



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ivana Herceg

**Genotipizacija virusa hepatitisa B te određivanje mutacija odgovornih za  
rezistenciju na inhibitore reverzne transkriptaze**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević”, pod vodstvom dr. sc. Ivane Grgić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Ovaj diplomski rad posvećujem mojim roditeljima i sestri Kristini kao znak zahvale za bezgraničnu ljubav i najveću pruženu podršku te mom didu Dragi koji nažalost nije dočekaio moje diplomiranje, ali je uvijek vjerovao i polagao nade u mene.*

*U Zagrebu, 15. travnja 2019.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### GENOTIPIZACIJA VIRUSA HEPATITISA B TE ODREĐIVANJE MUTACIJA ODGOVORNIH ZA REZISTENCIJU NA INHIBITORE REVERZNE TRANSKRIPTAZE

Ivana Herceg

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Približno 257 milijuna osoba u svijetu boluje od kronične infekcije virusom hepatitisa B, što u slučaju neliječenja dovodi do ciroze jetre ili hepatocelularnog karcinoma. Virus hepatitisa B je DNA virus s reverznom transkriptazom (RT) koja nema egzozonukleaznu aktivnost, što rezultira visokom stopom mutacija. Infekcija se najčešće liječi kompeticijskim inhibitorima reverzne transkriptaze koji ometaju replikaciju virusa. Kao posljedica selekcijskog pritiska uzrokovanog terapijom, ali i imunim odgovorom, javljaju se mutacije koje mogu dovesti do rezistencije. Cilj ovog istraživanja bio je po prvi puta odrediti genotipove virusa HBV u 30 ispitanika iz Hrvatske te mutacije koje su odgovorne za rezistenciju na inhibitore RT kao i one odgovorne za izbjegavanje imunog odgovora. Sangerovim sekvenciranjem interdomene A-B gena za RT te analizom sekvencija u algoritmu *Geno2Pheno* određeni su genotipovi te tražene mutacije. Od deset HBV genotipova koji su identificirani u svijetu, u Hrvatskoj su prisutni genotip A (A2) u 20% i genotip D (D1, D2, D3) u 80% ispitanika. U dva ispitanika genotipa A detektirane su mutacije koje uzrokuju rezistenciju na inhibitore RT. Mutacije za izbjegavanje imunog odgovora detektirane su u 6 ispitanika genotipa A te u 8 ispitanika genotipa D. Distribucija genotipova kao i prevalencija mutacija odgovara onima zabilježenim u ostalim zemljama Europe.

(47 stranica, 15 slika, 12 tablica, 72 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: HBV, Sangerovo sekvenciranje, virusni genotipovi, antivirusna terapija

Voditelj: dr. sc. Ivana Grgić, znan. sur.

Suvoditelj: dr. sc. Silvija Černi, doc.

Ocjenitelji: dr. sc. Silvija Černi, doc.

dr. sc. Ana Galov, izv. prof.

dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 04. travnja 2019. godine

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### HEPATITIS B VIRUS GENOTYPING AND DETECTION OF REVERSE TRANSCRIPTASE DRUG RESISTANCE MUTATIONS

Ivana Herceg

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Approximately 257 million people in the world have had chronic hepatitis B virus infection, which, in case of non-treatment, causes liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Hepatitis B virus is a DNA virus with a reverse transcriptase (RT) lacking exonuclease activity resulting in a high rate of viral mutations. Infection is mostly treated with competitive inhibitors of reverse transcriptase that obstruct the virus replication. The consequences of selective pressure caused by treatment as well as the immune response, may be the mutations leading to resistance. The goal of this research was to define the genotypes of HBV for the first time in a group of 30 examinees from Croatia and define the mutations responsible for the resistance to the RT inhibitors as well as the immuno-escape mutations. By sequencing A-B interdomain of the HBV RT gene by Sanger method and analysis of the sequences in the *Geno2Pheno* algorithm has determined virus genotypes and mutations. Out of the ten genotypes identified in the world, genotype A (A2) is present in 20% and genotype D (D1, D2, D3) in 80% of examinees in Croatia. In two genotype A examinees a mutation was detected, which caused resistance to the RT inhibitors. Immune-escape mutations were detected in 6 genotype A examinees and 8 genotype D examinees. Distribution of genotypes as well as the mutation prevalence are similar to those recorded in the other European countries.

(47 pages, 15 figures, 12 tables, 72 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library.

Keywords: HBV, sequencing by Sanger, viral genotypes, antiviral therapy

Supervisor: Dr. Ivana Grgić, Res. Assoc.

Co-supervisor: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.

Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 4th April 2019

## POPIS KRATICA

aa – aminokiselina (*amino acid*)

AHB – akutni hepatitis B (*acute hepatitis B*)

anti-HBc – antitijelo na antigen c virusa hepatitisa B (*antibody to the hepatitis B core antigen*)

anti-HBe – antitijelo na antigen e virusa hepatitisa B (*antibody to the hepatitis B e antigen*)

anti-HBs – antitijelo na površinski antigen virusa hepatitisa B (*antibody to the hepatitis B surface antigen*)

AuAg – australski antigen (*Australian antigen*)

cccDNA – kovalentno zatvorena kružna DNA (*covalently closed circular DNA*)

CHB – kronični hepatitis B (*chronic hepatitis B*)

ddNTP – dideoksinukleotid (*dideoxynucleotide*)

dNTP – deoksinukleotid (*deoxynucleotide*)

F – nizvodna (*forward*)

g – gravitacijska konstanta (*universal gravitational constant*) = 9.81 m/s<sup>2</sup>

HBcAg – antigen c virusa hepatitisa B (*hepatitis B core antigen*)

HBeAg – antigen e virusa hepatitisa B (*hepatitis B e antigen*)

HBsAg – površinski antigen virusa hepatitisa B (*hepatitis B surface antigen*)

HBV – virus hepatitisa B (*Hepatitis B virus*)

HBV Pol – polimeraza virusa hepatitisa B (*HBV Polymerase*)

HIV – virus humane imunodeficijencije (*Human immunodeficiency virus*)

HZJZ – Hrvatski zavod za javno zdravstvo

IFN – interferon (*interferon*)

Ig – imunoglobulin (*immunoglobulin*)

IgG – imunoglobulin klase G (*immunoglobulin G*)

IgM – imunoglobulin klase M (*immunoglobulin M*)

kb – kilobaza (*kilobase*)

L – veliki (*large*)

M – srednji (*middle*)

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (*messenger RNA*)

NA – nukleozidni/nukleotidni analog (*nucleoside/nucleotide analogue*)

NK – prirodno ubilačke stanice (*natural killer cells*)

NTCP – kotransportirajući polipeptid za natrijev taurokolat (*sodium taurocholate cotransporting polypeptide*)

OBI – „tiha” ili „okultna” infekcija virusom hepatitisa B (*silent or occult Hepatitis B virus infection*)

ORF – otvoreni okvir čitanja (*open reading frame*)

pb – parovi baza (*base pairs*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (*polymerase chain reaction*)

pgRNA – pregenomska RNA (*pregenomic RNA*)

R – uzvodna (*reverse*)

rcDNA – relaksirana kružna DNA (*relaxed circular DNA*)

rpm – okretaji u minuti (*revolutions per minute*)

RT – reverzna transkriptaza (*reverse transcriptase*)

S – mali (*small*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*)

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Otkriće virusa hepatitisa B .....	1
1.2. Genom i struktura virusa hepatitisa B .....	2
1.3. Genotipovi virusa HBV i njihova geografska distribucija .....	4
1.4. Replikacijski ciklus virusa HBV .....	5
1.5. Načini rasprostranjivanja, infektivnost i dijagnostika virusa HBV .....	7
1.6. Prevalencija infekcije virusom HBV .....	9
1.7. Patogeneza, liječenje i prevencija infekcije .....	10
1.8. Rezistencija na antivirusne lijekove .....	12
1.9. Izbjegavanje imunosnog odgovora .....	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	16
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. Ispitanici .....	17
3.2. Biološki uzorci .....	17
3.3. Reagensi i otopine .....	18
3.3.1. Komplet reagensa i otopina za izolaciju virusne DNA .....	18
3.3.2. Komplet reagensa i otopina za lančanu reakciju polimerazom .....	18
3.3.3. Komplet reagensa i otopina za ugniježđenu lančanu reakciju polimerazom ( <i>Nested PCR</i> ) .....	19
3.3.4. Komplet reagensa i otopina za reakciju sekvenciranja .....	19
3.3.5. Komplet reagensa i otopina za pročišćavanje i denaturaciju amplikona .....	20
3.4. Uređaji i računalni programi .....	20
3.4.1. Uređaji .....	20
3.4.2. Računalni programi .....	20
3.5. Metode .....	21
3.5.1. Izolacija virusne DNA .....	21



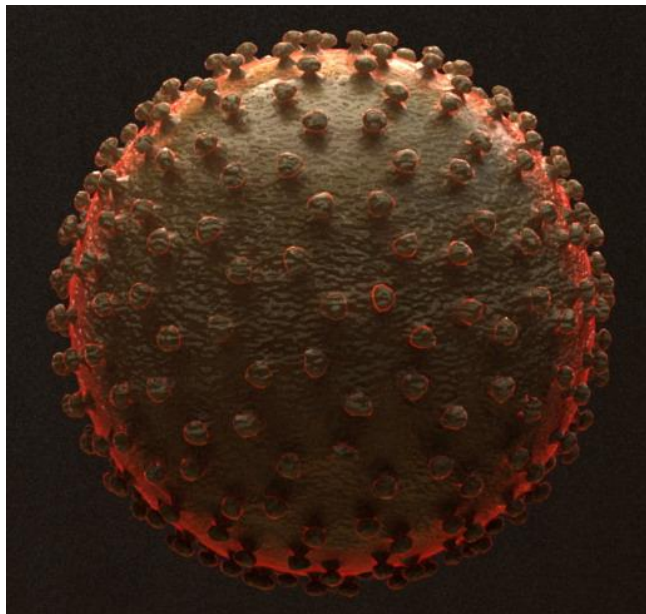
3.5.2. Lančana reakcija polimerazom .....	22
3.5.3. Ugniježdjena lančana reakcija polimerazom .....	24
3.5.4. Reakcija sekvenciranja.....	25
3.5.5. Obrada podataka .....	27
4. REZULTATI.....	28
4.1. Analiza sekvencija .....	28
4.2. Genotipizacija virusa HBV .....	30
4.3. Mutacije koje dovode do rezistencije na antivirusne lijekove.....	31
4.4. Mutacije koje dovode do izbjegavanja imunosnog odgovara .....	33
5. RASPRAVA.....	34
6. ZAKLJUČAK .....	39
7. LITERATURA.....	40
8. ŽIVOTOPIS .....	47

## 1. UVOD

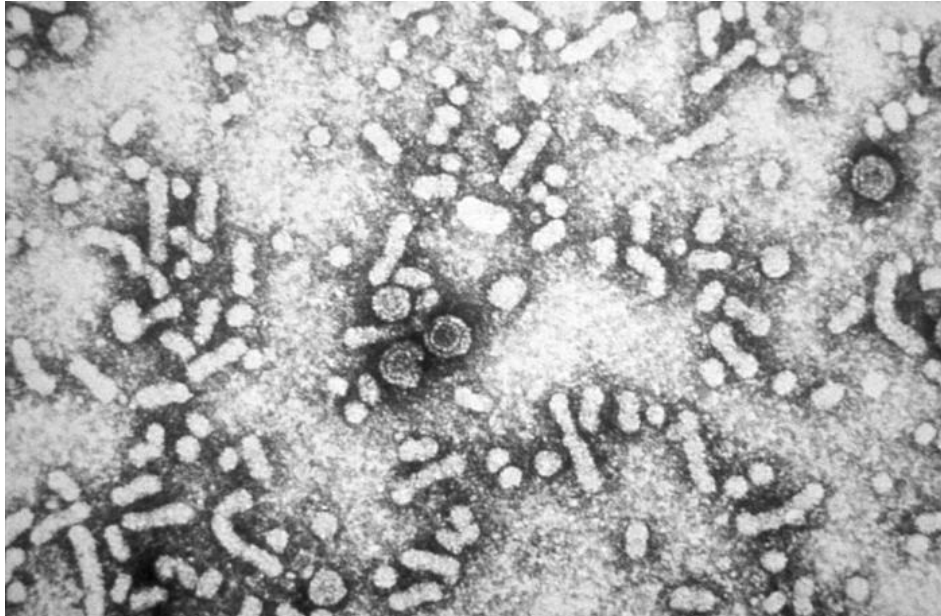
### 1.1. Otkriće virusa hepatitisa B

Virus hepatitisa B (*Hepatitis B virus*, HBV) (Slika 1.) pripada porodici *Hepadnaviridae* iz roda *Orthohepadnavirus*. Godine 1965. dr. Baruch Samuel Blumberg otkrio je površinski antigen (HBsAg) ovog virusa i za to je nagrađen Nobelovom nagradom za medicinu 1976. godine (Blumberg i sur. 1965). Izvorno, HBsAg je nazvan „australski antigen” (AuAg) jer je detektiran u uzorku krvi australskog Aboridžina koji je bolovao od hemofilije. Otkriven je na taj način što je AuAg reagirao s antitijelom anti-HBs u serumu Aboridžina (Block i sur. 2016). Australski antigen (HBsAg) bio je prvi marker koji se koristio za serološku detekciju specifičnih antitijela virusnog hepatitisa B. Virus hepatitisa B kao i svi ostali virusni hepatitisi (A, C, D, E, G) uzrokuju upalu i oštećenje jetre (hepatitis).

Virioni virusa HBV nazivaju se Daneove čestice. Naziv su dobile po Davidu Danu koji ih je otkrio 1970. godine (Dane i sur. 1970). To su čestice sfernog oblika koje imaju ikozaedralnu nukleokapsidu obavijenu lipidnom ovojnicom bogatom kolesterolom, i promjera su od 42 do 47 nm (Baumert i sur. 2014; Inan i Tabak 2015) (Slika 2.).



**Slika 1.** 3D model virusa hepatitisa B napravljen računalno na osnovu elektronsko mikroskopske snimke (preuzeto i prilagođeno prema <https://3dmodelsworld.com/downloads/hepatitis-b-3d-model/>).

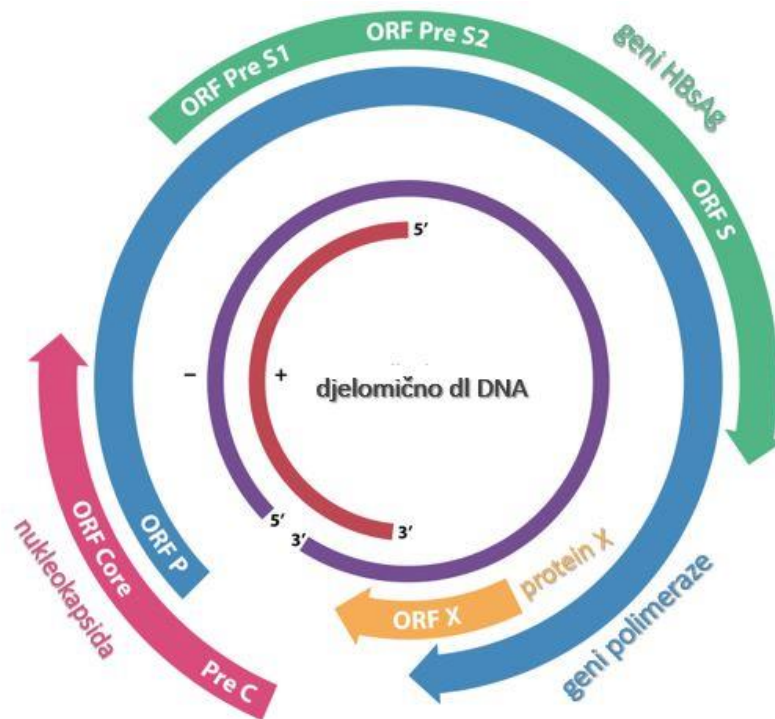


**Slika 2.** Virioni virusa hepatitisa B (Daneove čestice) pod TEM mikroskopom (preuzeto i prilagođeno prema <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=5631>).

