

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JOŽICA BOLE

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JOŽICA BOLE

**GENOTIPIZACIJA VIRUSA HEPATITISA B PRI KRVODAJALCIH V
SLOVENIJI**

GENOTYPING OF HEPATITIS B VIRUS IN BLOOD DONORS IN SLOVENIA

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani, pod mentorstvomizr. prof. dr. Matjaža Jerasa in somentorstvom dr. Polone Klemenc.

ZAHVALA

Na prvem mestu bi se zahvalila somentorici dr. Poloni Klemenc za številne nasvete, vodenje in ideje pri izvedbi diplomskega dela ter mentorjuizr. prof. dr. Matjažu Jerasu za vse nasvete pri pisanju diplome.

Hvala prof. dr. Odonu Planinšku in doc. dr. Žigi Jakopinu za temeljit pregled diplome.

In nenazadnje, hvala družini, fantu in prijateljem za podporo, razumevanje in čudovito preživeta študentska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Matjaža Jerasa in somentorstvom dr. Polone Klemenc.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	v
ABSTRACT.....	vi
SEZNAM OKRAJŠAV	vii
1 UVOD	1
1.1 Virus hepatitisa B.....	1
1.1.1 Zgradba	1
1.1.2 Življenjski cikel.....	3
1.1.3 Patogeneza okužbe s HBV in klinična slika.....	4
1.1.4 Mikrobiološka diagnostika okužbe s HBV	5
1.1.5 Epidemiologija	6
1.1.6 Genotipi HBV	7
1.2 Genotipizacija virusa hepatitisa B.....	9
1.2.1 PCR v realnem času	10
2 NAMEN DELA	12
3 METODE	13
3.1 Odvzem in shranjevanje vzorcev	13
3.1.1 Vzorci krvodajalcev	13
3.1.2 Kontrolni vzorci	13
3.2 Izolacija virusne DNA.....	14
3.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času	15
3.4 Uvedba in optimizacija metode qPCR za genotipizacijo HBV	16
3.4.1 Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond pri multiplih reakcijah qPCR	18
3.4.2 Volumen virusne DNA.....	18
3.4.3 Komercialna reakcijska mešanica za qPCR	19
3.4.4 Ločitev multiplih reakcij qPCR.....	19
3.4.5 Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond v ločenih reakcijah qPCR	19
3.4.6 Uvedba multiplih reakcij qPCR: <i>As + Bps</i> in <i>Ac + Bs</i>	20

3.4.7 Volumen elucije pri izolaciji virusne DNA.....	20
3.5 Končna metoda za genotipizacijo HBV	21
3.6 Učinkovitost in občutljivost metode za genotipizacijo HBV	23
3.7 Genotipizacija vzorcev HBV	23
4 REZULTATI.....	24
4.1 Uvedba in optimizacija metode qPCR za genotipizacijo HBV	24
4.1.1 Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond v multiplih reakcijah qPCR.....	26
4.1.2 Volumen virusne DNA.....	26
4.1.3 Komercialna reakcijska mešanica za qPCR	26
4.1.4 Ločitev multiplih reakcij qPCR.....	27
4.1.5 Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond v ločenih reakcijah qPCR	27
4.1.6 Uvedba multiplih reakcij qPCR: <i>As</i> + <i>Bps</i> in <i>Ac</i> + <i>Bs</i>	27
4.1.7 Volumen elucije pri izolaciji DNA	28
4.2 Končna metoda za genotipizacijo HBV	29
4.3 Učinkovitost in občutljivost metode za genotipizacijo HBV	31
4.4 Genotipizacija vzorcev HBV	33
5 RAZPRAVA	35
5.1 Uvedba in optimizacija metode qPCR za genotipizacijo HBV	35
5.2 Genotipizacija HBV	38
6 SKLEP.....	44
7 LITERATURA.....	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Morfološke oblike virusa hepatitisa B	1
Slika 2: Genom HBV in bralni okvirji S, C, P, X	2
Slika 3: Shematski prikaz pomnoževanja HBV	3
Slika 4: Geografska porazdelitev posameznih genotipov HBV	8
Slika 5: Signal fluorescence pri reakciji PCR v realnem času	11
Slika 6: Izbrani termo program reakcije qPCR	16
Slika 7: Shema genoma virusa hepatitisa B in odsekov v genomu, ki jih posamezni sestavi za genotipizacijo HBV pomnožujejo	17
Slika 8: Multikomponentni grafi, ki prikazujejo intenziteto fluorescence v odvisnosti od časa pred optimizacijo metode qPCR.....	25
Slika 9: Multikomponentni grafi spreminjanja intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa v optimiziranih reakcijah qPCR A_c+B_s in A_s+B_{ps}	29
Slika 10: Multikomponentni grafi spreminjanja intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa v optimiziranih reakcijah qPCR D, E, G in H	30
Slika 11: Multikomponentni grafi spreminjanja intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa v optimiziranih reakcijah qPCR C_s in C_{ps}	31
Slika 12: Standardna umeritvena krivulja za reakcijo qPCR G	32
Slika 13: Amplifikacijski graf reakcije qPCR G.....	32

KAZALO TABEL

Tabela I: Kontrolni vzorci QCMD	14
Tabela II: Sistem multiplih reakcij qPCR, [40].....	17
Tabela III: Reakcijska mešanica za reakcijo qPCR, [40].....	18
Tabela IV: Kombinacije končnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond za multiple reakcije qPCR ob uporabi reakcijskega sestava TaqMan Universal MasterMix II.....	18
Tabela V: Kombinacije končnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond za multiple reakcije qPCR ob uporabi reakcijskega sestava TaqMan Fast Virus 1-Step MasterMix.....	19
Tabela VI: Kombinacije končnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond v ločenih reakcijah qPCR ob uporabi reakcijskega sestava TaqMan Universal MasterMix II.....	20

Tabela VII: Kombinacije končnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond v multiplih reakcijah qPCR <i>As + Bps in Ac + Bs</i> , ob uporabi reakcijskega kompleta TaqMan Universal MasterMix II	20
Tabela VIII: Sistem osmih reakcij qPCR za genotipizacijo HBV (končna metoda).....	21
Tabela IX: Reakcijska mešanica za reakcijo qPCR (končna metoda)	21
Tabela X: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond ter njihove končne koncentracije uporabljene v reakcijah qPCR.....	22
Tabela XI: Rezultati reakcij qPCR pred optimizacijo.....	24
Tabela XII: Končne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond v posameznih reakcijah qPCR	27
Tabela XIII: Končne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond v multiplih reakcijah <i>As+Bps in Ac+Bs</i>	28
Tabela XIV: Sistem reakcij qPCR za genotipizacijo HBV (končna metoda) z optimiziranimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov in sond.....	29
Tabela XV: Območja linearnosti in meje detekcije optimiziranih reakcij qPCR	33
Tabela XVI: Število in deleži okužb s posameznimi genotipi HBV pri slovenskih krvodajalcih ...	33

POVZETEK

Virus hepatitisa B povzroča akutni in/ali kronični hepatitis B. Kljub številnim ukrepom proti širjenju okužbe je z njim še vedno okužen precejšen del svetovne populacije. Vedno več raziskav kaže na določeno povezanost med posameznimi genotipi virusa hepatitisa B in kliničnim potekom bolezni ter odzivom na protivirusno zdravljenje. Do danes je bilo odkritih in potrjenih osem genotipov od A do H, ki so značilno geografsko porazdeljeni.

Namen naše raziskave je bil določiti deleže okužbe s posameznimi genotipi virusa hepatitisa B pri krvodajalcih v Sloveniji. Virusno DNA smo osamili iz arhiviranih vzorcev plazme krvodajalcev, ki so jih na Zavodu RS za transfuzijsko medicino zbrali med leti 2000 in 2012. Za določanje genotipov virusa hepatitisa B smo uvedli in optimizirali metodo, ki temelji na verižni reakciji s polimerazo v realnem času.

Rezultati genotipizacije so pokazali, da je z genotipom D okuženih 84 %, z genotipoma A in B pa 8 % oziroma 2 % krvodajalcev. Mešani okužbi D/A in A/C pa smo odkrili pri preostalih 6 % krvodajalcev. Naši izsledki se dobro ujemajo z geografsko lego Slovenije na prehodu med Sredozemljem in srednjo Evropo, kjer močno prevladuje okužba z genotipom D ob manjšem do zmernem deležu okužbe z genotipom A.

Ključne besede: virus hepatitisa B, genotipizacija, krvodajalci.

ABSTRACT

Hepatitis B virus can cause acute and/or chronic hepatitis B and in spite of numerous interventions still infects a considerable amount of world population. An association between hepatitis B virus genotypes and clinical outcome, as well as response to antiviral therapy is being reported repeatedly over the last decade. By now, eight genotypes from A to H with distinctive geographical distribution have been recognised.

In Slovenia, the distribution of hepatitis B virus genotypes in blood donor population has not been determined yet, therefore our goal was to perform the viral genotyping. Viral DNA was isolated from blood donor plasma samples that have been archived between years 2000 and 2012. A genotyping method has been developed and optimized, based on the TaqMan real-time PCR.

Results revealed that genotype D infects 84 % of the analysed blood donor population, while genotypes A and B account for 8 % and 2 % of infections, respectively. The remaining 6 % of blood donors were infected by mixed genotypes, i.e.: D/A and A/C. Our results correspond well to Slovenian geographical location being on the edge of Mediterranean and Middle Europe, where predominant infection with genotype D and only minor to moderate infection with genotype A is expected.

Key words: hepatitis B virus, genotyping, blood donors.

SEZNAM OKRAJŠAV

angl.	angleško
anti-HBc	protitelo proti HBcAg (angl. antibody to HBcAg)
anti-HBe	protitelo proti HBeAg (angl. antibody to HBeAg)
anti-HBs	protitelo proti HBsAg (angl. antibody to HBsAg)
cccDNA	kovalentno zaprta krožna DNA (angl. covalently closed circular DNA)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
DNaza	deoksiribonukleaza
FAM	6-karboksifluorescein
HBcAg	jedrni antigen HBV (angl. hepatitis B core antigen)
HBeAg	zunajcelična oblika jedrnega antigena HBV (angl. hepatitis B e antigen)
HBsAg	plaščni antigen HBV (angl. hepatitis B surface antigen)
HBV	virus hepatitisa B (angl. hepatitis B virus)
HBxAg	antigen HBV, ki ga kodira gen X (hepatitis B x antigen)
idr.	in drugi/e
IFN-α	interferon alfa
IgM	imunoglobulin M
mRNA	informacijska RNA (angl. messenger RNA)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
qPCR	PCR v realnem času (angl. real-time PCR)
RFLP	metoda polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
RNaza	ribonukleaza
ROX	6-karboksi-X-rodamin

1 UVOD

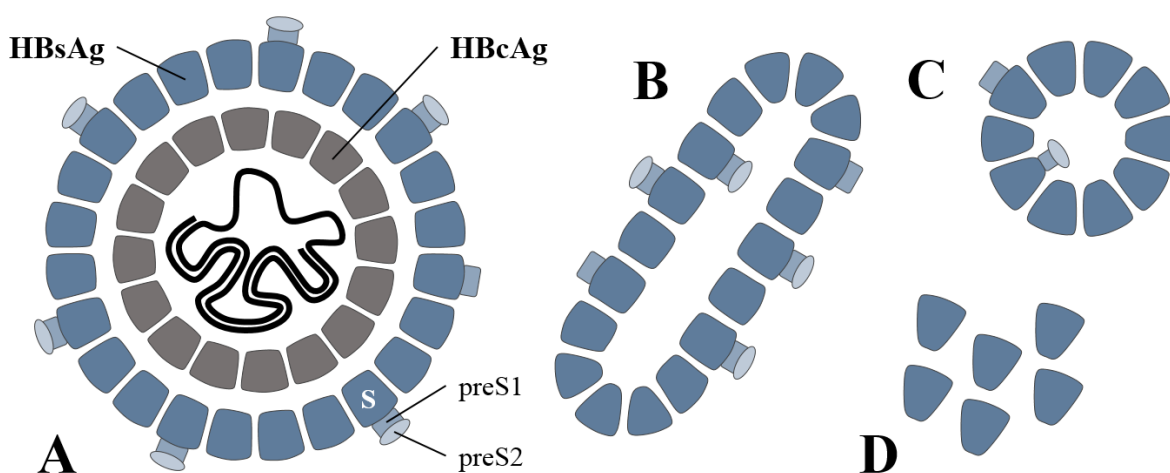
1.1 Virus hepatitisa B

Virus hepatitisa B (HBV) so prvič prepoznali leta 1965, danes pa v svetu velja za najbolj razširjen virus hepatitisa, ki ga taksonomsko uvrščamo v družino *Hepadnaviridae* in rod *Orthohepadnavirus*. Gre za majhen virus z deoksiribonukleinsko kislino (DNA) dolžine 3200 nukleotidov in nenavadnimi lastnostmi, ki spominjajo na retroviruse. Glede na razlike v epitopih antigenov, ki so prisotni na proteinih ovojnice, ločimo štiri glavne serotipe: adr, adw, ayr in ayw. Glede na podobnosti v nukleotidnem zaporedju virusa pa ločimo osem genotipov od A do H.

Okužba s HBV, ki je bila nekoč zelo pogosta, lahko pri človeku povzroči akutni ali kronični hepatitis. Po podatkih je na svetu še vedno več kot 240 milijonov kroničnih nosilcev, okrog 600.000 ljudi pa letno umre zaradi posledic akutne ali kronične bolezni. Zadnjih trideset let je na voljo varno in učinkovito cepivo, ki je izdatno prispevalo k zmanjšanju števila novih okužb s HBV. Velik problem pa še vedno predstavljajo ozdravitev kroničnih okužb, prepoznavna okultnih okužb, reaktivacija virusa in nepopolna zaščita po cepljenju [1–4].

1.1.1 Zgradba

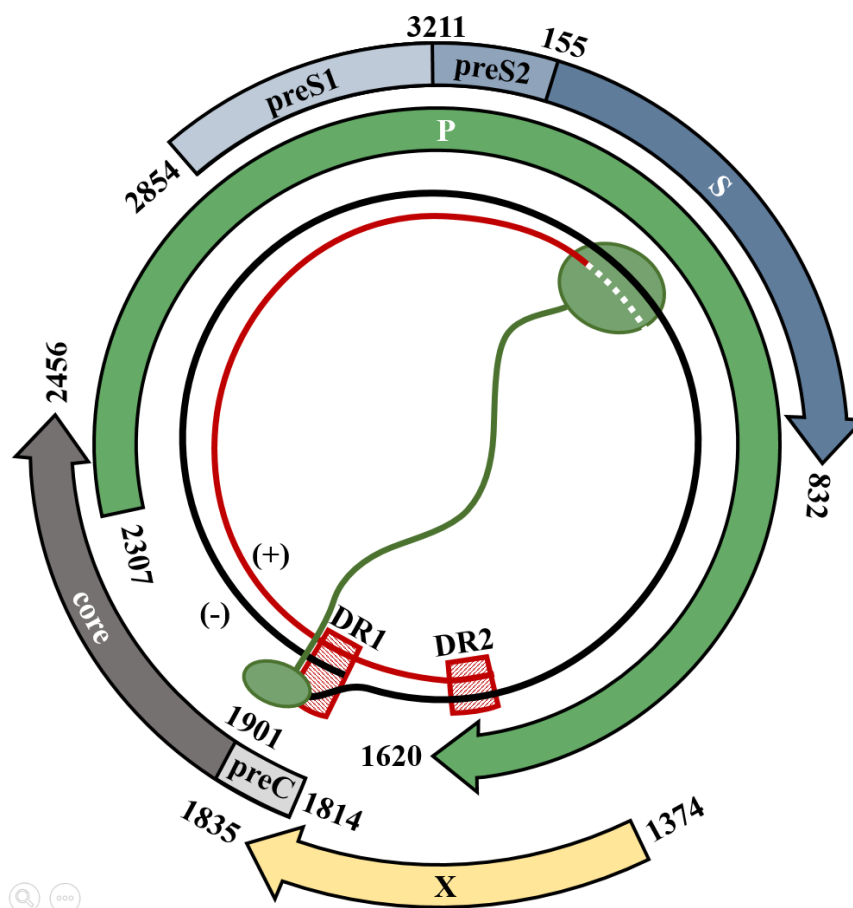
Z elektronskim mikroskopom lahko ločimo tri morfološke oblike delcev HBV (*Slika 1*).



Slika 1: Morfološke oblike virusa hepatitisa B. A – celotni virus, B – filamentozni delec, C – sferični delec in D – prosti proteini ovojnice, HBsAg. Povzeto po [3].

Dve od teh sta sestavljeni samo iz fosfolipidnega dvosloja in proteinov zunanje ovojnice (HBsAg). Ker ne vsebujeta nukleinske kisline, nista kužni. Pod mikroskopom ju vidimo kot manjše kroglaste strukture s premerom 20 nm in v obliki različno dolgih filamentov širine 22 nm. Za kužnost je odgovorna tretja oblika, nekoč poimenovana Danejevo telesce, ki je kroglaste oblike, s premerom 42 nm. V notranjosti ima virusno DNA in polimerazo, ki jo obdajata ikozaedrična nukleokapsida sestavljena iz jedrnega antigena (HBcAg) ter lipidna ovojnica s proteini ovojnice HBsAg. Celotnih virusov je v serumu bolnikov običajno tudi do 10.000 krat manj kot sferične in filamentozne oblike. Poleg omenjenih treh morfoloških oblik HBV lahko v serumu dokažemo tudi proste delce HBsAg [5].

Genom HBV je sestavljen iz delno dvovijačne, delno pa enovijačne krožne nukleinske kisline z okrog 3,2 kilobaznimi pari. Imenujemo jo sproščeno krožna DNA, vsebuje pa štiri prekrivajoče se bralne okvirje S, C, P in X (Slika 2).

