

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Anja ZAGOŽEN

**PREVALENCA OKUŽBE Z VIRUSOM HEPATITISA D  
PRI BOLNIKIH S KRONIČNIM HEPATITISOM B V  
SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Anja ZAGOŽEN

**PREVALENCA OKUŽBE Z VIRUSOM HEPATITISA D PRI  
BOLNIKIH S KRONIČNIM HEPATITISOM B V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**PREVALENCE OF HEPATITIS D VIRUS INFECTION IN  
SLOVENIAN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B VIRUS  
INFECTION**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu študijske komisije dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 11. 4. 2016 ter na osnovi Pravilnika o dodiplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Mario Poljak, dr. med., za somentorico asist. razisk. dr. Lea Hošnjak, univ. dipl. mikrobiol., in za recenzentko prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Mentor: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.

Somentorica: asist. razisk. dr. Lea Hošnjak, univ. dipl. mikrobiol.

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, univ. dipl. biol.  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Mario POLJAK, dr. med.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: asist. razisk. dr. Lea HOŠNJAK, univ. dipl. mikrobiol.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Anja Zagožen

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 578.7:616.36-002(043)=163.6  
KG virusi/virusi hepatitisa/virus hepatitis D/HDV/prevalenca  
okužbe/Slovenija/ELISA/rt-RT-PCR  
AV ZAGOŽEN, Anja  
SA POLJAK, Mario (mentor)/ HOŠNJAK, Lea (somentorica)/ SEME, Katja  
(recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija  
mikrobiologije  
LI 2016  
IN PREVALENCA OKUŽBE Z VIRUSOM HEPATITISA D PRI BOLNIKIH S  
KRONIČNIM HEPATITISOM B V SLOVENIJI  
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)  
OP IX, 82 str., 12 pregl., 7 sl., 145 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Virusni hepatitis, povzročen z okužbo z virusom hepatitisa B (HBV) in virusom  
hepatitisa D (HDV), v primerjavi z ostalimi virusno povzročenimi hepatitisi  
napreduje hitreje in predstavlja najtežjo obliko virusnega hepatitisa pri ljudeh.  
Na svetu je s HBV kronično okuženih 350 milijonov ljudi; od teh je bilo 15-  
20 milijonov ljudi že vsaj enkrat v življenju izpostavljenih tudi okužbi s HDV.  
V doslej edini raziskavi prevalence HDV v Sloveniji so v skupini bolnikov s  
kroničnim hepatitisom B v letih 1998-2002 dokazali 0,25 % (95 % interval  
zaupanja (IZ): 0,044-1,402 %) prevalenco okužbe s HDV. V našo raziskavo  
smo vključili 668 serumskih vzorcev, odvzetih istemu številu bolnikov s  
kroničnim hepatitisom B, ki so bili v državni referenčni laboratorij za virusne  
hepatitise napoteni med letoma 2002 in 2015. Prisotnost celokupnih protiteles  
anti-HDV smo dokazali pri 2/668 (0,299 %; 95 % IZ: 0,082-1,085 %) bolnikov  
ter tako dokazali, da se je prevalenca HDV v drugem časovnem obdobju  
povišala za le 0,049 odstotne točke in ostaja med najnižjimi v Evropi in svetu,  
kar je najverjetnejše posledica uspešnega preprečevanja okužbe s HBV z  
obveznim testiranjem krvodajalcev, nosečnic in partnerjev HBsAg-pozitivnih  
oseb ter cepljenja proti hepatitisu B. Zaradi izredno nizke prevalence okužbe s  
HDV rutinsko opredeljevanje okužbe s HDV v diferencialni diagnostiki  
poslabšanja bolezni jeter pri slovenskih bolnikih s kronično okužbo s HBV  
trenutno ni upravičeno.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 578.7:616.36-002(043)=163.6  
CX viruses/hepatitis viruses/hepatitis D virus/HDV/infection prevalence/Slovenia/ELISA/rt-RT-PCR  
AU ZAGOŽEN, Anja  
AA POLJAK, Mario (supervisor)/ HOŠNJAK, Lea (co-advisor)/ SEME, Katja (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2016  
TI PREVALENCE OF HEPATITIS D VIRUS INFECTION IN SLOVENIAN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B VIRUS INFECTION  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 82 p., 12 tab., 7 fig., 145 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB In comparison to patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection, patients with chronic HBV and hepatitis D virus (HDV) infection are significantly more likely to develop cirrhosis, liver decompensation and hepatocellular carcinoma. Of 350 million individuals chronically infected with HBV worldwide, approximately 15-20 million have been exposed to HDV. In the first Slovenian national prevalence study, performed between the years 1998 and 2002, which included 400 chronic hepatitis B patients, the prevalence of HDV was estimated to 0.25 % (95 % confidence interval (CI): 0.044-1.402 %). The present study included 668 HBsAg-positive serum samples obtained from the same number of patients referred to the Slovenian national reference laboratory for viral hepatitis between 2002 and 2015. Total anti-HDV antibodies were detected in 2/668 tested samples (0.299 %; 95 % CI: 0.082-1.085 %), confirming the results of the previous study and demonstrating that the prevalence of HDV in Slovenia remains among the lowest in Europe and around the world, which is most likely due to the successful prevention of HBV infections with mandatory testing of blood donors, pregnant women and partners of HBsAg-positive individuals and vaccination against hepatitis B. Due to the observed low prevalence of HDV infection, routine testing for HDV should not be considered in differential diagnosis of exacerbation of liver disease in Slovenian patients with chronic HBV infection.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 VIRUS HEPATITISA B .....	3
2.1.1 Zgradba in pomnoževanje HBV.....	3
2.1.2 Patogeneza HBV in imunski odziv .....	5
2.1.3 Klinična slika hepatitisa B .....	7
2.1.4 Epidemiologija okužbe s HBV.....	9
2.1.5 Mikrobiološka diagnostika hepatitisa B .....	10
2.1.6 Zdravljenje hepatitisa B.....	14
2.1.7 Preprečevanje okužbe s HBV .....	15
2.1.8 Okužba s HBV v Sloveniji.....	16
2.2 VIRUS HEPATITISA D .....	16
2.2.1 Zgradba virusnega delca in genoma HDV .....	17
2.2.2 Pomnoževanje HDV .....	20
2.2.3 Patogeneza HDV in klinična slika hepatitisa D .....	22
2.2.4 Interakcije med HBV in HDV .....	23
2.2.5 Interakcije HBV in HDV z gostiteljem .....	26
2.2.6 Epidemiologija okužbe s HDV.....	28
2.2.7 Mikrobiološka diagnostika hepatitisa D.....	36
2.2.8 Zdravljenje hepatitisa D .....	39
2.2.9 Preprečevanje okužbe s HDV .....	41
2.2.10 Okužba s HDV v Sloveniji .....	41
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>42</b>
3.1 MATERIALI .....	42
3.2 METODE.....	42

<b>3.2.1 Določanje prevalence okužbe s HDV pri slovenskih bolnikih s kroničnim hepatitisom B.....</b>	<b>42</b>
3.2.1.1 Kvalitativno dokazovanje prisotnosti celokupnih protiteles proti HDV .....	42
<b>3.2.2 Opredeljevanje akutne, kronične oz. prebolele okužbe s HDV.....</b>	<b>44</b>
3.2.2.1 Kvalitativno dokazovanje prisotnosti protiteles anti-HDV IgM .....	45
3.2.2.2 Kvalitativno dokazovanje prisotnosti virusnega antiga HDV-Ag .....	47
3.2.2.3 Dokazovanje prisotnosti HDV RNA .....	49
3.2.2.3.1 Osamitev celokupnih nukleinskih kislin.....	49
3.2.2.3.2 Preverjanje kakovosti osamljene RNA in odsotnosti zaviralcev PCR.....	49
3.2.2.3.3 Dokazovanje prisotnosti HDV RNA z obratno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (rt-RT-PCR) .....	51
<b>3.2.3 Izračun 95 % intervala zaupanja za prevalenco okužbe s HDV v populaciji bolnikov s kroničnim hepatitisom B v Sloveniji .....</b>	<b>53</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>57</b>
4.1 ANALIZA TESTIRANEGA VZORCA POPULACIJE .....	57
4.2 IZRAČUN PREVALENCE OKUŽBE S HDV V POPULACIJI BOLNIKOV S KRONIČNIM HEPATITISOM B V SLOVENIJI.....	57
4.3 OPREDELJEVANJE AKUTNE, KRONIČNE OZ. PREBOLELE OKUŽBE S HDV .....	59
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>62</b>
5.1 RAZPRAVA.....	62
5.2 SKLEPI.....	64
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>66</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>67</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prisotnost različnih seroloških in molekularnih označevalcev v različnih obdobjih akutnega in kroničnega hepatitisa B (Seme in sod., 2011: 91; Horvat in Taylor, 2015: 1843) .....	12
Preglednica 2: Prevalenca okužbe s HDV v Evropi .....	30
Preglednica 3: Oligonukleotidni začetniki in lovka za pomnoževanje 85 bp dolgega dela gena človeške ribosomske RNA, ki nosi zapis za beljakovino S9 .....	50
Preglednica 4: Vsebina posamezne reakcijske posodice za pomnoževanje 85 bp dolgega dela gena človeške ribosomske RNA, ki nosi zapis za beljakovino S9 ...	50
Preglednica 5: Potek pomnoževanja 85 bp dolgega dela človeške ribosomske RNA (rRNA), ki nosi zapis za beljakovino S9 .....	51
Preglednica 6: Oligonukleotidni začetniki in lovka za pomnoževanje dela gena, ki nosi zapis za HDV-Ag .....	51
Preglednica 7: Vsebina posamezne reakcijske posodice za pomnoževanje 71 bp dolgega dela gena za HDV-Ag .....	52
Preglednica 8: Potek HDV rt-RT-PCR .....	52
Preglednica 9: Izračunane vrednosti 95 % intervala zaupanja za prevalenco HDV v populaciji bolnikov s kroničnim hepatitisom B v Sloveniji, ki so bili kot nosilci HBsAg prvič opredeljeni med letoma 2002 in 2015 (Sergeant, 2016: 1) .....	57
Preglednica 10: Izračunane vrednosti 95 % intervala zaupanja za prevalenco HDV v populaciji bolnikov s kroničnim hepatitisom B v Sloveniji, ki so bili kot nosilci HBsAg prvič opredeljeni med letoma 1998 in 2002 (Sergeant, 2016: 1) .....	59
Preglednica 11: Rezultati opredeljevanja prisotnosti označevalcev okužbe s HDV in HBV v serumskih vzorcih 60-letnega bolnika .....	60
Preglednica 12: Rezultati opredeljevanja prisotnosti označevalcev okužbe s HDV in HBV v serumskih vzorcih 28-letne bolnice .....	61

## KAZALO SLIK

Slika 1: Prisotnost različnih označevalcev okužbe s HBV (Trépo in sod., 2014: 2055)	11
Slika 2: Shematski prikaz genoma HDV (Beeharry in sod., 2014: 166)	18
Slika 3: Shematski prikaz molekul HDV RNA (Alfaiate in sod., 2015: 114)	19
Slika 4: Shematski prikaz časovnega poteka okužbe s HBV in HDV pri bolnikih v raziskavi Schaperja in sod. (2010) (Wedemeyer, 2010: 628)	25
Slika 5: Prevalenca okužbe s HDV med nosilci HBsAg in geografska razporeditev genotipov HDV (Alfaiate in sod., 2015: 120)	35
Slika 6: Serološke značilnosti sočasne in nacepljene okužbe s HBV in HDV ter kroničnega hepatitisa D (Seme in sod., 2011: 98)	37
Slika 7: Grafični prikaz izračuna točkovne prevalence in pripadajočih intervalov zaupanja (Sergeant, 2016: 1)	58

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
Da	dalton, enota za merjenje atomske mase
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dsDNA	dvojnovijačna DNA (angl. <i>double-stranded DNA</i> )
ELISA	encimskoimunski test (angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
ER	endoplazmatski retikulum
HBcAg	beljakovina nukleokapside virusa hepatitisa B (angl. <i>HBV core antigen</i> )
HBeAg	nestrukturna, topna beljakovina virusa hepatitisa B (angl. <i>HBV envelope antigen</i> )
HBsAg	beljakovina ovojnice virusa hepatitisa B (angl. <i>HBV surface antigen</i> )
HBV	virus hepatitisa B (angl. <i>hepatitis B virus</i> )
HCV	virus hepatitisa C (angl. <i>hepatitis C virus</i> )
HDV	virus hepatitisa D (angl. <i>hepatitis D virus</i> )
HIV	človeški virus imunske pomanjkljivosti (angl. <i>human immunodeficiency virus</i> )
IFN- $\alpha$	interferon alfa
IU	mednarodna enota, merska enota za količino snovi (angl. <i>international unit</i> )
IZ	interval zaupanja
IUD	injicirajoči uživalci nedovoljenih drog
JCK	jetrnocelični karcinom (angl. <i>hepatocellular carcinoma</i> )
mRNA	sporočilna RNA (angl. <i>messenger RNA</i> )
NK	nukleinska kislina
nt	nukleotid
ORF	odprtji bralni okvir (angl. <i>open reading frame</i> )
OZ	oligonukleotidni začetnik
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i> )
RNA	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i> )
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. <i>real-time polymerase chain reaction</i> )
rt-RT-PCR	obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. <i>real-time reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
ssRNA/DNA	enovijačna RNA/DNA (angl. <i>single-stranded RNA/DNA</i> )

## 1 UVOD

Virusni hepatitis je sistemski okužba s hepatotropnimi virusi, ki primarno povzročajo vnetje jeter. Kljub številnim preventivnim ukrepom virusni hepatitisi še vedno predstavljajo svetovni javnozdravstveni problem s pomembnim deležem obolenosti in smrtnosti. Virusni hepatitisi se pojavljojo po vsem svetu, vendar se razširjenost posameznih vrst virusnih hepatitisov in način prenosa okužbe med državami v razvoju in razvitimi državami pomembno razlikuje. V skupino primarnih povzročiteljev virusnega hepatitisa uvrščamo virus hepatitisa A (HAV), virus hepatitisa B (HBV), virus hepatitisa C (HCV), virus hepatitisa D (HDV) in virus hepatitisa E (HEV). Virusnemu hepatitisu podobno stanje lahko povzročijo tudi različni drugi, sekundarni virusi hepatitisa, npr. humani virus citomegalije, virus Epstein-Barr, virus herpes simpleksa, virus varičele-zostra, virus rdečk, virus ošpic, virus mumpsa, virus rumene mrzlice, adenovirusi in enterovirusi (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014).

Klinični znaki akutnega virusnega hepatitisa so večinoma enaki ne glede na povzročitelja, akutni okužbi s HBV, HDV ali HCV pa pri deležu bolnikov sledi kronični hepatitis, ki lahko vodi do ciroze jeter in jetrnoceličnega karcinoma (JCK) (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014). JCK je ena izmed redkih vrst rakavih bolezni z naraščajočo pojavnostjo v svetu (Thomas in sod., 2015).

Okužba s HDV je možna le ob predhodni ali sočasni okužbi s HBV, saj se HDV ne more pomnoževati neodvisno od HBV. Ob sočasni okužbi s HDV in HBV akutnemu hepatitisu D ponavadi sledi spontana izguba HDV in ozdravitev, medtem ko se ob nacepljeni okužbi s HDV pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B pogosteje razvije kronični hepatitis povzročen z obema virusoma. V primerjavi z bolniki s kroničnim hepatitisom B se pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B in D bistveno pogosteje razvijejo ciroza, dekompenzacija jeter in jetrnocelični karcinom (Seme in sod., 2011).

Laboratorijske znake prebolelega ali aktivnega hepatitisa D lahko dokažemo pri 0-15 % bolnikov s kroničnim hepatitisom B (Seme in sod., 2011), zato ocenjujejo, da je na svetu med 15 in 20 milijonov ljudi okuženih s HDV (Alfaiate in sod., 2015).

Štunf in sod. (2005) so izvedli doslej edino raziskavo prevalence HDV v Sloveniji, v katero so vključili 400 serumskih vzorcev, ki so bili bolnikom s kroničnim hepatitisom B odvzeti med leti 1998 in 2002, ter ocenili, da je v Sloveniji 0,25 % (95 % IZ: 0,044-1,402 %) bolnikov s kroničnim hepatitisom B okuženih tudi s HDV (Štunf in sod., 2005).

Prevalenca okužbe s HDV se je v zadnjih 20 letih, predvsem v južni Evropi, znižala, medtem ko je v zahodni Evropi ponovno začela naraščati zaradi priseljevanja ljudi z

endemskih področij, predvsem iz Afrike, vzhodne Evrope, Turčije in Bližnjega vzhoda (Alfaiate in sod., 2015; Rizzetto, 2015).

## 1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V prvem delu diplomske naloge smo želeli določiti prevalenco okužbe s HDV pri slovenskih bolnikih s kroničnim hepatitisom B, ki so bili kot HBsAg-pozitivni prvič opredeljeni med letoma 2002 in 2015. Pričakovali smo, da bomo prisotnost celokupnih protiteles proti HDV dokazali v manj kot 1 % testiranih vzorcev in dokazali, da se prevalenca okužbe s HDV v Sloveniji v zadnjih 15 letih ni spremenila.

V drugem delu naloge smo želeli pri posameznikih z dokazano izpostavitvijo HDV opredeliti, ali gre za akutno, kronično ali prebolelo okužbo s HDV. Pričakovali smo, da bomo pri večini posameznikov dokazali, da so hepatitis D preboleli v preteklosti in niso več aktivno okuženi.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 VIRUS HEPATITISA B

Baruch Samuel Blumberg je leta 1965 v serumskem vzorcu bolnika s kroničnim hepatitisom odkril glavni virusni antigen (HBsAg) virusa hepatitisa B (angl. *hepatitis B virus*; HBV) in za svoje odkritje leta 1976 prejel Nobelovo nagrado za medicino in fiziologijo. HBV so dokončno opredelili Dane in sod. leta 1970 (Dane in sod., 1970). Svetovna zdravstvena organizacija (angl. *World Health Organization*; WHO) ocenjuje, da na svetu s HBV kronično okuženih 350 milijonov ljudi, zaradi posledic okužbe s HBV pa vsako leto umre skoraj milijon ljudi.

HBV, ki lahko okuži človeka, primate in nekatere opice, taksonomsko uvrščamo v družino *Hepadnaviridae*, rod *Orthohepadnavirus* (Seme in sod., 2011). Za vse viruse te družine je značilno, da so hepatotropni, z genomom v obliki sproščene krožne DNA in se podvajajo preko obratne transkripcije (Nassal, 2008).

Genotipi HBV se med seboj razlikujejo v vsaj 8 % nukleotidnega zaporedja (Seme in sod., 2011). Do januarja 2016 je bilo opredeljenih 10 različnih genotipov HBV, ki so označeni s črkami od A do J in so različno geografsko porazdeljeni; genotipa B in C se najpogosteje pojavljata v Aziji, genotipa A in D krožita v Evropi in Združenih državah Amerike, genotip G se pojavlja po vsem svetu, genotip H kroži v Srednji Ameriki, genotipa I in J se pojavljata v posameznih regijah v Aziji, genotipa E in F pa sta pogosta v Afriki ter v Srednji in Južni Ameriki (Giersch in Dandri, 2015). Genotipi HBV imajo najverjetnejše pomen pri kliničnem poteku hepatitisa B, odzivu na zdravljenje in napovedi izida bolezni (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014; Horvat in Taylor, 2015).