## 1.2. Genom i struktura virusa hepatitisa B

Virus HBV ima djelomično dvolančanu relaksiranu kružnu rcDNA (*relaxed circular DNA*) koja se sastoji od kodirajućeg i nekodirajućeg lanca. Na 5' nekodirajućeg lanca kovalentno je vezana polimeraza virusa HBV (HBV Pol) (Block i sur. 2007; Liang 2009; Baumert i sur. 2014; Inan i Tabak 2015).

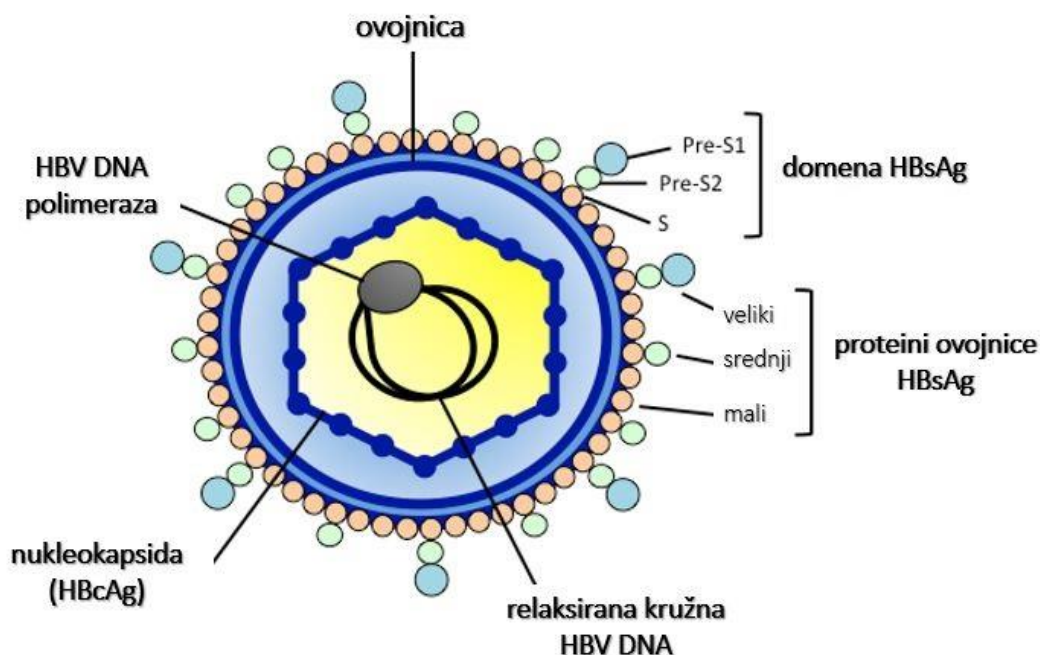
Duljina genoma virusa HBV je oko 3.3 kb, a čine ga četiri otvorena okvira čitanja (ORF) (Miller i sur. 1989; Stuyver i sur. 2000). Porodica *Hepadnaviridae* inače ima vrlo male genome u odnosu na ostale DNA viruse. Jedna od karakteristika genoma virusa HBV je asimetrična struktura kodirajućeg i nekodirajućeg lanca. Nekodirajući lanac je dulji, od 3.0 do 3.3 kb, a komplementarni kodirajući lanac može biti dug od 1.7 do 2.8 kb (Doo i Ghany 2010; Inan i Tabak 2015). Genom sadrži četiri preklapajuća ORF-a koji kodiraju proteine virusa HBV. ORF *PreS1/PreS2* i *S* kodira proteine ovojnice (tri proteina ovojnice L, M, S i površinski antigen HBsAg), ORF *Precore/Core* i *C* kodira za proteine nukleokapside (protein nukleokapside, antigen HBcAg i nestrukturani antigen HBeAg), ORF *P* kodira za virusnu polimerazu (reverzna transkriptaza, RNaza H i terminalna proteinska domena), dok ORF *X* kodira za protein X (HBx), transaktivator virusne transkripcije (Slika 3.).



**Slika 3.** Genom virusa hepatitisa B s prikazanim otvorenim okvirima čitanja (ORF) koji se djelomično preklapaju (preuzeto i prilagođeno prema <https://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/HBVdbGenome>).

Sekvencija gena *C* sadrži oko 500 pb i kodira proteine nukleokapside od 195 aminokiselina. Nukleokapsida nastaje spajanjem 240 virusnih kapsidnih proteina promjera 27 nm u ikozaedarnoj strukturi (Stuyver i sur. 2000; Liang 2009; Inan i Tabak 2015). Stanični proteini, uključujući proteinske kinaze, pakirani su unutar nukleokapside (Block i sur. 2007; Inan i Tabak 2015). Regija gena *S* duga je oko 1.2 kb i kodira glikoproteine L (veliki), M (srednji) i S (mali) koji se ravnomjerno rasporede po nukleokapsidi i sudjeluju u strukturi lipidne ovojnice (Stuyver i sur. 2000; Block i sur. 2007; Baumert i sur. 2014; Inan i Tabak 2015) (Slika 4.).

Tijekom transkripcije virusnog genoma dolazi do stvaranja transkripata pregenomske RNA (*pregenomic RNA*, pgRNA) i subgenomske mRNA.



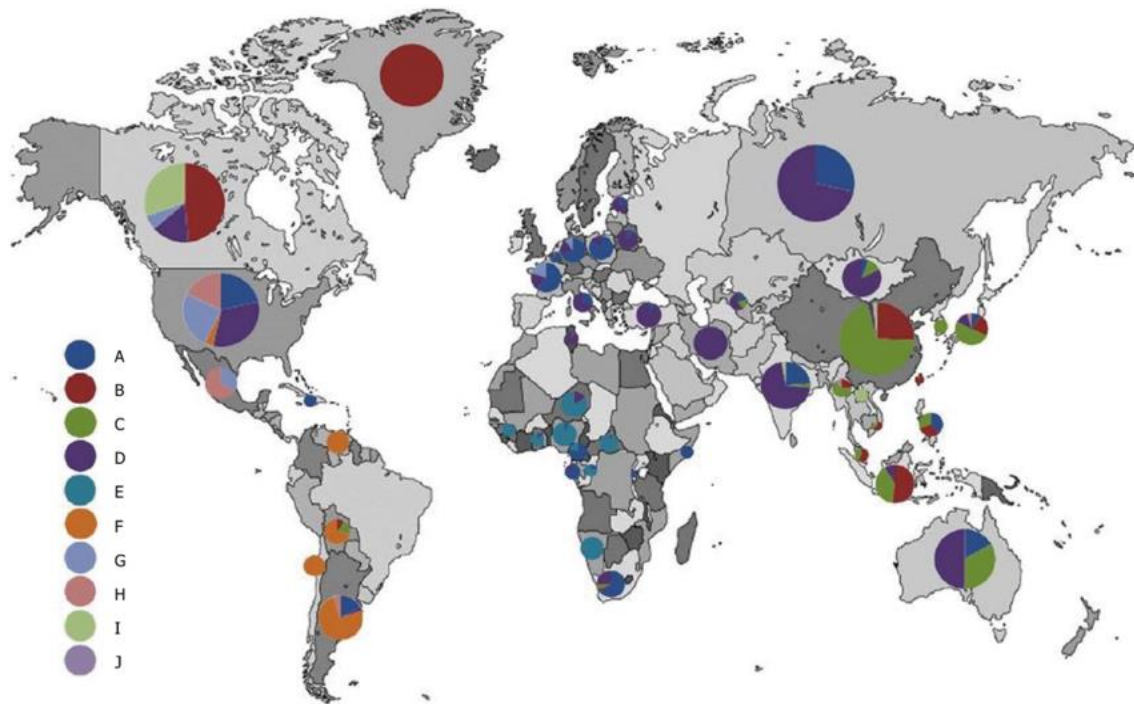
**Slika 4.** Struktura virusa hepatitisa B (preuzeto i prilagođeno prema <http://www.antimicrobe.org/v22.asp>).

### 1.3. Genotipovi virusa HBV i njihova geografska distribucija

Virus hepatitisa B, kojim je zaraženo je preko 250 milijuna osoba, rasprostranjen je gotovo u cijelom svijetu (Lin i Kao 2015). HBV se klasificira u deset genotipova koji su označeni slovima od A do J, i preko 30 podgenotipova koji su označeni slovom genotipa i brojkom (Sunbul 2014; Choi i sur. 2018). HBV genotipovi razlikuju se međusobno u više od 8% nukleotida sekvencije, dok se podgenotipovi međusobno razlikuju u 4% – 8% nukleotida sekvencije (Sunbul 2014).

Genotipovi pokazuju karakterističnu geografsku distribuciju. Genotip A široko je rasprostranjen u supsaharskoj i zapadnoj Africi, sjevernoj Europi, Aziji, Indiji i Americi. Genotipovi B i C uobičajeni su u Aziji i Pacifiku. Genotip C primarno je detektiran u jugoistočnoj Aziji. Genotip D dominantan je u Africi, Europi, mediteranskim zemljama i Indiji, a genotip E ograničen je na zapadnu Afriku. Genotip F nalazi se u Srednjoj i Južnoj Americi kao i genotip H. Genotip G uobičajen je u Francuskoj, Njemačkoj i SAD-u. Genotip I nedavno je prijavljen u Vijetnamu i Laosu, a najnoviji genotip J identificiran je na otocima Ryukyu u

Japanu (Lin i Kao 2015; Sunbul 2014) (Slika 5.). U Hrvatskoj do sada nije rađena sustavna nacionalna studija o distribuciji genotipova virusa HBV.

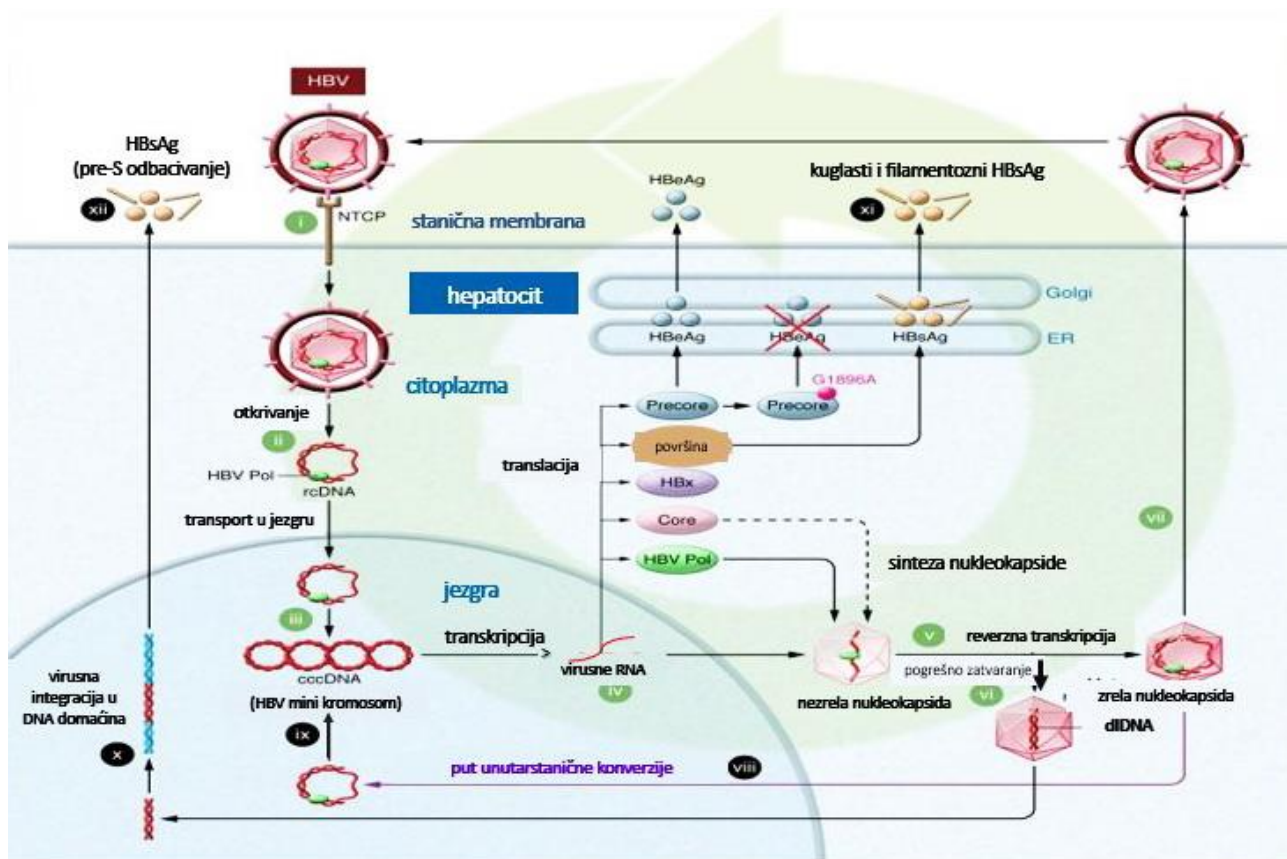


**Slika 5.** Geografska distribucija genotipova virusa hepatitisa B (preuzeto od Shi i sur. 2013; Sunbul 2014).

#### 1.4. Replikacijski ciklus virusa HBV

Virus hepatitisa B je hepatotropni virus koji isključivo inficira hepatocite. Infekcija započinje reverzibilnim vezanjem specifičnih receptora za hepatocite preS1 koji se nalaze na vanjskoj ovojnici zrele Daneove čestice i heparan sulfatnih proteoglikana na hepatocitu (Doo i sur. 2010; Watashi i sur. 2014; Inan i Tabak 2015). Ireverzibilnim vezanjem domene PreS1 proteina L na receptor NTCP (kotransportirajući polipeptid za natrijev taurokolat) omogućen je ulaz virusu HBV u hepatocit (Revill i Locarnini 2016). Nukleokapsida može ući na dva načina u citoplazmu, fuzijom virusne ovojnice s membranom stanice ili spajanjem s membranom endosoma nakon endocitoze (Watashi i sur. 2014; Inan i Tabak 2015). Interakcijom nukleokapside sa staničnim mikrotubulima odvija se prijenos u citoplazmi (Block i sur. 2007; Inan i Tabak 2015). Razvoj infekcije ovisi o ekspresiji faktora domaćina Rab5 i Rab7 (GTPaze) koji djeluju u biogenezi, odnosno lokalizaciji i sazrijevanju endosoma. Molekula rcDNA s kovalentno vezanom HBV Pol oslobađa se iz nukleokapside u citoplazmu i pomoću importina

$\alpha$  i  $\beta$  ulazi u jezgru hepatocita (Ezzikouri i sur. 2014; Inan i Tabak 2015). Nakon ulaska u jezgru polimeraza domaćina dovršava sintezu kodirajućeg lanca rcDNA, budući da kodirajući i nekodirajući lanac nisu iste duljine. Nakon što je kodirajući lanac završen, on se povezuje s nekodirajućim lancem formirajući kovalentno zatvorenu kružnu cccDNA (*covalently closed circular DNA*) pune duljine. Novonastala struktura DNA povezuje se s proteinima sličnim histonskim i nehistskim proteinima te njezina struktura nalik je kromatinu i zbog toga se zove mini kromosom koji služi kao kalup za transkripciju virusnih mRNA (Urban i sur. 2010; Zhang i sur. 2013; Doo i sur. 2010. Inan i Tabak 2015). Molekula cccDNA koristi sve stanične mehanizme za proizvodnju RNA i proteina koji su potrebni za obavljanje sinteze svih virusnih RNA i replikaciju virusa (Inan i Tabak 2015). Virusne molekule mRNA izlaze kroz jezgrine pore u citoplazmu hepatocita. Protein nukleokapside i virusna polimeraza sintetiziraju se kao rezultat translacije pregenomske RNA, a protein X te proteini ovojnice L, M i S sintetizirani su translacijom subgenomske mRNA na staničnim ribosomima (Ezzikouri i sur. 2014; Inan i Tabak 2015). Sinteza virusnog genoma događa se na kraju replikacijskog ciklusa unutar formirane nukleokapside. Proteini HBcAg formiraju nezrelu nukleokapsidu i stvaraju kompleks pgRNA/HBV Pol (Schadlar i Hildt 2009; Inan i Tabak 2015). Molekula pgRNA je kalup reverznoj transkriptazi (RT) za sintezu nekodirajućeg lanca DNA koji se produljuje. Reverzna transkriptaza prepoznaje petlju na pgRNA, tzv. *priming* mjesto i započinje sintezu nekodirajućeg lanca DNA. Nakon završetka sinteze nekodirajućeg lanca DNA, domena RNaze H razgrađuje pgRNA. Završeni nekodirajući lanac se koristi kao kalup za sintezu kodirajućeg lanca koji je rijetko dovršen i različitih je duljina (Beck i Nassal 2007; Inan i Tabak 2015). Tijekom sinteze kodirajući lanac DNA vraća se natrag do kraja nekodirajućeg lanca DNA i na taj način formira djelomično dvolančanu kružnu DNA. U endoplazmatskom retikulumu, zrela nukleokapsida koja sadrži DNA dobiva lipidnu ovojnicu s proteinima HBsAg (Doo i sur. 2010; Urban i sur. 2010; Inan i Tabak 2015). Virion prolazi kroz Golgijevo tijelo i preko sekretornih vezikula napušta hepatocit (Slika 6.).