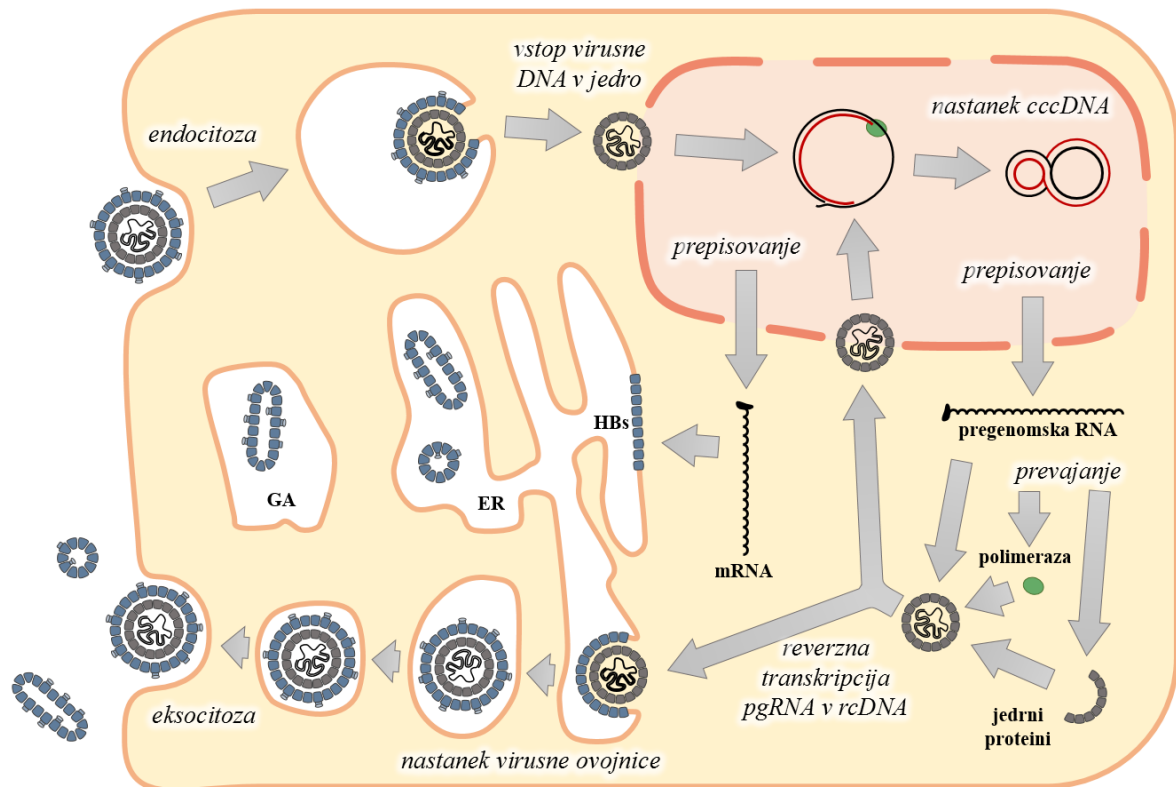


Slika 2: Genom HBV in bralni okvirji S, C, P, X v obliki kovalentno zaprte krožne DNA (genotip A, 3221 baznih parov). Povzeto po [3].

Področje S lahko strukturno in funkcionalno razdelimo na regije pre-S1, pre-S2 in S, ki kodirajo proteine ovojnice HBsAg. Področje C kodira protein nukleokapside HBcAg, ki ga najdemo le v jetrih, in njegovo topno različico HBeAg, ki se nahaja v serumu. Strukturno je področje C sestavljeno iz jedrne (angl. core) in nadjedrne (angl. precore) regije. Preostala bralna okvirja P in X pa kodirata polimerazo in proteine HBxAg [4].

1.1.2 Življenjski cikel

Življenjski cikel HBV (*Slika 3*) se prične z vezavo zrelih virionov na specifične receptorje človeških hepatocitov. Sledi vstop v celico z endocitozo in slačenje zunanje virusne ovojnice. Nukleokapsida nato potuje do jedrnih por, kjer virusna DNA preide v celično jedro. Celični dejavniki v jedru dopolnijo enovijačni del DNA tako, da iz sproščeno krožne DNA nastane stabilna dvovijačna DNA imenovana kovalentno zaprta krožna DNA (cccDNA). Ta se prepíše v subgenomske in pregenomske mRNA, ki nato potujejo v citoplazmo. Ta se prepíše v subgenomske in pregenomske mRNA, ki nato potujejo v citoplazmo.



Slika 3: Shematski prikaz pomnoževanja HBV. cccDNA – kovalentno zaprta krožna DNA; pgRNA – pregenomska RNA; rcDNA – sproščeno krožna DNA; HBs – proteini ovojnice; GA – Golgijev aparat; ER – endoplazmatski retikulum. Povzeto po [3].

Subgenomska mRNA se v endoplazmatskem retikulumu prevede v proteine, ki se sestavijo v HBsAg in izločijo skozi Golgijev aparat. Istočasno se pregenomska RNA v citosolu prevede v jedrne proteine HBcAg in DNA-polimerazo. Jedrni proteini se nato s pomočjo celičnih prenašalnih molekul (angl. chaperons) sestavijo v nukleokapsido, ki obda pregenomsko RNA in virusno DNA-polimerazo. Pregenomska RNA se v nukleokapsidi prepíše v genomsko DNA s pomočjo virusne polimeraze, ki ima sposobnost reverzne transkripcije. Tako nastali zreli jedrni delci se z brstenjem v lumen endoplazmatskega retikuluma obdajo z zunanjo ovojnico in izločijo iz celice ali pa potujejo nazaj k jedrnim poram, kjer se virusna DNA ponovno vrne v jedro in pretvori v cccDNA [3].

1.1.3 Patogeneza okužbe s HBV in klinična slika

Nekaj tednov po okužbi se virus hepatitisa B začne hitro pomnoževati, koncentracija njegove DNA pa doseže 10^{12} in več kopij/ml plazme. Posledično pride do izrazitega celičnega imunskega odziva gostitelja, ki ne zavira le razmnoževanja virusa, ampak povzroči tudi poškodbe hepatocitov.

Inkubacijska doba traja od 45 do 180 dni, nato pa sledi simptomatski ali asimptomatski akutni hepatitis. Pri bolnikih z izraženim akutnim hepatitisom B se sprva pojavijo prebavne težave in izpuščaji, sledijo utrujenost, povišana telesna temperatura, slabost in bruhanje, nato pa še zlatenica. Simptomi izginejo v pozni akutni fazi, ko se pojavijo nevtralizirajoča protitelesa proti antigenom HBV, ki preprečujejo okužbo novih celic in povzročajo dolgoletno klinično remisijo.

Če je koncentracija HBV DNA takoj po okužbi nizka, lahko imunski odziv pravočasno zaustavi virusno pomnoževanje, ko je prizadetih še relativno malo celic. Pri manj kot odstotku bolnikov pa se razvije fulminantni akutni hepatitis, ki povzroči obsežne poškodbe hepatocitov in v zelo kratkem času oslabi jetrno funkcijo.

Kljub »zazdravitvi« hujšega ali blažjega akutnega hepatitisa ostane nekaj virusnega genoma skritega v jetrih in sicer v obliki cccDNA. Koncentracije HBV DNA v serumu so v tem primeru pogosto tako nizke, da jih ne moremo zaznati. Preiskovanci so lahko hkrati seronegativni za vse označevalce okužbe s HBV ali pa imajo protitelesa proti HBcAg (anti-HBc) in/ali proti HBsAg (anti-HBs). Tak tip okužbe imenujemo okultna okužba s HBV, ki v večini primerov ne vpliva na bolnikovo življenje. Problematična je predvsem pri osebah z oslabljenim imunskim sistemom, saj lahko pri njih pride do reaktivacije

okužbe in posledično do hude oblike hepatitisa. Pri presaditvah jeter pa se lahko zgodi prenos bolezni iz darovalca na prejemnika.

Včasih pri akutnem hepatitisu imunski odziv ne uspe omejiti pomnoževanja HBV DNA, HBsAg pa se ne očisti iz telesa v šestih mesecih, temveč ostane prisoten v serumu daljši čas. V takem primeru lahko posumimo na kronično okužbo, ki je značilna predvsem za osebe, ki so se s HBV okužile bodisi od matere med porodom ali pa od družinskih članov v zgodnjem otroštvu. Pogosta je tudi pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom. Pri kronični okužbi prihaja sočasno do citotoksičnega celičnega imunskega odziva CD8⁺ limfocitov T in dolgotrajnega hitrega pomnoževanja DNA, kar vodi v vztrajajočo vnetno bolezen, progresivno fibrozo jeter in včasih tudi v jetrnocelični karcinom. Dejavniki, ki vplivajo na razvoj in posledice kroničnega hepatitisa B so genotip HBV, virusno breme, specifične virusne mutacije ter starost, spol in način življenja bolnikov [3–6].

1.1.4 Mikrobiološka diagnostika okužbe s HBV

Dokaz okužbe z virusom in postavitev diagnoze temeljita na pravilni interpretaciji kombinacije kliničnih znakov ter rezultatov mikrobioloških, biokemijskih in histoloških preiskav. V okviru mikrobiološke diagnostike izvajajo tako molekularno-biološke kot serološke preiskave. S hitrimi encimsko-immunskimi testi v serumih bolnikov določajo protitelesa anti-HBs, anti-HBe, imunoglobuline M anti-HBc (anti-HBc IgM) ter celokupna protitelesa anti-HBc in virusna proteina HBsAg in HBeAg. Poleg tega pogosto določajo tudi prisotnost in koncentracijo HBV DNA z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času in z metodo razvejane DNA.

Posamezni označevalci okužbe s HBV imajo značilen vzorec pojavljanja v serumu okužene osebe. Najprej lahko dokažemo HBV DNA, ki se v krvi pojavi 1–2 tedna po okužbi. Identifikacija HBV DNA v serumu omogoča diagnosticiranje hepatitisa v obdobju prvega diagnostičnega okna, še preden se pojavi HBsAg ter v obdobju drugega diagnostičnega okna, ko izgine HBsAg in še ne moremo zaznati protiteles anti-HBs. Virusna DNA je pomembna tudi pri opredelitvi okužb z mutiranimi različicami HBV, ki jih s standardnimi serološkimi testi ne moremo določiti. Kvantitativno določanje HBV DNA pa velja za nepogrešljivo orodje za oceno virusne aktivnosti in kužnosti bolnika. Večinoma ga uporabljamo za spremljanje učinkovitosti protivirusnega zdravljenja in

razreševanje nekaterih diagnostičnih problemov, v primerih, ko serološke raziskave ne zadostujejo.

Pojavu HBV DNA v krvi sledita proteina HBsAg in HBeAg. Prvega lahko včasih določimo že 1–2 tedna po okužbi, včasih pa šele po treh mesecih. Skupaj s HBV DNA je običajno v telesu zaznan le okrog šest mesecev oziroma do okrevanja od akutne bolezni, zato njegova dolgotrajnejša prisotnost v serumu pomeni kronično obolenost. HBeAg je topna oblika jedrnega proteina, ki se v krvi pojavi le nekaj dni za HBsAg. Povezan je s stopnjo virusnega pomnoževanja in s tem s kužnostjo bolnika. Višja koncentracija HBeAg torej pomeni hitrejše pomnoževanje HBV DNA in večjo kužnost bolnika. HBeAg pri večini bolnikov izgine iz krvi po nekaj tednih akutne bolezni. Izjema so tisti, pri katerih se akutna okužba razvije v kronično in je HBeAg prisoten v krvi daljši čas. Pri kroničnih bolnikih serokonverzija v protitelesa proti HBeAg (anti-HBe) običajno pomeni umiritev jetrnega vnetja in upočasnitev virusnega pomnoževanja.

Med protitelesi se najprej pojavijo anti-HBc tipa IgM, tem pa sledijo imunoglobulini G anti-HBc. Protitelesa anti-HBe lahko določimo kmalu po tem, ko iz krvi izgine HBeAg, to pa je pogosto na vrhuncu bolezni. Kot zadnja se že v fazi okrevanja pojavijo protitelesa anti-HBs, to pa se lahko zgodi tudi leta po tem, ko se telo očisti HBsAg. Pomembno je, da v serumu ostanejo prisotna daljši čas, saj gre za protitelesa, ki so odgovorna za imunost, medtem ko imunoglobulini anti-HBc in anti-HBe niso zaščitni. Pri 10–20 % bolnikov pa protiteles anti-HBs v serumu ne moremo zaznati. Ti imajo prisotne samo imunoglobuline anti-HBc kot znak prejšnje okužbe s HBV. Določitev protitelov anti-HBc je tako najbolj zanesljiva ocena stare okužbe s HBV, identifikacija in kvantifikacija imunoglobulinov anti-HBs pa najboljši način, s katerim ocenimo stopnjo imunosti in odziv na cepivo [3–5].

1.1.5 Epidemiologija

HBV je visoko endemičen v Aziji, na pacifiških otokih in v Afriki, kjer okužbe zajemajo 8–20 % prebivalstva. Večina okužb v Aziji poteka vertikalno pri otrocih, starih od nič do dve leti, medtem ko gre v Afriki in zahodnih državah običajno za horizontalen prenos. Čeprav se HBV prenaša zgolj s krvjo in telesnimi izločki, ki vsebujejo kri, ga je mogoče zaznati v skoraj vseh telesnih tekočinah.

V vzhodni Evropi označevalce okužbe zaznajo pri 2–7 %, v severni, srednji in zahodni Evropi pa pri < 1 % prebivalstva. V Sloveniji natančnega podatka o pogostosti okužbe v

splošni populaciji ne poznamo, je pa njena frekvenca prav tako ocenjena na manj kot odstotek prebivalstva. Letna pojavnost novih akutnih okužb je v zadnjih nekaj letih okrog ena na sto tisoč, pojavnost novih kroničnih okužb pa okrog dve na sto tisoč prebivalcev Slovenije [2, 6, 7].

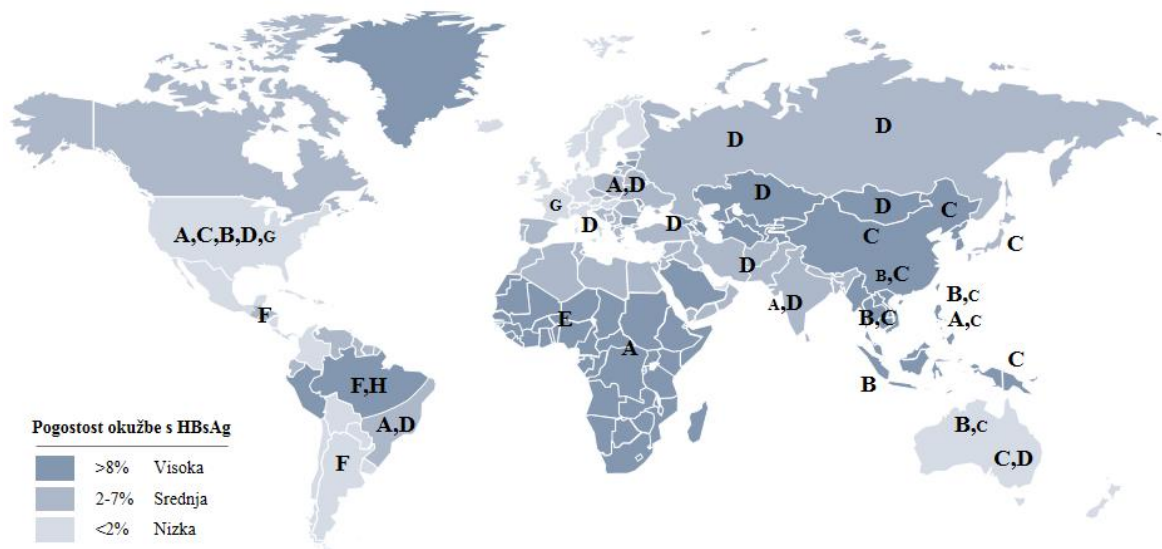
Okužbe s HBV se zaenkrat še ne da pozdraviti, zato je veliko truda vloženega v preprečevanje in omejitve širjenja okužbe. Poleg stroge higijene pri invazivnih medicinskih posegih in ustreznega življenjskega stila je cepljenje najučinkovitejše sredstvo za preprečevanje okužbe. Danes uporabljamo cepivo, ki vsebuje rekombinantni HBsAg. Cepljenje običajno poteka po shemi 0, 6, 12 mesecev, alternativno pa tudi v krajših razmakih. Cepimo se lahko v kateremkoli starostnem obdobju, vendar je učinkovitost cepljenja sorazmerna starosti osebe. Posledično je v nekaterih državah, vključno s Slovenijo, cepljenje otrok proti HBV del obveznega ali priporočenega nacionalnega programa. K preprečevanju hepatitisa B v Sloveniji uspešno pripomore tudi obvezno presejalno testiranje vseh krvodajalcev, nosečnic in partnerjev oseb, ki so pozitivne na HBsAg [5, 8].

1.1.6 Genotipi HBV

Edinstven način pomnoževanja HBV DNA vodi v zelo pogoste točkaste mutacije, delecije in insercije. Virusna reverzna transkriptaza namreč generira visoko frekvenco napak, ki jih ne popravlja, kar genomu HBV omogoča hiter razvoj. Posamezna mutacija pa lahko vpliva na različne gene, ker se bralni okvirji prekrivajo. Evolucija je tako pripeljala do današnjega obstoja različnih genotipov, subgenotipov, mutantov, rekombinantov in genetsko zelo sorodnih različic (angl. quasispecies) HBV.

Z analizo razlik v zaporedjih nukleotidov so zaenkrat določili osem genotipov (A–H), ki se med seboj razlikujejo v vsaj 8 % genoma. Ločimo pa tudi subgenotipe z razlikami v 4–8 % nukleotidnega zaporedja: A1–7, B1–9, C1–16, D1–9 in F1–4. Razvrščanje v subgenotipe je sicer še vedno predmet razprave, saj naj bi bili nekateri od teh samo rekombinantne različice drugih (sub)genotipov [6, 10].

Danes poznamo že precej natančno geografsko porazdelitev posameznih genotipov (*Slika 4*). Genotip D tako najdemo povsod po svetu, medtem ko so ostali bolj ali manj omejeni na posamezne kontinente.



Slika 4: Geografska porazdelitev posameznih genotipov HBV in pogostost okužbe s HBsAg. Povzeto po [3].

Genotip A močno prevladuje v severni in zahodni Evropi ter subsaharski in zahodni Afriki, genotipa B in C pa v azijsko-pacifiških regijah, pri čemer je razmerje med okuženimi z genotipom B in tistimi z genotipom C med državami različno. Genotip D je najpogostejši v Afriki, Evropi, Sredozemlju in Indiji, genotip E je omejen na zahodno Afriko, genotip F pa na srednjo in južno Ameriko. O okužbah z genotipom G so poročali v Franciji, Nemčiji in ZDA, z genotipom H pa v južni Ameriki. V zadnjem času naj bi izolirali še nepotrjena genotipa I v Vietnamu in Laosu ter J na Japonskem [12–18].