#### 2.1.1 Zgradba in pomnoževanje HBV

HBV je 42 nm velik virus z ovojnico, ki je sestavljena iz lipidnega dvosloja, ki izvira iz celice gostitelja ter vsebuje virusno beljakovino HBsAg (angl. *HBV surface antigen*). Znotraj ovojnice je 27 nm velika nukleokapsida, zgrajena iz virusne beljakovine HBcAg (angl. *HBV core antigen*). V serumu bolnikov s kroničnim hepatitisom B so prisotne tri morfološke oblike HBV. Manjši kroglasti delci premera 22 nm ter podolgovati delci širine 22 nm in dolžine 200 nm so sestavljeni le iz virusne ovojnice. Tretja morfološka oblika, t.i. Danejevo telesce, je kroglaste oblike, premera 42 nm in predstavlja celoten infektivni virus, ki je v serumu bolnikov, izmed vseh morfoloških oblik, prisoten v najmanjšem številu. V serumu je moč dokazati tudi proste, nevezane beljakovine HBsAg (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014). Vzrok za nastanek omenjenih morfoloških oblik je količina sintetizirane beljakovine HBsAg, ki močno presega količino nastalih virusnih nukleokapsid (Horvat in Taylor, 2015).

Izmed vseh virusov, ki lahko okužijo človeka, je HBV edini virus, katerega genom je sestavljen iz deloma dvojnovijačne in deloma enovijačne DNA, z negativno polarno verigo polne dolžine in nepopolno pozitivno polarno verigo. V infektivnem virusnem delcu molekula DNA zavzame "sproščeno krožno" obliko (angl. *relaxed circular DNA, rcDNA*). Genom HBV je dolg 3.200 nukleotidov in vsebuje 4 prekrivajoče se kodirajoče regije: S, C, P in X. Področje S nosi zapis za beljakovino virusne ovojnice (HBsAg). Področje C nosi zapis za celotno beljakovino virusne nukleokapside (HBcAg), ki je prisotna samo v jetrih, ter zapis za njeno krajšo, topno različico (HBeAg), ki je prisotna v serumu (Seme in sod., 2011), in morda sodeluje pri preusmerjanju imunskega odziva (Dandri in Locarnini, 2012). Področje P nosi zapis za virusno DNA polimerazo (od RNA odvisna DNA polimeraza – reverzna transkriptaza), področje X pa zapis za beljakovino, ki vpliva na prepisovanje tako virusnega kot celičnega genoma (Seme in sod., 2011). Genom HBV vsebuje štiri promotorje, dve ojačevalni področji (Enh1, Enh2) in dve neposredni ponovitvi (DR1, DR2) (Gish in sod., 2015). HBV je tudi edini izmed človeških DNA virusov, ki se pomnožuje preko obratnega prepisovanja (Matičič, 2014).

Vezavo in vstop HBV v posamezne hepatocite omogoča jetrni žolčnokislinski transporter (angl. *human sodium-taurocholate cotransporting polypeptide, hNTCP*), ki sodeluje pri enterohepatičnem kroženju žolčnih soli in se večinoma izraža na bazolateralni membrani diferenciranih hepatocitov (Yan in sod., 2012). Virus v celico najverjetneje vstopi s klatrinsko posredovano endocitozo, kateri sledi sprostitev nukleokapside iz endocitotskega vezikla. Nukleokapsida nato po mikrotubulih potuje v bližino celičnega jedra, kjer se med prenosom skozi jedrni transportni sistem razgradi - tako v jedro vstopi samo virusna DNA, ki ima na enem koncu kovalentno vezano virusno beljakovino P (Kann in sod., 2007; Schmitz in sod., 2010; Königer in sod., 2014). V jedru se s pomočjo celičnih encimov zaključi sinteza virusne DNA in nastane v celoti dvojnovijačna DNA, ki jo imenujemo kovalentno zaprta krožna DNA (angl. *covalently closed circular DNA, ccc-DNA*). ccc-DNA se s histonskimi in nehistonskimi beljakovinami poveže v minikromsom, na osnovi katerega se sintetizira pregenomska molekula RNA (pgRNA), v dolžini 3.500 nukleotidov, in več krajših sporočilnih molekul RNA (mRNA) iz delno prekrivajočih se odprtih bralnih okvirjev (angl. *open reading frame; ORF*). mRNA se v citoplazmi prevede v beljakovine kapside, pgRNA pa se skupaj z DNA polimerazo "zapakira" v nov virusni delec, znotraj katerega reverzna transkriptaza sintetizira nov virusni genom. Del novonastalih virionov ponovno potuje do jedra in sprosti svojo DNA, preostali virioni pa z brstenjem nukleokapside v lumen endoplazmatskega retikuluma (ER) pridobijo virusno ovojnico in površinske beljakovine (Seme in sod., 2011). Infektivni delci iz celice najverjetneje izstopijo preko multivezikularnih teles (angl. *multivesicular bodies*), subvirusni delci (brez genoma) pa preko Golgijskega aparata (Alfaiate in sod., 2015).

Rezultat prepisovanja virusne DNA je pet različno dolgih, med seboj delno prekrivajočih se mRNA molekul. Kodirajoča področja za HBsAg in HBcAg imajo več različnih mest za začetek prepisovanja, kar vodi v sintezo strukturnih beljakovin različnih velikosti in bioloških lastnosti (Seme in sod., 2011; Gish in sod., 2015). Tako nastanejo 3 različne površinske (transmembranske) beljakovine, ki imajo enako C-terminalno domeno in različne N-terminalne domene: mala (S), ki vsebuje le domeno S, srednja (M), ki vsebuje domeni pre-S1 in S, ter velika (L), ki vsebuje domene pre-S1, pre-S2 in S. Pre-S1 domena beljakovine L je ključna za infektivnost virusa oz. njegovo vezavo na celični receptor NTCP (Yan in sod., 2012).

Ker virusna reverzna transkriptaza ne popravlja napačno vgrajenih nukleotidov ima genom HBV izjemno visoko stopnjo mutacij; pri posameznem bolniku tako najdemo veliko različic virusa, ki jih imenujemo *quasispecies* (Seme in sod., 2011).

### **2.1.2 Patogeneza HBV in imunski odziv**

Za bolj ali manj učinkovit nadzor oz. omejevanje pomnoževanja HBV in obenem za poglavitev poškodb jeter je odgovoren celično posredovan imunski odgovor na skoraj vse virusne antogene na membrani hepatocitov. Pri nadzorovanju virusne okužbe je najpomembnejši sistem pridobljene imunosti, predvsem nastanek specifičnih citotoksičnih limfocitov T, medtem ko je za ugoden izid akutnega hepatitis B prav tako pomemben tudi humoralni imunski odziv oz. nastanek protiteles anti-HBs (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014; Trépo in sod., 2014). Odziv prirojene imunosti na okužbo s HBV je šibek. Naravni potek bolezni po okužbi s HBV je odvisen od lastnosti virusa, njegove koncentracije ter imunskega odziva in starosti gostitelja. Močnejši kot je imunski odziv in več hepatocitov kot je okuženih, težja je klinična slika hepatitis B. Blag ali srednje izražen imunski odziv v času akutne okužbe povzroči zmerno obliko akutnega hepatitis in omogoči zazdravitev virusne okužbe. Ljudje, ki serološko okrevojo po akutni okužbi s HBV, imajo močan T-celični odziv na več različnih epitopov virusnega genoma, pri kronično okuženih bolnikih pa je ta odziv šibek in usmerjen na manjše število epitopov. Za prehod v kronično bolezen HBV domnevno uporabi mehanizme, s katerimi preusmeri delovanje imunskega odziva ali se mu izogne (Gish in sod., 2015). Izredno agresiven imunski odziv naj bi bil odgovoren za nastanek fulminantne oblike hepatitis B, pa tudi za poslabšanje kroničnega hepatitis B (Trépo in sod., 2014).

Po okužbi s HBV se lahko razvije simptomatski ali asimptomatski akutni hepatitis. Pri delu bolnikov se okužba "zazdravi" oz. preide v dolgoletno klinično remisijo, pri deležu bolnikov pa se razvije kronični hepatitis B (Seme in sod., 2011). Izid akutnega hepatitis B je odvisen predvsem od starosti, pri kateri se bolnik okuži, in od načina

prenosa virusa. Pri 95 % novorojenčkov, 20-30 % otrok med 1. in 5. letom starosti in manj kot 5 % odraslih akutni hepatitis B napreduje v kronični hepatitis B (Seme in sod., 2011; Trépo in sod., 2014).

Ne glede na način okužbe oz. starost ob okužbi lahko klinični potek kroničnega hepatitis B razdelimo na zaporedne faze (Seme in sod., 2011), ki so opredeljene na podlagi specifičnih seroloških, viroloških in biokemijskih značilnosti: koncentracije serumske ALT in HBsAg, prisotnosti ali odsotnosti HBeAg ter viremije (Giersch in Dandri, 2015).

Prva nastopi **faza imunske tolerance**, med katero je serumska koncentracija virusne DNA nad 20.000 IU/ml oz. pogosto nad  $10^6$  IU/ml, vrednosti jetrnih encimov pa so normalne (Seme in sod., 2011), zato to obdobje imenujejo tudi faza "intenzivnega pomnoževanja in šibkega vnetja" (angl. "*high replicative, low inflammatory*" phase) (Gish in sod., 2015). V fazi imunske tolerance lahko dokažemo tudi prisotnost beljakovine HBeAg ter visoko koncentracijo HBsAg ( $>10^5$  IU/ml). Pri bolnikih, ki so se s HBV okužili perinatalno ali v zgodnjem otroštvu, lahko omenjena faza traja 20-40 let brez vidnega napredovanja bolezni. Novi podatki kažejo, da naj bi bila za vzpostavitev imunske tolerance pri dojenčkih odgovorna popolna odsotnost antigenske predstavitev HBV specifičnim T celicam v maternici, obenem pa naj bi okužba s HBV pri nosečnicah vplivala na povišanje koncentracije določenih citokinov, ki v plodu sproži pospešeno zorenje celic prirojenega imunskega odziva. S tem postane novorojenčkov prirojeni imunski odziv proti ostalim, tudi bakterijskim patogenom, močnejši (angl. *trained immunity*), kar kaže na potencialen simbiontski odnos med HBV in gostiteljem (Hong in sod., 2015). Pri osebah, ki so se s HBV okužile v odrasli dobi, faza imunske tolerance lahko traja le nekaj tednov. Kljub odsotnosti citopatskih sprememb v fazi imunske tolerance, dolgoletna prisotnost visoke viremije močno poveča tveganje za nastanek JCK, saj v tem obdobju zaradi virusne integracije v genomu hepatocitov nastanejo številne spremembe (Seme in sod., 2011). HBV DNA se v celični genom integrira naključno in lahko povzroči aktivacijo proto-onkogenov ali zavre uravnavanje izražanja genov (Horvat in Taylor, 2015).

Obdobju imunske tolerance sledi **imunsko aktivna faza**, imenovana tudi faza imunskega čiščenja, med katero se prične intenziven imunski odziv in v jetrih nastanejo glavne patocitološke spremembe. V omenjeni fazi se znižajo serumske koncentracije HBeAg, virusne DNA in HBsAg ( $10^3$ - $10^4$  IU/ml), naraste pa koncentracija jetrnih encimov (ALT), ki nato začne nihati (Chan in sod., 2010; Seme in sod., 2011; Trépo in sod., 2014) Prehod iz faze imunske tolerance v imunsko aktivno fazo je včasih povsem neopazen, saj so bolniki s HBeAg-pozitivnim kroničnim hepatitisom B pogosto asimptomatski (Horvat in Taylor, 2015).

Sčasoma sledi serokonverzija anti-HBe in izguba HBeAg z več možnimi kliničnimi izidi. Večina HBeAg-negativnih oz. 70-80 % anti-HBe-počitivnih bolnikov po serokonverziji vstopi v **fazo neaktivnega nosilstva HBsAg** (angl. *inactive carrier*), za katero je značilna umiritev vnetja v jetrih, znižanje koncentracije ALT in HBV DNA v serumu ali plazmi (<2000 IU/ml ali do nezaznavne koncentracije) ter postopen upad koncentracije HBsAg do  $10^2$ - $10^3$  IU/ml (Seme in sod., 2011; Trépo in sod., 2014). Bolniki, ki ostanejo v fazi neaktivnega nosilstva virusa, imajo dobro prognozo (Trépo in sod., 2014). V fazi neaktivnega nosilstva HBsAg pomnoževanje HBV ni popolnoma ustavljen, zato pri določenem deležu bolnikov lahko pride do **reaktivacije hepatitis** (Seme in sod., 2011). Za fazo reaktivacije hepatitis B je značilen porast koncentracije virusne DNA in/ali ALT (koncentracija ALT je lahko več kot petkrat višja od zgornje meje za normalno vrednost) (Trépo in sod., 2014). Pri 0,1-2 % neaktivnih nosilcev HBsAg lahko pride do **spontane popolne izgube HBsAg** in razvoja protiteles anti-HBs. Ker pri navidezno ozdravljenih bolnikih cccDNA HBV in integrirana virusna DNA še vedno ostaneta prisotni v hepatocitih, spontana izguba HBsAg pomeni le dolgoletno klinično remisijo z možnostjo reaktivacije v obdobju imunosupresije (Seme in sod., 2011; Gish in sod., 2015). Za opisano vrsto okužbe, ki jo imenujemo tudi **okultna** (angl. *occult*) **okužba**, je značilno, da je HBV DNA zaznavna v jetrih, medtem ko je v serumu nezaznavna ali pa občasno komaj zaznavna; vrednost ALT je normalna, prisotna pa so protitelesa anti-HBs in anti-HBc (Trépo in sod., 2014; Gish in sod., 2015). Nastanek prikrite okužbe s HBV vzpodbudijo številne mutacije, ki onemogočajo izražanje HBsAg in drugih virusnih beljakovin. Prikrita oblika okužbe je pogostejša v endemskih območjih, klinično pa je pomembna, ker so lahko ti bolniki vir prenosa HBV s krvjo (Seme in sod., 2011).

Kljub serokonverziji HBeAg ostane približno tretjina bolnikov v imunsko aktivni fazi, z vztrajno povišanimi vrednostmi jetnih encimov in virusnim bremenom nad 2000 IU/ml plazme, kar opredelimo kot **HBeAg-negativen kronični hepatitis B**, ki ima relativno slabo prognozo s povečanim tveganjem za nastanek ciroze jeter in JCK (Seme in sod., 2011; Trépo in sod., 2014). Pri HBeAg-negativnem hepatitisu B gre za okužbo s sevom HBV, ki nosi mutacijo v promotorju gena za beljakovino HBcAg in sintetizira le beljakovino HBcAg, ne pa tudi beljakovine HBeAg (Horvat in Taylor, 2015). HBeAg-negativna oblika kroničnega hepatitisa B je v Sloveniji zelo pogosta (Seme in sod., 2011).

### 2.1.3 Klinična slika hepatitisa B

Po obdobju inkubacije, ki traja od 30 do 180 dni, v povprečju pa 60-90 dni, se simptomatski akutni hepatitis B pojavi pri tretjini bolnikov, ki so se okužili v odrasli dobi, in pri manj kot 10 % okuženih otrok, mlajših od petih let. Pri ostalih bolnikih akutni hepatitis B poteka subklinično, asimptomatsko ali kot blaga bolezen, podobna

gripi. Klinično izražena akutna bolezen se prične z neznačilnimi prebavnimi težavami, 10-20 % bolnikov ima izpuščaj z bolečimi in oteklimi sklepi, po manj kot enem tednu pa sledi obdobje neznačilnih simptomov, kot so utrujenost, zmerno povišana telesna temperatura, slabost, bruhanje, neješčnost in izguba teže. Simptomi pri otrocih izzvenijo po treh tednih, pri odraslih pa po štirih do šestih tednih. Zatem se navadno pojavi zlatenica, ki lahko traja nekaj tednov (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014; Thomas in sod., 2015). Pri nekaterih bolnikih je opaziti tudi temno obarvan urin, sivo obarvano blato in povečana jetra (Horvat in Taylor, 2015). Akutni hepatitis B pri 0,1-2,0 % bolnikov lahko poteka v fulminantni obliku, kar se kaže s hitrim pešanjem jetrne funkcije (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014) ter lahko vodi v akutno odpoved delovanja jeter, jetrno encefalopatijo in komo. Fulminantni potek hepatitisa B ima 80 % stopnjo umrljivosti, če bolnikom ne presadijo jeter (Trépo in sod., 2014; Thomas in sod., 2015).

Če se pri bolniku okužba s HBV ne zazdravi po šestih mesecih, postane bolnik kronični nosilec HBV. Kronični hepatitis se razvije pri 5-10 % bolnikov, ki so se okužili v odrasli dobi, pogosteje pri tistih, ki so akutni hepatitis B preboleli subklinično ali anikterično. Pri imunsko oslabelih odraslih je delež prehoda iz akutnega v kronični hepatitis B lahko do 50 %, pri novorojenčkih 95 %, pri otrocih med prvim in petim letom starosti pa 20-50 % (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014; Trépo in sod., 2014). Kronični hepatitis B lahko več let ostane nedidiagnosticiran, saj so zanj značilni nespecifični simptomi (Horvat in Taylor, 2015). Pri tretjini bolnikov s kroničnim hepatitisom B brez protivirusnega zdravljenja po šestih letih pride do ciroze jeter; v obdobju petih let po pojavu ciroze jeter pri 23 % obolelih pride do odpovedi delovanja organa (Sundaram in Kowdley, 2015). JCK se letno razvije pri 4-6 % bolnikov z jetrno cirozo in pri 0,5 % bolnikov, ki nimajo ciroze. Po presaditvi jeter lahko pride tudi do HBV okužbe novega organa (Matičič, 2014; Horvat in Taylor, 2015; Sundaram in Kowdley, 2015). Izmed vseh s HBV kronično okuženih bolnikov, jih zaradi ciroze jeter in JCK umre 15-25 % (Trépo in sod., 2014). Večje tveganje za težji potek bolezni in nastanek JCK imajo bolniki, starejši od 30 oz. 50 let, moški, bolniki z visoko stopnjo virusnega pomnoževanja, bolniki, okuženi z genotipoma C in F (v primerjavi z genotipom B), ter bolniki, pri katerih so že ob okužbi prisotne določene mutacije v promotorju gena za beljakovino HBcAg (angl. *core promoter mutations*). Dejavniki tveganja za nastanek JCK so še izpostavljenost aflatoksinom v hrani, uživanje alkohola, kajenje, sočasna okužba s HCV in/ali HDV, prisotnost jetrne ciroze, prisotnost JCK v družini, afriško ali azijsko poreklo, debelost ter sladkorna bolezen (Seme in sod., 2011; Trépo in sod., 2014). JCK predstavlja eno izmed najbolj smrtonosnih oblik raka, saj je relativno odporen proti večini kemoterapevtikov (Thomas in sod., 2015).

Medtem, ko akutni hepatitis B redko, kronični hepatitis B v 10-20 % primerov spremljajo različne zunaj-jetrne bolezni, npr. mešana krioglobulinemija, membranski glomerulonefritis, nodozni poliarteritis, vaskulitis ter aplastična anemija, ki so posledica

krožecih imunskih kompleksov (Matičič, 2014) oz. avtoimuskih procesov in kronične imunske aktivacije ter neuravnoteženega humoralnega odziva (Trépo in sod., 2014; Thomas in sod., 2015).

#### **2.1.4 Epidemiologija okužbe s HBV**

Hepatitis B je najbolj pogosta kronična virusna okužba na svetu, saj ima serološke znake pretekle ali trenutne okužbe s HBV dve milijardi ljudi, 350 milijonov ljudi pa je kroničnih nosilcev HBV. Letno zaradi posledic nezdravljenega hepatitis-a B umre 780.000 oseb – nezdravljena okužba s HBV tako predstavlja deseti najpogosteji vzrok smrti na svetu (Lozano in sod., 2010; Trépo in sod., 2014).

