболевания и улучшать прогноз.

Выводы

1) Клиническое течение гепатитов В и С у беременных и новорожденных может отличаться от такового у взрослого населения. У беременных возможно бессимптомное течение, а у новорожденных — риск развития хронической инфекции. Вертикальная передача вируса от матери к плоду представляет значительный риск.

2) Результаты показали, что ПЦР метод был более эффективен для диагностики гепатитов В и С в каждой из исследуемых групп.

3) Анализ биохимических показателей за 2021-2022 гг. выявил, что активность гепатита определяют по степени повышения аминотрансфераз. При заболеваниях печени АЛТ является более специфичным маркером. Повышение показателя в 1,5-3 раза от верхней границы нормы свидетельствует о минимальной активности процесса, в 4-10 раз – об умеренной, более 10 раз – о высокой биохимической активности. Выявление повышенного уровня общего билирубина

в сыворотке с преобладанием прямой фракции указывает на нарушение билирубинового обмена (конъюгации и в большей степени экскреции) в печени.

4) Полученные данные свидетельствуют о сравнительно высокой частоте коинфекций сифилиса и ВИЧ у беременных женщин с хроническим гепатитом В и С. Несмотря на небольшую выборку, наблюдается тенденция к более высокому проценту коинфекции сифилисом у женщин с гепатитом В (12.5%) по сравнению с гепатитом С (9%). Частота коинфекции ВИЧ в обеих группах относительно низкая (6% и 5% соответственно).

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Погромская, М. Н. Сравнительная характеристика вирусных гепатитов В и С у беременных и их влияние на роды и здоровье новорожденного: автореф. дис. ... канд. мед. наук / М. Н. Погромская. – СПб.: [б. и.], 2000. – 19 с.
- 2 Аршинов, П. С. Особенности клинических проявлений вирусного гепатита С / П. С. Аршинов, О. И. Колиуш // Достижения отечественной эпидемиологии в XX веке. Взгляд в будущее. Материалы науч. конф. – 2001. – СПб. – 110 с.
- 3 СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. Судебные и нормативные акты РФ. [Электронный ресурс] : [сайт]. – URL: https://sudact.ru/law/postanovlenie-glavnogo-gosudarstvennogo-sanitarnogo-vracha-rf-ot_1377/sanpin-3.3686-21/ (дата обращения: 13.12.2024). – Загл. с экрана. – Яз. рус.
- 4 Клинические рекомендации. Острый гепатит В (ГВ) у взрослых (утв. Минздравом РФ 10.10.2024). [Электронный ресурс] : [сайт]. – URL: https://disuria.ru/_ld/10/1073_kr21B16MZ.pdf. (дата обращения: 13.12.2024). – Загл. с экрана. – Яз. рус.
- 5 Клинические рекомендации. Хронический вирусный гепатит С (утв. Минздравом РФ 10.10.2024). [Электронный ресурс] : [сайт]. – URL: https://disuria.ru/_ld/12/1211_kr21B18p2MZ.pdf (дата обращения: 13.12.2024). – Загл. с экрана. – Яз. рус.
- 6 Ковалева, Т. А. Вертикальная передача вирусов гепатитов В и С при беременности: возможности профилактики / Т. А. Ковалева, К. И. Чуйкова, И. Д. Евтушенкова, О. Г. Мухачева // Гинекология. – 2011. – № 2. – С. 45-49.
- 7 Wilkins, T. Hepatitis B: Screening, Prevention, Diagnosis, and Treatment / T. Wilkins, R. Sams, M. Carpenter // American Family Physician. - 2019. – Vol. 99(5). – P. 314-323.