Vedno več študij kaže na pomen genotipov HBV pri razvoju bolezni in njenem zdravljenju. Ker pa več kot tri četrtine vseh bolnikov s hepatitisom B živi na območjih vzhodne Azije, je večina raziskav, informacij in znanja v povezavi s HBV zasnovana na genotipih B in C ter na primerjavah med bolniki iz Azije (genotipa B in C) ter tistimi iz Evrope in ZDA (genotipa A in D).

Študije bolnikov s kroničnim hepatitisom so pokazale, da okužbi z genotipoma C in F pogosteje kot pri ostalih genotipih vodita v hudo obolenje jeter in jetrnocelični karcinom. V podsaharski Afriki pa je subgenotip A1 HBV bolj povezan z nastankom jetrnoceličnega karcinoma kot ostali genotipi in subgenotipi. Genotip D povzroča hujše poškodbe jeter kot genotip A, prav tako pa naj bi bilo pri genotipu A daljše obdobje remisije in hitrejši očistek HBsAg pri akutni bolezni. Vendar pa v primeru genotipa A prihaja pogosteje do razvoja

kronične bolezni kot pri genotipu D. Za slednjega je tudi bolj kot za vse ostale genotipe značilno, da se razvije HBeAg-negativni kronični hepatitis, pri katerem ostane virusna in imunska aktivnost visoka kljub serokonverziji HBeAg, bolezen pa ima neugodno prognozo [20–26].

Trenutno se za zdravljenje kroničnega hepatitisa uporabljata dve vrsti terapije: interferon alfa (IFN- α) in njegova pegilirana različica ter nukleotidni in nukleozidni analogi lamivudin, telbivudin, entekavir, adefovir in tenofovir. Znano je, da genotip HBV vpliva na odziv na zdravljenje z IFN- α . Pri bolnikih okuženih z genotipoma A ali B so tako 6–12 mesecev po končani terapiji z interferonom ugotovili boljši odziv na zdravljenje glede na nižje vrednosti alanin aminotransferaze in ugodnejšo serokonverzijo HBeAg kot pri tistih okuženih z genotipoma C ali D. Tudi zadnje metaanalize potrjujejo, da se pacienti okuženi z genotipoma A in B v splošnem bolje odzivajo na terapijo z interferonom [26–28].

Zelo majhne pa so razlike v odzivu na terapijo z nukleozidnimi in nukleotidnimi analogi pri bolnikih okuženih z različnimi genotipi HBV. Izjema je le lamivudin, pri katerem naj bi obstajala povezava med zgodnjim razvojem rezistence in genotipom B. Večja pogostost mutacij v promotorskih regijah »core« in »precore« povezanih z rezistenco na lamivudin pa naj bi bila prisotna tudi pri genotipu A v primerjavi z genotipom D [29–31].

1.2 Genotipizacija virusa hepatitisa B

Danes obstajajo številne metode za genotipizacijo HBV, ki imajo različno občutljivost, specifičnost, stroške in čas izvajanja. Zlati standard ostaja sekvenciranje celotnega genoma, ki mu sledi filogenetska analiza. Gre za zelo zanesljivo in občutljivo metodo, ki ne omogoča samo prepoznave poznanih, ampak tudi identifikacijo novih in rekombinantnih genotipov. Slabosti sekvenciranja so višja cena v primerjavi z ostalimi metodami, težavna uporaba v študijah z velikim številom vzorcev in slabša učinkovitost pri prepoznavanju mešanih genotipov v serumu. Poleg sekvenciranja se zelo pogosto uporablja tudi metoda PCR v realnem času, ki omogoča sočasno določanje genotipa in koncentracije DNA. Zagotavlja tudi nizko navzkrižno kontaminacijo, kratek čas izvedbe, dobro občutljivost, avtomatizacijo in boljše prepoznavanje mešanih genotipov kot sekvenciranje. Ostale uporabljene metode so še multipla PCR, metoda določanja polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP), hibridizacijska metoda INNO-LiPA, določanje serotipov, mikromreže idr. [32, 33].

1.2.1 PCR v realnem času

Verižna reakcija s polimerazo ali PCR (angl. Polymerase Chain Reaction) v realnem času temelji na metodi, ki jo je v osemdesetih razvil Kary Mullis s sodelavci. Ta izkorišča sposobnost toplotno stabilne DNA-polimeraze, da pomnoži želena področja molekule DNA z uporabo para specifičnih začetnih oligonukleotidov in termično dobro regulirane reakcije, ki se zaporedoma ponovi v 30–40 ciklih [34].

PCR v realnem času (qPCR) so prvič predstavili Higuchi in sodelavci v začetku devetdesetih let. Sprotno spremljanje pomnoževanja DNA so dosegli z dodatkom etidijevega bromida, ki poveča fluorescenco ob vezavi na DNA, in izvedbo reakcije pod UV lučjo. S kombiniranjem znanj o fluorescenčni kemiji in snemanju reakcij v realnem času pa so razvili tehnologijo, ki je danes komercialno dobro razširjena. Sčasoma so se poleg etidijevega bromida pojavili novi načini označevanja reakcijskega produkta, ki se medsebojno precej razlikujejo v mehanizmu delovanja, vendar je vsem skupna sposobnost povezave pomnoževanja DNA s spremembo v fluorescenci. Med pogosto uporabljane spadata barvili SYBR Green I in II, hidrolizirajoče in hibridizacijske sonde ter molekularna svetila (angl. molecular beacons) idr. [35–37].

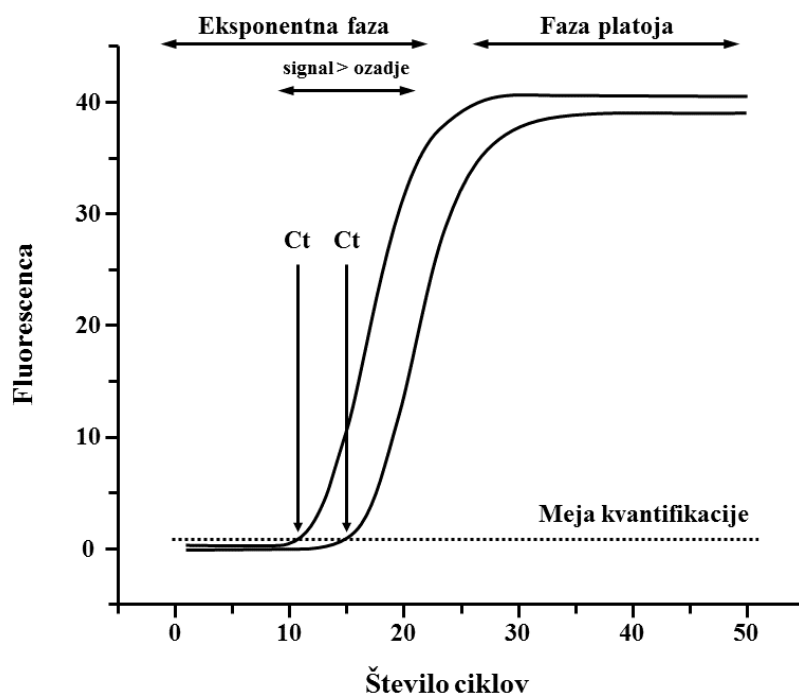
Metoda qPCR, pri kateri produkt DNA označujemo s hidrolizirajočimi sondami, tako kot klasična PCR, temelji na uporabi specifičnih začetnih oligonukleotidov. Poleg tega pa izkorišča edinstvene lastnosti sonde TaqMan in 5'–3' eksonukleazno aktivnost Taq-polimeraze. Sonda TaqMan je strukturno sestavljena iz kratkega oligonukleotida s specifičnim zaporedjem, ki je na obeh koncih označeno s fluorescenčnimi barvili. Barvilo na 3' koncu je poimenovano dušilec (angl. quencher), barvilo na 5' koncu pa reportersko barvilo (angl. reporter). Ker sta dušilec in reporter vezana na isti oligonukleotid in zato v medsebojni neposredni bližini, dušilec absorbira sproščeno svetlobo reporterske molekule. Tak princip prenosa energije z donorske na akceptorsko molekulo je poimenovan prenos fluorescenčne resonančne energije ali FRET (angl. Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Primer pogosto uporabljenega dušilca je tetrametilrodamin (TAMRA), v zadnjem času pa se uporabljajo tudi nefluorescenčni dušilci, na katere so pripete molekule MGB (angl. minor groove binder), ki stabilizirajo vezavo sonde na DNA in tako izboljšajo sekvenčno specifičnost. Kot reporterski fluorescenčni molekuli se pogosto uporabljata 6-

karboksifluorescein (FAM) in tetraklorofluorescein (TET), na voljo pa so še številne druge.

Na začetku reakcije se začetna oligonukleotida in sonda TaqMan prilegajo verigi tarčne DNA, Taq-polimeraza pa začne med vezanima začetnima oligonukleotidoma sintetizirati komplementarno verigo DNA v smeri 5'–3'. Ko doseže sondo, jo s svojo endonukleazno aktivnostjo hidrolizira, zaradi česar se dušilec in reportersko barvilo ločita. Dušilec zaradi povečanja razdalje ne absorbira več svetlobe reporterske molekule, zato lahko zaznamo povečevanje fluorescence med samim potekom reakcije.

Slika 5 prikazuje spreminjanje fluorescence s številom cikla reakcije qPCR. Kot lahko vidimo, je produkta v začetnih ciklih pomnoževanja malo, zato še ni mogoče ločiti signala fluorescence od ozadja. S povečevanjem števila pomnoženih odsekov DNA pa signal eksponentno raste. Pri popolni učinkovitosti reakcije bi zato v reakcijski zmesi morale po vsakem ciklu biti dvakrat več specifične DNA, v realnosti pa zmanjka reagentov in zato reakcija doseže plato. Končni rezultat, ki ga podamo s številom cikla ali Ct-jem (angl. threshold cycle), pri katerem zaznamo porast fluorescence v eksponentni fazi reakcije PCR, je sorazmeren količini nastalega produkta [37–39].



Slika 5: Signal fluorescence pri reakciji PCR v realnem času.

2 NAMEN DELA

Namen našega dela je uvesti metodo za genotipizacijo HBV in določiti porazdelitev genotipov HBV pri krvodajalcih v Sloveniji. Na področju Slovenije zaenkrat še nimamo podatkov o okužbi s posameznimi genotipi za krvodajalce ali za splošno populacijo, temveč je po neobjavljenih podatkih zaenkrat okvirno znana le porazdelitev genotipov HBV znotraj majhne populacije bolnikov s hepatitisom B.

Načrtovanje eksperimenta

Med leti 2000 in 2012 so na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino pri rutinskem testiranju krvi na patogene odkrili okužbo z HBV pri 54 krvodajalcih. Okužbe so potrdili s serološkimi (prisotnost HBsAg ter protiteles anti-HBc in anti-HBe ali HBeAg) in molekularno-biološkimi testi (HBV DNA).

Iz omenjenih arhiviranih vzorcev plazme bomo osamili HBV DNA s komercialnim sistemom za izolacijo virusne DNA. Na enak način bomo pripravili tudi kontrolne vzorce s poznanimi genotipi HBV, ki jih bomo uporabili za potrditev rezultatov genotipizacije.

Metodo za genotipizacijo bomo zasnovali na tehniki PCR v realnem času, ki jo poleg dobre občutljivosti in dostopnosti v laboratoriju, odlikuje tudi kratek čas izvedbe, nizka navzkrižna kontaminacija in dobro prepoznavanje mešanih genotipov. Uvedeno metodo qPCR bomo s pomočjo kontrolnih vzorcev optimizirali in ovrednotili.

V zadnjem koraku bomo z uvedeno in optimizirano metodo določili genotipe HBV DNA izolirane iz 54 vzorcev plazme krvodajalcev in določili porazdelitev okužbe s posameznimi virusnimi genotipi pri krvodajalcih v Sloveniji.

Hipoteza

Glede na pogostost pojavljanja posameznih genotipov HBV v sosednjih državah in pri bolnikih okuženih s HBV v Sloveniji sklepamo, da bo tudi v naših rezultatih prevladoval genotip D.

3 METODE

3.1 Odvzem in shranjevanje vzorcev

3.1.1 Vzorci krvodajalcev

Uporabili smo vzorce plazme krvodajalcev, ki so jim med leti 2000 in 2012 pri rutinskem testiranju na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani odkrili okužbo s HBV. Vzorce so vse do naše raziskave hranili zamrznjene pri temperaturi -80 °C.

Celokupno smo analizirali 54 vzorcev krvodajalcev s stalnim prebivališčem v Sloveniji (starost pri odvzetju: 18–59 let, moški/ženske: 40/14). Pri 37 krvodajalcih je bila navedena država rojstva Slovenija, pri enajstih Bosna in Hercegovina, pri dveh Makedonija, pri dveh Srbija, pri enem Češka in pri enem Moldavija.

Z rutinskimi trojnimi presejalnimi testi NAT (Nucleic Acid Testing, sistem Procleix Tigris) za HBV, HIV in HCV so v 52 vzorcih dokazali prisotnost virusne DNA, nato pa z razrešitvenimi testi NAT določili HBV DNA. En vzorec je bil pozitiven samo v presejalnem testu, en pa samo v razrešitvenem testu in sicer v eni od treh ponovitev. V vseh 54 vzorcih so zaznali serološke označevalce HBsAg in protitelesa anti-HBc, v 49 od teh so identificirali še anti-HBe, v petih pa HBeAg.

3.1.2 Kontrolni vzorci

Za uvedbo in optimizacijo metode qPCR za določanje genotipa HBV smo uporabili kontrolne vzorce iz programa EQA (angl. External Quality Assessment) naročene pri organizaciji QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics) iz Velike Britanije. Uporabili smo jih tudi kot pozitivne kontrole pri genotipizaciji HBV DNA iz vzorcev krvodajalcev. Gre za vzorce plazme in seruma, ki vsebujejo klinične izolate HBV, za katere so z več molekularno-biološkimi metodami določili genotipe HBV (A–E in H) in koncentracije prisotne virusne DNA. Kontrolni vzorec za genotip F v času naše analize pri QCMD ni bil na voljo.

Uporabili smo naslednje kontrolne panele pripravljene v letih 2007 (serum), 2011 (plazma) in 2013 (plazma):

- HBV QCMD 2007 Hepatitis B Virus Genotyping HBVG07 Proficiency Programme,

- EQA Programme 2011 Hepatitis B Virus Genotype HBVGT11,
- Hepatitis B Virus Genotype 2013 EQA Programme QAV064118 (HBVGT13).

Vzorci QCMD posameznih panelov, ki smo jih uporabili, so prikazani v *Tabeli I*. Med analizami smo jih hranili zamrznjene pri temperaturi -20 °C.

Tabela I: Kontrolni vzorci QCMD.

<i>GENOTIP</i>	<i>HBVG07</i>	<i>HBVGT11</i>	<i>HBVGT13</i>
A	QCMD 07-02	QCMD 11-05	QCMD 13-06
B		QCMD 11-04	QCMD 13-04
C	QCMD 07-03	QCMD 11-01	
D		QCMD 11-02 QCMD 11-06	QCMD 13-01
E	QCMD 07-01		
G	QCMD 07-08		
H		QCMD 11-08	QCMD 13-02

3.2 Izolacija virusne DNA

Reagenti in materiali

- Sestav za izolacijo EZ1 Virus Mini kit v2.0 (Qiagen, Nemčija).
- Naprava za izolacijo nukleinskih kislin BioRobot EZ1 (Qiagen, Nemčija).
- Vibracijski mešalnik Yellowline TTS2 (IKA, Nemčija).
- Centrifuga Minispin plus (Eppendorf, Nemčija).
- Pipete Eppendorf Research: 0,1–2,5 µl (Eppendorf, Nemčija).
- Pipete Eppendorf Reference: 2–20 µl, 10–100 µl in 100–1000 µl (Eppendorf, Nemčija).
- Nastavki za pipete ep.T.I.P.S. Eppendorf Dualfilter: 0,1–10 µl, 2–20 µl, 2–100 µl in 50–1000 µl (Eppendorf, Nemčija).

Vzorci krvodajalcev in kontrolne vzorce smo odmrznili na sobni temperaturi (20–25 °C), jih dobro premešali z vibracijskim mešalnikom Yellowline TTS2 in 10 sekund centrifugirali s centrifugo Minispin plus pri 14500 obratih/s. Po navodilih proizvajalca smo v mikropruvti pripravili raztopino »carrier« RNA ter jo skupaj s pripravljenimi vzorci in kartušami z reagenti iz sestava EZ1 Virus Mini Kit v2.0 vstavili v nosilce naprave za izolacijo nukleinskih kislin BIOROBOT EZ1. Protokol za izolacijo virusne DNA smo določili s pomočjo kartice EZ1 Virus Card v2.0.

Pri vzorcih, ki smo jih uporabili za optimizacijo naše metode, smo uporabili nastavitve elucije iz začetnih 400 μl plazme v končni volumen 150 μl oziroma iz 400 μl v 90 μl .

Vse vzorce, ki smo jih uporabili za genotipizacijo HBV, smo sprva eluirali iz 400 μl v 150 μl . Tiste, pri katerih je bil signal fluorescence po reakciji qPCR slab ali celo negativen, pa smo nato ponovno izolirali in sicer iz 400 μl v 90 μl in iz 400 μl v 60 μl .