HBV se prenaša parenteralno in se nahaja v skoraj vseh telesnih tekočinah; za prenos okužbe so najpomembnejše naslednje telesne tekočine okužene osebe: kri, slina in semenska tekočina. V blatu HBV ni bil dokazan. Skupine s povišanim tveganjem za okužbo s HBV so injicirajoči uživalci nedovoljenih drog (IUD), osebe v ustanovah zaprtega tipa, zdravstveno osebje, prejemniki transfuzije ali organov (predvsem pred uvedbo obveznega testiranja), bolniki na hemodializi, moški, ki imajo spolne odnose z moškimi, promiskuitetne osebe ter novorojenčki HBsAg-pozitivnih mater (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014; Trépo in sod., 2014). Tveganje za prenos HBV obstaja tudi pri zobozdravstvenih in lepotnih posegih, prebadanju in tetoviranju kože, manikuri, pedikuri, britju pri brivcu ter akupunkturi (Matičič, 2014; Sagnelli in sod., 2014).

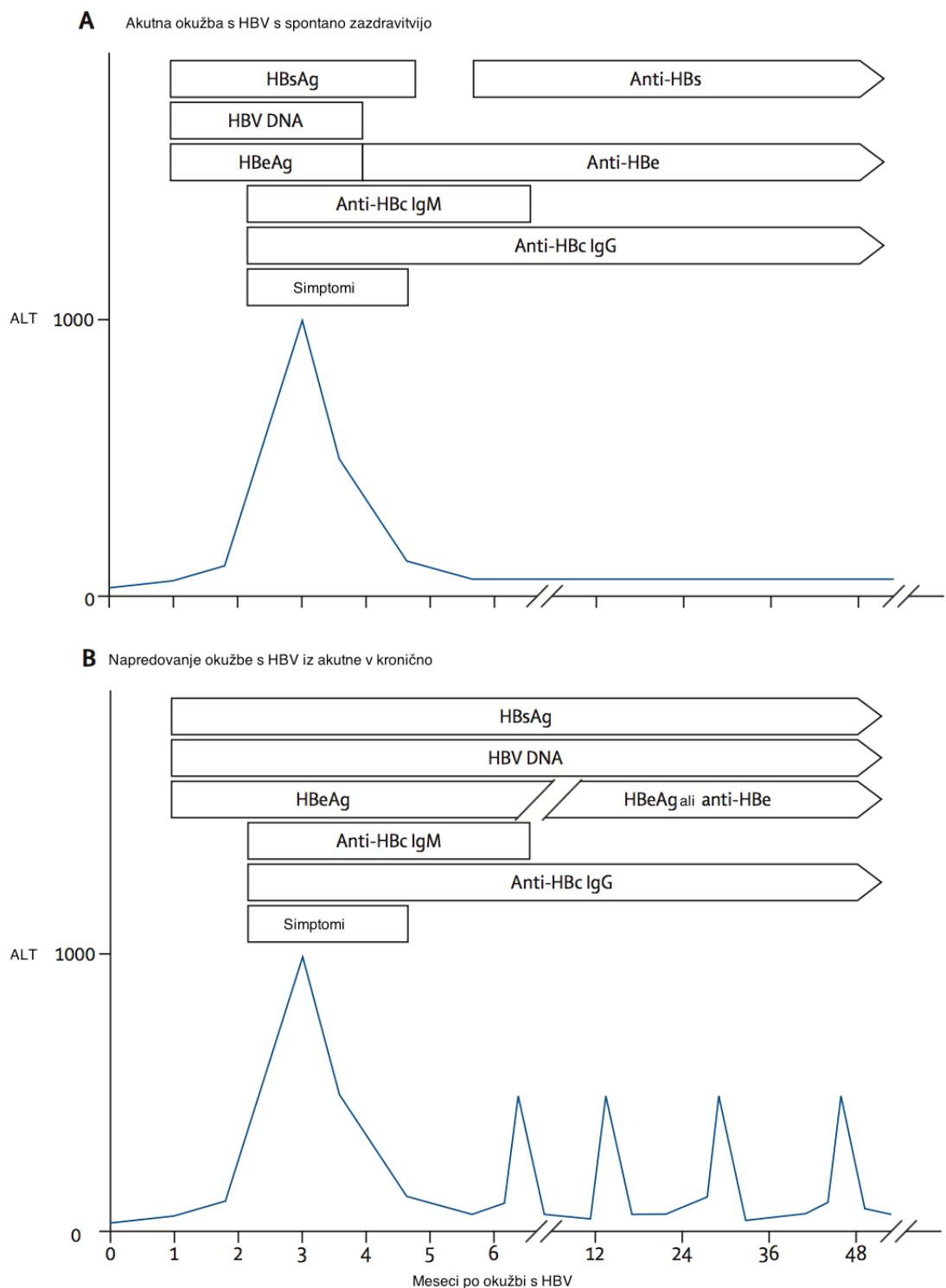
Večina (75 %) vseh s HBV okuženih bolnikov živi ali izvira iz Azije, 12 % pa iz Afrike; 45 % okuženih živi v visoko endemskih območjih, kjer je prevalenca HBV enaka ali večja od 8 % (Kitajska, jugovzhodna Azija, večina afriške celine, večina tihomorskih otokov, deli Bližnjega vzhoda in Amazonska kotlina). V visoko endemskih področjih se posamezniki s HBV večinoma okužijo perinatalno ali v zgodnjem otroštvu. Do prenosa okužbe z matere na otroka izjemoma pride tudi z dojenjem. Približno 43 % okuženih ljudi živi na območjih z zmerno prevalenco HBV (2-7 %), kar zajema južni del osrednje Azije, jugozahodno Azijo, vzhodno in južno Evropo, Rusijo ter Srednjo in Južno Ameriko. Na zmerno endemskih področjih so značilne perinatalne okužbe s HBV in okužbe tako v zgodnjem otroštvu kot tudi v odrasli dobi. Preostalih 12 % okuženih s HBV živi v nizko endemskih področjih z < 2 % prevalenco HBV (Severna Amerika, zahodna Evropa, Avstralija ter Japonska). Ljudje v nizko-endemskih območjih se s HBV večinoma okužijo v obdobju adolescence ali v odrasli dobi, najpogosteje s spolnim prenosom ali injiciranjem nedovoljenih drog. V razvitih državah na prevalenco HBV pomembno vpliva preseljevanje, saj je po podatkih meta-raziskave s HBV okuženih 7,2 % vseh migrantov, serološko pozitivnih po pretekli okužbi pa 39,7 % vseh migrantov (Rossi in sod., 2012; Trépo in sod., 2014; Gish in sod., 2015).

### **2.1.5 Mikrobiološka diagnostika hepatitisa B**

Mikroskopiranje se pri dokazovanju okužbe s HBV ne uporablja, pač pa se z mikroskopiranjem jetrnih biopsijskih vzorcev oceni histološko napredovanje bolezni in odziv na zdravljenje. HBV lahko hepatocite okuži tudi *in vitro*, vendar se kultivacija v diagnostiki ne uporablja (Horvat in Taylor, 2015).

Temelj rutinskega opredeljevanja okužbe s HBV so serološke preiskave, večinoma v obliki encimskoimunskih testov, s katerimi v serumu bolnikov dokazujemo šest poglavitnih označevalcev okužbe s HBV: virusni beljakovini HBsAg in HBeAg, protitelesa anti-HBs, celokupna protitelesa anti-HBc, protitelesa anti-HBc IgM in protitelesa anti-HBe. Serološke preiskave dopolnjuje merjenje koncentracije HBV DNA, z rezultatom podanim v IU HBV DNA/ml sera. Zaradi velikega števila diagnostičnih kazalcev, variabilnosti kliničnega poteka bolezni in pojavljanja virusnih mutant, je potrebno pri diagnostiki upoštevati tudi ostale klinične in histološke dejavnike (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014).

Na sliki 1 ter v preglednici 1 je prikazana prisotnost različnih seroloških in molekularnih označevalcev okužbe s HBV med potekom hepatitisa B.



Slika 1: Prisotnost različnih označevalcev okužbe s HBV (Trépo in sod., 2014: 2055). A: Akutna okužba s HBV. B: Napredovanje akutne okužbe s HBV v kronično. ALT: alanin aminotransferaza.

Preglednica 1: Prisotnost različnih seroloških in molekularnih označevalcev v različnih obdobjih akutnega in kroničnega hepatitisa B (Seme in sod., 2011: 91; Horvat in Taylor, 2015: 1843)

		HBsAg	HBeAg	protitelesa anti-HBc IgM	celokupna protitelesa anti-HBc	protitelesa anti-HBe	protitelesa anti-HBs	HBV DNA (IU/ml)
Akutni hepatitis B	Prodromalna faza akutnega hepatitisa B	+	-	-	-	-	-	+
	Zgodnja faza akutnega hepatitisa B	+	+	+/-	-	-	-	+
	Akutni hepatitis B	+	+	+	+	-	-	+
	Pozna faza akutnega hepatitisa B	+	-/+	+	+	-/+	-	+
	Zgodnja faza okrevanja po nedavni okužbi	-	-	++	+	+	+++	-/+
Kronični hepatitis B	Faza imunske tolerance	+	+	-	+	-	-	+++
	HBeAg-pozitivni kronični hepatitis B	+	+	-/+	+	-	-	>20.000
	HBeAg-negativni kronični hepatitis B	+	-	-/+	+	+	-	>20.000
	Poslabšanje kroničnega hepatitisa B	+	+/-	+	+	-/+	-	>20.000
	Neaktivni nosilec HBsAg	+	-	-	+	-/+	-	<2.000
	Uspešno cepljenje proti HBV	-	-	-	-	-	+	-
Zazdravljeni okužbi s HBV		-	-	-	+	-/+	-/+	-

+: pozitivno, -: negativno, -/+ in +/-: pozitivno ali negativno, ++: visoko pozitivno, +++: izrazito visoko pozitivno

Najpogosteje uporabljen serološki označevalec okužbe s HBV je HBsAg, ki je prisoten tako pri akutni kot pri kronični okužbi in pomeni izrazito kužnost posameznika, zato se dokazovanje HBsAg uporablja tudi za dnevno presejalno testiranje krvodajalcev in nosečnic. HBsAg lahko v krvi dokažemo dva do deset tednov pred pojavom simptomov akutnega hepatitisa B; obdobje okužbe pred pojavom HBsAg imenujemo prvo diagnostično okno. Nekaj tednov po pojavu simptomov HBsAg iz krvi izgine pri 90 % oseb, ki so se okužile v odrasli dobi, in pri 10-20 % oseb, ki so se okužile perinatalno ali v otroštvu. HBsAg dokazujemo kvalitativno in/ali kvantitativno (koncentracija je izražena v IU/ml), saj serumska koncentracija HBsAg neposredno odraža nivo virusnega izražanja, je dober napovedni dejavnik akutnega hepatitisa B in reaktivacije kroničnega hepatitisa B ter je odvisna od uspešnosti zdravljenja. Kvantifikacija HBsAg pomaga tudi pri razločevanju med neaktivnim nosilstvom HBsAg in HBeAg-negativnim kroničnim hepatitisom. V času akutnega hepatitisa B sta koncentraciji HBsAg in HBV DNA v krvi medsebojno odvisni, nato pa postaneta neodvisni (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014). Pri bolnikih, ki so okuženi z mutiranimi različicami HBsAg, so rezultati rutinskih seroloških testov lahko lažno negativni, zato pri njih v serumu določamo tudi prisotnost HBV DNA. V mnogih državah tako vse krvodajalce dodatno

testirajo še na prisotnost celokupnih protiteles anti-HBc, v ZDA pa še na prisotnost HBV DNA (Seme in sod., 2011; Horvat in Taylor, 2015).

V kolikor se hepatitis B zazdravi, lahko nekaj tednov pred ali nekaj tednov po izginotju HBsAg dokažemo protitelesa anti-HBs. Obdobje med izginotjem HBsAg in pojavom protiteles anti-HBs se imenuje drugo diagnostično okno, ki lahko traja tudi do nekaj let. Protitelesa anti-HBs v krvi imunsko-kompetentnih oseb ostanejo še nekaj desetletij po okužbi ali cepljenju in ščitijo pred ponovno okužbo. Učinkovitost cepljenja tako preverjamo s kvantitativnim določanjem protiteles anti-HBs (v IU/ml). Če šest mesecev po prvem pojavu HBsAg ne pride do serokonverzije protiteles anti-HBs, gre pri bolniku za trajno nosilstvo HBsAg, ki večinoma vodi v kronični hepatitis B (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014; Trépo in sod., 2014).

Nekaj dni po pojavu HBsAg lahko v serumu zaznamo tudi HBeAg, ki nato po nekaj tednih akutnega hepatitis pri večini bolnikov, ki so se okužili v odrasli dobi, izgine iz krvi. Po izginotju HBeAg se pojavijo protitelesa anti-HBe, ki niso zaščitna. HBeAg v krvi bolnikov s kroničnim hepatitisom B je pokazatelj virusnega pomnoževanja, povezan pa je tudi s kužnostjo bolnika ter z visoko vnetno aktivnostjo hepatitis B; kljub temu dokazovanje HBeAg v ta namen vse pogosteje nadomešča kvantifikacija HBV DNA. Pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B, ki so se okužili perinatalno ali v zgodnjem otroštvu, izguba HBeAg navadno pomeni umiritev virusnega pomnoževanja in vnetja. Pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B, ki so se s HBV okužili v odrasli dobi, je odsotnost HBeAg ob prisotnosti HBsAg in protiteles anti-HBe pogosto znak HBeAg-negativnega kroničnega hepatitis, ki ga potrujemo z določanjem HBV DNA in jetrnih encimov. Koncentracija HBV DNA, višja od 20.000 IU/ml, ob odsotnosti HBeAg zagotovo kaže na HBeAg-negativen kronični hepatitis (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014; Trépo in sod., 2014).

Celokupna protitelesa anti-HBc so prisotna v vseh časovnih obdobjih okužbe s HBV, razen v obdobju pred pojavom HBsAg in nekaj dni po njem - pri akutnem hepatitisu B se pojavijo 1-2 tedna po pojavu HBsAg in najpogosteje ostajajo dosmrtno, niso pa zaščitna. Dokazovanje celokupnih protiteles anti-HBc se skupaj z dokazovanjem HBsAg uporablja za presejalno testiranje prekuženosti populacije s HBV, saj na ta način lahko dokažemo sedanje in pretekle okužbe s HBV. Visok titer protiteles anti-HBc IgM je večinoma zanesljiv pokazatelj akutnega hepatitis B, medtem ko nizek titer lahko dokažemo tudi med reaktivacijo kroničnega hepatitis B, zato z dokazom protiteles anti-HBc IgM v vseh primerih ni mogoče ločiti med akutnim in kroničnim hepatitisom B (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014; Trépo in sod., 2014). V krvi nekaterih oseb lahko izmed vseh označevalcev okužbe s HBV dokažemo le celokupna protitelesa anti-HBc (angl. *anti-HBc alone status* ali *isolated anti-HBc*); pri večini oseb gre za preteklo prebolelo okužbo s HBV, 10 % oseb pa je kužnih kroničnih nosilcev HBV, kar lahko

potrdimo s kvantifikacijo serumske HBV DNA (Seme in sod., 2011; Trépo in sod., 2014). Pri bolnikih, pri katerih dokažemo samo celokupna protitelesa anti-HBc, lahko ob morebitni imunosupresiji pride do reaktivacije okužbe (Trépo in sod., 2014; Horvat in Taylor, 2015).

Serumska koncentracija HBV DNA je neposredni pokazatelj virusne aktivnosti (pomnoževanja) in kužnosti bolnika. Kvantifikacija HBV DNA v krvi se uporablja predvsem za spremljanje učinkovitosti protivirusnega zdravljenja, saj HBV DNA, ki je v krvi okužene osebe prisotna v vseh fazah bolezni, izgine le v primeru zazdravite. HBV DNA se v krvi pojavi 7-14 dni po okužbi oz. 3-4 tedne pred pojavom HBsAg in je pri bolnikih z akutnim hepatitisom B vedno prisotna tudi med prvim in drugim diagnostičnim oknom. Med potekom kroničnega hepatitisu B lahko koncentracija HBV DNA niha od nezaznavne količine do  $10^9$  IU/ml (Trépo in sod., 2014). Za določanje koncentracije HBV DNA se najpogosteje uporablja verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. *real-time polymerase chain reaction, RT-PCR*), s katero lahko natančno izmerimo koncentracijo HBV DNA od 5-50 IU/ml do  $10^6$ - $10^9$  IU/ml (Trépo in sod., 2014; Horvat in Taylor, 2015). Za opredeljevanje virusnega bremena HBV se lahko uporablja tudi digitalni PCR, z zanko posredovano izotermalno pomnoževanje DNA (angl. *loop-mediated isothermal amplification, LAMP*), pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem (angl. *transcription-mediated amplification, TMA*) ter pomnoževanje na način kotalečega se kroga. V uporabi so tudi biosenzorji, ki koncentracijo HBV DNA merijo na različne načine, npr. z merjenjem sprememb električnega potenciala zaradi vezave HBV DNA na elektrodo ali lovko (Liu in Yao, 2015).

Klinično pomembne mutacije HBV DNA, predvsem tiste povezane z odpornostjo HBV na protivirusna zdravila, večinoma dokazujemo z neposrednim določanjem nukleotidnega zaporedja, za dokaz najpogostejših mutacij pa so na voljo standardizirani molekularni testi, ki temeljijo na reverzni hibridizaciji pridelkov PCR s kratkimi specifičnimi oligonukleotidi, vezanimi na nitrocelulozno membrano. V primerjavi z neposrednim določanjem nukleotidnega zaporedja so hibridizacijski testi bolj občutljivi (Seme in sod., 2011), boljšo občutljivost pa je moč doseči tudi z metodami nove generacije za neposredno določanje nukleotidnega zaporedja. Genotipizacija HBV večinoma ni del rutinskega testiranja bolnikov, priporočljiva pa je v tistih predelih sveta, kjer znano kroži več različnih genotipov HBV (Horvat in Taylor, 2015).

## 2.1.6 Zdravljenje hepatitisa B

Akutni hepatitis B se samozazdravi pri 95 % imunsko-kompetentnih odraslih, zato je pri njih zdravljenje podporno, protivirusno pa zdravimo bolnike s fulminantnim ali dolgotrajnim težkim akutnim hepatitisom B (Seme in sod., 2011; Trépo in sod., 2014).

Pri akutni odpovedi delovanja jeter je potrebno intenzivno podporno zdravljenje in po potrebi tudi presaditev jeter (Matičič, 2014).

Kronični hepatitis B lahko poteka z različno aktivnostjo, zato ga je treba klinično in laboratorijsko nadzirati v rednih časovnih presledkih. Primarni cilj zdravljenja kroničnega hepatitisa B je preprečiti razvoj napredovale jetrne bolezni, sekundarni cilj pa je trajna odstranitev HBV DNA iz plazme, serokonverzija HBeAg s pojavom protiteles anti-HBe pri okuženih z divjim tipom virusa, izguba HBsAg ob pojavu protiteles anti-HBs ter normalizacija vrednosti serumske ALT, kar navadno spreminja tudi izboljšanje jetrne histologije (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014).