**Slika 6.** Replikacijski ciklus virusa hepatitisa B. Virus ulazi u hepatocit vezanjem na receptor za kotransportirajući polipeptid za natrijev taurokolat (NTCP) (i). Nakon uklanjanja virusne ovojnice i nukleokapside (ii), virusna rcDNA se transportira u jezgru, gdje se konvertira u cccDNA (iii), što je kalup za transkripciju svih virusnih mRNA (iv). PgRNA transportira se u citoplazmu, gdje se obavlja i pomoću polimeraze virusa HBV obrnuto transkribira u rcDNA (v). Ako se tijekom tog procesa dogodi pogrešno zatvaranje, umjesto rcDNA (vi) nastaje dDNA. Čestica sa zrelom nukleokapsidom i rcDNA izlučuju se iz stanice kao virion (vii), ili se rcDNA i dDNA mogu transportirati u jezgru (viii), gdje se rcDNA pretvara u cccDNA (ix) putem unutarstanične konverzije. DIDNA se može integrirati u kromosom domaćina (x). HBsAg se sintetizira iz mRNA (xi) dobivene iz virusnog mini kromosoma i iz integrirane DNA virusa HBV (xii). Mutacija G1896A uvodi preuranjeni stop kodon i ukida proizvodnju HBeAg (preuzeto i prilagođeno prema Revill i Locarnini 2016).

### 1.5. Načini rasprostranjenja, infektivnost i dijagnostika virusa HBV

Virus HBV rasprostranjuje se direktnim krvnim kontaktom te kontaktom s tjelesnim tekućinama (sperma, vaginalni sekret) tijekom spolnog odnosa kao i bliskim obiteljskim kontaktom. Najčešće se rasprostranjuje parenteralno, npr. dijeljenjem pribora prilikom intravenskog uzimanja droga te nesterilnim priborom za tetoviranje, *piercing* i kozmetičke tretmane. Rasprostranjuje se i vertikalnim putem s majke na dijete tijekom trudnoće i dojenja.



U prošlosti se mnogo osoba zarazilo tijekom transfuzija krvi, međutim danas se svaka doza krvi testira na virus HBV. Moguće se zaraziti i prilikom hemodijalize te transplantacije. Zdravstveni radnici imaju veliki rizik od zaraze. Iako se virus HBV može detektirati u slini, on se ne rasprostranjuje kihanjem, kašljanjem ili dijeljenjem pribora za jelo ili čaša. Također, nema zabilježenih slučajeva zaraze putem urina, fecesa, znoja i suza (Kaić i sur. 2013).

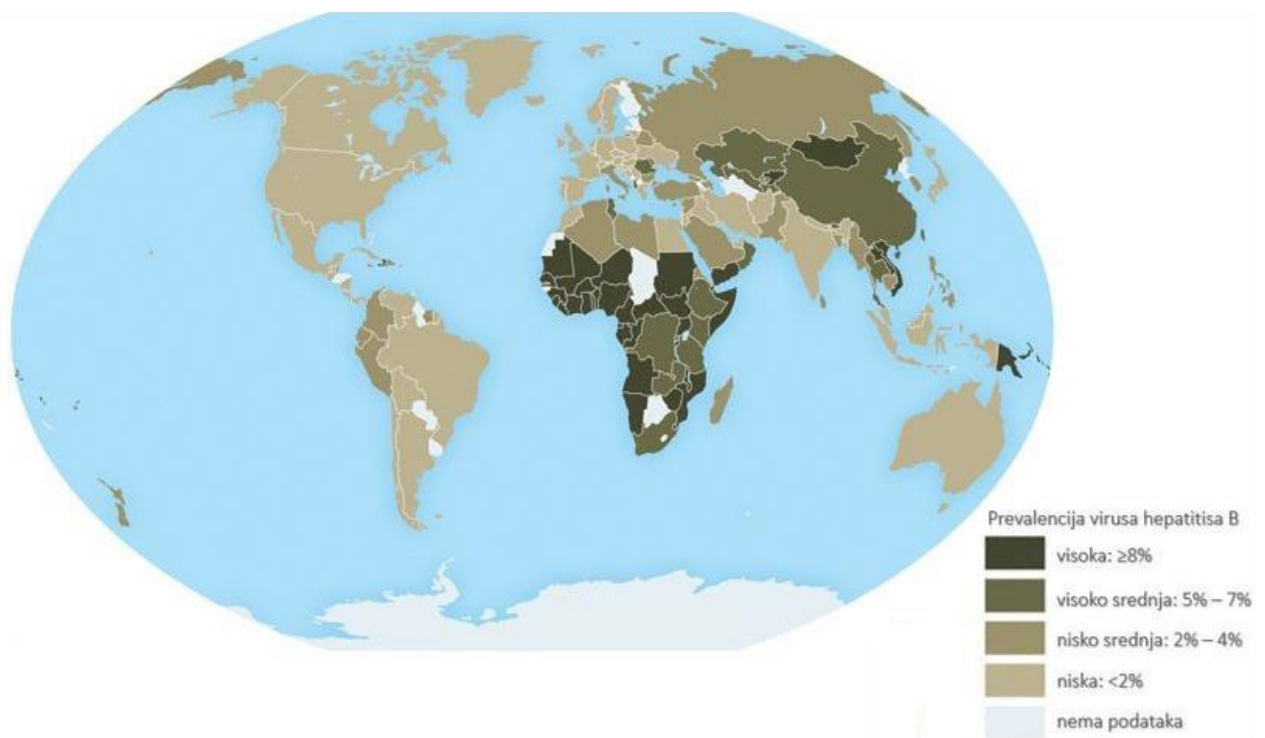
Virus hepatitisa B može preživjeti izvan tijela najmanje sedam dana. Inkubacijsko razdoblje je u prosjeku od 75 do 90 dana ovisno o putu prijenosa i količini inokuliranog virusa. Inficirana osoba počinje izlučivati virus tjednima prije nego što se jave prvi simptomi bolesti, i ostaje zarazna tijekom cijele faze bolesti (Kaić i sur. 2013). Za dijagnostiku virusa HBV potrebno je napraviti testiranje seruma na markere, a to su površinski antigen virusa hepatitisa B (HBsAg), antitijelo na površinski antigen virusa hepatitisa B (anti-HBs), antitijelo na antigen c virusa hepatitisa B klase imunoglobulina M i G (anti-HBc IgM i IgG), antigen e virusa hepatitisa B (HBeAg), antitijelo na antigen e virusa hepatitisa B (anti-HBe) i DNA virusa hepatitisa B (DNA virusa HBV), metodama radioimunotesta (*Radioimmunoassay*, RIA), enzimskog imunotesta na čvrstoj fazi (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) i lančane reakcije polimerazom (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Pozitivan rezultat testa na HBeAg upućuje na aktivnu replikaciju virusa, tj. infektivnost oboljelog, a detekcija prisutnosti anti-HBe znači da se virus više ne replicira. HBsAg je opći marker infekcije. Ako je rezultat testa na HBsAg negativan to znači da nema znakova aktivne infekcije virusom HBV, a ako je pozitivan to upućuje na moguću akutnu ili kroničnu infekciju. Rezultat testiranja na anti-HBs dokaz je oporavka te imunosti na infekciju virusom HBV ili postojanje infekcije. Pozitivan rezultat testa znači preboljenu infekciju ili imunizaciju, a negativan rezultat testa upućuje na trenutnu akutnu ili kroničnu infekciju. Ako je rezultat testa na anti-HBc negativan znači da nema znakova sadašnje ili preboljene infekcije, a uz pozitivan rezultat testa na anti-HBs, znači da su antitijela stečena cijepljenjem. Pozitivan rezultat testa na anti-HBc upućuje na infekciju. Nakon toga marker IgM pokazuje je li akutna, a marker IgG pokazuje je li infekcija kronična. U slučaju pozitivnog rezultata testa na anti-HBs i negativnog rezultata testa na HBsAg, uz pozitivan rezultat testa na anti-HBc, najvjerojatnije je riječ o preboljenoj infekciji, ali u slučaju negativnog rezultata testa na anti-HBs te pozitivnog rezultata testa na HBsAg i anti-HBc riječ je o kroničnom hepatitisu B (Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević”: Virusni hepatitis). Detekcija DNA virusa HBV upućuje na postojanje aktivne replikacije virusa i precizan je test za praćenje uspješnosti antivirusne terapije. Služi za određivanje viremije, broja kopija virusne DNA po

mililitru seruma. Viremija s više od 1000 kopija DNA virusa HBV po mL seruma smatra se povišenom razinom i upućuje na aktivnu replikaciju virusa (Dienstag 2008).

### 1.6. Prevalencija infekcije virusom HBV

Prevalencija infekcije virusom HBV je broj svih slučajeva kroničnog hepatitisa B kod određene populacije u određenom periodu. Svjetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*, WHO) procjenjuje da je u svijetu oko 257 milijuna osoba kronično zaraženo virusom HBV, a otprilike 887000 osoba svake godine umire od posljedica infekcije. U Europi je zaraženo 13.3 milijuna osoba (1.8% odraslih), a godišnje umre oko 36000 osoba. (Slika 7.).

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ), Hrvatska spada u zemlje s niskom učestalošću virusa HBV koji je zadnjih dvadesetak godina u opadanju zbog uvođenja cijepljenja, ali i dalje predstavlja važan javnozdravstveni problem s obzirom da je oko 25000 osoba u Hrvatskoj kronično zaraženo ovim virusom.



**Slika 7.** Prevalencija infekcije virusom hepatitisa B u svijetu 2015. godine (preuzeto i prilagođeno prema <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-b>).

## 1.7. Patogeneza, liječenje i prevencija infekcije

Virus HBV ne uzrokuje izravno oštećenje hepatocita, već je ono posljedica agresivnog odgovora imunskog sustava na virus. Nakon infekcije nastaje akutni hepatitis B (AHB) koji traje do 3 mjeseca nakon inkubacijskog razdoblja i u tom periodu imunski sustav organizma može eliminirati virus. Osoba za to vrijeme osjeća slabost i abdominalnu osjetljivost. Međutim, neke osobe neće moći eliminirati virus. Ukoliko infekcija virusom HBV traje dulje od 6 mjeseci razvit će se kronični hepatitis B (CHB). Simptomi su isti kao i u AHB te bolest često postoji godinama prije negoli se slučajno otkrije. U slučaju neliječenja CHB, zbog jakog upalnog procesa uzrokovanog imunskim sustavom, može nastati trajno oštećenje jetre poput ciroze jetre (LC) i hepatocelularnog karcinoma (HCC) (Papatheodoridis i sur. 2015).

Godine 1969. dr. Blumberg i dr. Irving Millman izumili su cjepivo protiv virusa HBV. Prva cjepiva dobivena su prikupljanjem HBsAg iz plazme osoba s kroničnom HBV infekcijom, a sredinom 80-ih godina zamijenjena su DNA-rekombinantnim cjepivima proizvedenim u kvascu (Romano i sur. 2014). Devedesetih godina prošloga stoljeća u Hrvatskoj je uvedeno obvezno cijepljenje protiv virusa HBV dok je u nekim europskim zemljama uvedeno i ranije, 1982. godine. Cjepivo je moguće primiti u dvije serije (*Heplisav-B* ili *Dynavax*) ili tri serije (*Recombivax HB*, *Engerix-B* i *Twinrix*), ovisno o životnoj dobi.

Za akutni hepatitis B ne postoji specifičan terapijski tretman. Kronični hepatitis B može se liječiti oralnim antivirusnim lijekovima (Tablica 1.) koji direktno djeluju na virus te injekcijama interferona  $\alpha$  koje imaju i imunomodulatorno djelovanje (Grimm i sur. 2011).

Antivirusni lijekovi korišteni u terapiji virusa HBV su nukleozidni i nukleotidni analozi (NA) koji uvijek ciljaju sintezu DNA reverznom transkriptazom, te funkcioniraju kao kompeticijski inhibitori enzima. Oni oponašaju prirodne nukleozide i nukleotide koji se ugrađuju unutar molekula DNA, te ometaju replikaciju virusa. Prilikom procesa replikacije kada dođe do ugradnje analoga u molekulu DNA enzimom RT, analog djeluje kao terminator jer zbog nedostatka hidroksilne skupine ne može formirati kovalentnu vezu s drugim nukleotidom, što rezultira završetkom lanca i inhibicijom daljnje replikacije virusa HBV (Grimm i sur. 2011).

Liječenje kroničnog hepatitisa B uobičajeno ne eliminira virus iz tijela u potpunosti, već smanjuje razine cccDNA, najvjerojatnije zbog smanjenja obnavljanja cccDNA putem inhibitora reverzne transkriptaze (NRTI) (Revill i Locarnini 2016; Zhang i sur. 2016).

Antivirusna terapija NA predviđena je kao trajna terapija koja bi se trebala provoditi najmanje jednu godinu, u nekim slučajevima i doživotno. Glavni nedostatak NA je ponovna replikacija virusa HBV nakon prekida terapije (Song i sur. 2012). Kod duljeg uzimanja antivirusne terapije može doći do mutacija koje dovode do supstitucije aminokiselina, te virus tako postaje rezistentan na antivirusne lijekove (Choi i sur. 2018). Tijekom cijelog procesa liječenja potrebno je mjeriti viremiju i paziti da njezina vrijednost bude manja od 1000 kopija DNA virusa HBV po mL seruma.