3.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

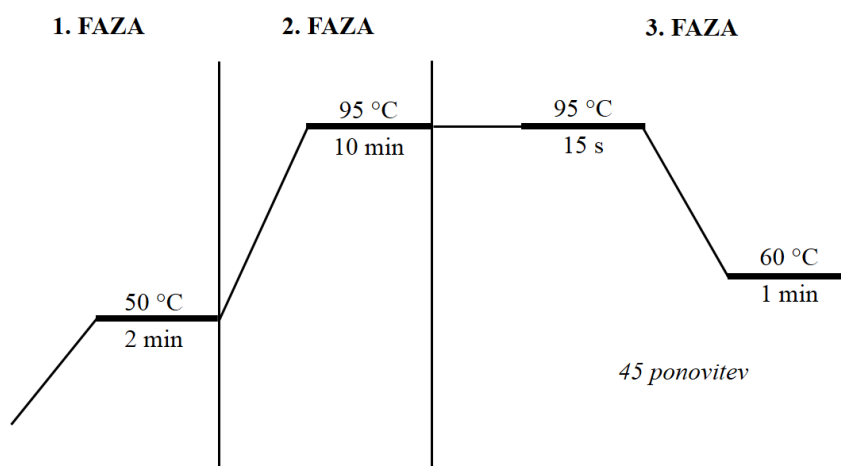
Reagenti in materiali

- Reakcijski sestav TaqMan Universal MasterMix II with UNG (Applied Biosystems, Velika Britanija).
- Reakcijski sestav TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems, Velika Britanija).
- Začetni oligonukleotidi; oligonukleotidna zaporedja v *Tabela X* (Applied Biosystems, Velika Britanija).
- Fluorescenčne sonde TaqMan: oligonukleotidna zaporedja v *Tabela X* (Applied Biosystems, Velika Britanija).
- Destilirana voda brez RNaze in DNaze (Gibco by Life technologies, ZDA).
- Naprava za qPCR ABI PRISM Sequence Detection System 7900HT (Applied biosystems, Velika Britanija).
- Zaščitna komora (BIOSAN, Latvija).
- Vibracijski mešalnik Lab dancer (IKA, Nemčija).
- Centrifuga H-6161 (Costar, Corning, ZDA).
- Centrifuga PLC-322 (Tehtnica Železniki, Slovenija).
- Mikrotitrna ploščica s 96 vdolbinicami Optical Reaction Plate (ABI PRISM, Applied Biosystems, ZDA).
- Mikrocentrifugirke: 1,7 ml (Costar, Corning, ZDA).
- Pipete Eppendorf Research: 10–100 μl in 100–1000 μl (Eppendorf, Nemčija).
Pipete Eppendorf Reference: 0,1–2,5 μl , 2–20 μl , 10–100 μl in 100–1000 μl (Eppendorf, Nemčija).
- Pipeta Eppendorf Research pro: 5–100 μl (Eppendorf, Nemčija).
- Nastavki za pipete ep.T.I.P.S. Eppendorf Dualfilter: 0,1–10 μl , 2–20 μl , 2–100 μl in 50–1000 μl (Eppendorf, Nemčija).

Reakcijske mešanice za qPCR smo pripravili tako, kot je za posamezne sklope raziskave opisano v naslednjih poglavjih. Do nanašanja na mikrotitrne ploščice smo jih shranili v temi. Začetne oligonukleotide in sonde smo do uporabe hranili pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, reakcijska sestava pa pri $0\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami, Optical Reaction Plate, smo najprej polnili z HBV DNA izolirano iz preiskovanih in kontrolnih vzorcev oziroma z vodo za PCR. V vdolbinice smo nato dodali pripravljeno reakcijsko mešanico za qPCR, tako da je bil celokupen reakcijski volumen $50\text{ }\mu\text{l}$. Napolnjeno ploščico smo prekrili z optično folijo, jo centrifugirali 1 min pri 2500 obratih/s in vstavili v napravo za PCR v realnem času ABI PRISM Sequence Detection System 7900HT.

Za spremljanje, pregled in obdelavo rezultatov reakcije smo uporabili programsko opremo SDS 2.1 proizvajalca Applied Biosystems. Izbrali smo program za reakcije qPCR z oznako absolutna kvantifikacija ter nastavili termo program, ki je predstavljen na *Sliki 6*.



Slika 6: Izbrani termo program reakcije qPCR.

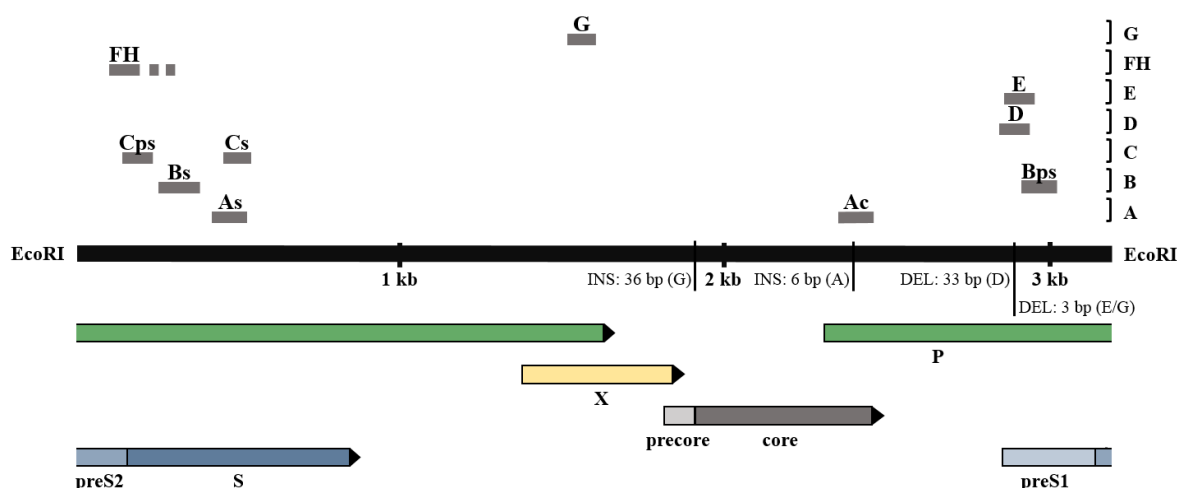
3.4 Uvedba in optimizacija metode qPCR za genotipizacijo HBV

Uvedbo metode za genotipizacijo HBV DNA smo zasnovali na članku Malmströma in sodelavcev [40]. V članku je opisana metoda qPCR, s katero lahko s štirimi multiplimi reakcijami določimo osem genotipov HBV (*Tabela II*). V vsaki od teh reakcij pride do razlikovanja posameznih genotipov HBV na podlagi bodisi specifičnih začetnih oligonukleotidov ali sond ali pa obeh.

Tabela II: Sistem multiplih reakcij qPCR, [40]. Sestavi za genotipizacijo so poimenovani tako, da prva črka označuje genotip, črke c, s in ps pa regije v genomu, na katere se začnejo prilegati istosmerni začetni oligonukleotidi. c – regija core; s – regija S; ps – regija pre-S; FAM – 6-karboksifluorescein; VIC in NED – fluorescenčni barvili, ki pripadata proizvajalcu Applied Biosystems.

<i>qPCR</i>	<i>As + Bps + Cps</i>			<i>E + G + FH</i>			<i>Ac + Bs</i>		<i>Cs + D</i>		<i>F</i>	<i>H</i>
<i>Sestav</i>	<i>As</i>	<i>Bps</i>	<i>Cps</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>FH</i>	<i>Ac</i>	<i>Bs</i>	<i>Cs</i>	<i>D</i>	<i>F</i>	<i>H</i>
<i>Barvilo sonde</i>	FAM	VIC	NED	VIC	FAM	NED	FAM	VIC	FAM	VIC	NED	NED

Odseke na genomu, ki jih pomnožujejo posamezni sestavi za genotipizacijo HBV, prikazuje *Slika 7*.



Slika 7: Shema genoma virusa hepatitisa B in odsekov v genomu, ki jih posamezni sestavi za genotipizacijo HBV pomnožujejo. Geni so prikazani v obliki horizontalnih puščic pod odebeljeno horizontalno črto, ki označuje celotni genom HBV. Z vertikalnimi črtami so označene insercije in delecije, značilne za posamezne genotipe. Krajše horizontalne črte nad genomom prikazujejo oligonukleotidna zaporedja v genomu, ki jih specifično pomnožujejo genotipizacijski sestavi. EcoRI – mesto cepitve z encimom EcoRI; INS – insercija; DEL – delecija.

Reakcijske mešanice za multiple reakcije smo sprva pripravili po protokolu iz omenjenega članka (*Tabela III*). Zaradi slabih končnih rezultatov smo morali reakcijsko mešanico optimizirati, ločiti multiple reakcije in spreminjati elucije virusne DNA pri izolaciji, pri čemer smo v vseh korakih obdržali enaka nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond.

Tabela III: Reakcijska mešanica za reakcijo qPCR, [40]. Sestava volumsko zadošča za analizo enega vzorca. Končni koncentraciji začetnih oligonukleotidov in sond sta v vseh sestavih po 200 nM.

<i>Sestava</i>	<i>Volumen</i>
HBV DNA	10 μ l
TaqMan Universal MasterMix II	25 μ l
začetni oligonukleotidi	1 μ l
sonde TaqMan	1 μ l
destilirana voda brez RNaze in DNaze	do 50 μ l
<i>Skupni volumen</i>	50 μl

3.4.1 Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond pri multiplih reakcijah qPCR

V prvi fazi optimizacije smo primerjali fluorescenčne signale posameznih reakcij qPCR pri uporabi različnih kombinacij končnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond. V mikrocentrifugirki smo pripravili reakcijske mešanice s po 25 μ l TaqMan Universal MasterMix II, 10 μ l HBV DNA izoliranih iz kontrolnih vzorcev in povečanimi končnimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov in sond ter različnimi razmerji med njimi (*Tabela IV*), nato pa jih dopolnili z destilirano vodo brez RNaze in DNaze do celokupnega volumna 50 μ l.

Tabela IV: Kombinacije končnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond za multiple reakcije qPCR ob uporabi reakcijskega sestava TaqMan Universal MasterMix II.

<i>qPCR</i>	<i>As + Bps + Cps</i>			<i>E + G + FH</i>			<i>Ac + Bs</i>		<i>Cs + D</i>		<i>F</i>	<i>H</i>
<i>Sestav</i>	<i>As</i>	<i>Bps</i>	<i>Cps</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>FH</i>	<i>Ac</i>	<i>Bs</i>	<i>Cs</i>	<i>D</i>	<i>F</i>	<i>H</i>
<i>Kombinacija začetni oligonukl./sonda (nM)</i>	200/200			200/200			200/200		200/200		200/200	200/200
	350/300			350/300			500/300		600/300		600/300	600/300
	400/200			400/200			600/200					

3.4.2 Volumen virusne DNA

Občutljivost metode smo poskusili izboljšati s povečanjem volumna virusne DNA v reakcijski mešanici in sicer iz 10 na 12,5 μ l. Povečanje količine HBV DNA se je izkazalo za dobro, zato smo ga uporabljali pri vseh naslednjih korakih.

3.4.3 Komercialna reakcijska mešanica za qPCR

Nadalje smo rezultate reakcije qPCR poskušali izboljšati z zamenjavo reakcijskega kompleta TaqMan Universal MasterMix II (2X) z reakcijskim kompletom TaqMan Fast Virus 1-Step MasterMix (1X), ki je v nasprotju s prvim izdelan posebej za določanje virusne DNA. Ponovno smo testirali različne kombinacije koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond. Reakcijske mešanice smo pripravili z 12,5 µl TaqMan Fast Virus 1-Step MasterMix, 12,5 µl HBV DNA in volumnom začetnih oligonukleotidov in sond, ki je ustrezal želeni koncentraciji za posamezno reakcijo qPCR (Tabela V) ter dopolnili z destilirano vodo brez RNaze in DNaze do skupnega volumna 50 µl. Reakcijo *E+G+FH* in dodatno reakcijo za razlikovanje genotipa F smo v tej fazi izločili.

Tabela V: Kombinacije končnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond za multiple reakcije qPCR ob uporabi reakcijskega sestava TaqMan Fast Virus 1-Step MasterMix.

<i>qPCR</i>	<i>As + Bps + Cps</i>			<i>Ac + Bs</i>		<i>Cs + D</i>		<i>H</i>
<i>Sestav</i>	<i>As</i>	<i>Bps</i>	<i>Cps</i>	<i>Ac</i>	<i>Bs</i>	<i>Cs</i>	<i>D</i>	<i>H</i>
<i>Kombinacija začetni oligonukleotidi/sonda (nM)</i>		200/200		200/200		200/200		200/200
		400/200		400/200		400/200		400/200
		600/200		600/200		600/200		600/200
		900/250		900/250		900/250		900/250

3.4.4 Ločitev multiplih reakcij qPCR

Vse multiple reakcije, *As+Bps+Cps*, *E+G+FH*, *Ac+Bs* in *Cs+D*, smo ločili na posamezne reakcije qPCR.

Ločitev multiplih reakcij nam je omogočila, da smo uvedli močnejše fluorescenčno barvilo FAM namesto VIC za sonde v sestavih *Bps*, *Bs* in *E* ter tudi namesto NED za sonde sestavov *Cps*, *Cs* in *H*.

3.4.5 Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond v ločenih reakcijah qPCR

Po ločitvi multiplih reakcij na enojne reakcije qPCR, smo v vseh sestavih (*As*, *Ac*, *Bs*, *Bps*, *Cs*, *Cps*, *D*, *E*, *G* in *H*) optimizirali razmerja med koncentracijami začetnih oligonukleotidov in sonde TaqMan (Tabela VI). Preostala reakcijska mešanica pa je vsebovala 25 µl reakcijskega sestava TaqMan Universal MasterMix II in 12,5 µl HBV

DNA, dopolnjenih z destilirano vodo brez RNaze in DNaze do celokupnega volumna 50 μ l.

Tabela VI: Kombinacije končnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond v ločenih reakcijah qPCR ob uporabi reakcijskega sestava TaqMan Universal MasterMix II.

<i>qPCR</i>	<i>As</i>	<i>Bps</i>	<i>Ac</i>	<i>Bs</i>	<i>Cs</i>	<i>Cps</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>H</i>
<i>Sestav</i>	<i>As</i>	<i>Bps</i>	<i>Ac</i>	<i>Bs</i>	<i>Cs</i>	<i>Cps</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>H</i>
<i>Kombinacija začetni oligonukleotid/sonda (nM)</i>	200/200									
	400/200									
	600/200									
	900/250									

3.4.6 Uvedba multiplih reakcij qPCR: *As + Bps* in *Ac + Bs*

V naslednjem koraku smo uvedli multipli reakciji *As+Bps* in *Ac+Bs* ter optimizirali razmerja uporabljenih koncentracij posameznih reagentov (*Tabela VII*). Reakcijsko mešanico smo pripravili iz 25 μ l TaqMan Universal MasterMix II in 12,5 μ l HBV DNA, dopolnjenih z destilirano vodo brez RNaze in DNaze do celokupnega volumna 50 μ l.

Tabela VII: Kombinacije končnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond v multiplih reakcijah qPCR *As + Bps* in *Ac + Bs*, ob uporabi reakcijskega kompleta TaqMan Universal MasterMix II.

<i>qPCR</i>	<i>As + Bps</i>		<i>Ac + Bs</i>	
<i>Sestav</i>	<i>As</i>	<i>Bps</i>	<i>Ac</i>	<i>Bs</i>
<i>Kombinacija začetni oligonukleotid/sonda (nM)</i>	400/200	200/200	400/200	200/200
	400/200	400/200	400/200	400/200
	400/200	600/200	400/200	600/200

3.4.7 Volumen elucije pri izolaciji virusne DNA

Že uvedeno in optimizirano metodo qPCR, ki je opisana v naslednjem poglavju, smo uporabili za primerjavo rezultatov, ki smo jih dobili s spreminjanjem elucijskega volumna pri izolaciji virusne DNA. Uporabili smo devet naključnih vzorcev krvodajalcev in primerjali izolacijo iz 400 μ l plazme v 150 μ l eluata, z izolacijo enakega volumna vzorca v 90 μ l.

3.5 Končna metoda za genotipizacijo HBV

Po zaključeni optimizaciji, smo postavili sistem osmih reakcij qPCR, ki nam omogočajo ločevanje sedmih genotipov: A, B, C, D, E, G in H (*Tabela VIII*).

Tabela VIII: Sistem osmih reakcij qPCR za genotipizacijo HBV (končna metoda).

<i>qPCR</i>	<i>Ac + Bs</i>		<i>As + Bps</i>		<i>Cs</i>	<i>Cps</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>H</i>
<i>Genotip</i>	A	B	A	B	C	C	D	E	G	H
<i>Sestav</i>	<i>Ac</i>	<i>Bs</i>	<i>As</i>	<i>Bps</i>	<i>Cs</i>	<i>Cps</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>H</i>
<i>Barvilo sonde</i>	FAM	VIC	FAM	VIC	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM

Splošno sestavo reakcijske mešanice smo prikazali v *Tabeli IX*.

Tabela IX: Reakcijska mešanica za reakcijo qPCR (končna metoda). Sestava volumsko zadošča za analizo enega vzorca.

<i>Sestava</i>	<i>Volumen</i>
HBV DNA (kontrolni vzorci)	12,5 µl
TaqMan Universal MasterMix II	25 µl
začetni oligonukleotidi	(Tabela X)
sonde TaqMan	(Tabela X)
destilirana voda brez RNaze in DNaze	do 50 µl
<i>Skupni volumen</i>	50 µl

Končne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond v reakcijski mešanici se med sestavi razlikujejo, zato smo jih prikazali posebej v *Tabeli X*, kjer smo navedli tudi oligonukleotidna zaporedja posameznih začetnih oligonukleotidov in sond.

Tabela X: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond ter njihove končne koncentracije uporabljene v reakcijah qPCR. Delno povzeto po [40].