Za zdravljenje kroničnega hepatitisa B se uporablja sedem protivirusnih zdravil, odobrenih s strani FDA. Interferon alfa (IFN- $\alpha$ ), ki ima protivirusno, imunomodulatorno in protiproliferativno delovanje, se uporablja v standardni in pegilirani (vezani s polietilenglikolom) obliki. IFN- $\alpha$  epigenetsko lahko zavira tudi prepisovanje virusne cccDNA, vendar ima veliko stranskih učinkov. Zraven INF- $\alpha$  za zdravljenje kroničnega hepatitisa B uporabljamo dve skupini zdravil: nukleozidne analoge (lamivudin, entekavir in telbivudin) in nukleotidne analoge (adefovir in tenofovir). V Sloveniji sta zdravili prve izbire tenofovir in entekavir, saj se mutacije, ki povezane s primarno odpornostjo HBV proti omenjenima protivirusnima zdraviloma pojavljajo le redko (entekavir) oz. se sploh ne pojavljajo (tenofovir) (Gish in sod., 2012). Nukleot(z)idni analogi preprečujejo reverzno transkripcijo pgRNA v HBV DNA, nimajo pa neposrednega učinka na cccDNA, zato lahko po prenehanju zdravljenja pride do virusne reaktivacije - večina bolnikov tako potrebuje dolgotrajno zdravljenje (Trépo in sod., 2014). Novo kandidatno protivirusno zdravilo Myrcludex-B je miristoilirani sintetični peptid, ki se veže na receptor NTCP in prepreči vezavo in vstop virusa, med medceličnim širjenjem okužbe s HBV pa ovira tudi znotrajcelično kopiranje cccDNA (Giersch in Dandri, 2015).

### 2.1.7 Preprečevanje okužbe s HBV

Izjemno pomemben ukrep preprečevanja okužbe s HBV je obvezno dokazovanje prisotnosti HBsAg v vsej darovani krvi, darovanih organih in darovani semenski tekočini. Na prisotnost HBsAg se obvezno testira tudi vse nosečnice, dojenčki nosilk HBsAg pa v prvih urah po rojstvu prejmejo poliklonske hiperimune B imunoglobuline in prvi odmerek cepiva. V zdravstvu je v izogib okužbi s HBV pri ravnjanju s krvjo in telesnimi tekočinami potrebno dosledno upoštevati previdnostne ukrepe. Posameznik se pred okužbo s HBV lahko zaščiti z varnimi spolnimi odnosi, varnim injiciranjem nedovoljenih drog in izogibanjem ostalim znanim dejavnikom tveganja (Seme in sod., Matičič, 2014; Zakotnik in sod., 2014).

Najbolj pomemben ukrep preprečevanja hepatitisa B je zagotovo cepljenje proti hepatitisu B, ki je na voljo od leta 1981. Večinoma se uporablja cepivo, ki vsebuje prečiščen rekombinantni HBsAg, sintetiziran v glivah kvasovkah. Po treh odmerkih cepiva 90-95 % cepljenih oseb razvije zadosten titer ( $>10 \text{ mIU/ml}$ ; WHO, 2014) zaščitnih protiteles anti-HBs. Zaščita je trajna in verjetno doživljenska. Do leta 2013 je bilo cepljenje otrok proti HBV vpeljano v nacionalni program cepljenja v 183 državah, vključno s Slovenijo (Seme in sod., 2011; Horvat in Taylor, 2015). S cepljenjem je dodatno potrebno zaščititi tudi vse osebe, ki imajo povečano tveganje za okužbo s HBV. S tremi odmerki cepiva je po oceni WHO po svetu cepljenih 81 % ljudi, največ v zahodnopacifiškem področju (92 %). Cepljenje novorojenčkov je bilo do leta 2013 vpeljano v 93 državah, svetovni delež cepljenih novorojenčkov pa je bil ocenjen na 38 %, in sicer je v zahodnopacifiški regiji znašal 79 %, v Afriki pa le 11 % (WHO, 2014).

## 2.1.8 Okužba s HBV v Sloveniji

V Sloveniji je pogostost hepatitisa B v splošni populaciji ocenjena na manj kot 5 %, pojavnost pa na manj kot 1 %. Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani so med letoma 1998 in 2009 vsako leto odkrili med 109 in 172 novih primerov hepatitisa B (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014).

V Sloveniji hepatitis B preprečujemo z obveznim testiranjem krvodajalcev, nosečnic in partnerjev nosilcev HBsAg ter s cepljenjem proti hepatitisu B. Slednje je od leta 1983 obvezno za zdravstvene in druge delavce, ki so pri svojem delu izpostavljeni možnosti okužbe s HBV, od leta 1988 tudi za novorojenčke kroničnih nosilk HBsAg ter spolne partnerje nosilcev HBsAg, od leta 1990 za dijake in študente zdravstvenih šol ter bolnike na hemodializi, od leta 1993 za IUD ter bolnike s spolno prenosljivimi boleznimi, od leta 1998 pa za vse otroke pred vstopom v osnovno šolo (Seme in sod., 2011). Cepljenje se priporoča tudi skupinam z večjim tveganjem za okužbo s HBV: družinskim članom nosilcev HBsAg, bolnikom s hemofilijo ter varovancem zavodov za telesno in duševno prizadete (Zakotnik in sod., 2014).

## 2.2 VIRUS HEPATITISA D

Virus hepatitisa D (angl. *hepatitis D virus*, HDV) ali hepatitis delta virus je leta 1977 odkrila skupina italijanskih znanstvenikov pod vodstvom Maria Rizzetta (Rizzetto in sod., 1977). V biopsijskih vzorcih jeter bolnikov s težkim potekom kroničnega hepatitisa B so ob prisotnosti HBsAg in odsotnosti HBcAg odkrili nov antigen – delta, misleč, da gre za antigensko različico jedrnih antigenov HBV ter pozneje s poskusi na

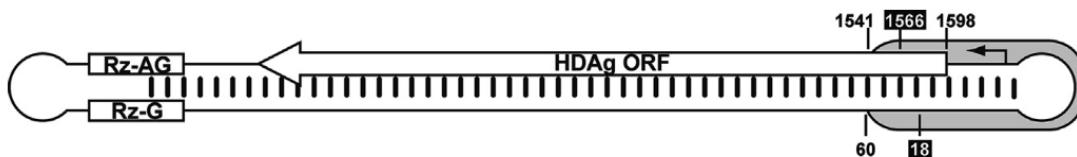
šimpanzih dokazali možnost sočasne okužbe s HBV in delta antigenom oz. naknadne okužbe HBsAg-pozitivnih oseb z delta antigenom. Rizzetto in sod. so pozneje dokazali tudi, da omenjeni delta antigen v telesu kroži kot delec, ki vsebuje HBsAg in molekulo RNA z nizko molekularno težo, in prvič postavili hipotezo o virusu hepatitisa D kot satelitskem virusu HBV (Rizzetto in sod., 1980a). Prvi testi za dokazovanje delta antiga so bili razviti leta 1980 (Rizzetto in sod., 1980b), obstoj virusa HDV pa je bil priznan leta 1983 (Rizzetto, 1983). S kloniranjem in določanjem nukleotidnega zaporedja so genom HDV v celoti opredelili leta 1986 (Wang in sod., 1986; Kuo in sod., 1988).

S HDV, ki je edini predstavnik družine *Deltaviridae* in rodu *Deltavirus*, se lahko razen človeka okužijo tudi opice in mali sesalci, ki so okuženi s HBV. Analiza nukleotidnega zaporedja izolatov HDV s celega sveta je pokazala, da obstaja vsaj osem genotipov HDV, ki so označeni s številkami od I do VIII in se med seboj razlikujejo po geografskih in kliničnih značilnostih, ter le dva serotipa HDV (Le Gal in sod., 2006; Seme in sod., 2011). Izolati posameznih genotipov HDV se med seboj razlikujejo v 35-40 % celotnega nukleotidnega zaporedja, posamezni izolati znotraj genotipa HDV pa v 11-19 % celotnega nukleotidnega zaporedja. Virusna populacija je pri posamezni okuženi osebi sestavljena iz mešanice več genetsko zelo sorodnih različic (angl. *quasispecies*) (Seme in sod., 2011; Alfaiate in sod., 2015).

### 2.2.1 Zgradba virusnega delca in genoma HDV

HDV je najmanjši virusni patogen z RNA genomom, ki lahko povzroča okužbe pri človeku in sesalcih. Premer kroglastega virusnega delca se giblje med 35 in 41 nm. Zunanja ovojnica HDV je zgrajena enako kot zunanja ovojnica HBV, a manjšega premera (Seme in sod., 2011). Znotraj ovojnice se nahaja 20-nanometrski ribonukleoprotein (RNP), ki je sestavljen iz ene molekule virusne genomske RNA in 70-200 molekul virusne beljakovine HDV-Ag – natančna struktura in stehiometrija RNP ni znana (Alfaiate in sod., 2015). Genom HDV, ki je prikazan na sliki 2, nosi zapis za edino virusno beljakovino - HDV-Ag ali antigen delta, ki je prisotna v dveh morfoloških oblikah, za kateri je značilno, da imata enak N-terminalni konec in različna C-terminalna konca. Krajsa oblika HDV-Ag, S-HDV-Ag, z atomsko maso 24 kDa, je sestavljena iz 195 aminokislin in z aktivacijo celične RNA-polimeraze II spodbuja pomnoževanje in podaljševanje virusne RNA ter spodbuja kopiranje virusne RNA v celici. Vezava S-HDV-Ag na virusno RNA, ki jo omogoča sekundarna struktura RNA in ne njeno primarno nukleotidno zaporedje, je ključna za zaščito virusne RNA pred razgradnjo z encimi gostiteljske celice (Griffin in sod., 2014). Daljsa oblika HDV-Ag, L-HDV-Ag, z atomsko maso 27 kDa, je sestavljena iz 213 oz. 214 aminokislin (odvisno od genotipa) in je ključna za sestavljanje novih virionov. Že majhna količina L-HDV-Ag zavira pomnoževanje virusne genomske RNA, v presežnih količinah pa tudi

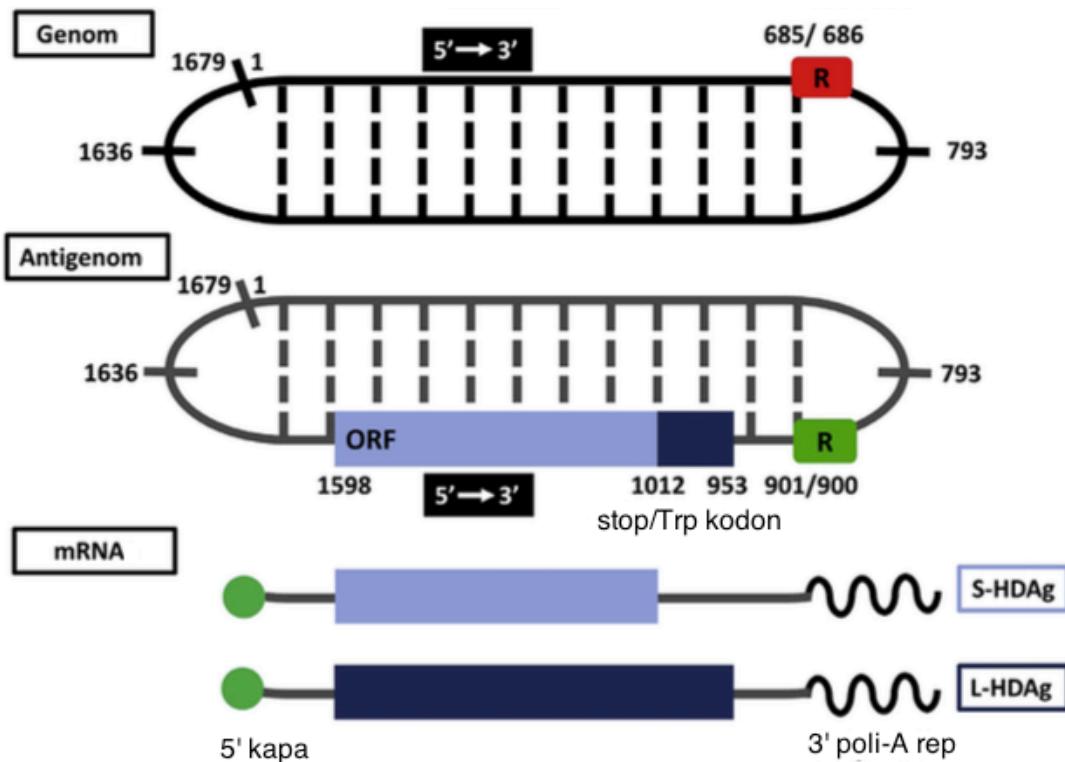
antigenomske in sporočilne RNA. Virus s pomočjo obeh oblik beljakovine HDV-Ag samouravnava svoje pomnoževanje, tako da preklaplja s pomnoževanja virusne RNA na sestavljanje virusnih delcev in obratno. Do preklopa pride s posttranskripcijsko modifikacijo antigenomske RNA, ko se S-HDV-Ag ORF s posredovanjem gostiteljske dsRNA adenozin deaminaze (angl. *double-stranded RNA adenosine deaminase, DRADA* ali *adenosine deaminase acting on RNA, ADAR*), ki stop kodon za S-HDV-Ag (kodon UAG) spremeni v kodon za triptofan (kodon UGG), podaljša za 57 nt in tako omogoči izražanje L-HDV-Ag (Seme in sod., 2011; Alfaiate in sod., 2015). .



Slika 2: Shematski prikaz genoma HDV (Beeharry in sod., 2014: 166). Nukleotidna mesta so oštrevlčena v skladu z referenčnim nukleotidnim zaporedjem (1679 nt), ki je v Genski banki dostopno pod pristopno številko M21012. Z belim okvirjem je označen HDV-Ag ORF med nukleotidnima mestoma 1.598 in 1.012. Okvir Rz-G označuje ribocimsko mesto na genomske verigi, okvir Rz-AG pa ribocimsko mesto na antigenomske verigi. Črna puščica označuje domnevno mesto začetka prepisovanja, t.j. nukleotidno mesto 1.630 (Beard in sod., 1996; Gudima in sod., 2000; Abrahem in Pelchat, 2008). Siva barva označuje področje med nukleotidnima mestoma 1.541 in 60, kjer se domnevno začne pomnoževanje virusnega genoma in za katerega je značilna visoka ohranjenost tako primarne kot sekundarne strukture (paličasta oblika molekule), in sicer tako pri genomske kot tudi pri antigenomske molekuli. Visoka ohranjenost omenjene strukture je pomembna za vezavo s celično RNA-polimerazo II.

Posttranslacijske modifikacije (fosforilacija, acetilacija, metilacija, sumoilacija in prenilacija) S-HDV-Ag in L-HDV-Ag vplivajo na spremembo funkcije omenjenih beljakovin in tako uravnavajo virusni življenjski cikel in posledično predstavljajo potencialna tarčna mesta za nova protivirusna zdravila (Alfaiate in sod., 2015; Rizzetto, 2016). Prenilacija L-HDV-Ag je ključna za tvorbo novih virionov, saj prepreči nadaljnje pomnoževanje virusnega genoma in HDV RNA usmeri v združevanje s HBsAg (Rizzetto, 2016); L-HDV-Ag se hkrati iz jedra prenese v ER in se neposredno poveže s S-HBsAg (Giersch in Dandri, 2015).

V okuženih jetrnih celicah najdemo tri različne molekule HDV RNA: genomsko, antigenomsko in sporočilno (angl. *messenger RNA; mRNA*), ki so prikazane na sliki 3.



Slika 3: Shematski prikaz molekul HDV RNA (Alfaiate in sod., 2015: 114). Okvirja R označujejo ribocimski mesti na genomski oz. antigenomske molekuli. ORF: odprt bralni okvir za HDV-Ag. Stop/Trp kodon: stop kodon, ki se s pomočjo encima ADAR lahko posttranskripcijsko modificira v kodon za AK triptofan.

Genomska RNA je enovijačna negativno polarna krožna molekula, velikosti 1.672-1.697 nt, in predstavlja najmanjši poznan virusni genom med človeškimi in živalskimi virusi. Zaradi visoke (70 %) stopnje komplementarnih odsekov in visoke vsebnosti GC nukleotidov je genom HDV zvit v nerazvejano paličasto strukturo, navidezno dvojnovijačno RNA. V jedru in citoplazmi okužene jetrne celice je prisotnih približno 300.000 molekul genomske RNA. Antigenomska RNA je komplementarna genomski RNA, je torej pozitivno polarna in prav tako zavzema navidezno dvojnovijačno zgradbo; v okuženi celici je prisotna v 60.000 kopijah in sicer samo v jedru. S prepisovanjem genomske RNA nastane 800 nt dolga mRNA s 5'-kapo in 3'-poliadeniliranim repom, ki se v okuženi celici nahaja v približno 600 kopijah (Seme in sod., 2011; Alfaiate in sod., 2015; Rizetto, 2016).

Genomska RNA in antigenomska RNA imata ribocimsko aktivnost in s tem zmožnost samocepitve, samozdruževanja in kislinsko-bazične katalize različnih reakcij, npr. spajanja peptidov, kar je nujno potrebno za pomnoževanje HDV (Seme in sod., 2011). Zapis za avtokatalitično ribocimsko aktivnost se nahaja na manj kot 100 nukleotidov dolgem delu zaporedja virusne RNA, ki je visoko ohranjeno pri vseh genotipih HDV.

(Alfaiate in sod., 2015). Samocepitvena aktivnost ribocima HDV je najhitrejša med vsemi znanimi ribocimi v naravi (Rizzetto, 2016).

### 2.2.2 Pomnoževanje HDV

HDV za popoln življenjski krog nujno potrebuje prisotnost HBV. V eksperimentalno okuženih živalih, ki hkrati niso okužene tudi s HBV, sicer pride do nastanka replikativnih intermediatov HDV in HDV-Ag, vendar ne pride do nastanka infektivnih virusnih delcev, saj za to HDV potrebuje istočasno izražanje površinskih glikoproteinov HBV (HBsAg). Razen nujne prisotnosti HBsAg ob nastajanju virusnih delcev HDV sta procesa pomnoževanja obeh virusov medsebojno neodvisna. Za razliko od HBV, HDV za pomnoževanje ne potrebuje specifičnih dejavnikov prepisovanja, značilnih le za jetrne celice, torej se ob ustreznem vnosu genoma v celico lahko razmnožuje tudi v drugih vrstah sesalčjih celic (Alfaiate in sod., 2015). Freitas in sod. (2014b) so dokazali, da se na celičnih kulturah z integrirano HBV DNA, HDV lahko pomnožuje tudi v odsotnosti pomnoževanja HBV; v eni izmed celičnih linij so nastali celo infektivni delci HDV. Kronični hepatitis D tako *in vivo* lahko vztraja tudi zgolj s prisotnostjo integrirane HBV DNA in v odsotnosti pomnoževanja HBV. Klinični pomen in trajanje samostojne HDV okužbe še nista opredeljena (Rizzetto, 2016).

HDV v jetrno celico vstopi na enak način kot HBV, torej preko receptorja hNTCP, pred vstopom v celico pa se nespecifično veže še na celične heparan-sulfatne proteoglikane. Po slačenju virusne ovojnica sledi transport HDV RNP v celično jedro; mehanizem transporta še ni popolnoma razjasnjen, verjetno pa gre za interakcijo med HDV-Ag in importini (Alfaiate in sod., 2015).