**Tablica 1.** Antivirusni lijekovi i struktura nukleozidnih i nukleotidnih analoga.

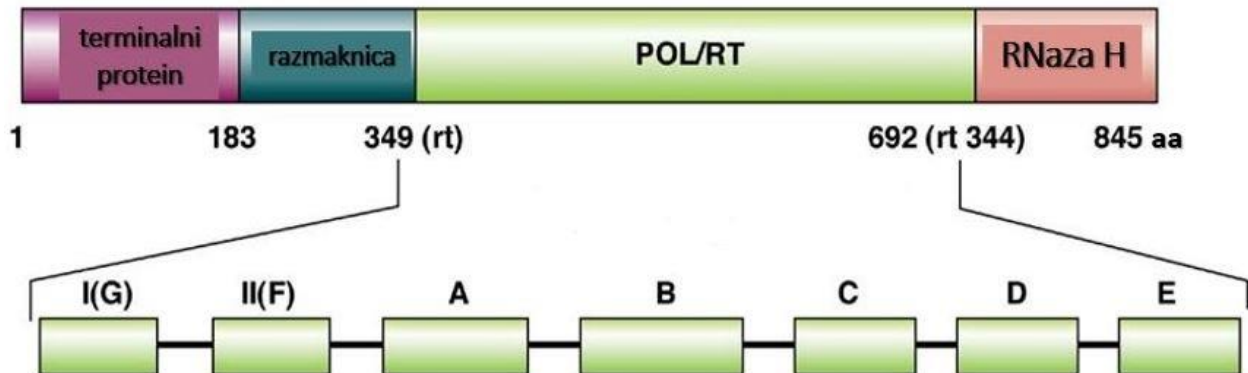
<b>antivirusni lijek (generički naziv)</b>	<b>aktivni sastojak (NA)</b>	<b>struktura</b>
<i>Baraclude</i> <sup>®</sup>	entekavir	nukleozidni analog gvanozina
<i>Epivir</i> <sup>®</sup> , <i>Zeffix</i> <sup>®</sup>	lamivudin	nukleozidni analog citidina
<i>Hepsera</i> <sup>®</sup>	adefovir dipivoksil	nukleotidni analog adenzina
<i>Sebivo</i> <sup>®</sup> , <i>Tyzeka</i> <sup>®</sup>	telbivudin	nukleozidni analog timidina
<i>Viread</i> <sup>®</sup>	tenofovir disoproksil fumarat	nukleotidni analog adenzina

Interferon  $\alpha$  (IFN 2a i 2b) umjereno inhibira replikaciju virusa HBV jer virus HBV ima određenu razinu osjetljivosti na interferon  $\alpha$  koja može biti specifična za genotip (Wieland i sur. 2005; Block i sur. 2007). Mehanizam njegova djelovanja je razgradnja virusne mRNA i inhibicija sinteze virusnih proteina kao i poticanje formiranja stanica NK te pomoćničkih T limfocita na produkciju citokina koji uništavaju inficirane hepatocite (Rijckborst i Janssen 2010).

Liječenje može usporiti napredovanje ciroze jetre, smanjiti pojavu hepatocelularnog karcinoma te poboljšati dugoročno preživljenje. Kod teškog oštećenja jetre jedina je opcija transplantacija organa.

## 1.8. Rezistencija na antivirusne lijekove

Kodirajuća sekvencija za HBV polimerazu, duga 2.5 kb (842 aa), najveća je u virusnom genomu (Stuyver i sur. 2000). Polimeraza ima četiri domene: terminalnu proteinsku domenu (TP) koja sadrži početnicu tirozina, domenu razmaknice, domenu RT koja je odgovorna za kataliziranje sinteze DNA i domenu RNaze H koja je ključna za razgradnju pgRNA (Clark i Hu 2015) (Slika 8.).



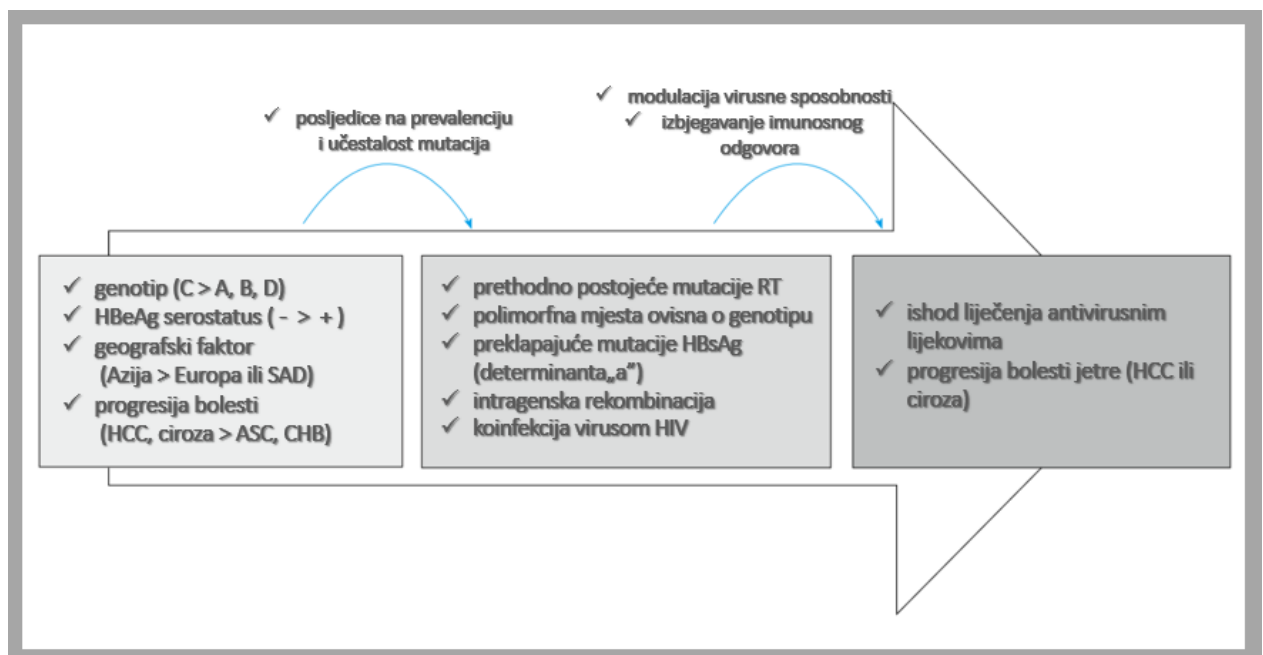
**Slika 8.** Polimeraza virusa hepatitisa B (preuzeto i prilagođeno prema Zolium i Locarnini 2009).

Iako je virus hepatitisa B DNA virus, on ima visoku stopu mutacija zato što tijekom svoje replikacije koristi DNA polimerazu ovisnu o RNA (RT), što dovodi do produkcije mnogih nejednakih varijanti genoma u svakom ciklusu replikacije (Caligiuri i sur. 2016). Razlog tome je što je reverzna transkriptaza polimeraza bez egzonukleazne aktivnosti koja tijekom replikacije koristi intermedijer RNA (pgRNA). Stopa pogreške iznosi  $10^{-7}$ , što je 10 puta više nego kod drugih DNA virusa, te rezultira pojavom mutacija u domenama RT koje posljedično zbog selekcijskog pritiska terapije mogu dovesti do rezistencije na antivirusne lijekove, odnosno selekcije najprilagođenijih varijanti virusnog genoma (Zhang i sur. 2013; Caligiuri i sur. 2016; Choi i sur. 2018). Točkaste mutacije (tranzicije i transverzije) u interdomeni A-B gena za RT mogu promijeniti konformacijsku strukturu RT supstitucijom aminokiselina te na taj način smanjiti učinkovitost vezanja NA (Strasfeld i Chou 2010; Zheng i sur. 2012; Xu i sur. 2015).

Mutacija koja uzrokuje rezistenciju na jedan od NA može uzrokovati i rezistenciju na drugi, što nazivamo križnom rezistencijom (Zolium i Locarnini 2009; Grimm i sur. 2011). Nukleotidni analozi adefovir i tenofovir nisu križno rezistentni s lamivudinom, telbivudinom i entekavirom (Dienstag 2008). Kada se dogode dvije ili više mutacija u istoj regiji, povećava se vjerojatnost

brže pojave rezistencije na NA zbog sinergističkog djelovanja, te se takva mutacija naziva kompenzacijska mutacija (Handel i sur. 2006).

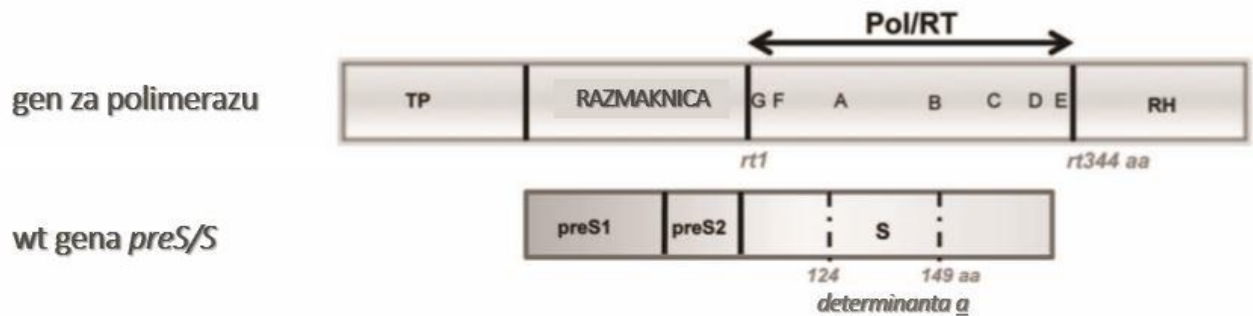
Prevalencija mutacija reverzne transkriptaze u bolesnika koji nisu liječeni ovisi o geografskim čimbenicima (prevalencija određenih mutacija ovisi o etničkoj pozadini ispitanika na određenom geografskom području), virusnom HBV genotipu, prisutnosti specifičnih antitijela na HBeAg (serostatusu), viremiji, progresiji bolesti, prisutnosti intragenske rekombinacije, koinfekciji virusom HIV i metodama korištenim za detekciju mutacija (Choi i sur. 2018) (Slika 9.). Međutim, rezistencija se može pojaviti i prilikom dugotrajnog liječenja virusa HBV inhibitorima reverzne transkriptaze kao i liječenja infekcije virusom HIV (Zheng i sur. 2012). Osobe zaražene virusom HIV često imaju i koinfekciju virusom HBV. Antivirusni lijekovi za liječenje infekcije virusa HBV djelotvorni su i u borbi protiv virusa HIV, a ako su korišteni prije liječenja virusa HBV, rezistencija na antivirusne lijekove pojavljuje se vrlo brzo (Dienstag 2008; Choi i sur. 2018).



**Slika 9.** Shematski prikaz koji ukazuje na ulogu prethodno postojećih mutacija reverzne transkriptaze virusa hepatitisa B u progresiji bolesti jetre i ishodima liječenja. HBV: virus hepatitisa B; HCC: hepatocelularni karcinom; ASC: asimptomatski prijenosnici; CHB: kronični hepatitis B; HIV: virus humane imunodeficijencije (preuzeto i prilagođeno prema Choi i sur. 2018).

## 1.9. Izbjegavanje imunosnog odgovora

Mutacije koje se nalaze u interdomeni A-B gena za RT koja se preklapa s regijom determinante „a” (glavna regija za indukciju zaštitnog humoralnog imunosnog odgovora) gena *S*, mogu dovesti do mutacija koje onemogućuju detekciju HBsAg i dovode do izbjegavanja imunosnog odgovora (*immune-escape mutation*). Te mutacije se još nazivaju i sekundarnim mutacijama (Ruiz-Tachiquín i sur. 2007; Sayan i Buğdaci 2013; Choi i sur. 2018) (Slika 10.).



**Slika 10.** Shematski prikaz preklapanja gena za polimerazu virusa hepatitisa B i determinante „a” gena *S* (preuzeto i prilagođeno prema Romanò i sur. 2014).

Antigen HBs nalazi se na ovojnici čestice virusa HBV. To je molekula od 226 aminokiselina koja se koristi se za dijagnosticiranje infekcije hepatitisom B (Stuyver i sur. 2000; Perazzo i sur. 2015; Ye i sur. 2015; Hossain i Ueda 2017). Provedba obveznog cijepljenja dovela je do značajnog smanjenja učestalosti i prijenosa virusa HBV. Prilikom cijepljenja stvaraju se antitijela (anti-HBs) na HBsAg. Iako se strategija imunizacije pokazala uspješnom, sve je više izvještaja o mutiranim virusima HBV koji se repliciraju unatoč cijepljenju i uzrokuju bolest (Romano i sur. 2014; Hossain i Ueda 2017).

Mutacija koja uzrokuje izbjegavanje imunosnog odgovora prvi put je identificirana u Italiji, 1988. godine u novorođenčeta. Dječak je odmah po rođenju primio cjepivo, ali je razvio infekciju virusom HBV. Otkriveno je da virus koji ima mutaciju u genu za HBsAg dobio perinatalno s majke nositeljice (Zanetti i sur. 1988).

Mutacije gena *S* javljaju se spontano kao posljedica selekcijskog pritiska imunosnog sustava domaćina, iako mehanizam kojim se to događa još uvijek nije otkriven (Leong i sur. 2016). Mutacija mijenja konformaciju determinante „a” HBsAg tako da neutralizirajuća antitijela, anti-HBs, inducirana cijepljenjem ili unesena imunoglobulinskom terapijom (HB Ig) više nisu u stanju prepoznati epitop virusa HBV i vezati se za njega, što rezultira infekcijom (Huang i

sur. 2012; Romano i sur. 2014; Leong i sur. 2016). Mutacije mogu utjecati na učinkovitost dijagnostičkih imunotestova, što znači da HBsAg nije moguće detektirati standardiziranim testovima (serološki testovi).

Postoji i infekcija tzv. „tihim” virusom HBV (*silent* ili *occult* HBV, OBI). OBI je prisutnost DNA virusa HBV u jetri (sa ili bez prisutnosti DNA virusa HBV u serumu) bez detektabilnog HBsAg, sa ili bez prisutnosti anti-HBs (Min-Sun i Yoon 2014; Manoochehr 2016). Karakterizira ga niska razina DNA virusa HBV u serumu (<200 kopija DNA virusa HBV/mL) i nemogućnost ekspresije HBsAg (Zeinab Nabil 2011), što je posljedica niske razine virusne replikacije. Osim mutacija u genu *S* koje čine HBsAg nedetektabilnim, uočeni su još neki mehanizmi koji mogu dovesti do nemogućnosti njegove detekcije, kao što su imunosupresija organizma domaćina nakon agresivnih načina liječenja nekih stanja, mutacije u genu *X* virusa HBV te mutacije u polimerazi ili kontrolnim područjima transkripcije virusa HBV. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja (Zeinab Nabil 2011; Min-Sun i Yoon 2014).

U ovom trenutku rizik od mutacija u genu za HBsAg nije tako velik kako se smatralo, ali osobe u kojih postoji mogućnost infekcije horizontalnim ili vertikalnim putem trebaju uzimati antivirusnu terapiju (Leong i sur. 2016).



## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U Republici Hrvatskoj do sada nije rađena sustavna nacionalna studija o distribuciji genotipova i podgenotipova virusa HBV kao ni o prevalenciji mutacija odgovornih za rezistenciju na inhibitore reverzne transkriptaze, te onih odgovornih za izbjegavanje imunskog odgovora. Određivanjem slijeda nukleotida interdomene A-B gena za reverznu transkriptazu moguće je odrediti genotipove i podgenotipove virusa HBV te mutacije odgovorne za rezistenciju i izbjegavanje imunskog odgovora. Određivanje navedenog izuzetno je važno zbog individualiziranog pristupa liječenja bolesnika s kroničnim hepatitisom B kao i sprječavanja terapijskog neuspjeha i progresije bolesti.

U svrhu toga određeni su sljedeći ciljevi istraživanja:

- ✓ odrediti slijed nukleotida interdomene A-B gena za reverznu transkriptazu virusa hepatitisa B Sangerovim sekvenciranjem, iz 30 uzoraka virusa HBV prikupljenih u vremenskom razdoblju od kolovoza 2017. do rujna 2018.;
- ✓ temeljem dobivenih sekvencija odrediti genotipove i podgenotipove virusa hepatitisa B koristeći bioinformatički algoritam *Geno2Pheno*;
- ✓ identificirati mutacije u interdomeni A-B gena za reverznu transkriptazu koje su odgovorne za rezistenciju na inhibitore reverzne transkriptaze koristeći bioinformatički algoritam *Geno2Pheno*;
- ✓ predvidjeti vezane mutacije u genu *S* koje su odgovorne za izbjegavanje imunskog odgovora koristeći bioinformatički algoritam *Geno2Pheno*.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu. U istraživanje je uključeno 30 ispitanika oba spola (Tablica 2.) s kroničnim hepatitisom B kojima je u sklopu rutinske dijagnostičke obrade određena viremija veća od 1000 kopija DNA virusa HBV po mL seruma. Ispitanici ranije nisu bili liječeni inhibitorima reverzne transkriptaze te su u kliničku skrb zaprimljeni od kolovoza 2017. do kraja rujna 2018. godine.