<i>qPCR</i>	<i>Genotip</i>	<i>Ime oligonukleotida in oznaka barvila</i>	<i>Nukleotidno zaporedje (5'-3')</i>	<i>Končna konc. [nM]</i>
<i>Ac + Bs</i>	A	AcF	AAATGCCCTATCTTATCAACACTTC	400
		AcR	TGCGAGGCGAGGGAGTTCT	400
		Ac MGB (FAM)	CTCKGTYCGTCGTCTAA	200
	B	BsF	AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCA	400
		BsR	CCAGGACAAATTGGAGGACAAC	400
		Bs MGB (VIC)	CCAAATCTCCAGTCACTC	200
<i>As + Bps</i>	A	AsF	CATCTTCTTRTTGGTWCTTCTGGAT	400
		AsR	GCAKGGTCCCGRCTGGTT	400
		As MGB (FAM)	CTCTAATCCAGGATCMACA	200
	B	BpsF	GCATGGGGACAAATCTTTCTGTC	200
		BpsR	AATCTGGATTKTCTGAGTTGGCTTT	200
		Bps MGB (VIC)	CCCTGGGATTCTTC	200
<i>Cs</i>	C	CsF	GTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAC	400
		CsR	GGARTCGTGCAAGTCTTGCA	400
		Cs MGB (FAM)	CAGGAACATCAACTACCAGC	200
<i>Cps</i>	C	CpsF	TGCACCGAACATGGAGATCAC	200
		CpsR	TCTGTGGTATTGTGAGGATTCTTGTC	200
		Cps MGB (FAM)	ACCCCTGCTCGTGTTA	200
<i>D</i>	D	DF	CTCATTTTGTGGGTCACCATATTC	200
		DR	GGTCGGGAAAGAATCCCAGA	200
		D MGB (FAM)	CAGAATCTTTCCACCAGCA	200
<i>E</i>	E	EF	CCTCATTTTGTGGGTCACCWTATTC	900
		ER	CCATTTCGAGAGGGACCGTC	900
		E MGB (FAM)	AGCCCCATGATGTAGC	250
<i>G</i>	G	GF	GAAACCGCCATGAACACCTCT	400
		GR	CCGGTTGTTGACATAACAAACAGT	400
		G MGB (FAM)	TCTGCCAAGGCAGTTAT	200
<i>H</i>	H	FHF	CCGACTATTGCCTCTCTCACATCA	400
		HR	GGGGTCCTAGGAGTCCTGATGT	400
		FH MGB (FAM)	CCCTGCTATGAACATGGA	200

3.6 Učinkovitost in občutljivost metode za genotipizacijo HBV

Posameznim sestavom za genotipizacijo HBV smo za vrednotenje učinkovitosti metode qPCR določili standardne krivulje. Kontrolne vzorce QCMD z osnovno koncentracijo HBV DNA približno 10^4 IU HBV DNA/ml smo redčili z destilirano vodo brez DNaz in RNaz v razmerju 1:10 tako, da smo pridobili redčitve s koncentracijami 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 in 10^0 IU/ml. Reakcije qPCR smo izvedli v trojniku skladno s protokolom metode za genotipizacijo HBV.

Za oceno občutljivosti reakcij smo pripravili več redčitev kontrolnih vzorcev in sicer 100, 75, 50, 25, 10, 7.5, 5, 2.5 in 1 IU HBV DNA/ml. Vsako reakcijo qPCR smo vedno izvedli v trojniku.

3.7 Genotipizacija vzorcev HBV

Po končani optimizaciji metode za genotipizacijo HBV smo določili genotipe 54 vzorcev HBV DNA izolirane iz plazme krvodajalcev.

Na eni mikrotitrski ploščici smo v vsaki vrstici pripravili eno pozitivno kontrolo (kontrolni vzorci), eno negativno kontrolo (destilirana voda brez RNaze in DNaze) in deset vzorcev krvodajalcev.

4 REZULTATI

4.1 Uvedba in optimizacija metode qPCR za genotipizacijo HBV

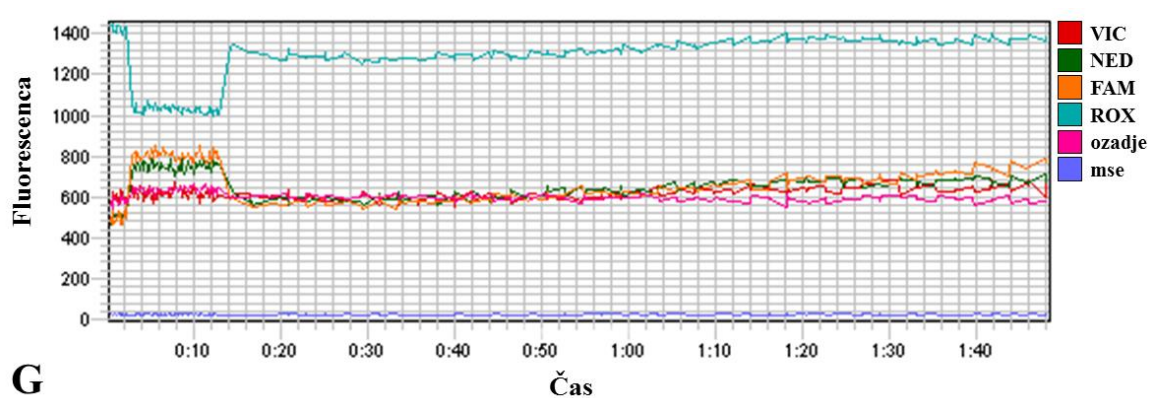
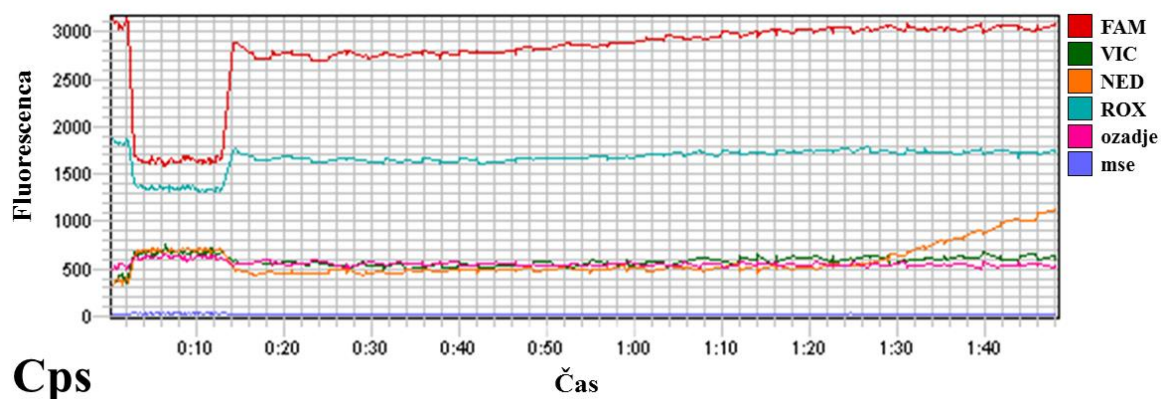
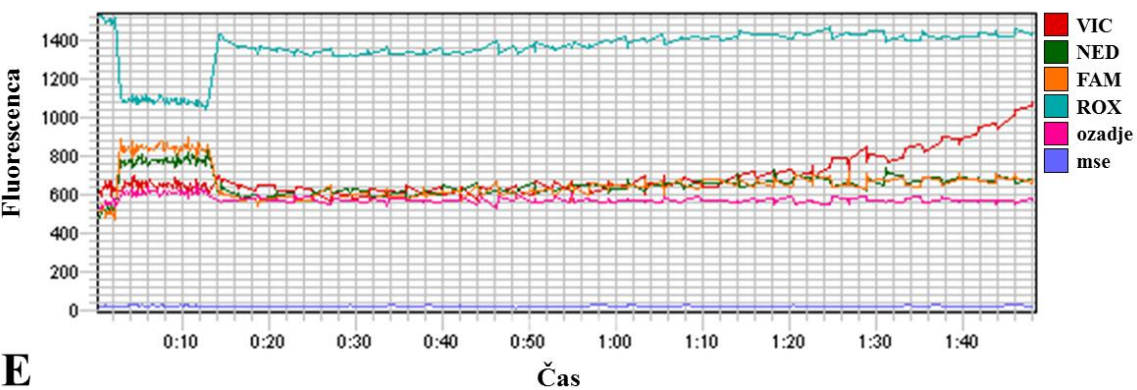
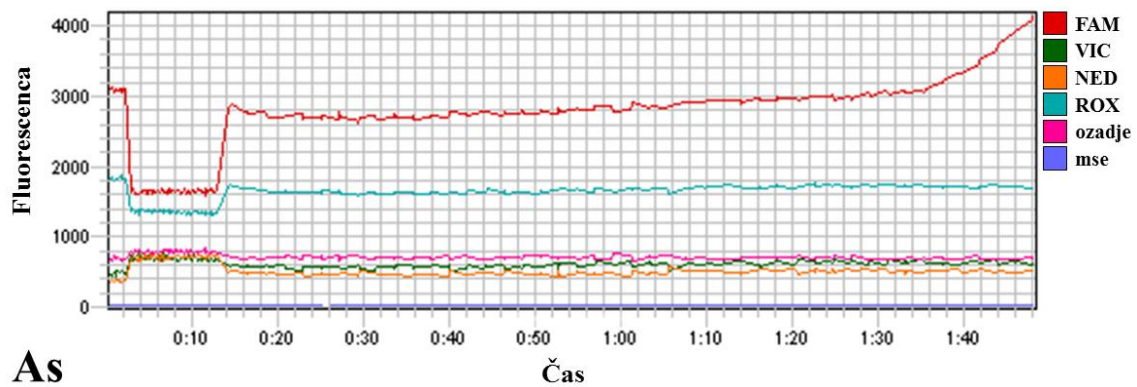
S kontrolnimi vzorci QCMD, ki vsebujejo poznane genotipe HBV in z vodo kot negativno kontrolo, smo skladno s člankom [40] izvedli PCR v realnem času z uporabo hidrolizirajočih sond TaqMan. Vse vzorce z genotipi A–E in H ter vodo kot negativno kontrolo smo testirali z vsemi štirimi reakcijami qPCR. Rezultati reakcij qPCR pred optimizacijo so prikazani v *Tabeli XI*.

Tabela XI: Rezultati reakcij qPCR pred optimizacijo. Reakcije z ustrežno krivuljo so označene z rumeno barvo, tiste z neustrezno krivuljo z modro, negativne pa niso obarvane.

<i>qPCR</i>	<i>As+Bps+Cps</i>			<i>E+G+FH</i>			<i>Ac+Bs</i>		<i>Cs+D</i>		<i>F</i>	<i>H</i>
<i>Sestav</i>	<i>As</i>	<i>Bps</i>	<i>Cps</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>FH</i>	<i>Ac</i>	<i>Bs</i>	<i>Cs</i>	<i>D</i>	<i>F</i>	<i>H</i>
<i>Signal qPCR</i>	+	+	/	/	/	/	+	+	+	+	/	+

Metodo smo vrednotili na podlagi grafičnega prikaza signalov posameznih reakcij, saj lahko le tako ugotavljamo njeno specifičnost, občutljivost in učinkovitost. Na multikomponentnem grafu, ki prikazuje stopnjo fluorescence v odvisnosti od časa, smo želeli krivulje čim bolj sigmoidne oblike. Končna fluorescenca vzorca je morala biti višja od krivulje pasivne reference (6-karboksi-X-rodamin ali ROX). Poleg oblike in višine krivulje smo spremljali tudi vrednosti Ct, ki označujejo število cikla, pri katerem zaznamo porast fluorescence v eksponentni fazi reakcije.

Pri multipli reakciji *As+Bps+Cps* smo dobili ustrežno krivuljo samo s sestavom za genotipizacijo *Bps*, v reakciji *Ac+Bs* samo pri *Ac* in v reakciji *Cs+D* samo pri *D*. V reakciji *E+G+FH* pa nismo zaznali pozitivnih signalov. Kljub temu je izmerjeni signal ustrezal našim zahtevam v dodatni reakciji dokazovanja genotipa H. V dodatni reakciji za določanje genotipa F po pričakovanju ni bilo pozitivnega signala, saj zanj nismo imeli na razpolago kontrolnega vzorca. *Slika 8* prikazuje multikomponentne grafe fluorescence v odvisnosti od časa, ki smo jih dobili pri uporabi sestavov za genotipizacijo *As*, *E*, *Cps* in *G*.



Slika 8: Multikomponentni grafi, ki prikazujejo intenziteto fluorescence v odvisnosti od časa pred optimizacijo metode qPCR. Sonda As je označena s FAM, E z VIC, Cps z NED in G z VIC. mse – srednja kvadratna napaka.

Vidimo, da se je fluorescenca samo v primeru *As* dvignila nad ROX, a je bila še vedno šibka. Pri *Cps* in *E* opazimo šibko dvigovanje krivulje, ki pa ne preseže ROX, pri *Cps* pa niti bazne linije fluorescence barvila FAM. V primeru *G* vidimo, da do povečanja fluorescence sploh ne pride.

V nobeni od reakcij qPCR ni bilo lažno pozitivnih rezultatov. Vse reakcije smo namreč izvedli s kontrolnimi vzorci z vsemi razpoložljivimi genotipi HBV DNA (z izjemo F). Izmerjeni signali so bili pozitivni le pri tistih reakcijah, ki dejansko določajo posamezni genotip.

Zaradi razmeroma slabih rezultatov genotipizacije, ki smo jih dobili po uporabi protokola opisanega v članku Malmströma [40], smo se odločili za korenito optimizacijo.

4.1.1 Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond v multiplih reakcijah qPCR

V prvi fazi optimizacije smo želeli primerjati signale posameznih reakcij po uporabi različnih kombinacij preiskovanih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond. Osnovno kombinacijo končne koncentracije začetnega oligonukleotida in sonde 200/200 nM iz članka [40] smo primerjali z različnimi kombinacijami, v katerih smo povečali koncentraciji obeh.

Izkazalo se je, da signalov v nobenem primeru nismo izboljšali s povečanjem koncentracije sonde na 300 nM. Pri reakciji *E+G+FH* namreč še vedno nismo zaznali pozitivnih signalov. V primerih *As* in *Bps* se je razmerje 400/200 izkazalo kot najboljše, signali ostalih reakcij pa so bili z vsemi uporabljenimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov in sond slabši ali enaki kot pri osnovni kombinaciji (200/200).

4.1.2 Volumen virusne DNA

Občutljivost metode smo skušali izboljšati tudi s povečanjem volumna virusne DNA v reakcijski mešanici in sicer iz 10 μ l na 12,5 μ l. Pri vseh reakcijah qPCR se je oblika krivulj na grafu izboljšala, vrednosti Ct pa so bile nižje.

4.1.3 Komerencialna reakcijska mešanica za qPCR

V naslednjem koraku optimizacije smo zamenjali komercialni sestav TaqMan Universal MasterMix II, ki je dvakrat koncentriran, s sestavom TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix, ki je štirikrat koncentriran in izdelan posebej za določanje virusne DNA. Pri testiranju

novega komercialnega kompleta smo uporabili tudi različne kombinacije začetnih oligonukleotidov in sond ter povečan volumen virusne DNA.

Signali reakcij so bili večinoma primerljivi s tistimi, ki smo jih dobili pri uporabi starega komercialnega sestava za qPCR. Pri kompletih za genotipizacijo *Bps*, *Cs* in *D* pa so bile krivulje celo slabše. Pri vseh reakcijah so se znižale vrednosti Ct.

4.1.4 Ločitev multiplih reakcij qPCR

Vse multiple reakcije qPCR smo nato ločili na posamezne in pri sondah *Bps*, *Bs*, *Cps*, *Cs*, *E* in *FH* zamenjali fluorescenčni barvili NED in VIC s FAM.

Z genotipizacijskima sestavoma *E* in *G* smo nato prvič dobili pozitivna signala, ki sta imela tudi primerno obliko. Signali so se precej izboljšali tudi pri *Cps*, *Cs*, *D* in *H*, le nekoliko pa pri *As*, *Ac*, *Bps* in *Bs*.

4.1.5 Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond v ločenih reakcijah qPCR

Po ločitvi multiplih reakcij qPCR in menjavi sond smo v vseh genotipizacijskih sestavih (*As*, *Ac*, *Bs*, *Bps*, *Cs*, *Cps*, *D*, *E*, *G* in *H*) optimizirali razmerja med koncentracijami začetnih oligonukleotidov in sond. V *Tabeli XII* smo označili kombinacije končnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond v reakcijski mešanici qPCR, s katerimi smo dobili krivulje primerne za določanje genotipov.

Tabela XII: Končne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond v posameznih reakcijah qPCR.

Optimalne kombinacije koncentracij so označene z rumeno barvo.

<i>qPCR</i>	<i>As</i>	<i>Bps</i>	<i>Ac</i>	<i>Bs</i>	<i>Cs</i>	<i>Cps</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>H</i>
Kombinacija začetni oligonukl./sonda (nM)	200/200	200/200	200/200	200/200	200/200	200/200	200/200	200/200	200/200	200/200
	400/200	400/200	400/200	400/200	400/200	400/200	400/200	400/200	400/200	400/200
	600/200	600/200	600/200	600/200	600/200	600/200	600/200	600/200	600/200	600/200
	900/250	900/250	900/250	900/250	900/250	900/250	900/250	900/250	900/250	900/250

4.1.6 Uvedba multiplih reakcij qPCR: *As* + *Bps* in *Ac* + *Bs*

Pri primerjavi rezultatov ločenih reakcij *As*, *Bps*, *Ac* in *Bs* z multiplima reakcijama *As+Bps* in *Ac+Bs* smo opazili, da ločene ne generirajo bistveno boljše krivulje. Zato smo v sistem reakcij za genotipizacijo uvedli multipli reakciji *As+Bps* in *Ac+Bs*, v katerih smo uporabili prvotne sonde in zato barvilo FAM za *As* in *Ac* ter VIC za *Bs* in *Bps*.

V naslednjem koraku smo optimizirali razmerja koncentracij posameznih začetnih oligonukleotidov in sond v multiplih reakcijah $As+Bps$ in $Ac+Bs$. Njihove optimalne končne koncentracije so navedene v *Tabeli XIII*. V sestavih za genotipizacijo As in Ac smo najboljšo kombinacijo koncentracij določili že prej, ker sonde nismo spreminjali. Zato smo spremenili samo še razmerja oligonukleotidnih začetnikov in sond v sestavih Bs in Bps .

Tabela XIII: Končne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond v multiplih reakcijah $As+Bps$ in $Ac+Bs$. Optimalne kombinacije koncentracij so označene z rumeno barvo.

<i>qPCR</i>	<i>As + Bps</i>		<i>Ac + Bs</i>	
<i>Komplet</i>	<i>As</i>	<i>Bps</i>	<i>Ac</i>	<i>Bs</i>
<i>Začetni oligonukleotid/sonda (nM)</i>	400/200	200/200	400/200	200/200
	400/200	400/200	400/200	400/200
	400/200	600/200	400/200	600/200

4.1.7 Volumen elucije pri izolaciji DNA

Po zaključeni optimizaciji reakcij qPCR smo primerjali rezultate, ki smo jih dobili s spreminjanjem volumna elucije pri izolaciji virusne DNA iz devetih naključno izbranih vzorcev plazme krvodajalcev.

Pri sedmih vzorcih z elucijskim volumnom 90 μ l je bil Ct za 1–2 cikla nižji, fluorescenca pa nekoliko višja kot pri tistih z elucijo v 150 μ l. Preostala dva vzorca sta bila negativna pri vseh reakcijah qPCR.