HDV RNA se najverjetneje pomnožuje in prepisuje s pomočjo od DNA-odvisne celične RNA-polimeraze II, ki jo HDV preusmeri v pomnoževanje svojega genoma, pri čemer ima glavno vlogo verjetno S-HDV-Ag, ki z vezavo na RNA-polimerazo II deluje kot dejavnik prepisovanja. Medtem, ko se genomska in sporočilna RNA pomnožujeta v nukleoplazmi okužene celice, se antigenomska RNA pomnožuje le v jedrcu celice, najverjetneje tudi s sodelovanjem RNA-polimeraze I in/ali III. HDV RNA se pomnožuje po mehanizmu kotalečega se kroga (angl. *rolling circle*), s katerim najprej nastanejo multimerne kopije oz. prepisi antigenomske RNA, ki se z lastno ribocimsko aktivnostjo cepijo in zaokrožajo v monomere, obenem pa se z genomske RNA prepiše tudi poliadenilirana mRNA. Del antigenomskih molekul se nato z mehanizmom kotalečega se kroga prepiše nazaj v multimerne molekule genomske RNA, ki se prav tako same cepijo in zaokrožajo v monomerne kopije genoma. Preostanek antigenomskih molekul se modifcira s celičnim encimom ADAR1, se nato ponovno prepiše v genomsko RNA, s te pa se nato prepiše mRNA za S-/L-HDV-Ag. Vsaka genomska RNA torej lahko vstopi v nov cikel pomnoževanja, se prepiše v mRNA za S-/L-HDV-

Ag ali pa zapusti jedro in se zapakira v nov virusni delec. Virusni delci HDV naj bi enako kot subvirusni delci HBV potovali preko ER, kjer pridobijo ovojnico s HBsAg, in nato preko Golgijskega aparata izstopali iz celice (Alfaiate in sod., 2015). Za tvorbo novih virionov HDV zadostuje prisotnost S-HBsAg, za kužnost pa je nujna tudi prisotnost L-HBsAg. Večina vezavnih mest za HDV-Ag se nahaja na S domeni beljakovine HBsAg (Rizzetto, 2016).

Velikost HDV genoma je le malo večja od velikosti genomov viroidov, t.j. subvirusnih delcev, ki predstavljajo najmanjše rastlinske patogene in tudi najbolj preprosto znano vrsto genoma v naravi. Tudi viroidi imajo ribocimsko aktivne, krožne RNA zvite v paličasto zgradbo, v svojo korist preusmerijo delovanje gostiteljskih encimov, pomnožujejo se na način kotalečega se kroga, ne nosijo pa zapisa za lastne beljakovine in ne potrebujejo virusa pomočnika. Druga oblika subvirusnih delcev rastlin so virusoidi, od katerih imajo nekateri prav tako majhne krožne RNA, nekateri nosijo zapis za beljakovine, vsi pa potrebujejo prisotnost virusa pomočnika. HDV ima lastnosti tako viroidov in virusoidov kot tudi »pravih« virusov. HDV je najverjetneje nastal z rekombinacijo (rastlinske) satelitske RNA, ki je pridobila celično RNA z zapisom za HDV-Ag, saj je ribocim HDV strukturno in biokemično podoben oz. homologen ribocimu znotraj introna človeškega gena CPEB3, v nekaterih regijah pa tudi zaporedju človeške 7SL RNA (Alfaiate in sod., 2015; Rizzetto, 2016). Obstaja tudi hipoteza, da tako virusna RNA kot zapis za HDV-Ag izhajata iz človeškega transkriptoma, saj celice vseh oblik življenja vsebujejo majhne krožne RNA z ribocimsko aktivnostjo, ki potencialno lahko postanejo samoreplikativne, HDV-Ag pa bi lahko izviral iz celičnega prepisa beljakovine DIPA (angl. *delta-interacting protein A*) (Hughes in sod., 2011; Sureau in Negro, 2016).

Evolucija HDV najverjetneje poteka preko mutacij, urejanja (angl. *editing*) in rekombinacij virusnega genoma. Pomemben dejavnik, ki vpliva na virusno evolucijo, je pomnoževanje in prepisovanje virusnega genoma z RNA-polimerazami, ki nimajo popravljalnih mehanizmov. Substitucijska hitrost, opredeljena z longitudinalnim sledenjem vzorcev bolnikov *in vivo*, je ocenjena na  $5,9 \times 10^{-4} - 3,0 \times 10^{-2}$  zamenjav na nukleotidno mesto na leto, variira pa glede na fazo okužbe (višja hitrost v akutni fazi), genomsko mesto (višja hitrost v manj ohranjenih področjih) ter prisotnost protivirusnega zdravljenja (višja hitrost pod pritiskom zdravljenja). Substitucijska hitrost v nekodirajočih regijah je tako  $3,52 \times 10^{-3}$  zamenjav na nukleotidno mesto na leto, v kodirajočih regijah pa  $1,49 \times 10^{-3}$  za sinonimne zamenjave in  $0,67 \times 10^{-3}$  zamenjav na nukleotidno mesto na leto za nesinonimne zamenjave. Omenjene vrednosti so nekoliko višje kot pri večini ostalih RNA virusov, pri katerih je substitucijska hitrost ocenjena na  $1 \times 10^{-5} - 3,4 \times 10^{-3}$  zamenjav na nukleotidno mesto na leto, npr. pri virusu hepatitisa C na  $7,9 \times 10^{-4}$ , pri HIV pa na  $2,5 \times 10^{-3}$  zamenjav na nukleotidno mesto na leto. Dolgotrajna *in vitro* raziskava je substitucijsko hitrost HDV ocenila na  $2 \times 10^{-2}$ , 70 % teh zamenjav pa

naj bi bilo posledica urejanja virusnega genoma (Hughes in sod., 2011; Alfaiate in sod., 2015).

### **2.2.3 Patogeneza HDV in klinična slika hepatitisa D**

Napredovanje bolezni, povzročene s HBV in HDV, je v primerjavi z ostalimi virusno povzročenimi hepatitisi hitrejše, zato hepatitis B in D predstavlja najtežjo obliko virusnega hepatitisa pri ljudeh. S HDV se lahko okužimo na dva osnovna načina: sočasna okužba z obema virusoma (koinfekcija) in naknadna ali nacepljena HDV okužba bolnika, ki že ima kronični hepatitis B (superinfekcija). Pri imunsko-kompetentnih odraslih osebah v 90-95 % sočasni okužbi sledi ozdravitev, saj po akutnem hepatitisu D najpogosteje pride do spontane izgube obeh virusov. Po prebolelem hepatitisu D je imunost dosmrtna, ob ponovnem stiku pa lahko pri posamezniku pride le do blage in kratkotrajne bolezni. Pri superinfekciji je ozdravitev redka, saj v 90 % primerov pride do razvoja kroničnega hepatitisa D (Seme in sod., 2011; Reinheimer in sod., 2012; Alfaiate in sod., 2015).

Akutni hepatitis D se prične z inkubacijsko dobo, ki traja tri do sedem tednov. Potek akutnega hepatitisa v primeru sočasne okužbe s HDV in HBV je lahko bodisi asimptomatski, bodisi blag z nespecifičnimi simptomi, bodisi težak in se konča z akutno jetrno odpovedjo in smrtjo, če bolniku ne presadijo jeter (Giersch in Dandri, 2015). Potek akutnega hepatitisa D je klinično lahko enak akutnemu hepatitisu B, večinoma pa je težji z višjo smrtnostjo (Seme in sod., 2011; Alfaiate in sod., 2015). Klinično izražen akutni hepatitis D po inkubacijskem obdobju preide v tri do sedem dni dolgo predikterično oz. prodromalno obdobje z neznačilnimi simptomi (utrjenost, letargija, izguba teka in slabost) in porastom vrednosti jetrnih encimov. Ob nastopu ikterične faze se lahko pojavi zlatenica, lahko pride tudi do temne obarvanosti urina in bledo sive obarvanosti blata. V primeru zazdravitve okužbe se s prenehanjem simptomov prične poiakterično obdobje oz. obdobje okrevanja, ki traja več tednov. Pri 15 % bolnikov ima akutni hepatitis D v porastu aminotransferaz in bilirubina dva zagona, ki sta verjetno odraz poskodbe jeter z obema virusoma (WHO, 2001; Matičič, 2014; Alfaiate in sod., 2015). Sočasna okužba s HBV in HDV v 30 % vodi v nastanek fulminantnega hepatitisa z 2-20 % smrtnostjo, v manj kot 5 % primerov pa v kronični hepatitis D (Matičič, 2014).

Nacepljena okužba s HDV ima krajšo inkubacijsko dobo kot sočasna okužba s HBV in HDV. Nacepljena okužba s HDV je klinično zaznavna pri 50 % bolnikov, in sicer se najpogosteje kaže kot resni »akutni« ali fulminantni hepatitis pri asimptomatskih nosilcih HBV, ki večinoma ne vedo, da imajo tudi kronični hepatitis B (Seme in sod., 2011; Alfaiate in sod., 2015). Pri nacepljeni okužbi 70-95 % bolnikov preide v kronični hepatitis, povzročen z obema virusoma, ki pri 60-70 % bolnikov preide v cirozo po 10-

15 letih, pri 10-15 % pa že v dveh letih po okužbi (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014; Sureau in Negro, 2016). V 80. letih so bili na takrat endemskih področjih bolniki s HDV-povzročeno cirozo povprečno 10 let mlajši od bolnikov s cirozo, povzročeno le s HBV (Rizzetto, 2015, 2016). Klinično lahko kronični hepatitis D poteka enako kot kronični hepatitis B, le da v primerjavi z bolniki s kroničnim hepatitisom B bolniki s kroničnim hepatitisom B in D bistveno pogosteje razvijejo cirozo (trikrat pogosteje), dekompenzacijo jeter (dvakrat pogosteje) in JCK (Seme in sod., 2011; Rizzetto in Alavian, 2013; Noureddin in Gish, 2014). Tveganje za nastanek ciroze se povečuje s časom od okužbe in po 10 letih znaša 23 %, po 20 letih 41 % in po 30 letih 77 % (Yurdaydin in sod., 2010). Povezava med kroničnim hepatitisom D in povečanim tveganjem za nastanek JCK zaenkrat še ni potrjena (Alfaiate in sod., 2015; Sureau in Negro, 2016). Možen razplet kroničnega hepatitisa B in D je tudi ustavitev pomnoževanja HDV, nadaljnji potek bolezni pa je nato odvisen le od aktivnosti HBV (Hughes in sod., 2011).

V Grčiji, na Samoi ter na Dalnjem vzhodu so HDV našli tudi v povezavi z blago klinično sliko ali normalno jetrno funkcijo, zato je klinična slika morda odvisna tudi od virusnega genotipa (Rizzetto in Ciancio, 2012). V primerjavi z ostalimi genotipi je okužba z genotipi HDV-1, -2 in -3 in genotipom HBV-C po nekaterih podatkih povezana s težjim potekom bolezni in slabšim odzivom na protivirusno zdravljenje (Su in sod., 2006; Hughes in sod., 2011).

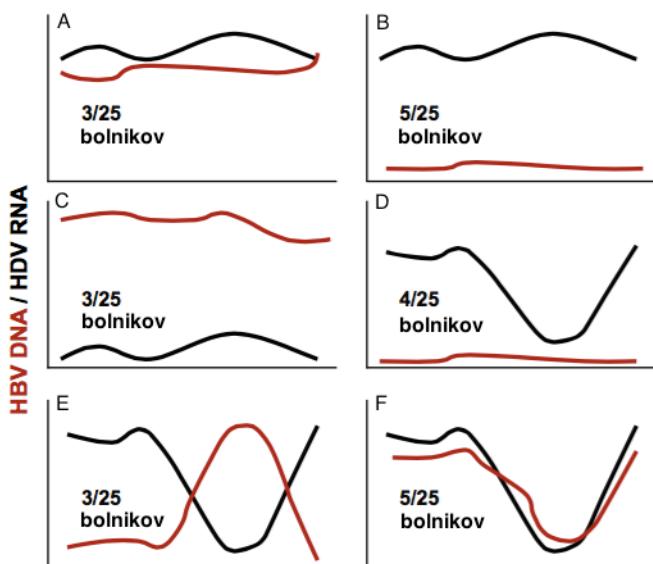
### **2.3.4 Interakcije med HBV in HDV**

Raziskovalci že vse od odkritja HDV ugotavljajo, da njegova aktivnost vpliva na aktivnost HBV. Številne *in vivo*, *in vitro*, klinične ter retrospektivne raziskave so pokazale, da okužba s HDV v akutni fazì začasno zmanjša raven pomnoževanja in izražanja HBV ter upočasni porast viremije HBV in porast HBV cccDNA v jetrih. Prisotnost HBcAg so tako dokazali v jetrih 50 % bolnikov, ki so bili okuženih samo s HBV, pri 6 % HDV-Ag-pozitivnih bolnikov in pri 13 % anti-HDV-pozitivnih bolnikov. Kljub temu, da naj bi pri bolnikih s trojno okužbo – s HBV, HCV in HDV – HDV zaviral pomnoževanje tako HBV kot tudi HCV (Jardi in sod., 2001), pri azijskih bolnikih najverjetneje »prevladuje« HCV (Liaw in sod., 1992; Giersch in Dandri, 2015).

V presečni raziskavi, ki je vključevala 37 španskih bolnikov z nezdravljenim kroničnim hepatitisom B in D so z opredeljevanjem viremije HBV in HDV pri 40,5 % bolnikov dokazali aktivnost obeh virusov, pri 10,8 % bolnikov sta bila oba virusa neaktivna, pri 32,4 % bolnikov je bil aktivен le HDV, pri 16,2 % bolnikov pa le HBV (Schaper in sod. 2010). Virusno breme so opredeljevali s kvantitativno metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo v realnem času (angl. *real-time reverse transcription*

*polymerase chain reaction, rt-RT-PCR)* s klinično občutljivostjo 1.000 kopij HDV RNA/ml in 300 kopij HBV DNA/ml ter kot dominanten označili virus z vsaj 10-krat višjo serumsko koncentracijo virusne nukleinske kisline (NK). Pri 25 bolnikih, vključenih v raziskavo, so dodatno spremljali (do osem let v polletnih razmakih) tudi nihanje viremije obeh virusov in potek bolezni. Ob longitudinalnem spremeljanju bolnikov so opredelili sedem različnih profilov virusnega pomnoževanja (slika 4):

1. pri 12 % bolnikov sta bila vztrajno aktivna oboji virusa, pri čemer je pri 4 % prevladoval HDV, pri 8 % pa noben izmed virusov;
2. pri 20 % bolnikov je bil HBV neaktivni in HDV vztrajno aktivni;
3. pri 12 % bolnikov je bil HDV neaktivni in HBV vztrajno aktivni;
4. pri 28 % je aktivnost obeh virusov nihala, in sicer je pri 8 % bolnikov nihala alternirajoče (porast viremije enega virusa in padec viremije drugega), pri čemer je pri 4 % dominiral HDV, pri 4 % pa noben izmed virusov; pri 20 % bolnikov pa je aktivnost obeh virusov nihala vzporedno (porast ali padec obeh viremij hkrati), pri čemer je pri 8 % prevladoval HDV, pri 12 % pa noben izmed virusov;
5. pri 16 % bolnikov je bil HBV neaktivni, aktivnost HDV pa je nihala;
6. pri 4 % bolnikov je z vztrajno aktivnostjo prevladoval HDV, aktivnost HBV pa je nihala;
7. pri 4 % bolnikov je z vztrajno aktivnostjo prevladoval HBV, aktivnost HDV pa je nihala.



Slika 4: Shematski prikaz časovnega poteka okužbe s HBV in HDV pri bolnikih v raziskavi Schaperja in sod. (2010) (Wedemeyer, 2010: 628). Bolnike so v polletnih razmakih spremljali 4-8 let. A: vztrajna aktivnost obeh virusov (profil 1). B: neaktivnost HBV in vztrajna aktivnost HDV (profil 2). C: neaktivnost HDV in vztrajna aktivnost HBV (profil 3). D: neaktivnost HBV in nihajoča aktivnost HDV (profil 5). E: alternirajoče nihanje aktivnosti obeh virusov (profil 4a). F: vzporedno nihanje aktivnosti obeh virusov (profil 4b). Na sliki nista prikazana 6. in 7. profil virusnega pomnoževanja, in sicer vztrajno prevladujoča aktivnost HDV ob nihanju aktivnosti HBV ter vztrajno prevladujoča aktivnost HBV ob nihanju aktivnosti HDV.

HBV je tako prevladoval pri 16 % bolnikov, HDV pri 60 % bolnikov, pri 5 % bolnikov sta virusa vzporedno nihala, pri 4 % pa sta prevladovala izmenjujoče. Razlika v dominantnosti posameznega virusa, ki so jo pridobili s presenčnim in longitudinalnim testiranjem virusnega bremena, je bila statistično značilna, kar pomeni, da lahko s presečnim testiranjem le točkovno ocenimo odnos med HBV in HDV oz. prevladujoč virus. Z longitudinalnim spremljanjem so tudi pri kontrolni skupini 10 HDV-negativnih nezdravljenih bolnikov s kroničnim hepatitisom B opazili nihanje aktivnosti HBV. Kljub temu, da med koncentracijo serumskega HBsAg in koncentracijo HDV RNA/HBV DNA niso dokazali značilne povezave, so opazili, da v primerjavi s samostojno okužbo s HBV koncentracija HBsAg bolj niha v prisotnosti HDV pri vseh sedmih profilih virusnega pomnoževanja. Pri kroničnem hepatitisu D torej ne moremo govoriti le o zaviranju aktivnosti HBV s strani HDV, pač pa gre za zapleten, dinamičen in morda razvijajoč se odnos med obema virusoma ter med posameznim virusom in gostiteljem, zato se pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B in D priporoča redno spremljanje koncentracije HBV DNA in HDV RNA (Schaper in sod., 2010).

Mutacije v beljakovini HBsAg dokazano vplivajo na vezavo HBsAg s HDV-Ag ter na sestavljanje novih virionov HDV in na njihovo infektivnost, in sicer naj bi infektivnost HDV najbolj omogočale različice genotipa HBV-D, nato različice genotipa HBV-B, zatem različice genotipa HBV-E in nazadnje različice genotipa HBV-A; različice

znotraj ostalih HBV genotipov pa imajo zelo različen vpliv na infektivnost HDV (Freitas in sod., 2014a). Zgoraj omenjeno nihanje aktivnosti HBV in HDV je tako morda posledica pojava genetskih različic HBV in/ali HDV (Giersch in Dandri, 2015).

Beljakovine S-, M- in L-HBsAg, ki imajo sposobnost samozdruževanja, se v celici sintetizirajo v velikih količinah, ki presegajo potrebe sestavljanja novih virionov HBV - posledično se iz celice izločajo kot subvirusni delci. V mililitru infektivnega seruma je tako prisotnih povprečno  $10^{12}$ - $10^{13}$  subvirusnih delcev in  $10^8$ - $10^9$  virionov HBV. Ob pričetku akutnega hepatitisa D je v mililitru seruma prisotnih  $10^{10}$ - $10^{11}$  virionov HDV; v primerjavi z nukleokapsido HBV se torej HDV RNP bolj učinkovito obdajajo z beljakovinami HBsAg (Sureau in Negro, 2016).

Nihanje aktivnosti HBV in HDV med potekom okužbe je najverjetneje tudi posledica tekmovanja obeh virusov za isto celično RNA-polimerazo II (Sureau in Negro, 2016), S- in L-HDV-Ag z reprimiranjem HBV ojačevalnih zaporedij Enh1 in Enh2 ovirata prepisovanje HBV DNA z RNA-polimerazo II. Pomnoževanje HBV oz. prenos HBV mRNA iz jedra v citoplazmo zavira tudi celična beljakovina MxA, ki ima IFN- $\alpha$  inducibilni promotor, ki ga lahko aktivira tudi L-HD-Ag (Williams in sod., 2009). L-HDV-Ag lahko aktivira tudi izražanje različnih promotorjev HBV, npr. promotorjev pre-S, S in C (Wei in Ganem, 1998).