**Tablica 2.** Demografski i biološki parametri ispitanika.

Parametri	Žene	Muškarci	Ukupno
<b>Spol</b>			
N	13	17	30
%	43	57	100
<b>Dob (godine)</b>			
minimum	30	20	
maksimum	77	69	
medijan	38	43	41.5
<b>Viremija (kopije DNA virusa HBV/mL)</b>			
minimum	1356	1175	
maksimum	300853	>989000000	
medijan	16785	110987.5	41595

#### 3.2. Biološki uzorci

Uzorci krvi ispitanika prikupljeni su u Centru za virusni hepatitis Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević”. U sterilne epruvete Vacutainer od 6 mL bez antikoagulansa, venepunkcijom je prikupljena periferna krvi. Nakon inkubacije od 15 minuta pri sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 9500 x g (3500 rpm). Centrifugiranjem je serum odvojen od stanica krvi i fibrinogena koji su zaostali u talogu. Serum je pipetom Pasteur prenesen u sterilnu epruvetu i pohranjen pri -20 °C do daljnje obrade.

### 3.3. Reagensi i otopine

#### 3.3.1. Komplet reagensa i otopina za izolaciju virusne DNA

- *QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (250)* (Qiagen, Hilden, Njemačka)
  - proteaza K (*proteinase K*) – cijepa peptidnu vezu proteina na karboksilnom kraju alifatskih i aromatskih aminokiselina
  - pufer za liziranje (*buffer AL*) – sadrži kaotropne soli (gvanidin klorid)
  - pufer za ispiranje 1 (*buffer AW1 concentrate*) – za ispiranje nečistoća; koncentrat u koji se dodaje apsolutni etanol
  - pufer za ispiranje 2 (*buffer AW2 concentrate*) – za ispiranje nečistoća s dodatkom natrijevog azida za inhibiciju rasta mikroorganizama; koncentrat u koji se dodaje apsolutni etanol
  - pufer za oslobađanje DNA s kolone (*buffer AE*) – sadrži 10 mM Tris-Cl i 0.5 mM EDTA, pH = 9.0
- 96%-tni etanol (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

#### 3.3.2. Komplet reagensa i otopina za lančanu reakciju polimerazom

- *FastStart<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System* (Roche, Basel, Švicarska)
  - smjesa Hot start *FastStart<sup>TM</sup> Taq* DNA polimeraze i termostabilnog proteina s 3' – 5' egzonukleaznom aktivnošću koji se aktiviraju zagrijavanjem pri 95°C (*FastStart<sup>TM</sup> High Fidelity Enzyme Blend 5U/μL*)
  - 10x koncentrirani reakcijski *FastStart<sup>TM</sup>* pufer s 18 mM MgCl<sub>2</sub> (*FastStart<sup>TM</sup> High Fidelity Reaction Buffer, with 18 mM MgCl<sub>2</sub> 10x concentrated*)
  - otopina koja sadrži 10 mM svakog nukleotida (*PCR Grade Nucleotide Mix*)
  - dvostruko destilirana, deionizirana i autoklavirana voda (*Water, PCR grade*)
- početnice *HBV OUT FORWARD* i *HBV OUT REVERSE* *Invitrogen* (Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, SAD) (Choi i sur. 2018)

### 3.3.3. Komplet reagensa i otopina za ugniježdenu lančanu reakciju polimerazom (*Nested PCR*)

- *FastStart™ High Fidelity PCR System* (Roche, Basel, Švicarska)
  - smjesa Hot start *FastStart™ Taq* DNA polimeraze i termostabilnog proteina s 3' – 5' egzonukleaznom aktivnošću koji se aktiviraju zagrijavanjem pri 95°C (*FastStart™ High Fidelity Enzyme Blend 5U/μL*)
  - 10x koncentrirani reakcijski *FastStart™* pufer s 18 mM MgCl<sub>2</sub> (*FastStart™ High Fidelity Reaction Buffer, with 18 mM MgCl<sub>2</sub> 10x concentrated*)
  - otopina koja sadrži 10 mM svakog nukleotida (*PCR Grade Nucleotide Mix*)
  - dvostruko destilirana, deionizirana i autoklavirana voda (*Water, PCR grade*)
- početnice *HBV IN FORWARD* i *HBV IN REVERSE Invitrogen* (Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, SAD) (Choi i sur. 2018)

### 3.3.4. Komplet reagensa i otopina za reakciju sekvenciranja

- *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Warrington, UK)
  - reakcijska smjesa za Sangerovu dideoksi metodu sekvenciranja koja sadrži fluorescentno označene ddNTP-ove i AmpliTaq® DNA polimerazu (*BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix*)
  - 5x koncentrirani pufer, specifično optimiziran za korištenje s „v3.1 Ready Reaction Mix” (*BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5x Sequencing Buffer*)
- početnice *HBV IN FORWARD* i *HBV IN REVERSE Invitrogen* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) (Choi i sur. 2018)
- destilirana, deionizirana i autoklavirana voda očišćena od nukleaza (*DEPC – Treated Water*; Ambion, Austin, Texas, SAD)
- matriks za razdvajanje DNA fragmenata pri kapilarnoj elektroforezi (*POP-7™ polymer*; Applied Biosystems, Warrington, UK)
- pufer za kapilarnu elektroforezu (*310 and 31xx Running Buffer, 10x*; Applied Biosystems, Warrington, UK)
- kapilare za elektroforezu (*3130xl/3100 Genetic Analyzer 16-Capillary Array, 50 cm*; Applied Biosystems, Warrington, UK)

### 3.3.5. Komplet reagensa i otopina za pročišćavanje i denaturaciju amplikona

- natrijev acetat (*Sodium acetate buffer solution*, 3 M, pH = 5.2; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) – sol za precipitaciju DNA
- 96%-tni i 70%-tni etanol (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska) - etilni alkohol za otapanje DNA
- visoko deionizirani formamid (*Hi-Di™ Formamide*; Applied Biosystems, Warrington, UK) – reagens za otapanje taloga i denaturaciju

## 3.4. Uređaji i računalni programi

### 3.4.1. Uređaji

- centrifuga *Hettich EBA 20* (Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Hettich), Tuttlingen, Njemačka)
- vrtložna miješalica *Agitateur Top-Mix 1118* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- termoblok *R 1.5 mL* (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- ultracentrifuga *SIGMA 3K30* (Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode am Harz, Njemačka)
- termokružnik *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- centrifuga *5430* (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- uređaj za sekvenciranje *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Warrington, UK)

### 3.4.2. Računalni programi

- program *DNA Sequencing Analysis* verzija 5.1 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD)
- program *Vector NTI Software* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- bioinformatički algoritam *Geno2Pheno* (Genafor, Max Planck Institut Informatik, Bonn, Njemačka)
- baza podataka *GenBank* (NCBI, Bethesda, Maryland, SAD)
- program *Microsoft Office Excel* (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD)

### 3.5. Metode

#### 3.5.1. Izolacija virusne DNA

Virusna DNA iz seruma izolirana je korištenjem komercijalnog kompleta reagensa *QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (250)* prema protokolu proizvođača (Slika 11.). U epruvetu od 1.5 mL otpipetirano je 20  $\mu$ L proteaze K, 200  $\mu$ L uzorka seruma te 200  $\mu$ L pufera za liziranje stanica AL. Dobivena smjesa promiješana je na vrtložnoj miješalici 15 sekundi kako bi enzimska razgradnja bila efikasnija. Uzorak je inkubiran u termobloku 10 min pri 350 okretaja u minuti (rpm, *revolutions per minute*) i 56 °C. Zatim je u epruvetu dodano 200  $\mu$ L 96%-tnog etanola i uzorak je promiješan na vrtložnoj miješalici 15 sekundi. Sadržaj epruvete volumena 620  $\mu$ L prebačen je u *QIAamp<sup>®</sup> Spin* epruvetu s kolekcijskom epruvetom od 2 mL te centrifugiran u ultracentrifugi 1 min pri 6000 x g (8000 rpm). Epruveta *QIAamp Spin* koja sadrži membranu od silika-gela, na koju se vezala DNA, nakon svakog centrifugiranja prebačena je u nove kolekcijske epruvete od 2 mL. Dodano je 500  $\mu$ L pufera za ispiranje AW1 i ponovljeno centrifugiranje 1 min pri 6000 x g (8000 rpm). Zatim je dodano 500  $\mu$ L pufera za ispiranje AW2 i uzorak je centrifugiran 3 min pri 20000 x g (14000 rpm). Budući da puferi AW1 i AW2 sadrže etanol koji može inhibirati reakciju, potrebno je ukloniti njegove ostatke centrifugiranjem uzorka 1 min pri 20000 x g (14000 rpm). Kolona je prebačena u epruvetu Eppendorf od 1.5 mL. Da bi se DNA isprala s kolone, dodano je 200  $\mu$ L pufera AE. Uzorak je inkubiran 1 min pri sobnoj temperaturi te nakon toga centrifugiran 1 min pri 6000 x g (8000 rpm). Dobiveni izolat pohranjen je pri -20 °C.



**Slika 11.** Shematski prikaz postupka izolacije DNA pomoću kompleta reagensa *QIAamp* (preuzeto i prilagođeno prema <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>).

### 3.5.2. Lančana reakcija polimerazom

Korištenjem komercijalnog kompleta reagensa *FastStart<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System* i početnica *Invitrogen HBV OUT F* i *HBV OUT R* (Tablica 3.), pripremljene su reakcijske smjese (Tablica 4.) za umnažanje interdomene A-B gena za reverznu transkriptazu iz izolirane DNA.

Pomiješano je 22.5  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese i 2  $\mu\text{L}$  izolirane DNA. Uzorci su stavljeni u termokružnik pri određenim uvjetima reakcije (Tablica 5.). Nakon završetka reakcije, amplikoni su korišteni za ugniježđenu lančanu reakciju polimerazom.

**Tablica 3.** Početnice za lančanu reakciju polimerazom.

<i>HBV OUT FORWARD (F)</i> <i>nizvodna</i>	$c = 26.9 \text{ nmol}$	5' TTC CTG CTG GTG GCT CCA GTT C 3'
<i>HBV OUT REVERSE (R)</i> <i>uzvodna</i>	$c = 20.5 \text{ nmol}$	5' TGC TAG GAG TTC CGC AGT ATG 3'

**Tablica 4.** Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerazom.

SASTAV REAKCIJSKE SMJESE	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O	18.85
10 x reakcijski pufer s 18 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5
smjesa dNTP-ova (10 mM)	0.5
početnica <i>HBV OUT F</i> (20x)	0.2
početnica <i>HBV OUT R</i> (20x)	0.2
smjesa enzima <i>FastStart<sup>TM</sup> High Fidelity</i> (5U/ $\mu\text{L}$ )	0.25
DNA	2
<b>UKUPAN VOLUMEN</b>	<b>24.5</b>

**Tablica 5.** Uvjeti lančane reakcije polimerazom.

KORACI UVJETI	<i>amplifikacija, 45 ciklusa</i>					
	inicijalna denaturacija	denaturacija	vezanje početnica	elongacija	završna elongacija	hlađenje
temperatura	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C
vrijeme	2 min	30 s	30 s	1 min	7 min	$\infty$



### 3.5.3. Ugniježdjena lančana reakcija polimerazom

Kako bi se povećala specifičnost, dobiveni ampliconi prve PCR reakcije korišteni su kao kalupi za drugu PCR reakciju. I za ovu reakciju pripremljene su reakcijske smjese (Tablica 7.) korištenjem komercijalnog kompleta reagensa *FastStart<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System* te početnica *Invitrogen HBV IN F* i *HBV IN R* (Tablica 6.).

Pomiješano je 24.5 µL reakcijske smjese i 0.5 µL umnožene DNA. Uzorci su stavljeni u termokružnik pri istim uvjetima reakcije kao i za reakciju PCR (Tablica 5.). Nakon završetka reakcije, ampliconi su pohranjeni pri -20 °C do daljnje obrade.

**Tablica 6.** Početnice za ugniježdenu reakciju polimerazom.

<i>HBV IN FORWARD (F)</i> <i>nizvodna</i>	c = 26.1 nmol	5' CTC GTG GTG GAC TTC TCT C 3'
<i>HBV IN REVERSE (R)</i> <i>uzvodna</i>	c = 22.4 nmol	5' GCA AAG CCC AAA AGA CCC AC 3'

**Tablica 7.** Reakcijska smjesa za ugniježdenu lančanu reakciju polimerazom.

SASTAV REAKCIJSKE SMJESE	VOLUMEN (µL)
H <sub>2</sub> O	20.85
10 x reakcijski pufer s 18 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5
smjesa dNTP-ova (10 mM)	0.5
početnica <i>HBV IN F</i> (20x)	0.2
početnica <i>HBV IN R</i> (20x)	0.2
smjesa enzima <i>FastStart<sup>TM</sup> High Fidelity</i> (5U/µL)	0.25
produkt PCR	0.5
<b>UKUPAN VOLUMEN</b>	<b>25</b>

### 3.5.4. Reakcija sekvenciranja

Sekvenciranjem će se odrediti slijed nukleotida interdomene A-B gena za reverznu transkriptazu DNA virusa HBV. Sangerova dideoksi metoda sekvenciranja temelji se na ugradnji fluorescentno označenih dideoxi nukleotida tijekom PCR sinteze komplementarnog lanca DNA.

Za određivanje sekvencija dobivenih amplicona interdomene A-B gena za RT, korišten je komercijalni komplet reagensa *BigDye<sup>TM</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* i početnice *Invitrogen HBV IN F* i *HBV IN R* (Tablica 6.). Ampliconi dobiveni ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom razrijeđeni su 50 puta. U setove od 8 reakcijskih epruveta s poklopcima MicroAmp<sup>®</sup>, za svaki uzorak pripremljene su po dvije reakcijske smjese s nizvodnom (F), odnosno uzvodnom (R) početnicom (Tablica 8.) u dvije reakcijske epruvete. Umnažanje za reakciju sekvenciranja provedeno je u termokružniku pri određenim uvjetima reakcije (Tablica 9.).

**Tablica 8.** Reakcijska smjesa za reakciju sekvenciranja.

SASTAV REAKCIJSKE SMJESE	VOLUMEN (μL)
H <sub>2</sub> O	5.9
5 x reakcijski pufer	2
početnica <i>HBV IN F</i> (20x)	0.6
početnica <i>HBV IN R</i> (20x)	0.6
<i>BigDye<sup>TM</sup> Terminator v3.1 Ready Reaction Mix</i>	0.5
razrijeđeni produkt PCR	1
<b>UKUPAN VOLUMEN</b>	<b>10</b>

**Tablica 9.** Uvjeti reakcije umnažanja za reakciju sekvenciranja.

<b>KORACI</b>	<i>amplifikacija, 25 ciklusa</i>			<b>hlađenje</b>
	<b>denaturacija</b>	<b>vezanje početnica</b>	<b>elongacija</b>	
<b>UVJETI</b>				
<b>temperatura</b>	96 °C	50 °C	60 °C	4 °C
<b>vrijeme</b>	10 s	5 s	4 min	∞

Nakon umnažanja za reakciju sekvenciranja, umnožene fragmente DNA potrebno je pročistiti od neugrađenih ddNTP/dNTP i početnica. Pročišćavanje produkata provedeno je pomoću 3 M natrijeva acetata i 96%-tnog etanola. Pripremljena je otopina od 2 µL NaAc i 50 µL EtOH. U svaku epruvetu s produktima dodano je 52 µL te otopine, poklopljeno i dobro promiješano okretanjem. Uzorci su centrifugirani 20 min pri 2000 x g. Odmah nakon završetka centrifugiranja uklonjeni su poklopci, na epruvete su stavljene papirnati ručnici, te su one okrenute centrifugirane 1 min pri 150 x g. U epruvete je zatim dodano 150 µL hladnog 70%-tnog etanola, stavljene su poklopci i dobro je promiješano okretanjem. Uzorci su centrifugirani 5 min pri 2000 x g. Nakon završetka centrifugiranja uklonjeni su poklopci, na epruvete su stavljene papirnati ručnici, te su one okrenute centrifugirane 1 min pri 150 x g. Kako bi se uzorci denaturirali, korišten je visoko deionizirani formamid. U svaki uzorak dodano je 20 µL formamida, uzorci su poklopljeni i dobro promiješani, te stavljene u termokružnik pri određenim uvjetima reakcije (Tablica 10.). Epruvete s denaturiranim sekvencijskim produktima premještene su na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica, poklopljene gumenim čepovima i stavljene u uređaj za sekvenciranje *ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer*. Za kapilarnu elektroforezu korišten je polimer *POP-7<sup>TM</sup>* i kapilara od 50 cm.