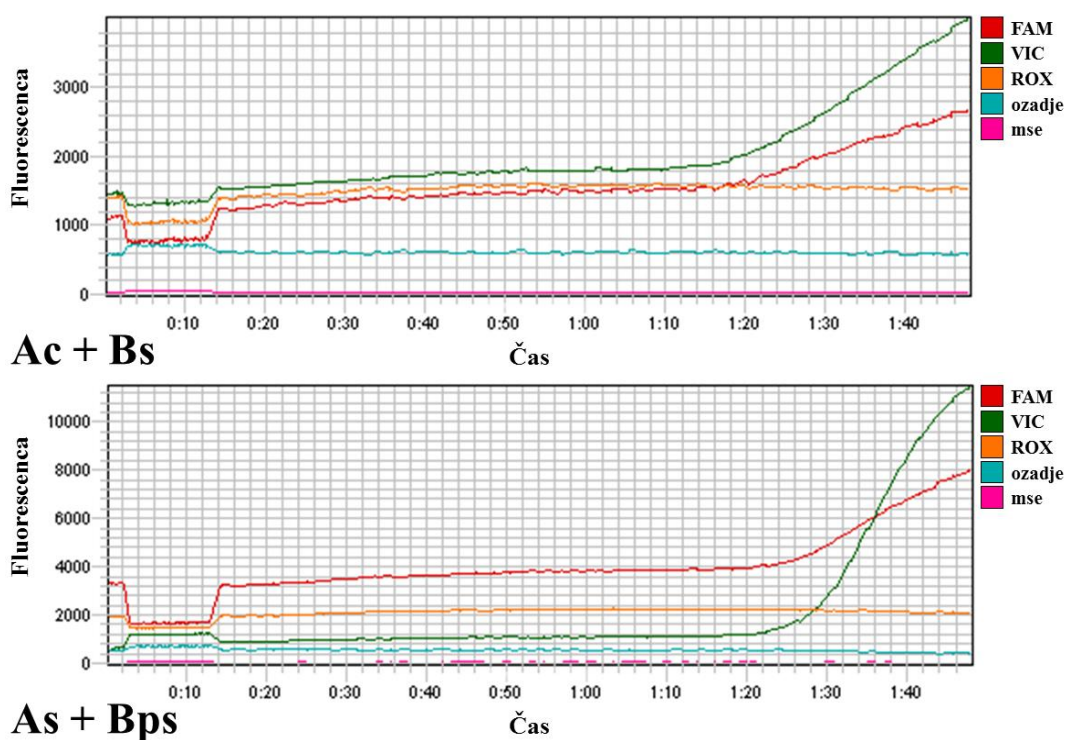
4.2 Končna metoda za genotipizacijo HBV

Po zaključeni optimizaciji smo postavili sistem osmih reakcij qPCR, ki so specifične za genotipe A, B, C, D, E, G in H. Prikazan je v *Tabeli XV*, vključno s končnimi koncentracijami posameznih začetnih oligonukleotidov in sond.

Tabela XIV: Sistem reakcij qPCR za genotipizacijo HBV (končna metoda) z optimiziranimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov in sond.

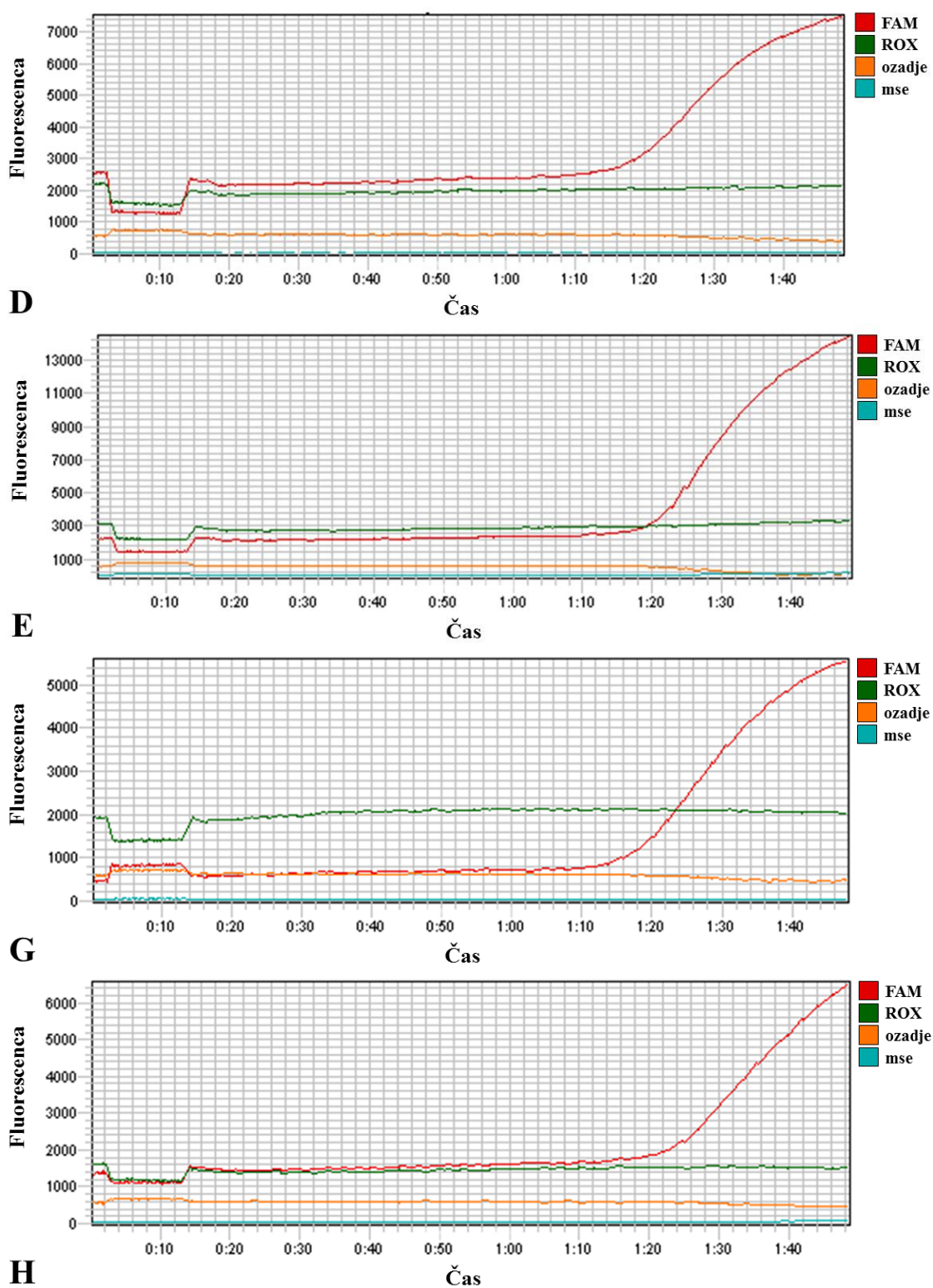
qPCR	Ac+B _s		As+B _{ps}		C _s	C _{ps}	D	E	G	H
Sestav	Ac	B _s	As	B _{ps}	C _s	C _{ps}	D	E	G	H
Barvilo sonde	FAM	VIC	FAM	VIC	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM
Začetni oligonukl./sonda (nM)	400/200	400/200	400/200	200/200	400/200	200/200	200/200	900/250	400/200	400/200

Multikomponentna grafa, ki prikazujeta intenziteto fluorescence v odvisnosti od časa za optimizirani multipli reakciji qPCR *Ac+B_s* in *As+B_{ps}*, sta prikazana na *Sliki 9*.

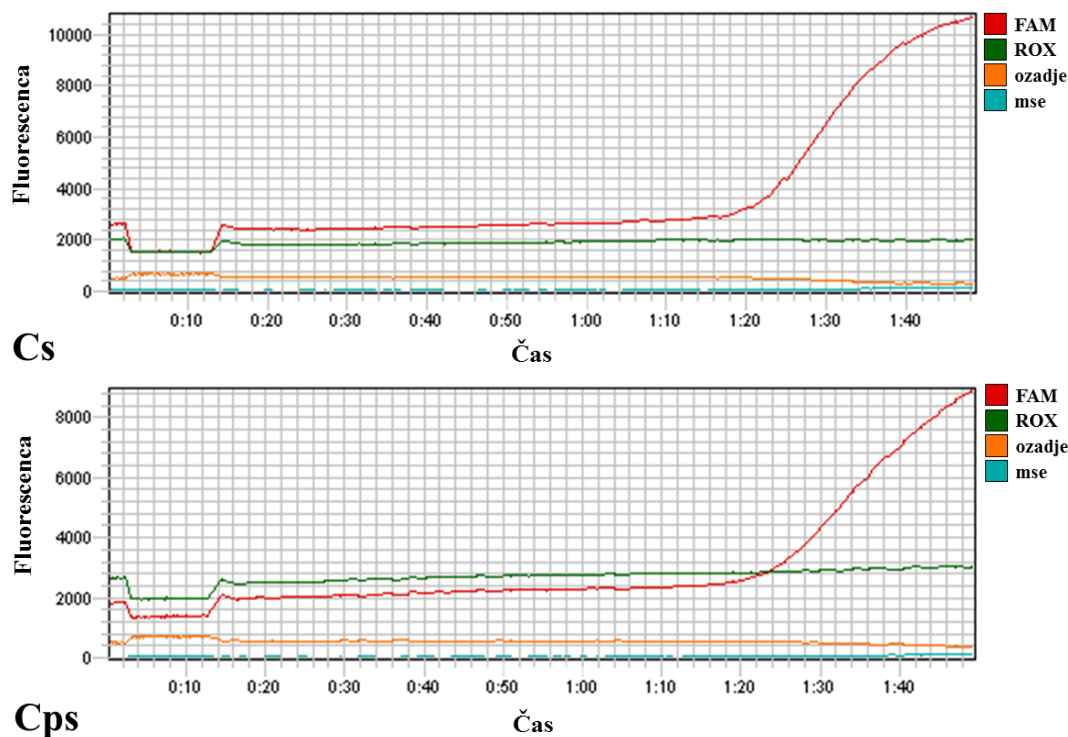


Slika 9: Multikomponentni grafi spreminjanja intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa v optimiziranih reakcijah qPCR *Ac+B_s* in *As+B_{ps}*. Sonde Ac in As sta označeni s FAM, B_s in B_{ps} pa z VIC.

Grafe spreminjanja intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa za ločene reakcije qPCR *D*, *E*, *G*, *H* predstavlja Slika 10, za *Cs* in *Cps* pa Slika 11.



Slika 10: Multikomponentni grafi spreminjanja intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa v optimiziranih reakcijah qPCR *D*, *E*, *G* in *H*. Sonda *D*, *E*, *G*, *H* so označene s FAM.



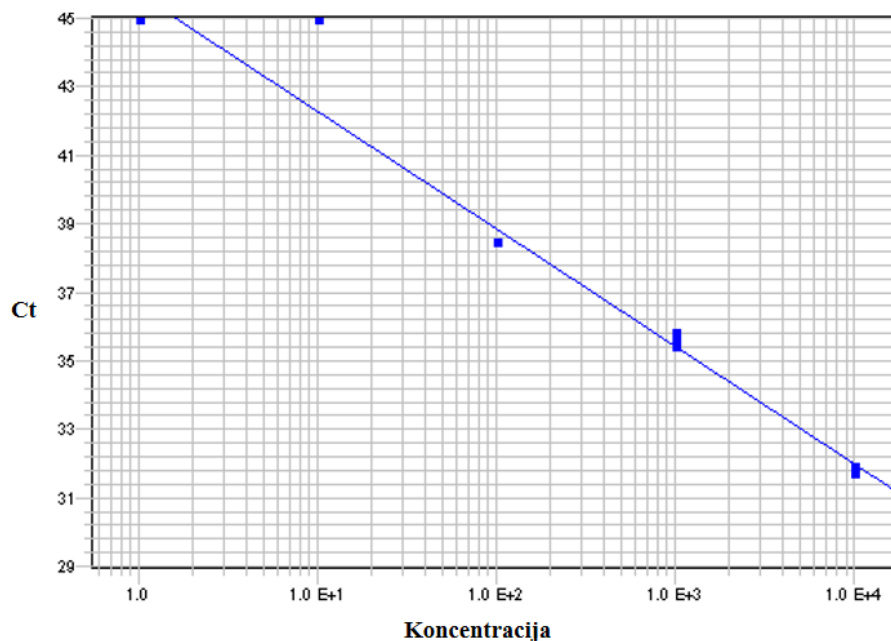
Slika 11: Multikomponentni grafi spreminjanja intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa v optimiziranih reakcijah qPCR Cs in Cps. Sondi Cs in Cps sta označeni s FAM.

Glede na rezultate izvedenih reakcij qPCR smo se odločili uporabljati reakcijski sestav TaqMan Universal MasterMix II, izolacijo virusne DNA iz 400 μ l plazme v 150 μ l eluata in uporabo 12,5 μ l virusne DNA.

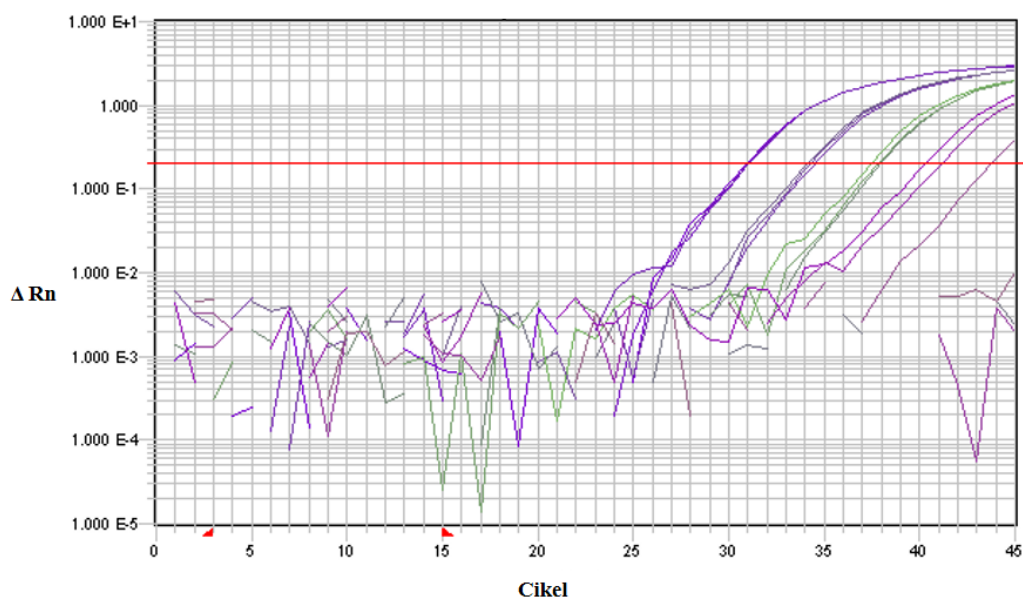
Metoda, ki smo jo uvedli, omogoča testiranje največ desetih preiskovanih vzorcev na eni mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami.

4.3 Učinkovitost in občutljivost metode za genotipizacijo HBV

Za oceno zmogljivosti in učinkovitosti reakcije qPCR smo posameznim sestavam določili standardno krivuljo. Pri tem imamo na x-osi logaritemske vrednosti koncentracij vzorcev, na y-osi pa vrednosti Ct. Reakcijo smo vrednotili s pomočjo parametrov umeritvene krivulje. Za dobro točnost in ponovljivost reakcije velja, da mora biti naklon krivulje v območju med -3,10 in -3,58. Primerno linearnost umeritvene krivulje pa zagotavlja korelacijski koeficient, ki ima vrednost $\geq 0,98$. Parametri naših standardnih krivulj so pri vseh reakcijah v zelenih intervalih. Kot primer smo na *Sliki 12* prikazali standardno krivuljo in na *Sliki 13* amplifikacijski graf za reakcijo G.



Slika 12: Standardna umeritvena krivulja za reakcijo qPCR G. Naklon premice: $-3,43$; $R^2 = 0,9899$.



Slika 13: Amplifikacijski graf reakcije qPCR G. ΔRn – normalizirano razmerje intenzitete fluorescence.

Za določanje občutljivosti reakcij qPCR smo pripravili ustrezne redčitve in reakcije izvedli v trojnikih. Mejo detekcije smo postavili na najnižjo koncentracijo, pri kateri sta bili vsaj dve od treh reakcij pozitivni.

Meje detekcije in območja linearnosti za posamezne reakcije qPCR so prikazani v *Tabeli XV*.

Tabela XV: Območja linearnosti in meje detekcije optimiziranih reakcij qPCR. Vse vrednosti so podane v IU HBV DNA/ml.

<i>Sestav</i>	<i>Ac</i>	<i>Bs</i>	<i>As</i>	<i>Bps</i>	<i>Cs</i>	<i>Cps</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>H</i>
Območje linearn.	10 ² –10 ⁴	10 ² –10 ⁴	10 ¹ –10 ⁴	10 ¹ –10 ⁴	10 ² –10 ⁴	10 ² –10 ⁴	10 ² –10 ⁴	10 ² –10 ⁴	10 ¹ –10 ⁴	10 ² –10 ⁴
Meja detekcije	100	10	25	10	25	25	50	25	5	100

4.4 Genotipizacija vzorcev HBV

Porazdelitev okužbe z genotipi HBV v populaciji slovenskih krvodajalcev

Genotipizirali smo 54 vzorcev HBV DNA izoliranih iz plazme krvodajalcev, ki so jim med leti 2000 in 2012 pri rutinskem testiranju odkrili okužbo s HBV. Genotip HBV smo določili v 49 vzorcih, pet pa je bilo negativnih pri vseh reakcijah qPCR. Pri opredelitvi porazdelitve okužbe s posameznimi genotipi HBV, ki je predstavljena v *Tabeli XVI*, smo upoštevali vse pozitivne vzorce.

Tabela XVI: Število in deleži okužb s posameznimi genotipi HBV pri slovenskih krvodajalcih. Prevladujoča genotipa A in D sta označena z rumeno barvo, mešani okužbi pa z modro.