## 2.2.5 Interakcije HBV in HDV z gostiteljem

Kopičenje HBsAg v ER v tem organelu sproži stresni odziv, ki vodi v prenos HDV-Ag iz jedra v ER, omenjeni prenos pa vpliva na celično povečanje aktivnosti jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (angl. *nuclear factor- $\kappa$ B*, NF- $\kappa$ B) oz. proteinskega kompleksa, ki nadzira prepisovanje DNA, proizvodnjo citokinov, celično preživetje in predvsem imunski odziv na okužbo ter s tem vpliva na povečanje vnetnega odziva v celici (Huang in sod., 2006).

Beljakovini HBx in L-HDV-Ag lahko sinergistično aktivirata pot, odvisno od odzivnega elementa za serum (angl. *serum response element (SRE) dependent pathway*), od katere je odvisno izražanje različnih genov, ki uravnavajo celično rast, diferenciacijo in transformacijo – torej procese, ki so del karcinogeneze, kar bi lahko bil vzrok za težji potek bolezni pri okužbi s HBV in HDV ter za starost bolnikov, ki so ob razvoju JCK mlajši od bolnikov, okuženih le s HBV (Goto in sod., 2003; Giersch in Dandri, 2015). HBx in L-HDV-Ag v celici sinergistično povečata tudi signalno aktivacijo, inducirano s transformacijskim rastnim dejavnikom beta (angl. *transforming growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ) in aktivatorsko beljakovino 1 (angl. *activator protein 1*, AP-1). TGF- $\beta$  je citokin, udeležen pri regeneraciji jeter in fibrotični ter cirotični transformaciji

jetre ob okužbi z virusi hepatitisa; HDV torej na ta način spodbuja fibrozo jeter (Choi in sod., 2007).

HBV ima več mehanizmov izogibanja aktivaciji imunskega odziva. Eksperimentalne raziskave in opazovanje kroničnih nosilcev HBV je pokazalo, da je pri okužbi s HBV motena aktivacija Toll-u podobnih receptorjev (angl. *Toll-like receptors, TLR*), ki na makrofagih in dendritičnih celicah prepoznavajo struktorno ohranjene mikrobne molekule. Raziskave *in vitro* ter raziskave na himernih miškah kažejo, da HBV ovira z interferonom alfa (IFN- $\alpha$ ) posredovano jedrno translokacijo dejavnikov prepisovanja STAT (angl. *signal transducer and activator of transcription*), ki uravnava celični imunski odziv, pomnoževanje, apoptozo in diferenciacijo, torej tudi procese, udeležene pri karcinogenezi. Z *in vitro* raziskavami so dokazali tudi, da HBV ovira funkcijsko pomembno metilacijo beljakovin STAT in aktivnost celičnih DNA metiltransferaz, ki prepreči delovanje dejavnikov STAT. Beljakovina HBx z oviranjem delovanja mitohondrijskih protivirusnih signalnih beljakovin (angl. *mitochondrial antiviral signaling proteins*) moti delovanje prirojenega imunskega odziva (Giersch in Dandri, 2015).

Perzistanca HBV je pri kroničnem hepatitisu B povezana z okvarjenim T-celičnim odzivom, ki je posledica motenj pri uravnavanju kostimulatornih poti, motenj signalizacije T-celičnih receptorjev ter povečanja T-celične apoptoze in se kaže s supresijo, nepravilnim delovanjem ali izčrpanostjo HBV-specifičnih celic T. Bolniki s kroničnim hepatitisom B ne razvijejo zadostnega imunskega odziva prirojene in pridobljene imunosti (Giersch in Dandri, 2015).

Pri omejevanju okužbe s HDV in poškodbi jeter naj bi imela vlogo tako prirojeni kot pridobljeni imunski odziv. S-HDV-Ag naj bi bil po nekaterih raziskavah odgovoren za neposredni citopatski učinek na hepatocite, L-HDV-Ag pa omogoča vztrajnost okužbe s HDV in verjetno omogoča dovzetnost hepatocitov za imunsko-posredovane poškodbe. V preteklosti so pri bolnikih, ki so jih z interferonom zdravili do izginotja HDV RNA, opazili aktivacijo naravnih celic ubijalk. Novejša raziskava je razkrila, da imajo nezdravljeni HDV bolniki v krvi več normalno diferenciranih naravnih celic ubijalk, medtem ko se pri z IFN- $\alpha$  dolgotrajno zdravljenih bolnikih pojavi več nezrelih celic ubijalk, ki so manj dovzetne za stimulacijo. Visoka koncentracija naravnih celic ubijalk pred in med protivirusnim zdravljenjem je povezana z uspešnim zdravljenjem (Lunemann in sod., 2015). L-HDV-Ag domnevno lahko aktivira signalizacijo s STAT3 in NF- $\kappa$ B, kar kot omenjeno povzroči stres ER in nekroinflamacijo, poveča pa tudi proizvodnjo reaktivnih kisikovih spojin in tako poveča verjetnost za razvoj JCK. Inducirani STAT3 aktivira DNA metiltransferaze, te pa utišajo tumor supresorske gene. HDV moti tudi signalizacijo z IFN- $\alpha$ , in sicer s preprečitvijo aktivacije in translokacije dejavnikov STAT, s tem pa prispeva k perzistenci HDV in ovira uspešno protivirusno

zdravljenje. JCK je povezan s prekomernim izražanjem beljakovine klusterin, ki je molekularni šaperon s funkcijo pravilnega zvijanja celičnih beljakovin. L-HDV-Ag poveča acetilacijo klusterinskih promotorjev, kar podaljša preživetje okužene celice in potencialno vodi v nastanek JCK (Giersch in Dandri, 2015). Napačno sestavljena molekula HDV RNA naj bi neposredno aktivirala proteinsko kinazo R, ki je pomembna pri odzivu prirojenega imunskega sistema (Alfaiate in sod., 2015).

Na humaniziranih himernih miškah so dokazali, da v človeških hepatocitih stabilna okužba s HBV in HDV izzove močnejši odziv prirojenega imunskega sistema v primerjavi z okužbo samo s HBV. Za okužbo z obema virusoma je značilna tudi večja aktivacija interferonsko spodbujenih genov (angl. *interferon stimulated genes*, ISG), višja koncentracija dejavnikov prepisovanja STAT in produkcija citokinov ter povisano izražanje genov, udeleženih pri antigenski predstavitvi in pri prepoznavanju okuženih celic s strani naravnih celic ubijalk. Vse našteto pomeni močnejše vnetje in hujše poškodbe jeter in najverjetneje vpliva na težji potek bolezni ob okužbi s HBV in HDV v primerjavi z okužbo samo s HBV. Močnejši imunski odziv najverjetneje vpliva tudi na manjšo aktivnost HBV v prisotnosti HDV (Giersch in sod., 2015).

Odziv pridobljenega imunskega sistema na okužbo s HDV je šibek. Pri kronično okuženih bolnikih T celice pomagalke izločajo velike količine interlevkina-10, ki med drugim inhibira interferonske poti. V primerjavi z bolniki, okuženimi s HBV ali HCV, imajo bolniki s kroničnim hepatitisom D tudi večjo koncentracijo celic T s perforinom, ki uničujejo okužene celice, kar je v skladu s težjim potekom hepatitis D v primerjavi z ostalimi virusnimi hepatitisi. Pri bolnikih z neaktivnim hepatitisom D so opazili, da lahko specifični epitopi HDV-Ag inducirajo aktivacijo specifičnih T celic pomagalk. Medtem ko je odziv citotoksičnih celic T pri bolnikih z zazdravljenou okužbo s HDV šibek, ga pri bolnikih z aktivno boleznijo sploh ne zaznamo. Šibek T-celični odziv pri kroničnem hepatitisu D je morda posledica prej omenjenih mehanizmov HBV. Učinkovit T-celični odziv je opaziti le pri bolnikih, ki se dobro odzivajo na protivirusno zdravljenje, torej je nujno potreben za popolno odstranitev HDV (Alfaiate in sod., 2015; Giersch in Dandri, 2015). V poskusnih miškah, cepljenih s peptidi HDV, se razvije HDV-specifičen odziv T celic ubijalk, ki lahko tudi popolnoma izniči okužbo s HDV (Sureau in Negro, 2016).

## 2.2.6 Epidemiologija okužbe s HDV

HDV se enako kot HBV prenaša parenteralno, predvsem z okuženo krvjo in pogosto v kombinaciji s HCV in HIV (Alfaiate in sod., 2015). Pred začetkom testiranja krvodajcev na HBsAg je bila okužba s HDV v neendemskih področjih (ZDA in zahodna Evropa) omejena na prejemnike krvi in krvnih pripravkov; izjemno pogost je prenos med IUD (Seme in sod., 2011). V visoko endemskih področjih (Azija, Afrika,

Južna in Srednja Amerika) so pomemben način prenosa okužbe s HDV tako heteroseksualni kot homoseksualni spolni odnosi; v skupnostih z nižjim socialno-ekonomskim statusom so prisotni tudi prenosи znotraj družine. Vertikalni oz. perinatalni prenos okužbe s HDV do sedaj še ni bil opisan (Alfaiate in sod., 2015). Raziskava na šimpanzih je pokazala, da za okužbo zadošča izjemno majhen inokulum HDV, in sicer 1 CID (angl. *chimpanzee infectious dose*); koncentracija HDV v plazmi okuženega šimpanza lahko doseže tudi  $10^{11}$  CID (Ponzetto in sod., 1987).

Okužba s HDV se pojavlja povsod po svetu, vendar so na različnih geografskih področjih različno pogoste in velikokrat ne odražajo prevalence bolnikov s kroničnim hepatitisom B, na kar verjetno vplivajo razlike v socialnem vedenju ljudi in v genetski nagnjenosti za okužbo s HDV ter razlike v virulentnosti posameznih genotipov HDV. V osemdesetih letih prejšnjega stoletja so na Japonskem, v Indoneziji in Koreji kljub visoki prevalenci okužbe s HBV opazili le malo okužb s HDV (Rizzetto, 2015). Podatki o prevalenci okužbe s HDV v posameznih regijah so verjetno podcenjeni zaradi različnih, nestandardiziranih, diagnostičnih metod ter njihovega omejenega dostopa na mnogih endemskih področjih. Zaradi vse večjega preseljevanja ljudi in številnih potovanj na posameznih geografskih področjih prihaja do sprememb (porasta ali upada) prevalence okužbe s HDV (Alfaiate in sod., 2015). Da bi zagotovili primerljivost podatkov, bi morali v vse raziskave prevalence HDV zajeti le bolnike z aktivnim kroničnim hepatitisom B, ki imajo v primeru nacepljene okužbe s HDV močan in zaznaven serološki odziv proti HDV; neaktivni nosilci HBsAg namreč najverjetneje niso okuženi tudi s HDV, saj bi to njihovo asimptomatsko bolezen spremenilo v aktivni kronični hepatitis. Po sočasni okužbi z obema virusoma je serološki odziv šibkejši in kratkotrajnejši, bolezen je večinoma akutna in se spontano zazdravi, z leti pa upade tudi količina protiteles anti-HDV IgG (Rizzetto, 2015).

V 80. letih prejšnjega stoletja je bilo ocenjeno, da je s HDV okuženih približno 5 % vseh bolnikov s kroničnim hepatitisom B, kar je v svetovnem merilu pomenilo 15-20 milijonov ljudi, izmed katerih je večina imela težak in napredajoč hepatitis (Ciancio in Rizzetto, 2014). Visoko endemski področji sta bili takrat v Afriki in Južni Ameriki, saj je bila prevalence HDV pri kroničnih nosilcih HBsAg v Amazonski kotlini kar 85 %. Sredozemske države so imele srednje visoko prevalenco okužbe s HDV, npr. Italija in Turčija 25 %, v nizko-endemskih državah zahodne Evrope in ZDA pa so okužbo s HDV dokazali le pri IUD (Rizzetto in Ciancio, 2012). Epidemiološke raziskave prevalence in širjenja okužbe s HDV so potekale večinoma v Italiji in na Tajvanu, kjer se je HDV v visokorizičnih skupinah (predvsem IUD) širil epidemično, v splošni populaciji pa endemično. IUD so se s HDV večinoma okužili sočasno s HBV preko souporabe pripomočkov za injiciranje nedovoljenih drog. V splošni populaciji so bile najpogostejše superinfekcije, saj se je HDV v glavnem prenašal s tesnimi stiki z bolniki s kroničnim hepatitisom D. V južni Italiji je bil glavni dejavnik tveganja za prenos

okužbe s HDV sobivanje z nosilcem HDV znotraj velike družine v majhnih bivalnih prostorih. Število raziskav iz drugih delov sveta je bilo omejeno; ker so mnoge raziskave zajele le nekaj posameznih primerov, so bili podatki razpršeni in nepopolni. Sistematične klinične raziskave, v katere so bile vključene smiselne kohorte bolnikov (bolniki z akutnim in kroničnim hepatitisom B), so dale bolj skladne podatke, na podlagi katerih so zaključili, da je HDV pri nosilcih HBsAg po vsem svetu poglavitni povzročitelj ciroze jeter in fulminantnega hepatitisa (Rizzetto, 2015).

Zaradi izboljšanja sanitarnih in življenjskih pogojev, vedenjskih sprememb ljudi zaradi strahu pred okužbo z virusom HIV, predvsem pa zaradi uvedbe cepljenja proti hepatitisu B in testiranja vseh krvodajalcev na prisotnost HBsAg, je v devetdesetih letih prejšnjega stoletja prevalenca HDV v zahodnih državah upadla na 5-10 %; v primerjavi s starejšimi posamezniki je bil upad večji pri mlajših nosilcih HBsAg (Wedemeyer in Manns, 2010; Rizzetto in Ciancio, 2012).

V zadnjih 15 letih se je trend upadanja števila primerov okužbe s HDV ustavil, delno tudi kot posledica manjše pozornosti zdravnikov na okužbo s HDV zaradi upada prevalence v devetdesetih letih prejšnjega stoletja. V preglednici 2 so prikazani zadnji znani podatki o prevalenci okužbe s HDV v evropskih državah.

Preglednica 2: Prevalenca okužbe s HDV v Evropi

Država	Testirana populacija (obdobje)	Označevalec okužbe s HDV	Število testiranih posameznikov	Prevalenca HDV (%)	Vir
Albanija	bolniki s kroničnim virusnim in/ali alkoholnim jetrnim obolenjem (1995 in 2005)	celokupna protitelesa anti-HDV	Leto 1995: 106 Leto 2005: 99	Leto 1995: 9 Leto 2005: 7	Kondili in sod., 2010
Avstrija	nosilci HBsAg	celokupna protitelesa anti-HDV	138	2,9	Frisch-Niggemeyer in Kunz, 1985
Belgija	kronični nosilci HBsAg (2008-2009)	celokupna protitelesa anti-HDV	1585	3,7-5,5	Ho in sod., 2013
Bolgarija	kronični nosilci HBsAg	HDV-Ag	105	8,6	Naoumov in sod., 1986
Danska	bolniki s kroničnim hepatitisom B (1970-1985)	N/A	100	29	Krogsgaard in sod., 1988
Finska	nosilci HBsAg (1983-1984)	celokupna protitelesa anti-HDV	121	0,8	Pohjanpelto in sod., 1985

N/A: ni podatkov

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 2: Prevalenca okužbe s HDV v Evropi

Država	Testirana populacija (obdobje)	Označevalec okužbe s HDV	Število testiranih posameznikov	Prevalenca HDV (%)	Vir
Francija	HBsAg-pozitivni darovalci krvi (1997-2011)	celokupna protitelesa anti-HDV, HDV RNA	4492	Leta 1997-2011: 1,98 Leta 1997-2005: 1,1 Leto 2010: 6,5 Leto 2011: 0,85	Servant-Delmas in sod., 2014
Grčija	kronični nosilci HBsAg (1997-2010)	celokupna protitelesa anti-HDV	2137	4,2	Manesis in sod., 2013
Hrvaška	kronični nosilci HBsAg	N/A	100	19	Jelić D in Jelić O, 1994
Italija	kronični nosilci HBsAg (2006-2007)	celokupna protitelesa anti-HDV	1386	8,1	Stroffolini in sod., 2009
Italija (Ferrara)	kronični nosilci HBsAg	celokupna protitelesa anti-HDV	Italijani: 78 priseljenci: 76	Italijani: 1,2 priseljenci: 7,9	Contini in sod., 2012
Italija (Milano)	novoodkriti nosilci HBsAg (2007-2008)	celokupna protitelesa anti-HDV	Italijani: 381 priseljenci: 107	Italijani: 5,0 priseljenci: 4,7	De Paschale in sod., 2012
Italija	nosilci HBsAg	celokupna protitelesa anti-HDV	Italijani: 716 priseljenci: 295	Italijani: 7,4 priseljenci: 11,5	Brancaccio in sod., 2014
Kosovo	splošna populacija (zdravstveni delavci, nosečnice, darovalci krvi, bolniki na rutinskem testiranju krvi)	protitelesa anti-HDV IgG	1287	0,078	Quaglio in sod., 2008
Madžarska	kronični nosilci HBsAg	N/A	118	13,6	Horváth in sod., 1992-1993
Nemčija (Hannover)	nosilci HBsAg (1992-2006)	celokupna protitelesa anti-HDV	2354	11,3	Wedemeyer in sod., 2007
Nemčija (Frankfurt)	kronični nosilci HBsAg (2000-2011)	celokupna protitelesa anti-HDV	2844	7,4	Rehnheimer in sod., 2012
Poljska	bolniki s kroničnim hepatitisom B	celokupna protitelesa anti-HDV	102	3,9	Chlabcz in sod., 2003
severna Poljska	kronični nosilci HBsAg	celokupna protitelesa anti-HDV, HDV RNA	63	celokupna protitelesa anti-HDV: 4,8 HDV RNA: 7,9	Bielawski in sod., 2006
Portugalska	kronični nosilci HBsAg	N/A	N/A	17,3	Ramalho in sod., 1987
Romunija	kronični nosilci HBsAg (2005)	anti-HDV IgG, HDV RNA	1094	20,4	Popescu in sod., 2013
Slovenija	nosilci HBsAg (1998-2002)	celokupna protitelesa anti-HDV	400	0,25	Štunf in sod., 2005
Srbija in Črna Gora	nosilci HBsAg	celokupna protitelesa anti-HDV	614	11,2	Delić in sod., 1993

N/A: ni podatkov

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 2: Prevalenca okužbe s HDV v Evropi

Država	Testirana populacija (obdobje)	Označevalec okužbe s HDV	Število testiranih posameznikov	Prevalenca HDV (%)	Vir
Španija	priseljenci iz Ekvatorialne Gvineje	celokupna protitelesa anti-HDV	1220	20,4 med nosilci HBsAg	Rivas in sod., 2013
	HIV-počitivni bolniki (od 2004 dalje)	celokupna protitelesa anti-HDV	1147	1,5	Fernández-Montero in sod., 2014
	specialistično zdravljeni afriški priseljenci	celokupna protitelesa anti-HDV	2518	78,8 med nosilci HBsAg	Cuenca-Gómez in sod., 2016
Švedska	kronični nosilci HBsAg (1997-2008)	N/A	9160	3,5-3,6	Ji in sod., 2012
Švica	nosilci HBsAg (2002-2013)	celokupna protitelesa anti-HDV	465	4,4	Hirzel in sod., 2015
Združeno kraljestvo (London)	nosilci HBsAg	celokupna protitelesa anti-HDV, anti-HDV IgM, HDV RNA	1048	2,1	William Tong in sod., 2013

N/A: ni podatkov. Podatki o prevalenci okužbe s HDV zaenkrat niso dostopni za naslednje države: Bosna in Hercegovina, Češka, Estonija, Irska, Litva, Latvija, Makedonija, Norveška in Slovaška.