**Tablica 10.** Uvjeti reakcije denaturacije.

<b>KORACI</b>	<b>denaturacija</b>	<b>hlađenje</b>
<b>UVJETI</b>		
<b>temperatura</b>	90 °C	4 °C
<b>vrijeme</b>	2 min	∞

### 3.5.5. Obrada podataka

Dobivene sekvencije pregledane su u programu *DNA Sequencing Analysis* v5.1 i pohranjene u obliku datoteke *abi*. Sekvencije su uređene u programu *Vector NTI Software*. Genotipovi i podgenotipovi virusa hepatitisa B kao i mutacije u sekvencijama povezane s rezistencijom na pojedine antivirusne lijekove koji inhibiraju reverznu transkriptazu te izbjegavanjem imunskog odgovora, identificirani su pomoću bioinformatičkog algoritma *Geno2Pheno*. U Tablici 11. nalazi se popis svih poznatih supstitucija u interdomeni A-B gena za RT virusa HBV te njihovih učinaka na djelotvornost antivirusnih lijekova.

**Tablica 11.** Popis svih poznatih supstitucija u interdomeni A-B gena za reverznu transkriptazu virusa HBV i njihovih učinaka na djelotvornost antivirusnih lijekova (preuzeto i prilagođeno iz bioinformatičkog algoritma *Geno2Pheno*).

lijek	supstitucija	učinak
<b>lamivudin</b> <i>Epivir<sup>®</sup>, Zeffix<sup>®</sup></i>	180C ili 180M	ograničena osjetljivost rezistencija
	181T ili 181V	
	204I ili 204S ili 204V	kompenzacijska mutacija
	80V ili 80I 173L	
<b>adefovir d</b> <i>Hepsera<sup>®</sup></i>	181T ili 181V	rezistencija
	236T	
<b>entekavir</b> <i>Baraclude<sup>®</sup></i>	204V ili 204I	djelomična rezistencija
	(169T ili 184A ili 184G ili 184I ili 184S ili 202G ili 202I ili 250V) i (204V)	rezistencija
	(169T ili 184A ili 184G ili 184I ili 184S ili 202G ili 202I ili 250V) i (204I)	
	180C ili 180M	kompenzacijska mutacija
	169T ili 184A ili 184G ili 184I ili 184S	
	202G ili 202I 250V	
<b>tenofovir df</b> <i>Viread<sup>®</sup></i>	236T	ograničena osjetljivost
<b>telbivudin</b> <i>Tyzeka<sup>®</sup>, Sebivo<sup>®</sup></i>	181T ili 181V	rezistencija
	204I ili 204V	
	80I ili 80V	kompenzacijska mutacija

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza sekvencija

Sakupljena je krv i izolirana DNA iz seruma 30 ispitanika s kroničnim hepatitisom B, odnosno od 13 ispitanika ženskog spola medijana starosti 38 godina i medijana viremije 16785 kopija DNA virusa HBV po mL seruma te 17 ispitanika muškog spola medijana starosti 43 godine i medijana viremije 110987.5 kopija DNA virusa HBV po mL seruma. Koncentracija i čistoća virusne DNA nisu provjeravane. DNA je umnožena reakcijom PCR te su ampliconi veličine 600 pb svih uzoraka direktno podvrgnuti reakciji sekvenciranja. Nakon obrade podataka u programu *Vector NTI Software* (Slika 12.) i u algoritmu *Geno2Pheno*, detektirani su genotipovi i podgenotipovi virusa HBV kao i mutacije u sekvencijama interdomene A-B gena za RT povezane s rezistencijom na inhibitore reverzne transkriptaze te su predviđene vezane mutacije u genu *S* povezane s izbjegavanjem imunskog odgovora (Slika 13.).



**Slika 12.** Pregled i uređivanje sekvencija u programu *Vector NTI Software*. Prikaz složenih sekvencija dobivenih nizvodnim odnosno uzvodnim početnicama.

A)

Geno2pheno [hbv] 2.0

Page: [Input](#) | [Results](#) | [Resistance](#) | [Escape](#) | [References](#) | [Contact](#)

Sequence: 0

Feature: [Alignment](#) | [Prediction](#) [PDF](#) | [Summary PDF](#) | [CSV](#) | [HIV-Grade](#)

Sequence Information		
Identifier:	(No identifier given) - HBVR13MZ	
Genotype:	D	
Dual Infection:	No indication of dual infection was found (100% confidence)	
Subgenotype:	D3 (similarity to subgenotype profile = 97.8%)	
Included RT domain codons:	58 - 277 (similarity to reference = 95.45%)	
Included SHB protein codons:	49 - 227 (similarity to reference = 96.65%)	
Mutations RT domain:	L91I, S117PS, F122L, Q130P, Y135S, V207IMV, C256CS, D263E, I266V, Q267R	
Mutations SHB protein:	F80FS, T127P, S193LS, M198IM, W199LW, I208IT	
Escape mutations SHB protein:		

Drug Resistance		
Drug	Scored mutations	Resistance analysis
Lamivudine, Zeffix®	none	susceptible <span style="color: green;">■</span>
Adefovir, Hepsera®	none	susceptible <span style="color: green;">■</span>
Entecavir, Baraclude®	none	susceptible <span style="color: green;">■</span>
Tenofovir DF	none	susceptible <span style="color: green;">■</span>
Telbivudine, Tyzeka®, Sebivo®	none	susceptible <span style="color: green;">■</span>

Escape Mutations		
Mutation	Mode of Action	Impact

B)

Geno2pheno [hbv] 2.0

Page: [Input](#) | [Results](#) | [Resistance](#) | [Escape](#) | [References](#) | [Contact](#)

Sequence: 0

Feature: [Alignment](#) | [Prediction](#) [PDF](#) | [Summary PDF](#) | [CSV](#) | [HIV-Grade](#)

Sequence Information		
Identifier:	(No identifier given) - HBVR10SH	
Genotype:	A	
Dual Infection:	No indication of dual infection was found (100% confidence)	
Subgenotype:	A2 (similarity to subgenotype profile = 98.87%)	
Included RT domain codons:	63 - 264 (similarity to reference = 90.59%)	
Included SHB protein codons:	55 - 227 (similarity to reference = 91.91%)	
Mutations RT domain:	L91I, F122N, H124N, H126Y, Y135S, N139Q, L145M, Q149K, F151Y, R153W, I163V, L180M, M204V, L217R, F221Y, V253I, C256S, Y257W, S259T	
Mutations SHB protein:	T68I, S114T, R122K, T127P, T131N, Y134F, S143T, G159A, F161Y, A168V, V194A, I195M, L209V, L213I	
Escape mutations SHB protein:	122K, 131N	

Drug Resistance		
Drug	Scored mutations	Resistance analysis
Lamivudine, Zeffix®	180M,204V	resistant <span style="color: red;">■</span>
Adefovir, Hepsera®	none	susceptible <span style="color: green;">■</span>
Entecavir, Baraclude®	204V,180M	partly resistant <span style="color: red;">■</span>
Tenofovir DF	none	susceptible <span style="color: green;">■</span>
Telbivudine, Tyzeka®, Sebivo®	204V	resistant <span style="color: red;">■</span>

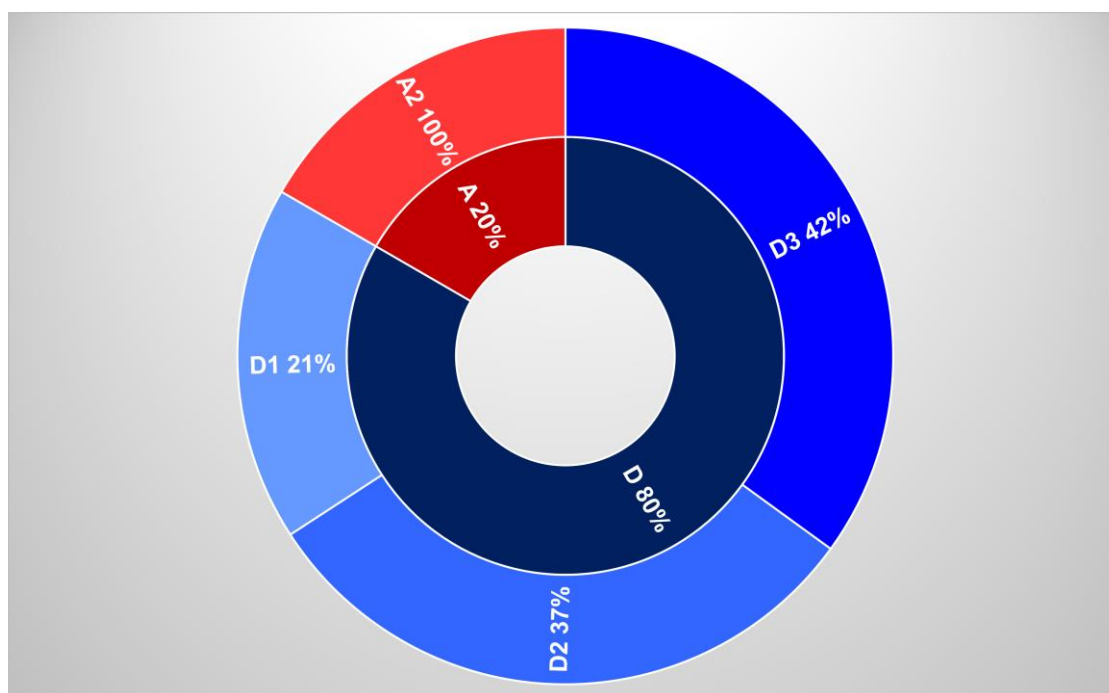
Escape Mutations		
Mutation	Mode of Action	Impact
122K	Detection	Secondary Mutation
131N	Detection	Secondary Mutation

**Slika 13.** Primjer rezistencijskih profila dvaju ispitanika zaraženih virusom HBV genotipova A i D, dobivenih pomoću algoritma *Geno2Pheno*. **A)** Bez prisutnih supstitucija povezanih s rezistencijom na inhibitore reverzne transkriptaze i izbjegavanjem imunosnog odgovora; **B)** S detektiranim supstitucijama povezanim s rezistencijom na pojedine inhibitore reverzne transkriptaze i izbjegavanjem imunosnog odgovora.

Sekvencije regije interdomene A-B gena za reverznu transkriptazu pohranjene su u *GenBank* pod pristupnim brojevima: MK410095, MK410096, MK410097, MK410098, MK410099, MK410100, MK410101, MK410102, MK410103, MK410104, MK410105, MK410106, MK410107, MK410108, MK410109, MK410110, MK410111, MK410112, MK410113, MK410114, MK410115, MK410116, MK415823, MK415824, MK416163, MK416164, MK416165, MK416166, MK416167, MK468728.

#### 4.2. Genotipizacija virusa HBV

U sklopu provedenog istraživanja identificirana su dva genotipa virusa HBV u hrvatskoj populaciji, genotipovi A i D (Slika 14.). Genotip A detektiran je u 6 ispitanika (20%) te je kod svih detektiran podgenotip A2. Genotip D detektiran je kod 24 ispitanika (80%), od čega je 5 ispitanika (21%) imalo podgenotip D1, 9 ispitanika (37%) podgenotip D2 i 10 ispitanika (42%) podgenotip D3 (Slika 15.). Kada se uspoređuje distribucija genotipova po spolu, od 13 ispitanika ženskog spola, 1 ispitanica (8%) imala je genotip A, a kod 12 (92%) ih je detektiran genotip D. Distribucija podgenotipova genotipa D bila je: 2 ispitanice (17%) imale su podgenotip D1, 4 (33%) podgenotip D2, a njih 6 (50%) podgenotip D3. Od 17 ispitanika muškog spola, 5 ispitanika (29%) imalo je genotip A, a 12 (71%) genotip D. Među muškim ispitanicima s detektiranim genotipom D, 3 (25%) su imala podgenotip D1, 5 (42%) ih je imalo podgenotip D2, a 4 (33%) podgenotip D3.



**Slika 14.** Zastupljenost genotipova i podgenotipova u istraživanoj populaciji.

### 4.3. Mutacije koje dovode do rezistencije na antivirusne lijekove

Sekvenciranjem interdomene A-B gena za RT virusa HBV, dobivene su sekvencije koje su uspoređene s odgovarajućim referentnim sekvencijama genotipa D u bioinformatičkom algoritmu *Geno2Pheno*. Algoritam relevantnim smatra sve mutacije za koje se u prethodnim istraživanjima pokazalo da uzrokuju rezistenciju ili djelomičnu rezistenciju na trenutno dostupne inhibitore reverzne transkriptaze (entekavir, lamivudin, adefovir, telbivudin, tenofovir). Kod dva ispitanika genotipa A detektirane su dvije supstitucijske mutacije koje uzrokuju rezistenciju na antivirusne lijekove. Supstitucija u genu za RT gdje je metionin na poziciji 204 zamijenjen valinom (rtM204V) uzrokovao je rezistenciju na telbivudin. Mutacija rtM204V zajedno sa supstitucijom u genu za RT gdje je leucin na poziciji 180 zamijenjen metioninom (rtL180M) doveo je do kompenzacijske mutacije i brže pojave rezistencije na lamivudin te djelomične rezistencije na entekavir (Slika 15.). Detektirano je još 106 supstitucijskih mutacija u interdomeni A-B gena za RT, ali se nalaze na pozicijama koje nisu odgovorne za rezistenciju na antivirusne lijekove. Njihova prisutnost bila je učestalija kod ispitanika genotipa A, nego kod ispitanika genotipa D.





#### 4.4. Mutacije koje dovode do izbjegavanja imunskog odgovora

Nakon detekcije rezistencijskih mutacija u interdomeni A-B gena za RT, bioinformatički algoritam *Geno2Pheno* napravio je predikciju vezanih mutacija u genu *S* koji kodira za HBsAg. Od 30 ispitanika, kod njih 14 (47%), 6 ispitanika (43%) genotipa A i 7 ispitanika (57%) genotipa D, detektirano je sedam supstitucijskih mutacija koje dovode do izbjegavanja imunskog odgovora (Tablica 12.). Kod ispitanika podgenotipa D1 nisu detektirane mutacije povezane s izbjegavanjem imunskog odgovora. Dvije mutacije koje se javljaju zajedno kod svih ispitanika podgenotipa A2 su supstitucija u genu *S* gdje je arginin na poziciji 122 zamijenjen lizinom (sR122K) i supstitucija u genu *S* gdje je treonin na poziciji 131 zamijenjen asparaginom (sT131N) te su odgovorne za onemogućavanje detekcije HBsAg standardiziranim testovima. Mutacije kod ispitanika podgenotipa D2 koje se nisu nužno javljale ovisno jedna o drugoj su: supstitucija u genu *S* gdje je glutamin na poziciji 101 zamijenjen s histidinom (sQ101H); sR122K odgovorna za onemogućavanje detekcije HBsAg standardiziranim testovima; supstitucija u genu *S* gdje je metionin na poziciji 133 zamijenjen izoleucinom (sM133I) odgovorna za onemogućavanje detekcije HBsAg standardiziranim testovima i neučinkovitost imunoglobulinske terapije; supstitucija u genu *S* gdje je metionin na poziciji 133 zamijenjen leucinom (sM133L) odgovorna za onemogućavanje detekcije HBsAg standardiziranim testovima, nedjelotvornost ranije primljenih cjepiva i neučinkovitost imunoglobulinske terapije kao i supstitucija u genu *S* gdje je asparaginska kiselina na poziciji 144 zamijenjena glutaminskom kiselinom (sD144E). Dvije mutacije koje se javljaju kod ispitanika podgenotipa D3 su sQ101H i supstitucija u genu *S* gdje je prolin na poziciji 120 zamijenjen sa serinom (sP120S) odgovorna za onemogućavanje detekcije HBsAg standardiziranim testovima te nedjelotvornost ranije primljenih cjepiva.