<i>Genotip</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>D/A</i>	<i>A/C</i>
Število in delež okužb	4 8 %	1 2 %	0	41 84 %	0	0	0	0	2 4 %	1 2 %

Genotipi A, B in D

Za določanje genotipov A, B in C smo uporabili dva sestava za genotipizacijo HBV, ki pa ne določata vedno istih subgenotipov. Sestav *Ac* omogoča določanje subgenotipov A1, A2 in A3, *As* pa le A1 in A2. S sestavom *Bs* določimo vseh osem subgenotipov, z *Bps* pa samo B1, B2, B4 in B6. Oba sestava *Cs* in *Cps* omogočata določanje subgenotipov C1, C2, večine sevov C6, C7 ter nekaterih sevov C3 in C4. Pri genotipih D, E, G in H pa imamo samo en sestav za genotipizacijo HBV *D*, *E*, *G* in *H*, ki določa vse subgenotipe.

Okužbo z genotipom A smo dvakrat potrdili v treh vzorcih, ki so imeli pozitivne reakcije qPCR *As* in *Ac*. Četrty vzorec je imel trikrat pozitivno reakcijo *As*, vendar pa tudi negativno

reakcijo *Ac*. Z reakcijo *Ac* sicer določimo vse genotipe A, vendar pa je reakcija *As* občutljivejša. Vzorec z genotipom B je imel v dveh ponovitvah nedvoumno pozitiven rezultat z nizko vrednostjo *Ct* in ustrezno krivuljo in sicer tako pri reakciji *Bs* kot *Bps*.

Genotip D smo določili v 41 vzorcih, pri čemer smo načeloma vsak vzorec genotipizirali enkrat. Pri dvajsetih naključno izbranih vzorcih, v katerih smo pri prvem določanju določili okužbo z genotipom D, smo rezultate enkrat do trikrat potrdili s ponovno genotipizacijo HBV DNA.

Mešani okužbi A / C in D / A

Genotip C smo v enem vzorcu določili v obliki mešane okužbe A/C. V dveh ponovitvah je bila reakcija pozitivna samo s sestavom *Cps*, s *Cs* pa obakrat popolnoma negativna. Poleg reakcije *Cps* sta bili pozitivni tudi *As* in *Ac*. Vrednost *Ct* pa je bila pri reakciji *Cps* precej višja kot pri *Ac* in *As*.

Mešano okužbo D/A smo določili v dveh vzorcih in jo pri vsakem potrdili trikrat. V prvem vzorcu je imela reakcija s sestavom za genotipizacijo *As* dokaj visoko vrednost *Ct*, reakcija *D* nekaj ciklov nižjo, reakcija *Ac* pa je bila negativna. Slednja je bila negativna tudi pri drugem vzorcu, reakcija *As* je v tem primeru imela povprečno vrednost *Ct*, reakcija *D* pa precej nižjo kot pri večini preiskovanih vzorcev.

Negativni vzorci

Sedem od 54 vzorcev plazme krvodajalcev je bilo pri prvem določanju genotipa HBV negativnih z vsemi osmimi reakcijami qPCR. Pri vseh sedmih smo zato genotipizacijo ponovili še vsaj dvakrat, pri čemer pa smo prilagodili izolacijo HBV DNA tako, da smo 400 µl vzorcev eluirali v 60 ali 90 µl, da bi kar čim bolj skoncentrirali virusno DNA.

Pri štirih vzorcih so bile reakcije qPCR za vse genotipe negativne tudi v dodatnih dveh ponovitvah. Pri enem smo enkrat določili genotip D, dvakrat pa nismo dobili pozitivnega signala. Pri preostalih dveh vzorcih smo v naslednjih treh ponovitvah določili genotip D. Z avtomatiziranim sistemom Artus za določanje koncentracije HBV DNA v plazmi ali serumu smo petim vzorcem, ki so bili trikrat negativni, skušali izmeriti koncentracijo HBV DNA, a je bila ta pri vseh 0 IU/ml.

5 RAZPRAVA

Z virusom hepatitisa B je okužen velik del svetovne populacije, pri čemer je protivirusno zdravljenje kroničnih okužb še vedno nezadovoljivo. Precej raziskav nakazuje, da je genotip HBV pomemben dejavnik tako pri kliničnem poteku s HBV izzvanega hepatitisa kot tudi pri odzivu na protivirusno zdravljenje. Genotipi HBV so značilno geografsko porazdeljeni. Tako je znano, da v Evropi prevladuje okužba z genotipoma HBV A in D, v Sloveniji pa za splošno populacijo še nimamo teh podatkov.

Za genotipizacijo HBV danes uporabljajo številne različne metode. Mi smo za določanje okužb s posameznimi genotipi HBV pri krvodajalcih izbrali metodo PCR v realnem času, ki omogoča neznatno navzkrižno kontaminacijo, kratek čas izvedbe, dobro občutljivost, avtomatizacijo in ustrezno prepoznavanje mešanih genotipov.

5.1 Uvedba in optimizacija metode qPCR za genotipizacijo HBV

Genotipizacijo smo sprva izvedli po metodi, ki so jo objavili Malmström in sodelavci [40], vendar z rezultati nismo bili zadovoljni. Pri večini reakcij smo sicer dobili ustrezno specifičnost, vendar pa z njimi nismo uspeli določiti genotipov E in G. Poleg tega sta bili neustrezni tudi občutljivost in učinkovitost reakcij qPCR, zaradi česar smo se odločili, da jih spremenimo in optimiziramo.

Ob spreminjanju koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond se je izkazalo, da se je učinkovitost reakcij qPCR vedno poslabšala takrat, ko smo povečali koncentracijo sond nad 200 nM. Pri nadaljnji optimizaciji smo zato ohranili njihovo začetno koncentracijo (200 nM) in zviševali samo koncentracije začetnih oligonukleotidov, z izjemo ene kombinacije in sicer 900/250 nM. Zelo različnih kombinacij z višjimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov in sond pa nismo mogli dobro preizkusiti, saj smo bili volumsko omejeni s 50 µl celokupnega reakcijskega volumna.

Nato smo se odločili za uvedbo novega reakcijskega sestava za qPCR (TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix), ki je posebej namenjen za določanje virusne DNA. Poleg tega omogoča tudi več možnosti za spreminjanje koncentracij ostalih reagentov, saj je bolj koncentriran kot običajni reakcijski sestav (TaqMan Universal MasterMix II), ki smo ga uporabljali najprej. Po izvedbi reakcije qPCR z njim so bile vrednosti Ct v vseh reakcijah

nižje v primerjavi z uporabo starega sestava, kar pomeni, da je bil novi učinkovitejši oziroma hitrejši v pomnoževanju matrične DNA. Po drugi strani pa so bili signali sproščene fluorescence zgolj primerljivi, v nekaterih primerih celo slabši od tistih, ki smo jih dobili z uporabo prvotnega sestava. Zato smo se odločili nadaljevati z uporabo TaqMan Universal MasterMix II, saj je cenejši, novi sestav pa ni izboljšal rezultatov v tolikšni meri, da bi to upravičilo njegovo nadaljnjo uporabo.

Sumili smo, da pri multiplih reakcijah qPCR, ki smo jih izvedli skladno s člankom [40], posamezni sestavi oligonukleotidnih začetnikov in sond motijo medsebojno delovanje. V naslednjem koraku smo zato ločili multiple reakcije qPCR na posamezne. S tem smo omogočili, da smo lahko pri sondah zamenjali reporterski barvili NED in VIC s FAM, saj je znano, da imata NED in VIC v splošnem šibkejšo fluorescenco od FAM. Pred ločitvijo reakcij tega nismo mogli izvesti, saj v eni reakcijski mešanici ne moremo imeti dveh sond, ki razlikujeta med dvema različnima genotipoma, označenih z istim barvilom. Izkazalo se je, da je bila zamenjava fluorescenčnega barvila ugodna, saj smo tako prvič uspeli določiti genotipa E in G. Prav tako pa so se signali precej izboljšali tudi pri vseh ostalih reakcijah: *As, Ac, Bps, Bs, Cps, Cs, D* in *H*.

Z ločitvijo multiplih reakcij qPCR na posamične smo omogočili tudi testiranje več različnih kombinacij končnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond, saj smo v posamezni reakcijski mešanici uporabili le en sestav za genotipizacijo HBV in bili zato manj volumsko omejeni. Za končne kombinacije koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond smo izbrali tiste, pri katerih je bila krivulja intenzitete fluorescence očitno najboljša. Pri reakcijah qPCR, v katerih je bilo več različnih kombinacij koncentracij približno enako učinkovitih, pa smo se odločili za tiste, kjer smo porabili najmanj reagentov. Občutljivost metode smo še dodatno izboljšali s povečanjem volumna testirane HBV DNA v reakcijski mešanici in sicer iz 10 na 12,5 μ l.

Pri primerjavi rezultatov ločenih reakcij qPCR *As, Bps, Ac* in *Bs* z multiplima reakcijama qPCR *As+Bps* in *Ac+Bs* se je izkazalo, da pri ločenih reakcijah ne dobimo bistveno boljših krivulj. V sistem reakcij za genotipizacijo smo zato uvedli tudi ti multipli reakciji qPCR, saj smo tako uporabili manjše število reakcij za celokupno genotipizacijo HBV DNA.

Z ločitvijo osnovnih multiplih reakcij qPCR in menjavo sond smo izboljšali tako občutljivost kot učinkovitost reakcij. Slaba lastnost te menjave pa je, da se je s tem število

reakcij qPCR iz štirih osnovnih multiplih in dveh dodatnih za razlikovanje med genotipoma F in H povečalo na osem. Število vzorcev, ki jih lahko na ta način testiramo v eni mikrotitrski ploščici, pa se je zmanjšalo na polovico.

Pri testiranju različnih volumnov elucij pri izolaciji HBV DNA smo po pričakovanjih dobili boljše rezultate pri 90 μ l eluatu, saj so v tem primeru vzorci bolj koncentrirani kot pri eluciji v 150 μ l. Kljub temu pa razlika v signalih ni bilo zelo velika. Na podlagi tega smo se odločili, da bomo vse vzorce krvodajalcev izolirali iz 400 μ l plazme v 150 μ l eluata, saj s tem dobimo večji volumen testnih vzorcev. Zaloge arhiviranih vzorcev plazme so bile namreč omejene. Ker smo za eno genotipizacijo potrebovali 100 μ l HBV DNA, smo tako skrajšali tudi čas obdelave vzorcev in zmanjšali stroške porabe reagentov za izolacijo virusne DNA, saj smo izvedli le eno elucijo namesto dveh ali treh. Kljub temu pa smo pri tistih vzorcih HBV DNA, ki so imeli pri prvem določanju genotipa HBV negativen ali slab signal pri reakcijah qPCR, nato pri ponovni izolaciji HBV DNA eluirali iz 400 μ l plazme v 90 μ l ali 60 μ l in nato genotipizacijo ponovili.

Z uvedbo novega sistema osmih reakcij, ki so specifične za genotipe A, B, C, D, E, G in H, smo nekoliko povečali stroške in čas obdelave vzorcev v primerjavi z metodo qPCR, na kateri smo našo metodo zasnovali. Povečali smo namreč volumen uporabljenih reagentov in zmanjšali število vzorcev, ki jih lahko naenkrat testiramo na mikrotitrski ploščici. Kljub temu pa so stroški in čas obdelave še vedno razmeroma nizki, precej izboljšana občutljivost in učinkovitost reakcij qPCR pa še dodatno odtehtata omenjeni slabosti.

Če bi hoteli še bolj optimizirati reakcije qPCR, bi lahko spreminjali tudi razmerja med koncentracijami istosmernih in obratnosmernih začetnih oligonukleotidov, vendar smo bili za potrebe naše raziskave s končno metodo zadovoljni. Prav tako nismo optimizirali termo programa reakcije qPCR, saj je iz literature in izkušenj znano, da je uporabljeni termo program primeren oziroma najboljši za večino reakcij qPCR.

Reakcije za določanje genotipa F nismo uporabili in optimizirali, ker nismo uspeli pridobiti primerne kontrolnega vzorca. Genotip F HBV je namreč zelo redek in omejen na južno in srednjo Ameriko [12, 13]. Posledično ne moremo zagotoviti, da nihče od preiskovanih krvodajalcev ni okužen z genotipom F, čeprav te pri slovenskih krvodajalcih ne pričakujemo.

Našo metodo smo ovrednotili s standardnimi krivuljami in pri vseh reakcijah qPCR dobili primerne parametre, zato nam vrednosti Ct v območju linearnosti lahko služijo za oceno koncentracije HBV DNA v našem vzorcu. Določili smo tudi občutljivost, ki pa velja zgolj kot ocena, saj so osnovne koncentracije HBV DNA v kontrolnih vzorcih QCMD podane le okvirno. Bolj točne podatke bi lahko dobili tako, da bi koncentracije v kontrolnih vzorcih dali izmeriti, vendar pa se za to zaenkrat nismo odločili, saj kvantitativno določanje HBV DNA ni bil namen našega dela.

Z našo metodo lahko pri vseh genotipih zanesljivo določimo HBV DNA v intervalu 10^2 – 10^4 IU/ml ali več. Zaznamo lahko tudi koncentracije, ki so nižje od 10^2 IU/ml, na primer pri eni od reakcij qPCR do 5 IU/ml, kar pomeni da je občutljivost precej dobra in potrjuje podatke, da virusno breme pri krvodajalcih z okužbo HBV pogosto znaša manj kot 10^3 IU/ml [41, 42].

5.2 Genotipizacija HBV

Med leti 2000 in 2012 so na Zavodu RS za transfuzijsko medicino z rutinskim testiranjem na patogene odkrili okužbo s HBV pri 54 krvodajalcih. Iz arhiviranih vzorcev plazme smo osamili virusno DNA in z optimizirano metodo qPCR določili genotipe HBV ter porazdelitev okužb s posameznimi genotipi HBV pri krvodajalcih v Sloveniji.

Identificirani genotipi HBV imajo pričakovan profil glede na geografsko lego Slovenije. Za sredozemsko območje namreč v splošnem velja, da močno prevladuje genotip D HBV, manjši delež pa predstavlja okužba z genotipom A, medtem ko so okužbe z ostalimi genotipi redke in predvsem posledica priseljevanja z drugih celin.

Če se osredotočimo na nekatere sosednje države, imamo večinoma na voljo podatke za populacije bolnikov, ki pa niso vedno primerljive s podatki za krvodajalce, saj slednji predstavljajo »zdravo« populacijo. Podatki študij kažejo, da je na Hrvaškem z genotipom D okuženih 80 %, z genotipom A 8 %, preostalih 12 % pa predstavljajo mešane okužbe bolnikov [43]. V severovzhodni Italiji je bila okužba z genotipom D potrjena pri 73 % bolnikov, okužba z A pa pri 26 %, če ne upoštevamo podatkov za priseljence iz Azije in Afrike [44, 45]. V študiji, v katero so zajeli krvodajalce iz celotne Italije, so pri 86,4 % določili genotip D, pri preostalih 13,6 % pa genotip A [42, 46]. Na Madžarskem so okužbe nekoliko bolj raznolike in sicer je z genotipom D okuženih 47 %, z genotipom A 43 %, z

genotipom B 1,2 %, z genotipom C 1,6 % bolnikov, mešanih okužb pa je 7,4 % [43]. Naši rezultati se ujemajo z geografsko lego Slovenije in s podatki sosednjih držav. Porazdelitev okužb namreč lahko dobro umestimo med omenjene države, saj močno prevladuje genotip D (84 %) tako kot v Italiji in na Hrvaškem, hkrati pa smo zaznali tudi 6 % mešanih okužb (D/A in A/C) in okužbe z genotipom A (8 %), ki so še posebej značilne za Madžarsko in srednjo Evropo.

Po podatkih Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani, so v 138 izolatih slovenskih bolnikov s hepatitisom B določili genotip D v 95 %, genotip A pa v 5 % [5]. V naši raziskavi, v katero smo vključili krvodajalce, smo določili manjši delež okužb z genotipom D (84 %), večji delež okužb z genotipom A (8 %), poleg tega pa ugotovili še okužbe z genotipom B ter različne mešane okužbe. Določene razlike v rezultatih so verjetno posledica dejstva, da gre v našem primeru za krvodajalce, ki zastopajo »zdravo« populacijo, v njihovem pa za bolnike s hepatitisom B. Za genotip D je na primer značilnejše, da povzroča izrazitejšo akutno obliko bolezni z več simptomi kot pa okužba z genotipom A, zato jo verjetno tudi pogosteje diagnosticirajo. Po drugi strani pa velja za kronični hepatitis B ravno obratno, saj ga pogosteje diagnosticirajo pri okužbah z genotipom A v primerjavi z genotipom D, pri čemer je za slednjega, tako kot pri akutni bolezni, značilna hujša oblika [26, 47, 48]. Podatkov o kliničnem stanju bolnikov, katerih vzorce so analizirali na IMI nimamo, tako da je to le ena od možnih razlag. Odsotnost mešanih okužb v raziskavi na IMI je lahko tudi posledica uporabe drugačne metode, ki ima lahko slabšo občutljivost za njihovo zaznavo. Poleg tega imajo bolniki običajno tudi precej višje koncentracije HBV DNA v primerjavi s krvodajalci, zato morda prevladujoči genotip pogosteje prikrije mešano okužbo z drugim genotipom.

Podrobnejši pregled rezultatov pri manj pričakovanih genotipih B in C je pokazal, da sta bili obe reakciji z uporabljenima sestavoma za genotipizacijo *Bs* in *Bps* pozitivni. Ker sestav za genotipizacijo *Bs* določi vseh osem subgenotipov, *Bps* pa samo B1, B2, B4 in B6 lahko sklepamo, da je v pozitivnem vzorcu prisoten eden ali več sevov s subgenotipi B1, B2, B4 ali B6. Pri genotipu C je situacija nekoliko bolj zapletena, saj je bila pozitivna samo reakcija s sestavom za genotipizacijo *Cps*, reakcija s *Cs* pa je bila negativna, pri čemer oba sestava pomnožujeta iste subgenotipe: C1–4 in C6–7. Rezultati so tako morda posledica rekombinacije ali mutacije v pomnoženem predelu regije S v genomu, ki jo

pomnožuje komplet *Cs*, ne pa v regiji pre-S, ki jo pomnožuje *Cps*. Reakciji qPCR *Cs* in *Cps* imata približno enako občutljivost, zato nizka koncentracija DNA v vzorcu verjetno ni bila vzrok za razliko v prisotnosti pozitivnega signala. Ker gre za mešano okužbo, bi lahko pri vzorcu pozitivnem na genotipa A/C sumili na slabo specifičnost reakcije *Cps*, zaradi katere bi dobili pozitivne rezultate zgolj zaradi zelo visoke koncentracije HBV DNA genotipa A, ki so jo nakazovale precej nizke vrednosti Ct pri reakcijah *As* in *Ac*. Vendar pa je to le malo verjetno, saj je reakcija *Cps* bolj specifična kot *Cs*. Začetni oligonukleotid *CpsF* ima namreč za boljše razlikovanje uvedeno dodatno mesto nekomplementarnih baz.