Kot je razvidno iz preglednice 2, se v Italiji prevalenca okužbe s HDV močno razlikuje med italijanskimi državljenji (1,2-7,4 %) in priseljenci (4,7-11,5 %). V Franciji prevalenca okužbe s HDV niha oz. nekoliko narašča na račun migrantov z endemskih območij (predvsem iz Afrike) (Le Gal in sod., 2007; Servant-Delmas in sod., 2014). V Nemčiji se prevalenca okužbe s HDV giblje med 7,4 in 11,3 %; 19 % anti-HDV-počitivnih bolnikov je bilo rojenih v Nemčiji, 26 % se jih je preselilo iz Turčije, 28 % pa iz vzhodne Evrope ali držav bivše Sovjetske zveze (Wedemeyer in sod., 2007; Rehnheimer in sod., 2012). Zadnja raziskava prevalence HDV v Veliki Britaniji je razkrila upad prevalence z 8,5 % v letu 2008 na 2,1 % v letu 2013, pri čemer je bilo 22,7 % anti-HDV-počitivnih bolnikov IUD, 28-50 % pa priseljencev, predvsem iz podsaharske Afrike (William Tong in sod., 2013). V Grčiji, kjer je 65 % bolnikov s kroničnim hepatitisom D migrantov, je prevalenca okužbe s HDV 4,2 % (Rizzetto in Ciancio, 2012; Manesis in sod., 2013). V ostalih evropskih državah je okužba s HDV omejena na skupine s povečanim tveganjem za okužbo, predvsem IUD in promiskuitetne osebe ter ljudi, ki so kri in krvne pripravke prejeli pred začetkom testiranja krvodajalcev na HBsAg. Med avtohtonimi prebivalci Evrope so s HDV najpogosteje okuženi IUD. V Švici je med kroničnimi nosilci HBsAg s HDV okuženih 5,9 % posameznikov, od tega je 62 % IUD (Genné in Rossi, 2011); po zadnjih podatkih je prevalenca HDV v omenjeni državi 4,4 % (Hirzel in sod., 2015). V Avstriji, Belgiji, na Irskem, Poljskem in Češkem naj bi bila prevalenca okužbe s HDV pod 5 % (Rizzetto, 2015). V ZDA je s HDV okuženih 8 % nosilcev HBsAg, od katerih je 26 % IUD (Gish in sod., 2013).

V zahodnih državah tako obstajajo tri podskupine s HDV-okuženih bolnikov. V prvo podskupino uvrščamo starejše bolnike z danes večinoma napredovalim obolenjem jeter, ki so se večinoma okužili v Sredozemlju, med epidemijo HDV v osemdesetih letih prejšnjega stoletja. Drugo podskupino predstavljajo mlajši IUD, ki so pogosto sočasno okuženi še s HCV in/ali HIV. V tretjo podskupino pa uvrščamo priseljence z visoko endemskih področij, ki so večinoma mlajši, krajši čas okuženi s HDV in imajo pogosto agresivno obliko hepatitisa, podobno tisti med južnoevropsko epidemijo v osemdesetih letih prejšnjega stoletja (Ciancio in Rizzetto, 2014; Alfaiate in sod., 2015; Rizzetto, 2015).

Grenlandija je endemsko področje okužb s HBV in HDV, saj je 40 % nosilcev HBsAg pozitivnih tudi na označevalce okužbe s HDV (McMahon, 2004), prihaja do izbruhovaltnega hepatitis (Børresen in sod., 2010), prebivalci pa s preseljevanjem obe okužbi prenašajo tudi na celinsko Dansko (Rex in sod., 2012).

Turčija ostaja država z visoko prevalenco okužbe s HDV, ki se giblje med 1,6 % pri otrocih s hepatitisom B v zahodni Turčiji (Özgenç in sod., 2013) in 45,5 % pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B v vzhodno-turški regiji Elazig (Bahcecioglu in sod., 2011).

V Afriki je okužba s HDV pogosta predvsem v osrednjem in zahodnem delu celine (Alfaiate in sod., 2015). Prevalenca okužbe s HDV pri kroničnih nosilcih HBsAg v Somaliji znaša 47,36 % (Rizzetto in Alavian, 2013), v Kamerunu pa 17,6 % (Rizzetto, 2016). Med nosilci HBsAg je prevalenca okužbe s HDV v Mavretaniji 33,1 % (Lunel-Fabiani in sod., 2013), v Burkini Faso 2,5-20,5 %, v Nigeriji 1,3-27,3 %, v Srednjeafriški republiki 2,9-50 % (Andernach in sod., 2014) in v Gabonu 63 % (Makuwa in sod., 2009). Med nosilci HBsAg v Egiptu je prevalenca protiteles anti-HDV 8,3 %, prevalenca HDV RNA pa 9,9 % (Fouad in sod., 2016).

Prevalenca okužbe s HDV je še vedno visoka na Bližnjem vzhodu in v okolici; pri kroničnih nosilcih HBsAg v Savdske Arabiji znaša 8,15 % (Rizzetto in Alavian, 2013). V vzhodnem Iranu so prisotnost HDV zaznali pri 3,1 % bolnikov s kroničnim hepatitisom B (Ziae in Azarkar, 2013), v Teheranu pa pri 3,5 % nosilcih HBsAg (Keshvari in sod., 2014). Z meta-analizo, v katero so zajeli podatke 62 raziskav iz vzhodnega Sredozemlja (države severne Afrike in Bližnjega vzhoda), so povprečno prevalenco okužbe s HDV ocenili na 14,74 % pri asimptomatskih nosilcih HBsAg, na 27,8 % pri bolnikih s kroničnim hepatitisom, na 36,57 % pri bolnikih s cirozo ali JCK ter na 16,44 % pri osebah s povečanim tveganjem za okužbo s HDV – IUD in bolniki na hemodializi (Amini in sod., 2013).

V nekaterih področjih Azije prevalenca HDV ne odraža visoke prevalence HBV. HDV je visoko endemičen v Pakistanu, in sicer v pokrajini Larkana in v Karachiju s 23,6 in

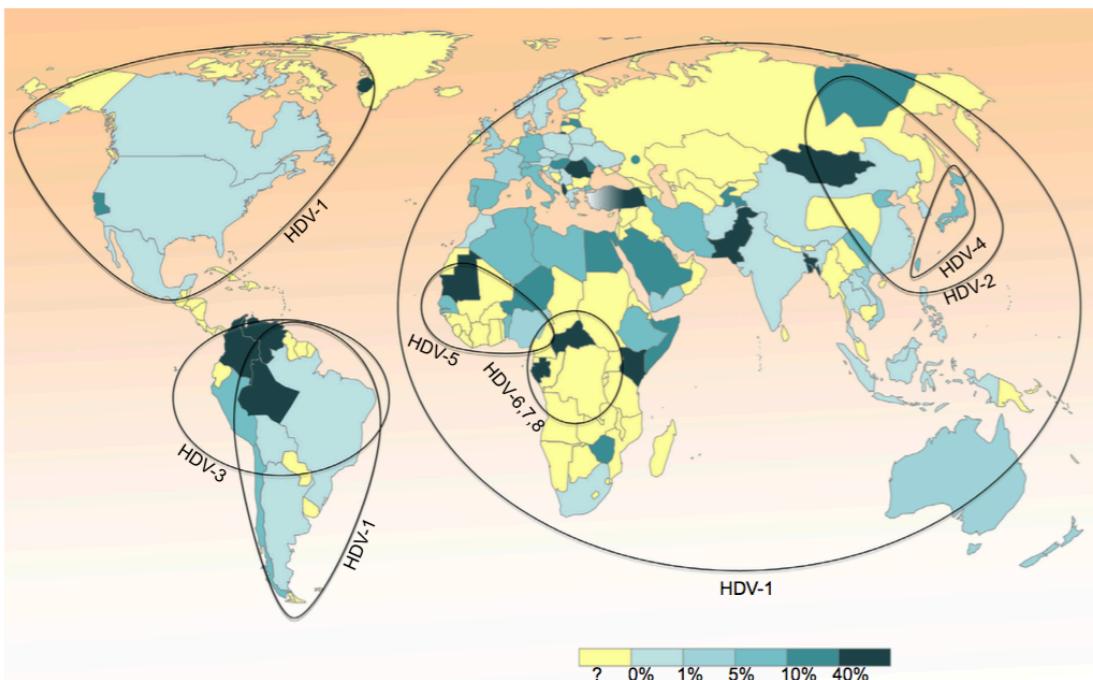
28,1 % prevalenco HDV (Shaikh in sod., 2011; Abbasi in sod., 2014). V indijski pokrajini Punjab ima anti-HDV protitelesa kar 88,8 % kroničnih nosilcev HBsAg (Zaidi in sod., 2010), na severu Indije niso zazanali okužb s HDV (Jat in sod., 2015), na državnem nivoju pa naj bi bila prevalenca HDV med nosilci HBsAg 5-10 % (Rizzetto in Ciancio, 2012). V kitajski provinci Guangdou so med bolniki s kroničnim hepatitisom B dokazali 6,5 % prevalenco protiteles anti-HDV IgM (Liao in sod., 2014), medtem ko so v mestu Shijazkiang med bolniki s hepatitisom B prisotnost anti-HDV dokazali pri 13 % bolnikov, ter pri 0,15 % bolnikov v Hong Kongu in pri 13,5 % bolnikov v provinci Shandong (Ciancio in Rizzetto, 2002, cit. po Rizzetto, 2015). Tajvan je bil v devetdesetih letih prejšnjega stoletja endemsko področje, saj so celokupna protitelesa anti-HDV dokazali pri 55 % HBsAg-pozitivnih prostitutk ter pri kar 91 % HBsAg-pozitivnih IUD (Rizzetto in Ciancio, 2012). Po uvedbi cepljenja proti HBV je med nosilci HBsAg prevalenca HDV upadla na 4,4 %, močno pa je narasla v rizičnih skupinah – pri IUD in HIV-pozitivnih bolnikih, pri katerih znaša 11,1-74,9 % (Lin in sod., 2015). Podobno kot na Tajvanu je tudi v Maleziji in na Tajskev prevalenca HDV med ne-IUD nosilci HBsAg nizka (0,9 % v Maleziji, 0,7 % na Tajskev) ter višja (20-34 %) med IUD (Rizzetto, 2015). V Vietnamu je anti-HDV-pozitivnih 10,7 % nosilcev HBsAg (Dunford in sod., 2012). V raziskavi v severnem Vietnamu so prisotnost HDV RNA dokazali pri 15,4 % nezdravljenih nosilcev HBsAg oz. pri 43,3 % nezdravljenih bolnikov z akutnim hepatitisom B (Sy in sod., 2013). V Mongoliji so med bolniki z napredovalim hepatitisom B pri kar 82 % dokazali prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV (Oyunsuren in sod., 2006); iz Mongolije, ki je endemsko področje za okužbo s HBV, poročajo tudi o izbruhih fulminantnega hepatitisa zaradi sočasne ali naknadne okužbe s HDV (Tsatsralt-Od in sod., 2006). Po zadnjih podatkih je anti-HDV-pozitivnih 67 % mongolskih nosilcev HBsAg (Rizzetto, 2016), Mongolija pa ima tudi eno izmed najvišjih stopenj pojavnosti JCK na svetu (54,1 novih primerov na 100.000 prebivalcev na leto) (Baatarkhuu in sod., 2011). Med otoki Mikronezije z najvišjo prevalenco okužbe s HDV izstopa Kiribati, kjer je 37 % nosilcev HBsAg tudi HDV RNA-pozitivnih (Han in sod., 2014). Na korejskem polotoku, ki je endemično področje okužbe s HBV, prevalenca protiteles anti-HDV med nosilci HBsAg ostaja nizka, in sicer 0,32 % (Kim in sod., 2011). Na Japonskem je bilo v osemdesetih in devetdesetih letih prejšnjega stoletja otoče Okinawa (predvsem otoki Miyako) endemsko za okužbo s HDV; leta 1995 je bila prevalenca protiteles anti-HDV med nosilci HBsAg 23,5 % (Sakugawa in sod., 1995), leta 2000 pa 8,5 % (Arakawa in sod., 2000).

V ruski regiji Samara so imeli v devetdesetih letih prejšnjega stoletja močan izbruh akutnega, pogosto fulminantnega hepatitisa D, ki se je razvil kot posledica koinfekcije s HBV; prevalenca protiteles anti-HDV IgG pri bolnikih s fulminantnim hepatitisom je bila 48 % (Flodgren in sod., 2000). Danes je prevalenca HDV pri neaktivnih nosilcih HBsAg po državi 0,1-2,5 %, pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B pa je po novejših

podatkih najvišja v južni republiki Tyva (46,5 %) in vzhodni republiki Sakha (12,5 %) (Kozhanova in sod., 2014).

Zahodna Amazonska kotlina, ki zajema predele Brazilije, Peruja, Ekvadorja, Venezuela in Kolumbije, je že od osemdesetih let prejšnjega stoletja naprej visoko-endemske področje za okužbe s HBV in HDV (prevladujejo okužbe z genotipom HDV-3) (Alfaiate in sod., 2015). Kljub temu, da Brazilija na državnem nivoju nima visoke prevalence HDV, je zadnja brazilska raziskava kot anti-HDV-pozitivne opredelila 65 % nosilcev HBsAg v Amazonski kotlini (Crispim in sod., 2014).

Slika 5 prikazuje prevalenco okužbe s HDV med nosilci HBsAg po svetu ter geografsko razporeditev genotipov HDV.



Slika 5: Prevalenca okužbe s HDV med nosilci HBsAg in geografska razporeditev genotipov HDV (Alfaiate in sod., 2015: 120). Skala prikazuje domnevni delež bolnikov s hepatitism B, ki so sočasno ali naknadno okuženi s HDV. Z rumeno barvo so označene države z nepopolnimi podatki o prevalenci HDV. Nekateri podatki o prevalenci izvirajo iz starejših raziskav iz osemdesetih in devetdesetih let prejšnjega stoletja. Črne črte označujejo okvirno razširjenost posameznih genotipov HDV, pri čemer je genotip HDV-1 prisoten po vsem svetu.

Znanih je osem genotipov HDV, označenih kot HDV-1 do HDV-8. Okužba z genotipom HDV-1, ki je prisoten po vsem svetu, se lahko klinično izrazijo na zelo različne načine. Genotip 2, prej imenovan 2a, se pojavlja na Japonskem, Kitajskem, Tajvanu, v južni Aziji in v ruski pokrajini Yakutia. Tajvanska raziskava je dokazala, da v primerjavi z genotipom HDV-2 pri okužbi z genotipom HDV-1 manjši delež bolnikov okreva ter da ima večina teh bolnikov težji potek bolezni (Su in sod., 2006). HDV-3 predstavlja najbolj genetsko raznolik genotip HDV, saj se v primerjavi s posameznimi

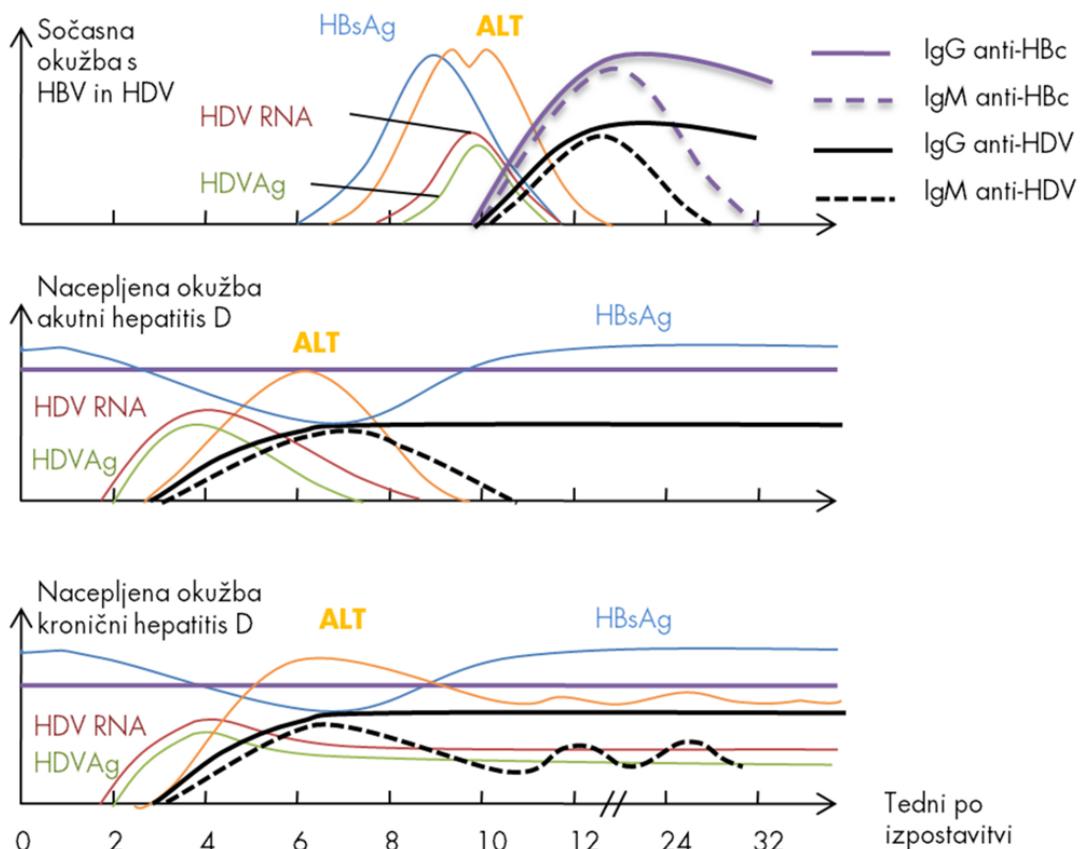
izolati znotraj ostalih genotipov HDV, posamezni izolati genotipa HDV-3 med seboj bolj genetsko razlikujejo; omenjena genetska raznolikost genotipa HDV-3 odseva tudi genetsko raznolikost na istem področju prisotnega virusa pomočnika, HBV genotipa F. HDV-3 je prisoten v Amazonski kotlini in Srednji Ameriki in je povezan s posebno težko obliko fulminantnega hepatitisa, imenovanega vročica Labrea, ki pogosto vodi v akutno odpoved jeter in smrt; vročica Labrea je prizadela predvsem prvotne prebivalce področja, še posebno otroke (Bensabath in sod., 1987). Genotip 4, prej imenovan 2b, se pojavlja na Japonskem in Tajvanu. Kljub temu, da ima okužba s HDV-4 pogosto blag klinični potek, je različica HDV-4 na japonskem otoku Miyako v nasprotju z različico HDV-4 na Tajvanu povezana z večjo verjetnostjo napredovanja v cirozo jeter. Genotipe 5-8 so odkrili pri posameznikih afriškega izvora in še niso podrobno raziskani (Hughes in sod., 2011; Alfaiate in sod., 2015; Rizzetto, 2015).

### **2.2.7 Mikrobiološka diagnostika hepatitisa D**

Temelj rutinskega opredeljevanja okužbe s HDV so serološke preiskave, večinoma v obliki encimskoimunskih testov, s katerimi v serumu bolnikov dokazujemo prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV, protiteles anti-HDV IgM ter virusne beljakovine HDV-Ag, uporablja pa se tudi molekularno dokazovanje HDV RNA v serumu (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014).