**Tablica 12.** Detektirane supstitucijske mutacije povezane s izbjegavanjem imunskog odgovora po podgenotipovima istraživane populacije.

podgenotip mutacije	A2	D1	D2	D3
sQ101H	0	0	1	1
sP120S	0	0	0	1
sR122K	6	0	2	0
sT131N	6	0	0	0
sM133I	0	0	1	0
sM133L	0	0	1	0
sD144E	0	0	1	0

## 5. RASPRAVA

U svijetu je približno 257 milijuna osoba kronično zaraženo virusom hepatitisa B (WHO), dok je u Hrvatskoj zaraženo oko 25000 osoba (HZJZ). Kronični hepatitis B može se liječiti oralnim antivirusnim lijekovima kao što su inhibitori reverzne transkriptaze te interferon  $\alpha$ . Potrebno ga je dijagnosticirati na vrijeme i započeti s odgovarajućom terapijom jer u slučaju neliječenja može se razviti ciroza jetre ili hepatocelularni karcinom. Iako je virus HBV DNA virus, uočena je visoka stopa mutacija. Razlog tome je da enzim reverzna transkriptaza, važna u replikacijskom ciklusu ovog virusa, nema egzoznu aktivnost (Caligiuri i sur. 2016). Mutacije u interdomeni A-B gena za reverznu transkriptazu mogu dovesti do rezistencije na antivirusne lijekove, ali i do mutacija u genu za površinski antigen virusa hepatitisa B, što može uzrokovati izbjegavanje imunosnog odgovora. Do danas su poznate 22 mutacije u interdomeni A-B gena za reverznu transkriptazu i 66 mutacija u determinanti „a” gena S za površinski antigen virusa HBV (*Geno2Pheno*). Prevalencija postojećih mutacija reverzne transkriptaze u bolesnika koji nisu liječeni ovisi o geografskim čimbenicima, virusnom HBV genotipu, prisutnosti specifičnih antitijela na HBeAg, viremiji, progresiji bolesti, prisutnosti intrageneske rekombinacije, koinfekciji virusom HIV i metodama korištenim za detekciju mutacija (Choi i sur. 2018).

U Hrvatskoj do sada nije rađena sustavna nacionalna studija na virusu HBV koja bi uključivala njegovu genotipizaciju te utvrđivanje učestalosti mutacija odgovornih za rezistenciju na antivirusne lijekove i izbjegavanje imunosnog odgovora.

U istraživanju je Sangerovom metodom uspješno sekvencirano 30 uzoraka virusa HBV. Analizom sekvencija u bioinformatičkom algoritmu *Geno2Pheno* određeni su genotipovi i podgenotipovi te mutacije povezane s rezistencijom na inhibitore reverzne transkriptaze i izbjegavanjem imunosnog odgovora.

Prema studiji Deterding i sur. (2008), dva genotipa virusa HBV uobičajena za jugoistočnu Europu i Hrvatsku su A i D. Genotip A rjeđe je zastupljen, u postotku od 8%, dok je genotip D učestao s postotkom od 80%. Rezultati ovog istraživanja pokazali su zastupljenost genotipa A u postotku od 20% i genotipa D u postotku od 80%. Genotip A karakterističan je za sjevernu Europu, međutim prema studijama Deterding i sur. (2008), McMahon (2009) i ovom istraživanju potvrđen je njegov geografski pomak od sjevera prema jugoistoku Europe, i to s pretežitom učestalošću podgenotipa A2. Kao u Hrvatskoj, samo genotipovi A i D zastupljeni

su u Norveškoj, Danskoj (A > D), Estoniji, Latviji, Litvi, Rusiji, Rumunjskoj, Italiji i Srbiji (D > A). Samo genotip D zastupljen je u Albaniji i Grčkoj (D = 100%). Genotipovi A i D s genotipovima B i C zastupljeni su u Švedskoj (D > A > B = C), Češkoj (A > D > B > C) i Mađarskoj (A > D > C > B). Uz genotipove A i D, u Poljskoj zastupljeni su genotipovi F i H (A > D > F > H), u Španjolskoj genotip F (D > A > F), u Ujedinjenom Kraljevstvu genotipovi B, C i G (A > D > G > B > C), u Njemačkoj genotipovi B, C, E i F (A > D > C > B > E = F), u Belgiji genotip G (A > D > G) te u Francuskoj genotipovi B, C, E i G (D > A > B > G > C = E) (Schaefer 2007; Deterding i sur. 2008). Može se uočiti da su genotipovi A i D dva dominantna genotipa virusa HBV zastupljena u Europi. Genotip A još je lokaliziran na području supsaharske i zapadne Afrike, Azije te Australije, a genotip D na području sjeverne Afrike i Indije (Shi i sur. 2013; Ozaras i sur. 2015). Na Aljasci je rasprostranjen genotip A (A2), ali je detektiran i genotip D kod imigranata starije dobi čiji genotip virusa HBV predstavlja genotip njihove zemlje podrijetla. Podgenotip A2 osim u sjevernoj Europi i na Aljasci, uočen je još i u 48 saveznih država SAD-a (Chu i sur. 2003). Podgenotip D1 uobičajen je za Bugarsku, Tursku, Srednji Istok, Sjevernu Afriku, Indoneziju i Brazil, D2 za Srbiju, Albaniju Tursku, Libanon, Brazil i zapadnu Afriku te D3 za Srbiju, zapadnu Indiju i Indoneziju (Ozaras i sur. 2015). Zastupljenost podgenotipova ovog istraživanja, D1 u postotku od 21%, D2 u postotku od 37% i D3 u postotku od 42% odgovara rezultatima distribucije podgenotipova genotipa D (D1 – 7.5%, D2 – 30.4%, D3 – 45.1%) u Srbiji prema studiji Lazarević i sur. (2007). Iako je u ovom istraživanju nasumično odabrana mala skupina ispitanika za genotipizaciju virusa HBV, prevalencija genotipova A i D kao i podgenotipova A2, D1, D2 i D3 je reprezentativna.

Točkaste mutacije koje se događaju u interdomeni A-B gena za reverznu transkriptazu dovode do supstitucije aminokiselina i na taj način mijenjanja konformacije reverzne transkriptaze. Promjenom konformacije, reverzna transkriptaza ne može ugraditi nukleozidne ili nukleotidne analoge, na kojima se bazira antivirusna terapija, u DNA virusa HBV i spriječiti njegovu daljnju virusnu replikaciju (Strasfeld i Chou 2010; Zheng i sur. 2012; Xu i sur. 2015). Mehanizmi koji dovode do rezistencije na antivirusne lijekove još nisu otkriveni, tako da su potrebna daljnja istraživanja (Delaney i sur. 2003; Lee i sur. 2014). Fung i sur. (2008) u svojoj studiji pronašli su visoku stopu mutacija u reverznoj transkriptazi, rtM204I/V u postotku od 12% i rtL180M u postotku od 10% koje su dovele do rezistencije na antivirusne lijekove kod osoba zaraženih virusom HBV genotipa D. Prema studiji Lee i sur. (2014), u Koreji su detektirane mutacije neovisno o genotipovima virusa HBV: rtM204I/V (50.2%), rtL180M (39.2%) i rtA181T/V (19.6%) te kompenzacijska mutacija rtL180M + rtM204I/V (49.3%) kod

ispitanika koji nisu liječeni od kroničnog hepatitisa B. Mutacije rtL180M i rtM204V bile su povezane s rezistencijom na lamivudin i osjetljivošću na telbivudin. U Brazilu, prema studiji Pacheco i sur. (2017) kod 6% ispitanika koji ranije nisu liječeni od kroničnog hepatitisa B detektirane su mutacije rtA181S, rtA194T, rtS202I, rtM204I, rtM204V te rtL180M + rtM204V. U 4 od 137 ispitanika genotipa A uočena je mutacija rtM204V koja uzrokuje rezistenciju na telbivudin, a zajedno s rtL180M dovodi do kompenzacijske mutacije koja povećava sposobnost replikacije virusa tako što uzrokuje rezistenciju na lamivudin i entekavir. Mutacije rtM204V i rtL180M bile su povezane i s mutacijama sI195M, sW196L i sG145R za izbjegavanje imunskog odgovora, odnosno nedjelotvornosti ranije primljenih cjepiva. Rezultati ovog istraživanja približni su rezultatima istraživanja Pacheco i sur. (2017). U ovom istraživanju mutacije rtM204V te rtL180M + rtM204V javile su se samo kod 2 od 6 ispitanika genotipa A (A2) te je rtM204V dovela do rezistencije na telbivudin, a rtL180M + rtM204V do rezistencije na lamivudin i djelomične rezistencije na entekavir. Popratne mutacije za izbjegavanje imunskog odgovora koje su se javile zajedno su sR122K i sT131N te uzrokuju onemogućavanje detekcije površinskog antigena virusa HBV standardiziranim testovima. Ovim istraživanjem potvrđeni su zaključci i studije Amarapurkar (2007) da mutacija rtM204V uzrokuje rezistenciju na telbivudin te dovodi do kompenzacijske mutacije zajedno s mutacijom rtL180M i uzrokuje rezistenciju na lamivudin i djelomičnu rezistenciju na entekavir. Također, Li i sur. (2005) te Wang i sur. (2016) uočili su kod rezistencije na lamivudin i povećan rizik od rezistencije na entekavir uzrokovan sinergističkim utjecajem rtM204V + rtL180M. U studiji Delaney i sur. (2003) mutacija rtV173L javila se kao treća kompenzacijska mutacija s rtL180M + rtM204V, što u ovom istraživanju nije uočeno, ali je moguće da se pojavi nakon izvjesnog vremena. Često osobe koje imaju virus HBV podgenotipa A2 sadrže mutaciju rtL217R koja dovodi do rezistencije na adefovir dipivoksil prema studiji Bottecchia i sur. (2008), što u ovom istraživanju nije uočeno, ali ne znači da se možda neće pojaviti s vremenom. Ispitanici ovog istraživanja imaju terapijsku opciju korištenja adefovir dipivoksila ili tenofovir disoproksil fumarata. Postoje istraživanja koja su dokazala da je moguće revertiranje mutacije odgovorne samo za rezistenciju na lamivudin nakon prestanka uzimanja terapije na određeno vremensko razdoblje. U najnovijoj studiji Zhang i sur. (2018) skupini ispitanika se nakon 36 mjeseci uzimanja terapije lamivudin razvila rezistencija na lijek. Nakon prestanka uzimanja lamivudina na izvjesno vrijeme, mutacija odgovorna za rezistenciju na lamivudin revertirala se u divlji tip, zasad nepoznatim mehanizmom, što se čini kao pozitivan budući ishod liječenja i za ispitanike ovog istraživanja.

Supstitucije aminokiselina u genu *S* mijenjaju konformaciju determinante „*a*”, glavne regije za indukciju zaštitnog humoralnog imunskog odgovora, površinskog antigena virusa HBV, tako da neutralizirajuća antitijela na površinski antigen virusa HBV više nisu u stanju prepoznati epitet virusa HBV i vezati se za njega, te spriječiti potencijalnu infekciju (Huang i sur. 2012; Romano i sur. 2014; Leong i sur. 2016). Kao i kod rezistencije na antivirusne lijekove, mehanizmi kojima se događaju mutacije u genu *S* još uvijek nisu otkriveni (Leong i sur. 2016). Colagrossi i sur. (2018) u svojoj velikoj studiji uočili su da se mutacije za izbjegavanje imunskog odgovora razvijaju kod velikog broja pacijenata u Europi. To predstavlja potencijalnu prijetnju od infekcije kod cijepljenih osoba ili osoba koje su podvrgnute imunoglobulinskoj terapiji jer antitijela stečena cijepljenjem ili unesena terapijom ne prepoznaju mutirane oblike površinskog antigena virusa hepatitisa B. Osim nedjelotvornosti ranije primljenih cjepiva i neučinkovitosti imunoglobulinske terapije, navedene mutacije mogu biti povezane i s nastankom rezistencije na antivirusne lijekove. U studiji su utvrdili učestalost 29 mutacija koje su povezane s izbjegavanjem imunskog odgovora u korelaciji s mutacijama rtM204V i rtL180M. Neke mutacije koje su uočene kao sQ101K, sP120S, sT131I, sD144E, detektirane su i u ovom istraživanju također u korelaciji s rtM204V i rtL180M. Zastupljenost mutacija za izbjegavanje imunskog odgovora bila je značajno veća kod ispitanika zaraženih virusom HBV genotipa D nego genotipa A, što je potvrđeno i u ovom istraživanju (Tablica 12.). Osim mutacija koje su detektirali Colagrossi i sur. (2018), u ovom istraživanju još su uočene mutacije sR122K, sM133I, sM133L. Prema studijama Ireland i sur. (2000) te Hossain i Ueda (2017) navedene mutacije istovremeno su za posljedicu trebale imati i pojavu supstitucije sY100S, što u ovom istraživanju nije uočeno. Mutacije koje dovode do izbjegavanja imunskog odgovora prijavljene su širom svijeta, na nukleotidnim pozicijama 120, 123, 124, 126, 127, 129, 130, 131, 133, 134, 141, 142, 144 i 146 unutar determinante „*a*” gena *S* (Perrazzo i sur. 2015). U jednoj studiji u južnoj Kini detektirane su mutacije sQ101H (2.3%), sT131N (11.4%) te sM133L (11.4%) slične prevalencije kao u ovom istraživanju (Liu i sur. 2018). Mutacije koje dovode do onemogućavanja detekcije površinskog antigena virusa HBV serološkim testovima, virus HBV onda je moguće detektirati molekularnim metodama.

Važno je poznavati genotipove i podgenotipove koji su zastupljeni u Republici Hrvatskoj zbog individualiziranog pristupa liječenja bolesnika s kroničnim hepatitisom B. Nadalje, bitno je prije samog liječenja ispitati postojanje mogućih mutacija koje bi dovele do rezistencije na antivirusnu terapiju te na taj način spriječiti terapijski neuspjeh i progresiju same bolesti. Nužno je detektirati mutacije koje uzrokuju izbjegavanje imunskog odgovora kako bi se na vrijeme

počelo s preventivnom i odgovarajućom terapijom. Od iznimne je važnosti uočiti jasne karakteristike supstitucija koje dovode do izbjegavanja imunosnog odgovora zbog poboljšanja dijagnostičkih testova, dizajniranja novih cjepiva te sprečavanja neuspjeha imunoglobulinske terapije.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Kod 30 analiziranih ispitanika s kroničnim hepatitisom B detektirana su dva genotipa virusa HBV. Genotip A detektiran je kod 20% ispitanika, a genotip D kod 80% ispitanika. Svi izolati genotipa A pripadali su podgenotipu A2, dok su izolati genotipa D pripadali podgenotipovima D1 (21%), D2 (37%) i D3 (42%).
2. Mutacije koje uzrokuju rezistenciju na antivirusne lijekove iz skupine inhibitora reverzne transkriptaze detektirane su isključivo kod ispitanika zaraženih virusom HBV genotipa A. Detektirane su ukupno dvije supstitucijske mutacije, rtM204V odgovorna za rezistenciju na telbivudin i kompenzacijska mutacija rtL180M + rtM204V odgovorna za rezistenciju na lamivudin i djelomičnu rezistenciju na entekavir.
3. Mutacije koje dovode do izbjegavanja imunosnog odgovara detektirane su kod 43% ispitanika genotipa A i 57% ispitanika genotipa D. Kod genotipa A radi se o dvije supstitucijske mutacije sR122K i sT131N, a povezuju se s onemogućavanjem detekcije HBsAg standardiziranim testovima. Kod genotipa D također se radi o šest supstitucijskih mutacija sQ101H, sP120S, sR122K, sM133I, sM133L i sD144E koje su povezane s onemogućavanjem detekcije HBsAg standardiziranim testovima, nedjelotvornošću ranije primljenih cjepiva i neučinkovitošću imunoglobulinske terapije.