Za vzorce, pri katerih smo določili okužbo z manj značilnima genotipoma B in C, sklepamo, da so najverjetneje posledica horizontalnega prenosa med potovanji v tujini, oziroma preko stika s tujci. Večina preiskovane plazme (69 %) je bila namreč odvzeta krvodajalcem rojenim v Sloveniji. Preostali pa so bili rojeni v Bosni in Hercegovini (11/54), Srbiji (2/54), Makedoniji (2/54), na Češkem (1/54) in v Moldaviji (1/54), kjer sta genotipa B in C prav tako zelo redka [43, 45, 49–51]. Skoraj vsem krvodajalcem, ki niso bili rojeni v Sloveniji, smo določili genotip D (94 %), izjema je bil le krvodajalec rojen na Češkem, ki smo mu določili okužbo z genotipom A, ta pa je zelo značilna za države srednje Evrope. Priseljenci iz jugovzhodne in vzhodne Evrope predstavljajo dokaj visok delež vseh do sedaj identificiranih okužb krvodajalcev v Sloveniji, kar lahko morda razložimo z večjo pogostostjo okužbe s HBV v teh državah [7, 52, 53].

Delež mešanih okužb (8 %), ki smo ga ugotovili z našo analizo, se sprva lahko zdi visok. Vendar pa pri pregledu literature ugotovimo, da je s tovrstno okužbo obremenjen zelo različen delež ljudi v različnih populacijah. Podatki tako nihajo od 1,6 % populacije bolnikov v ZDA pa tudi do 67 % populacije kroničnih bolnikov na Švedskem [54, 55]. Nasploh je za območja z endemičnim hepatitisom B značilno, da je delež mešanih okužb visok. Tako je na primer na Kitajskem njihov delež v splošni populaciji ocenjen na 50 % [56, 57], v srednji in vzhodni Evropi pa so ju v povprečju zaznali pri 8 % bolnikov [43]. Mešane okužbe so še posebej značilne za odvisnike od prepovedanih drog in se lahko pojavljajo v obliki koinfekcij in superinfekcij [58]. Na kombinacije genotipov, ki se pojavljajo v mešanih okužbah, vpliva predvsem geografska porazdelitev, pa tudi lastnosti genoma posameznega genotipa.

Z analizo rezultatov smo določili le eno manj predvidljivo mešano okužbo A/C in dve bolj pričakovani D/A, ki sta sestavljeni iz pri nas prevladujočih genotipov. Čeprav PCR v

realnem času v splošnem velja za eno izmed občutljivejših metod, kar se tiče zaznavanja mešanih okužb, smo vseeno zagotovili, da ni bilo lažnih rezultatov zaradi kontaminacije z drugim vzorcem. Pred ponavljanjem genotipizacije smo namreč te vzorce ponovno izolirali. Možnosti, da bi do kontaminacije prišlo še pred arhiviranjem plazme, pa ni, saj so datumi odvzema plazme krvodajalcev zelo različni.

Poleg omenjenih treh mešanih okužb smo sumili nanje še pri nekaterih drugih vzorcih, vendar so bili signali pri reakcijah qPCR za drugi genotip zelo šibki. Kot mešane okužbe smo tako vodili samo tiste, kjer smo prisotnost genotipa nedvoumno prepoznali na osnovi ustrezne krivulje in vrednosti Ct ter dovolj visoke fluorescence. Kljub temu pa bi bilo smiselno potrditi rezultate in preveriti morebitno prisotnost dodatnih mešanih okužb še z drugo metodo. S pomočjo primerjave vrednosti Ct za posamezne genotipe v mešani okužbi, bi lahko ocenili tudi prevladujoči genotip HBV v njej. Poleg tega bi lahko z našo metodo qPCR testirali umetno ustvarjene mešane okužbe z različnimi razmerji med posameznimi genotipi in tako sklepali o deležu posameznega genotipa v mešanih okužbah, ki smo jih odkrili, in določili mejo detekcije za zaznavo podrejenega genotipa.

Pri negativnih vzorcih lahko sklepamo, da so v njih prisotne zelo nizke koncentracije HBV DNA, ki so pod mejo detekcije. Lahko pa bi vsebovali tudi genotip F ali subgenotip C5, saj zanju nismo vzpostavili identifikacijske metode. Določanja subgenotipa C5 ni omogočala že osnovna metoda qPCR iz članka [40], na kateri smo zasnovali naše reakcije qPCR, vendar pa ga tudi v naši metodi qPCR nismo posebej dodali. Reakcije qPCR za določanje genotipa F nismo uporabili, ker nismo uspeli pridobiti primernega kontrolnega vzorca, zato je nismo optimizirali in ovrednotili.

Predpostavko o nizkih koncentracij HBV DNA smo do neke mere potrdili z določanjem koncentracije DNA s testom Artus, ki omogoča kvantifikacijo HBV DNA in se uporablja za ugotavljanje koncentracije pri bolnikih s hepatitisom B. V petih vzorcih, ki smo jih vodili kot negativne, smo na ta način izmerili koncentracijo 0 IU/ml, pri čemer lahko Artus kvantificira tudi subgenotip C5 in genotip F. Še vedno pa je možno, da je bila v katerem od negativnih vzorcev prisotna oblika HBV z mutacijo v visoko ohranjeni regiji genoma, ki jo pomnožuje sestav začetnih oligonukleotidov v testu Artus in je bil zato vzorec tudi s tem testom negativen.

Po prvem določanju genotipa HBV smo dobili sedem negativnih vzorcev, zato smo znova izvedli izolacijo virusne DNA, vendar tokrat z elucijo v manjši volumen ter ponovili genotipizacijo. Izkazalo se je, da je bila ponovna izolacija z elucijo v manjši volumen ugodna, saj smo pri dveh od sedmih vzorcev identificirali in potrdili genotip D v treh ponovitvah.

Štirje od petih vzorcev so bili negativni v vseh ponovitvah. Dva od teh sta imela že s presejalnimi testi slabo zaznavno HBV DNA, zato smo z njima še dodatno potrdili odsotnost lažno pozitivnih rezultatov. Pri enem vzorcu je bila reakcija qPCR za genotip D pozitivna v samo eni od štirih ponovitev. To pripisujemo zelo nizki koncentraciji HBV DNA, ki smo jo pri eni od ponovitev verjetno uspešneje izolirali in prenesli v reakcijsko mešanico. Ker v tem vzorcu nismo mogli zanesljivo določiti prisotnosti genotipa D HBV, smo ga smatrali za negativnega.

Izmerjene vrednosti Ct so bile pri pozitivnih vzorcih v razponu 14–41, kar kaže na zelo različne koncentracije HBV DNA v vzorcih. Čeprav naše metode nismo optimizirali za kvantitativno določanje, pa smo vrednosti Ct vseeno primerjali s serološkimi izvidi in ugotovili, da so bile vrednosti Ct občutno nižje (vsaj za 10 ciklov) v tistih vzorcih, v katerih so predhodno potrdili prisotnost HBeAg, ne pa protiteles anti-HBe. Zelo nizke vrednosti Ct nakazujejo na precej visoke koncentracije DNA, kar se ujema s sočasno serološko zaznavo HBeAg, ki je pokazatelj visoke virusne aktivnosti [5].

Vse rezultate bi bilo v prihodnosti dobro preveriti z vsaj še eno metodo. Nedvoumno bi jih lahko potrdili s sekvenciranjem genoma v kombinaciji s filogenetsko analizo, ki velja za zlati standard genotipizacije. Problem bi lahko bil le pri identifikaciji mešanih okužb, saj sekvenciranje teh pogosto ne zazna, zato bi bila morda v tem primeru primernejša metoda INNO-LiPA [10, 33]. Kljub temu pa bi s sekvenciranjem lahko raziskovali prisotnost subgenotipov HBV, katerih določanje postaja v zadnjih letih skoraj enako aktualno kot določanje genotipov. Med rezultati bi pričakovali tudi detekcijo nekaterih mutacij, ki so še posebej značilne za dolgotrajne nosilce okužbe s HBV in rekombinacij med genotipi HBV, ki so značilne za mešane okužbe [59].

Iz naše analize smo zaenkrat izločili vzorce z dokazano okultno okužbo, v katerih so zelo nizke koncentracije HBV DNA (manj kot 200 IU/ml). Prav določanje genotipa HBV pri okulturnih okužbah ostaja izziv za prihodnost, saj so na Zavodu RS za transfuzijsko

medicino že arhivirali okrog 30 vzorcev plazme krvodajalcev, pri katerih so zaznali le tovrstno okužbo. Porazdelitev genotipov bi bilo zanimivo določiti tudi pri teh in rezultate obeh raziskav primerjati oziroma medsebojno dopolniti.

6 SKLEP

Znanje o povezanosti genotipov HBV s kliničnim potekom hepatitisa B in njegovim zdravljenjem se nenehno povečuje. Posledično se bodo v prihodnosti morda spremenile tudi smernice zdravljenja te bolezni in bo genotipizacija postala del klinične ocene bolnikov pred terapijo, kot je to v primeru hepatitisa C. Dobro analizirana porazdelitev okužb s posameznimi genotipi HBV je lahko zanimiva odskočna deska za nadaljnje študije v povezavi s HBV, predvsem za genotipa A in D ter mešane okužbe, ki še vedno niso tako dobro raziskani kot genotipa B in C.

Za določanje genotipov HBV smo uvedli in optimizirali metodo, ki temelji na tehniki PCR v realnem času s hidrolizirajoči sondami TaqMan. Metoda ima dobro specifičnost in občutljivost za genotipizacijo HBV DNA iz plazemskih vzorcev krvodajalcev, omogoča kratek čas obdelave in razmeroma nizke stroške, dobro pa se izkaže tudi pri zaznavi mešanih okužb.

Z našo raziskavo smo prvič opredelili porazdelitev okužbe s posameznimi genotipi HBV pri krvodajalcih v Sloveniji. Izkazalo se je, da v 84 % zbranih plazemskih vzorcev HBV prevladuje genotip D, sledita mu genotip A z 8 % in genotip B z 2 %. Mešani okužbi D/A in A/C pa predstavljata preostalih 6 %. Ugotovljena porazdelitev genotipov se dobro ujema z geografsko lego Slovenije na prehodu med Sredozemljem in srednjo Evropo in z genotipi značilnimi za to področje.

Rezultate bi bilo smiselno potrditi in nadgraditi še z drugo metodo, saj ostajajo odprta vprašanja glede okužbe s posameznimi subgenotipi ter prisotnostjo rekombinacij in mutacij. Cilj tovrstnih preiskav je pridobiti čim bolj celovit in natančen pregled nad okužbami z različnimi genotipi HBV pri krvodajalcih, ki so sicer le del vseh okužb v slovenskem prostoru, a najboljše predstavljajo »zdravo« populacijo.

7 LITERATURA

1. Dienstag J: Hepatitis B Virus Infection. *N Engl J Med* 2008; 359: 1486–1500.
2. WHO: World Health Organization. Hepatitis B. Fact sheet no. 204. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Dostopno: April 2014.
3. Gerlich WH: Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where are we now. *Virology Journal* 2013; 10: 239.
4. Liang T: Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 2009; 49: 13–21.
5. Poljak M, Petrovec M: *Medicinska virologija, Medicinski razgledi*, Ljubljana, 2011: 84–96.
6. Kao JH: Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus. *Korean J Intern Med* 2011; 26: 255–261.
7. Rantala M, van de Laar MJ: Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe – a review. *Eurosurveillance* 2008; 13.
8. Pravilnik o obveznem testiranju krvi in komponent krvi 2007. *Url RS* 9/932–933.
9. Dienstag J: Hepatitis B Virus Infection. *N Engl J Med* 2008; 359: 1486–1500.
10. Norder H, Couroucé AM, Coursaget P idr.: Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47: 289–309.
11. Norder H., Couroucé AM, Magnius LO: Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489–503.
12. Devesa M, Pujol FH: Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. *Virus Res.* 2007; 127: 177–184.
13. Campos RH, Mbayed AV, Pineiro y Leone FG: Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. *Journal of Clinical Virology* 2005; 34: 8–13.

14. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C idr.: A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67–74.
15. Naumann H, Schaefer S, Yoshida CF idr.: Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol* 1993; 74: 1627–1632.
16. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH idr.: Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059–2073.
17. Olinger CM, Jutavijittum P, Hübschen JM idr.: Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1777–1780.
18. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F idr.: A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype. *J. J Virol* 2009; 83: 10538–10547.
19. Kao JH, Chen PJ, Lai MY idr.: Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554–559.
20. Chu CJ, Hussain M, Lok AS: Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1756–1762.
21. Kew MC, Kramvis A, Yu MC idr.: Increased hepatocarcinogenic potential of hepatitis B virus genotype A in Bantu-speaking sub-saharan Africans. *J Med Virol* 2005; 75: 513–521.
22. Thakur V, Guptan RC, Kazim SN idr.: Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2000; 17: 165–170.
23. Chan HLY, Hui AY, Wong ML idr.: Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004; 53: 1494–1498.

24. Pujol FH, Navas MC, Hainaut P idr.: Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer letters* 2009; 286: 80–88.
25. Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A idr.: Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002; 123: 1848–56.
26. Lin CL1, Kao JH: The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26: 123–130.
27. Erhardt A, Blondin D, Hauck K idr.: Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005; 54: 1009–1013.
28. Wai CT, Chu CJ, Hussain M idr.: HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002; 36: 1425–30.
29. Hsieh TH, Tseng TC, Liu CJ idr.: Hepatitis B virus genotype B has an earlier emergence of lamivudine resistance than genotype C. *Antivir Ther* 2009; 14: 1157–1163.
30. Petersen J, Buti M: Considerations for the long-term treatment of chronic hepatitis B with nucleos(t)ide analogs. *Expert Rev Gastroenterol Hepato* 2012; 6: 683–693.
31. Zöllner B, Petersen J, Puchhammer-Stöckl E idr.: Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 2004; 39: 42–50.
32. Bassem GSS, Abbas RO, Azzazy HME: Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *International Journal of Infectious Diseases* 2010; 14: 941–953.
33. Cabezas-Fernandez MT, Cabeza-Barrera MI: Introduction of an Automated System for the Diagnosis and Quantification of Hepatitis B and Hepatitis C Viruses. *Open Virol J* 2012; 6: 122–134.
34. Mullis KB, Falona F: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335–350.

35. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS idr.: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992; 10: 413–417.
36. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G idr.: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11: 1026–1030.
37. Valasek MA, Repa JJ: The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; 29: 151–159.
38. Holland PM, Abramson RD, Watson R idr.: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 7276–7280.
39. Heid CA, Stevens J, Livak KJ idr.: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986–994.
40. Malström S, Berglin-Enquist I, Lindh M: Novel Method for Genotyping Hepatitis B Virus on the Basis of TaqMan Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1105–1111.
41. Hennig H, Puchta I, Luhm J idr.: Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Blood* 2002; 100: 2637–41.
42. Romanò L1, Velati C, Cambiè G idr.: Hepatitis B virus infection among first-time blood donors in Italy: prevalence and correlates between serological patterns and occult infection. *Blood Transfus* 2013; 11: 281–288.
43. Deterding K, Constantinescu I, Nedelcu FD: Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. *J Med Virol* 2008; 80: 1707–1711.
44. Dal Molin G, Poli A, Crocè LS idr.: Hepatitis B virus genotypes, core promoter variants, and precore stop codon variants in patients infected chronically in North-Eastern Italy. *Journal of Medical Virology* 2006; 78: 734–40.
45. Miyakawa Y, Mizokami M: Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 2003; 46: 329–338.

46. Schaefer S: Hepatitis B virus genotypes in Europe. *Hepatology Research* 2007; 37: 20–26.
47. Kidd-Ljunggren K, Myhre E, Bläckberg J: Clinical and serological variation between patients infected with different Hepatitis B virus genotypes. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 42: 5837–5841.
48. Kidd-Ljunggren K1, Miyakawa Y, Kidd AH: Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol.* 2002; 83: 1267–1280.
49. Lazarevic I, Cupic M, Delic D idr.: Distribution of HBV genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes among chronically infected patients in Serbia. *Arch Virol* 2007; 152: 2017–2025.
50. V Němecek, O Strunecký: [Hepatitis B virus (HBV) genotypes in the Czech Republic]. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti J.E. Purkyne* 2004; 53: 55–61.
51. Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E idr.: Spatial and temporal dynamics of hepatitis B virus D genotype in Europe and the Mediterranean Basin. *PLoS One* 2012; 7: e37198.
52. Petrovic J, Salkic NN, Ahmetagic S idr.: Prevalence of chronic hepatitis B and hepatitis C among first time blood donors in Northeast Bosnia and Herzegovina: an estimate of prevalence in general population. *Hepat Mon.* 2011; 11: 629–633.
53. Stanojević B1, Osiowy C, Schaefer S idr.: Molecular characterization and phylogenetic analysis of full-genome HBV subgenotype D3 sequences from Serbia. *Infect Genet Evol.* 2011; 11: 1475–1480.
54. Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P idr.: Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *J Infect Dis* 2002; 186: 752–759.
55. Mallory MA1, Page SR, Hillyard DR: Development and validation of a hepatitis B virus DNA sequencing assay for assessment of antiviral resistance, viral genotype and surface antigen mutation status. *J Virol Methods* 2011; 177: 31–37.
56. Andernach IE, Jutavijittum P, Samounry B: A high variability of mixed infections and recent recombinations of hepatitis B virus in Laos. *PLoS One* 2012; 7: e30245.

57. Huang ZM, Huang QW, Qin YQ idr.: Clinical characteristics and distribution of hepatitis B virus genotypes in Guangxi Zhuang population. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6525–6529.
58. Chen BF, Chen PJ, Jow GM idr.: High prevalence of mixed genotype infections in hepatitis B virus infected intravenous drug users. *J Med Virol* 2004; 74: 536–542.
59. Dong HL, Chan Z, Liu DP idr.: A1762T/G1764A mutations of hepatitis B virus, associated with the increased risk of hepatocellular carcinoma, reduce basal core promoter activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2008; 374: 773–776.