## 7. LITERATURA

- Amarapurkar D. N. (2007): Telbivudine: A new treatment for chronic hepatitis B. *World Journal of Gastroenterology* **13**: 6150-6155.
- Baumert T. F., Meredith L., Ni Y., Felmlee D. J., Mckeating J. A., Urban S. (2014): Entry of hepatitis B and C viruses-recent progress and future impact. *Current Opinion in Virology* **4**: 58-65.
- Beck J., Nassal M. (2007): Hepatitis B virus replication. *World Journal of Gastroenterology* **13**: 48-64.
- Block T. M., Guo H., Guo J. T. (2007): Molecular virology hepatitis B virus for clinicians. *Clinical Liver Disease* **11**: 685-706.
- Block T. M., Alter H. J., London W. T., Bray M. (2016): A historical perspective on the discovery and elucidation of the hepatitis B virus. *Antiviral Research* **131**: 109-123.
- Blumberg B. S., Alter H. J., Visnich S. (1965): A "New" Antigen in Leukemia Sera. *The Journal of the American Medical Association* **252**: 252-257.
- Bottecchia M., Madejón A., Sheldon J., García-Samaniego J., Barreiro P., Soriano V. (2008): Hepatitis B virus genotype A2 harbours an L217R polymorphism which may account for a lower response to adefovir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **62**: 626-640.
- Caligiuri P., Cerruti R., Icardi G., Bruzzone B. (2016): Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection. *World Journal of Gastroenterology* **22**: 145-154.
- Cann A. J. (2012): *Principles of Molecular Virology*. University of Leicester, Leicester.
- Choi Y. M., Lee S. Y., Kim B. J. (2018): Naturally occurring hepatitis B virus reverse transcriptase mutations related to potential antiviral drug resistance and liver disease progression. *World Journal of Gastroenterology* **24**: 1708-1724.
- Chu C. J., Keeffe E. B., Han S. H., Perrillo R. P., Min A. D., Soldevila-Pico C., Carey W., Brown R. S. Jr, Luketic V. A., Terrault N., Lok A. S. (2003): Hepatitis B virus genotypes in the United States: Results of a nationwide study. *Gastroenterology* **125**: 444-451.

- Clark D. N., Hu J. (2015): Hepatitis B Virus Reverse Transcriptase – Target of Current Antiviral Therapy and Future Drug Development. *Antiviral Research* **123**: 132-137.
- Colagrossi L., Hermans L. E., Salpini R., Di Carlo D., Pas S. D., Alvarez M., Ben-Ari Z., Boland G., Bruzzone B., Coppola N., Seguin-Devaux C., Dyda T., Garcia F., Kaiser R., Köse S., Krarup H., Lazarevic I., Lunar M. M., Maylin S., Micheli V., Mor O., Paraschiv S., Paraskevis D., Poljak M., Puchhammer-Stöckl E., Simon F., Stanojevic M., Stene-Johansen K., Tihic N., Trimoulet P., Verheyen J., Vince A., Zidovec Lepej S., Weis N., Yalcinkaya T., Boucher C. A. B., Wensing A. M. J., Perno C. F., Svicher V. and on behalf of the HEPVIR working group of the European Society for translational antiviral research (ESAR). (2018): Immune-escape mutations and stopcodons in HBsAg develop in a large proportion of patients with chronic HBV infection exposed to anti-HBV drugs in Europe. *BMC Infectious Diseases* **18**: 251.
- Dane D. S., Cameron C. H., Briggs M. (1970): Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *The Lancet* **1**: 695-698.
- Delaney W. E., Yang H., Westland C. E., Das K., Arnold E., Gibbs C. S., Miller M. D., Xiong S. (2003): The Hepatitis B Virus Polymerase Mutation rtV173L Is Selected during Lamivudine Therapy and Enhances Viral Replication In Vitro. *Journal of Virology* **77**: 11833-11841.
- Deterding K., Constantinescu I., Nedelcu F. D., Gervain J., Nemeček V., Srtunecky O., Vince A., Grgurevic I., Bielawski K. P., Zalewska M., Bock T., Ambrozaitis A., Stanczak J., Takács M., Chulanov V., Ślusarczyk J., Dražd'áková M., Wiegand J., Cornberg M., Manns M. P., Wedemeyer H. (2008): Prevalence of HBV Genotypes in Central and Eastern Europe. *Journal of Medical Virology* **80**: 1707-1711.
- Dienstag J. L. (2008): Hepatitis B virus infection. *The New England Journal of Medicine* **359**: 1486-1500.
- Doo E. C., Ghany M. G. (2010): Hepatitis B virology for clinicians. *Clinical Liver Disease* **14**: 397-408.
- Ezzikouri S., Ozawa M., Kohara M., Elmdaghri N., Benjelloun S., Tsukiyama-Kohara K. (2014): Recent insights into hepatitis B virus-host interactions. *Journal of Medical Virology* **86**: 925-932.

- Fung S. K., Mazzulli T., El-Kashab M., Sherman M., Popovic V., Sablon E. (2008): Lamivudine-Resistant Mutation among Treatment-Naive Hepatitis B Patients Is Common and May Be Associated with Treatment Failure. *Hepatology* **48**: 703-703.
- Geno2Pheno: HBV Resistance. <https://hbv.geno2pheno.org/index.php> (pristupljeno: 21.03.2019.).
- Grimm D., Thimme R., Blum H. E. (2011): HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatology International* **5**: 644-653.
- Handel A., Regoes R. R., Antia R. (2006): The Role of Compensatory Mutations in the Emergence of Drug Resistance. *PLOS Computational Biology* **2**: 137.
- Hossain M. G., Ueda K. (2017): Investigation of a Novel Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Escape Mutant Affecting Immunogenicity. *PLoS ONE* **12**: 1-22.
- Hrvatska udruga za borbu protiv HIV-a i virusnog hepatitisa: Što je hepatitis B? <https://huhiv.hr/sto-je-hepatitis-b/> (pristupljeno: 20.01.2019.).
- Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Virusni hepatitisi. <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/virusni-hepatitisi/> (pristupljeno: 21.10.2018.).
- Huang C. H., Yuan Q., Chen P. J., Zhang Y. L., Chen C. R., Zheng Q. B., Yeh S. H., Yu H., Xue Y., Chen Y. X., Liu P. G., Ge S. X., Zhang J., Xia N. S. (2012): Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *Journal of Hepatology* **57**: 720-729.
- Inan N., Tabak F. (2015): Hepatitis B Virus: Biology and Life Cycle. *Viral Hepatitis Dergisi* **21**: 1-7.
- Ireland J. H., O'Donnell B., Basuni A. A., Kean J. D., Wallace L. A., Lau G. K., Carman W. (2000): Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays. *Hepatology* **31**: 1176-1182.
- Kaić B., Vilibić-Čavlek T., Kurečić Filipović S., Nemeth-Blažić T., Pem-Novosel I., Višekruna Vučina V., Šimunović A., Zajec M., Radić I., Pavlić J., Glamočanin M., Gjenero-Margan I. (2013): Epidemiologija virusnih hepatitisa. *Acta Medica Croatica* **67**: 273-279.

- Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević”: Virusni hepatitisi. [http://bfm.hr/page/odjel-za-virusologiju?fbclid=IwAR3A0iqHLiXfOk8S0Z9R2QHcj43e5cbZOSs95H\\_XgU\\_o3-ztC5jaiT5oB9A](http://bfm.hr/page/odjel-za-virusologiju?fbclid=IwAR3A0iqHLiXfOk8S0Z9R2QHcj43e5cbZOSs95H_XgU_o3-ztC5jaiT5oB9A) (pristupljeno: 21.03.2019.).
- Lazarevic I., Cupic M., Delic D., Svirtlih N. S., Simonovic J., Jovanovic T. (2007): Distribution of HBV genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes among chronically infected patients in Serbia. *Archives of Virology* **152**: 2017-2025.
- Lee A.-J., Lee C. H., Jeon C.-H. (2014): Analysis of Reverse Transcriptase Gene Mutations in the Hepatitis B Virus at a University Hospital in Korea. *Annals of Laboratory Medicine* **34**: 230-234.
- Leong J., Lin D., Nguyen M. H. (2016): Hepatitis B surface antigen escape mutations: Indications for initiation of antiviral therapy revisited. *World Journal of Clinical Cases* **4**: 71-75.
- Li M., Hou W., Wo J., Liu K. (2005): Character of HBV (hepatitis B virus) polymerase gene rtM204V/I and rtL180M mutation in patients with lamivudine resistance. *Journal of Zhejiang University SCIENCE* **6**: 664-667.
- Liang T. J. (2009): Hepatitis B: The Virus and Disease. *Hepatology* **49**: 13-21.
- Lin C. L., Kao J. H. (2015): Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **5**: 1-19.
- Liu K., Xie M., Lu X., Yu H., Wang H., Xu X., Yang Q., Lin Y., Ma Q. (2018): Mutations within the major hydrophilic region (MHR) of Hepatitis B virus from individuals with simultaneous HBsAg and anti-HBs in Guangzhou, Southern China. *Journal of Medical Virology* **90**: 1337-1342.
- Manoochehr M. (2016): Update on occult hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology* **22**: 8720-8734.
- McMahon B. J. (2009): The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatology International* **3**: 334-342.
- Miller R.H., Kaneko S., Chung C. T., Girones R., Purcell R. H. (1989): Compact Organization of the Hepatitis B Virus Genome. *Hepatology* **9**: 322-327.

- Min-Sun K., Yoon J. K. (2014): Occult hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology* **6**: 860-869.
- Ozaras R., Balkan I. I., Yemisen M., Tabak F. (2015): Epidemiology of HBV subgenotypes D. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* **39**: 28-37.
- Pacheco S. R., Dos Santos M. I. M. A., Stocker A., Zarife M. A. S., Schinoni M. I., Paraná R., Dos Reis M. G., Silva L. K. (2017): Genotyping of HBV and tracking of resistance mutations in treatment-naïve patients with chronic hepatitis B. *Infection and Drug Resistance* **10**: 201-207.
- Papathodoridis G. V., Chan H. L., Hansen B. E., Janssen H. L., Lampertico P. (2015): Risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: assessment and modification with current antiviral therapy. *Journal of Hepatology* **62**: 956-967.
- Perazzo P., Eguibar N., González R. H., Nusblat A. D., Cuestas M. L. (2015): Hepatitis B Virus (HBV) and S-Escape Mutants: From the Beginning until Now. *Journal of Human Virology and Retrovirology* **2**: 46-54.
- Revill P. A., Locarnini S. A. (2016): New perspectives on the hepatitis B virus life cycle in the human liver. *Journal of Clinical Investigation* **126**: 833-836.
- Rijckborst V., Janssen H. L. A. (2010): The Role of Interferon in Hepatitis B Therapy. *Current Hepatology Reports* **9**: 231-238.
- Romanò L., Paladini S., Galli C., Raimondo G., Pollicino T., Zanetti A. R. (2015): Hepatitis B vaccination. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* **11**: 53-57.
- Ruiz-Tachiquín M.-E., Valdez-Salazar H.-A., Juárez-Barreto V., Dehesa-Violante M., Torres J., Muñoz-Hernández O., Alvarez-Muñoz M.-T. (2007): Molecular analysis of hepatitis B virus "a" determinant in asymptomatic and symptomatic Mexican carriers. *Virology Journal* **4**: 6.
- Sayan M., Buğdaci M. S. (2013): HBV Vaccine Escape Mutations in a Chronic Hepatitis B Patient Treated with Nucleos(t)ide Analogues. *Mikrobiyoloji bülteni* **47**: 544-549.
- Schadlar S., Hildt E. (2009): HBV life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses* **1**: 185-209.

- Schaefer S. (2007): Hepatitis B virus genotypes in Europe. *Hepatology Research* **37**: 20-26.
- Sheldon J., Soriano V. (2008): Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**: 766-768.
- Shi W., Zhang Z., Ling C., Zheng W., Zhu C., Carr M. J., Higgins D. G. (2013): Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infection, Genetics and Evolution* **16**: 355-361.
- Song Z.-L., Cui Y.-J., Zheng W.-P., Teng D.-H., Zheng H. (2012): Diagnostic and therapeutic progress of multi-drug resistance with anti-HBV nucleos(t)ide analogues. *World Journal of Gastroenterology* **18**: 7149-7157.
- Strasfeld L., Chou S. (2010): Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. *Infectious Disease Clinics of North America* **24**: 809-833.
- Stuyver L., De Gendt S., Van Geyt C., Zoulim F., Fried M., Schinazi R. F., Rossau R. (2000): A new genotype of hepatitis B virus: Complete genome and phylogenetic relatedness. *Journal of General Virology* **81**: 67-74.
- Sunbul M. (2014): Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World Journal of Gastroenterology* **20**: 5427-5434.
- Urban S., Schulze A., Dandri M., Petersen J. (2010): The replication cycle of hepatitis B virus. *Journal of Hepatology* **52**: 282-284.
- Wang Y., Liu S., Chen Y., Zheng S., Zhou L., Lu F., Duan Z. (2016): Lamivudine-resistant rtL180M and rtM204I/V are persistently dominant during combination rescue therapy with entecavir and adefovir for hepatitis B. *Experimental and Therapeutic Medicine* **11**: 2293-2299.
- Watashi K., Urban S., Li W., Wakita T. (2014): NTCP and beyond: opening the door to unveil hepatitis B virus entry. *International Journal of Molecular Sciences* **15**: 2892-2905.
- Wieland S. F., Eustaquio A., Whitten-Bauer C., Boyd B., Chisari F. V. (2005): Interferon prevents formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids. *PNAS* **102**: 9913-9917.

- World Health Organization Europe: Data and statistics. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/hepatitis/data-and-statistics> (pristupljeno: 21.10.2018.).
- Xu J., Wu B., Wang J. H., Huang L., Wang D. Y., Zhao L., Zhao G., Wang Y. (2015): Pre-existing mutations in reverse transcriptase of hepatitis B virus in treatment-naive Chinese patients with chronic hepatitis B. *PLoS ONE* **10**: 1-12.
- Zanetti A. R., Tanzi E., Manzillo G., Maio G., Sbreglia C., Caporaso N., Thomas H., Zuckerman A. J. (1988): Hepatitis B variant in Europe. *The Lancet* **2**: 1132-1133.
- Zeinab Nabil A. S. (2011): An overview of occult hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology* **17**: 1927-1938.
- Zhang Q., Chen J., Pan M., Liu J., Liu T., Zhou Y.-H. (2018): Comparison of replication competence of wild-type and lamivudine-resistant hepatitis B virus isolates from a chronic hepatitis B patient. *Virus Research* **15**: 165-170.
- Zhang X., Hou J., Lu M. (2013): Regulation of hepatitis B virus replication by epigenetic mechanisms and microRNAs. *Frontiers in Genetics* **14**: 202.
- Zhang X., Lu W., Zheng Y., Wang W., Bai L., Chen L., Feng Y., Zhang Z., Yuan Z. (2016): In situ analysis of intrahepatic virological events in chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Clinical Investigation* **126**: 1079-1092.
- Zheng J., Zeng Z., Zhang D., Yu Y., Wang F., Pan C. Q. (2012): Prevalence and Significance of Hepatitis B Reverse Transcriptase Mutants in Different Disease Stages of Untreated Patients. *Liver International* **32**: 1535-1542.
- Zoulim F., Locarnini S. L. (2009): Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* **137**: 1593-1608.

## 8. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

**Ime i prezime:** Ivana Herceg

### OBRAZOVANJE

**rujan 2016. – travanj 2019.**      **Diplomski studij Molekularna biologija**  
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno matematički fakultet

**srpanj 2013. – rujan 2016.**      **Preddiplomski studij Biologija i ekologija mora**  
Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za studije mora

**rujan 2009. – lipanj 2013.**      **Jezična gimnazija**  
Gimnazija Metković

### OSPOSOBLJAVANJE

**27. travnja 2018.**      **International Symposium on Epigenetics in Head and Neck Cancer**  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb

**ožujak – lipanj 2017.**      **Laboratorijska stručna praksa**  
Laboratorij za molekularnu i staničnu biologiju  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb

### OSOBNJE VJEŠTINE

**Strani jezici:** engleski, njemački

**Digitalne vještine:** Microsoft Office, Internet, Web Design