Ker je v mnogih predelih sveta okužba s HDV še vedno endemična in ker se v zahodnem svetu prevalenca okužbe s HDV ne znižuje občutno, naj bi v skladu z evropskimi smernicami za obravnavo okužbe s HBV na okužbo s HDV testirali vse s HBV-okužene osebe, tudi neaktivne nosilce HBsAg, predvsem pa bolnike s kroničnim hepatitisom B, in ne le oseb z višjim tveganjem za okužbo s HDV (IUD, priseljencev z endemskih območij, bolnikov na hemodializi, moških, ki imajo spolne odnose z moškimi, oseb ki imajo spolne stike z znanimi nosilci HDV, medicinskega osebja ter osebja javne varnosti) (Hughes in sod., 2011; Noureddin in Gish, 2014).

Slika 6 prikazuje serološke značilnosti sočasne in nacepljene okužbe s HBV in HDV ter kroničnega hepatitisa D.



Slika 6: Serološke značilnosti sočasne in nacepljene okužbe s HBV in HDV ter kroničnega hepatitis D (Seme in sod., 2011: 98).

Tako pri sočasni kot pri nacepljeni okužbi se HDV-Ag in HDV RNA v krvi bolnika pojavita nekaj dni pred pojavom ali hkrati s pojavom prvih simptomov hepatitis D. Protitelesa anti-HDV IgM in IgG se v krvi pojavijo 1-2 tedna po pojavu HDV-Ag in HDV RNA (Hughes in sod., 2011; Seme in sod., 2011); ob ali kmalu po pojavu simptomov se pojavijo protitelesa anti-HDV IgM, le malo zatem pa tudi protitelesa anti-HDV IgG.

Sočasno okužbo s HBV in HDV lahko v istem serumskem vzorcu ali v vzorcih odvzetih znotraj enega meseca dokažemo s sledečimi označevalci virusne okužbe: HBsAg, protitelesa anti-HBc IgM ter enim ali več virusnih kazalcev hepatitis D (HDV-Ag, HDV RNA in protitelesa anti-HDV IgM). Pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B na podoben način (brez dokaza prisotnosti protiteles anti-HBc IgM) dokažemo tudi nacepljeno okužbo s HDV (Seme in sod., 2011). Ob začetku nacepljene okužbe se lahko serumska raven HBsAg zniža zaradi medsebojnega vpliva visusov HBV in HDV (Matičič, 2014).

Za dokazovanje aktivnosti HDV se primarno priporoča dokazovanje virusne RNA v serumu, z uporabo visoko občutljivih metod RT-PCR; kot alternativo lahko uporabimo tudi dokazovanje protiteles anti-HDV IgM, predvsem pri HDV RNA-negativnih bolnikih s kliničnimi znaki hepatitis D, saj so rezultati HDV RT-PCR zaradi raznolikosti genomov posameznih genotipov HDV lahko lažno negativni, vendar tudi protitelesa anti-HDV IgM niso 100 % občutljiv in specifičen označevalec okužbe s HDV oz. njegove replikativne aktivnosti (Hughes in sod., 2011; Wranke in sod., 2014; Alfaiate in sod., 2015).

Pri sočasni okužbi ostanejo HDV-Ag, HDV RNA in protitelesa anti-HDV IgM v krvi okužene osebe od štiri do osem tednov, prvi izgine HDV-Ag, nato HDV RNA, nazadnje pa protitelesa anti-HDV IgM; hkrati se začne bolnikovo okrevanje. Če pri bolniku HDV RNA in protitelesa anti-HDV IgM v krvi vztrajajo več kot 10 tednov, to kaže na prehod bolezni v kronični hepatitis D. Serumska protitelesa anti-HDV IgM nato ostanejo prisotna pri večini bolnikov s kroničnim hepatitisom D, zaradi nevtralizacijskega učinka protiteles pa pri omenjenih bolnikih redko dokažemo prisotnost serumskega HDV-Ag (Hughes in sod., 2011; Seme in sod., 2011).

Dokazovanje prisotnosti celokupnih protiteles anti-HDV (anti-HDV IgM in anti-HDV IgG) je ponavadi prvi korak v diagnostiki okužbe s HDV. Ker v prvih dneh po okužbi s HDV protitelesa anti-HDV še niso prisotna in je rezultat testiranja lahko lažno negativen, moramo nosilce HBsAg z aktivnim hepatitisom na prisotnost protiteles anti-HDV testirati ponovno (3 oz. 10 tednov po okužbi; Slika 6) ali jih testirati na prisotnost HDV RNA (1-8 tednov po okužbi; Slika 6) (Noureddin in Gish, 2014; Alfaiate in sod., 2015).

HDV-Ag lahko v serumu nekaterih imunsko-kompetentnih bolnikov dokažemo le pred pojavom simptomov akutnega hepatitis D. Trajanje prisotnosti HDV-Ag in njegova koncentracija v krvi sta ponavadi sorazmerna s težavnostjo bolezni; prisotnost HDV-Ag pogosteje dokažemo pri fulminantnem in težkem akutnem hepatitisu in redkeje pri blažjem poteku bolezni. Po pojavi celokupnih protiteles anti-HDV postane HDV-Ag v serumu nezaznaven; pri kroničnem hepatitisu D ga lahko v serumu občasno dokažemo le pri imunsko-kompromitiranih bolnikih, ki imajo delno ali popolnoma okvarjen imunski odziv (Gripon in sod., 1987; Alfaiate in sod., 2015).

Če v serumu testirane osebe dokažemo zgolj celokupna protitelesa anti-HDV, ne pa tudi kazalcev aktivne okužbe s HDV (HDV-Ag, HDV RNA in protiteles anti-HDV IgM), gre pri testirani osebi najverjetneje za preteklo, zazdravljenou okužbo s HDV (Seme in sod., 2011). Titer protiteles anti-HDV IgG v nekaj tednih do nekaj mesecih po izveneli sočasni okužbi začne postopno upadati, lahko tudi na nezaznavno raven (Matičič, 2014).

HDV RNA je zaznavna pri vseh bolnikih s kroničnim hepatitisom D in postane nezaznavna po spontani zazdravljivosti ali po uspešnem protivirusnem zdravljenju. Korelacija med virusnim bremenom in težavnostjo bolezni ni povsem jasna, kvantifikacija HDV RNA pa se uporablja predvsem za spremljanje odziva na protivirusno zdravljenje (Hughes in sod., 2011; Alfaiate in sod., 2015). Zaradi genetske raznolikosti genotipov HDV je potrebno pri razvoju oligonukleotidnih začetnikov in sond ter pri postavljanju protokolov za pomnoževanje virusne RNA upoštevati posebnosti nukleotidnega zaporedja. Za postavitev kvantitativnih različic HDV RT-PCR lahko uporabimo s strani WHO odobren standard z znano koncentracijo virusne RNA (Chudy in sod., 2013). S koncentracijo HDV RNA pozitivno korelira tudi koncentracija HBsAg, ki prav tako lahko služi za spremljanje uspešnosti zdravljenja (Hughes in sod., 2011).

Koncentracija HBsAg in rezultati jetrnih testov ne korelirajo s težavnostjo bolezni, zato se za ocenjevanje le-te uporablja biopsija jeter ali ocenjevalno klinično točkovanie (Hughes in sod., 2011; Alfaiate in sod., 2015).

Pri 70-90 % bolnikov s hepatitisom D v krvi ne zaznamo HBeAg, ampak le protitelesa anti-HBe. Ker HDV domnevno zavira pomnoževanje HBV, v serumu zaznamo tudi nizko ali ničelno koncentracijo HBV DNA, ki pa je lahko višja pri HBeAg-pozitivnih bolnikih. Koncentracija HBV DNA lahko poraste tudi po spontani ali protivirusno zazdravljeni okužbi s HDV (Hughes in sod., 2011).

V posameznih primerih ima lahko klinični pomen tudi genotipizacija HDV, saj sta genotipa HDV-1 in -3 povezana s težjo klinično sliko bolezni in slabšim odzivom na protivirusno zdravljenje (Su in sod., 2006).

S HDV-okužene bolnike naj bi zaradi pogoste sočasne okužbe s HCV in/ali HIV testirali tudi na prisotnost teh dveh virusov (Hughes in sod., 2011).

## 2.2.8 Zdravljenje hepatitisa D

Pogoj za uspešno zdravljenje hepatitisa D je sočasno uspešno nadzorovanje oz. zdravljenje hepatitisa B, saj genom HDV ne nosi zapisa za lastne encime in tako ni usmerjenega protivirusnega zdravljenja proti hepatitisu D (Seme in sod., 2011; Matičič, 2014). Akutni hepatitis D zdravimo simptomatsko, fulminantni potek hepatitisa D pa zahteva intenzivno zdravljenje in po potrebi tudi presaditev jeter. V primerjavi z bolniki s kroničnim hepatitisom B pri bolnikih okuženih s HBV in HDV po presaditvi jeter redkeje pride do ponovne okužbe s HBV (Matičič, 2014); ponovno okužbo s HBV preprečujemo z dolgotrajno terapijo s poliklonskimi hiperimunimi B imunoglobulini (Hughes in sod., 2011). Latentna okužba s HDV v odsotnosti HBV lahko v

humaniziranih miškah traja do šest tednov; ob nacepljeni okužbi s HBV se razvije v aktivno bolezen (Giersch in sod., 2014).

Pri kroničnem hepatitisu D, ki običajno poteka z izrazito nekroinflamatorno in fibrotično aktivnostjo, je učinkovito le zdravljenje s standardnim ali pegiliranim interferonom alfa (PEG IFN- $\alpha$ ) (Matičič, 2014). Natančen mehanizem delovanja IFN- $\alpha$  pri okužbi s HDV ni znan, saj na pomnoževanje HDV morda vpliva posredno, preko z ADAR posredovanega urejanja, ali z inhibicijo virusnega vstopa v celico (Alfaiate in sod., 2015). Ciroza jeter, povezana z okužbo s HDV, ter rezultati jetrnih testov pred začetkom zdravljenja ne vplivajo na odziv na zdravljenje s PEG IFN- $\alpha$  (Hughes in sod., 2011). Zdravljenje ostaja empirično in prilagojeno posameznemu bolniku, saj pri nekaterih bolnikih dosežemo le izničenje viremije, ne pa tudi izničenja HBsAg, ki je cilj zdravljenja. Kljub temu, da lamivudin, adefovir, entekavir, ribavirin in klevudin proti HDV niso učinkoviti, so raziskave pri bolnikih, okuženih s HIV, HBV in HDV, dokazale, da dolgotrajno zdravljenje s tenofovirjem zmanjša tudi aktivnost HDV in izboljša klinično sliko bolezni (Alfaiate in sod., 2015). Zdravljenje z nukleot(z)idnimi analogi je primerno za bolnike s hitrim naraščanjem koncentracije HBV v krvi (Hughes in sod., 2011).

Trenutno so v razvoju številna potencialno nova zdravila proti HDV; ker je celična prenilacija L-HDV-Ag ključna za translokacijo in sestavljanje virusnih delcev, v kliničnih raziskavah testirajo učinkovitost inhibitorjev prenilacije (npr. lonafarnib). Tarča zdravil bi lahko bile tudi ostale pomembne posttranslacijske modifikacije HDV-Ag, funkcionalne domene virusnega genoma in virusna ribocimska aktivnost. Že omenjeno novo kandidatno protivirusno zdravilo Myrcludex-B je sintetični peptid, ki oponaša 47 miristoiliranih N-terminalnih aminokislin L-HBsAg in se veže na receptor NTCP ter s svojo vezavo prepreči vezavo in vstop HBV in HDV. Myrcludex-B med medceličnim širjenjem okužbe s HBV tudi ovira znotrajcelično kopiranje cccDNA, kar so dokazali na humaniziranih miškah, vendar prepreči tudi transport žolčne kisline. Ciklosporin A, ki ga pogosto uporabljam kot imunosupresor po presaditvi jeter, *in vitro* preko NTCP preprečuje vstop HBV in HDV v celico. Ostali inhibitorji NTCP, odobreni za druge indikacije (npr. ezetimib, irbesartan in ritonavir), prav tako preprečijo zgodnje faze okužbe s HDV. Kot potencialno primerne tarče protivirusnih zdravil raziskujejo tudi interakcije med HBsAg in heparan-sulfatnimi proteoglikani. Proti okužbi s HBV so učinkoviti tudi novi imunomodulatorni dejavniki, npr. interferon lambda in agonisti receptorjev PRR (angl. *pattern recognition receptor*) (Alfaiate in sod., 2015; Sureau in Negro, 2016).

## 2.2.9 Preprečevanje okužbe s HDV

Vsi ukrepi za preprečevanje okužbe s HBV, opisani v podpoglavlju 2.1.7., veljajo tudi za preprečevanje okužbe s HDV. Specifičnega cepiva proti hepatitisu D ni, vendar lahko s cepljenjem proti HBV pri HBV-neprekuženih osebah uspešno preprečimo tudi okužbo s HDV. S cepljenjem proti HBV ne moremo preprečiti nacepljene okužbe s HDV pri kroničnih nosilcih HBV, saj cepivo pri njih ne izzove nastanka protiteles anti-HBs. Protitelesa usmerjena proti HDV-Ag nimajo močne nevtralizacijske učinkovitosti, zato cepiva na podlagi HDV-Ag niso primerna za preprečevanje okužbe s HDV. Trenutno raziskujejo možnosti cepljenja z notranjimi virusnimi beljakovinami oz. peptidi, ki izzovejo odziv citotoksičnih celic T in preprečijo širjenje virusa (Roggendorf, 2012; Alfaiate in sod., 2015).

## 2.2.10 Okužba s HDV v Sloveniji

Štunf in sod. (2005) so izvedli doslej edino raziskavo prevalence HDV v Sloveniji. V retrospektivno raziskavo so vključili 400 serumskih vzorcev, ki so bili HBsAg-pozitivnim bolnikom odvzeti med letoma 1998 in 2002, ter prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV dokazali pri 1/400 (0,25%) bolnikov, kar je bila takrat najnižja opisana prevalenca HDV pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B na področju južnoevropskih in sredozemskih držav.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

V retrospektivno raziskavo smo vključili serumske vzorce bolnikov iz zbirke kliničnih vzorcev Laboratorija za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, pri katerih smo prisotnost HBsAg prvič dokazali v obdobju med februarjem 2002 in decembrom 2015, in ki so bili ob odvzemu kronološko zadnjega serumskega vzorca že vsaj šest mesecev HBsAg-pozitivni. Z generiranjem naključnih števil v programu Excel (Microsoft, Redmond, WA, ZDA) smo izmed vseh primernih bolnikov s kroničnim hepatitisom B naključno izbrali 668 bolnikov, pri katerih smo na prisotnost označevalcev okužbe s HDV testirali zadnji odvzet HBsAg-pozitiven serumski vzorec.

Vsi klinični vzorci so bili do izvedbe testiranja shranjeni na –30 °C.

#### 3.2 METODE

##### **3.2.1 Določanje prevalence okužbe s HDV pri slovenskih bolnikih s kroničnim hepatitisom B**

###### **3.2.1.1 Kvalitativno dokazovanje prisotnosti celokupnih protiteles proti HDV**

Celokupna protitelesa proti HDV (IgG in IgM) smo v serumskih vzorcih kvalitativno dokazovali z neposredno kompetitivno encimskoimunsko metodo (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) z uporabo komercialno dostopnega kompleta kemikalij ETI-AB-DELTAK-2 (DiaSorin, Saluggia, Italija) z 99,0 % (95 % interval zaupanja; IZ: 97,8-99,6 %) klinično specifičnostjo in 99,4 % (95 % IZ: 96,8-100 %) klinično občutljivostjo za dokazovanje prisotnosti protiteles anti-HDV. Test smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami oz. reakcijskimi posodicami (testnimi mesti). V vsaki vdolbinici, ki predstavlja trdni nosilec, je vezana določena količina rekombinantnega HDV-Ag. Testnemu sistemu hkrati dodamo preiskovan serumski vzorec (oziroma pozitivno ali negativno kontrolo) in testna protitelesa anti-HDV humanega izvora, ki so označena z encimom hrenova peroksidaza (angl. *horseradish peroxidase; HRP*). V kolikor so v bolnikovem serumu prisotna protitelesa anti-HDV, le-ta z encimsko označenimi testnimi protitelesi anti-HDV tekmujejo za vezavo na omejeno količino HDV-Ag. S HRP-označena protitelesa se vežejo na mesta, ki jih ne zasedejo protitelesi iz preiskovanega serumata; količina vezanih s HRP-označenih protiteles je tako nasprotno sorazmerna koncentraciji protiteles anti-HDV v preiskovanem vzorcu. Encimsko aktivnost HRP ugotavljamo z

dodatkom brezbarvnega kromogen/substrata, ki se ob delovanju HRPobarva, ter intenzitetu barve izmerimo spektrofotometrično. Manjša kot je obarvanost in s tem absorptivnost testnega mesta, več protiteles anti-HDV je prisotnih v bolnikovem serumu.

Vsaka mikrotitrskra ploščica je vsebovala tri testna mesta s pozitivnim kontrolnim vzorcem, dve testni mesti z negativnim kontrolnim vzorcem ter testno mesto za umerjanje spektrofotometra oz. merjenje osnovne absorbance kromogen/substrata (angl. *blank*). Oba kontrolna vzorca sta del diagnostičnega kompleta kemikalij; pozitivno kontrolo predstavlja raztopina protiteles anti-HDV, negativno kontrolo pa človeški serum/plazma, ki ne vsebuje protiteles anti-HDV.

V posamezne vdolbinice smo najprej prenesli 50 µl posamezne kontrole oz. preiskovanega vzorca, nato pa smo v vse vdolbinice dodali še 100 µl testnih protiteles, ki smo jih predhodno v razmerju 1:50 redčili s priloženo raztopino človeškega serumaplazme, pufra PBS in konzervansov. Tako pripravljeno mikrotitrsko ploščico smo prekrili s samolepilno folijo, da bi preprečili izhlapevanje, in jo tri ure inkubirali pri 37 °C.

Po končani inkubaciji smo vsako vdolbinico mikrotitrsko ploščico s pomočjo avtomatskega spiralca petkrat zapored sprali s 300 µl 1-kratnega spiralnega pufra, ki smo ga pripravili iz 25-kratne raztopine spiralnega pufra, ki vsebuje pufer PBS, Tween 20 in konzervanse, ter destilirane vode. S spiranjem smo odstranili vsa nespecifično vezana ter nevezana protitelesa in beljakovine ter se pred nadaljevanjem prepričali, da so vsa testna mesta povsem suha.

V nadaljevanju smo v vsako vdolbinico dodali 100 µl mešanice kromogen/substrata, ki smo si ga v razmerju 1:1 pripravili iz kromogena (pufrska raztopina derivata tetrametilbenzidina) in encimskega substrata (pufrska raztopina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), in ploščico 30 minut inkubirali v temi pri sobni temperaturi.

Po končani inkubaciji smo v vsako testno vdolbinico dodali 100 µl reagenta za prekinitev encimske reakcije (1 N žveplene kisline) ter v roku ene ure izmerili absorbanco vzorcev pri 450/620 nm s pomočjo spektrofotometra Sunrise (Tecan, Männedorf, Švica) in programa za analizo podatkov Magellan (Tecan). Pred merjenjem absorbance testnih vzorcev smo spektrofotometer umerili z merjenjem absorbance praznega testnega mesta s kromogen/substratom, ki ga analizator nato odšteje od izmerjene vrednosti absorbance testnih vzorcev.

V skladu z navodili proizvajalca smo po merjenju absorbance za vsak posamezen test (posamezno mikrotitrsko ploščico) preverili veljavnost testiranja oz. ali so bili izpolnjeni naslednji pogoji:

- Izmerjena vrednost absorbance testnega mesta, ki vsebuje le kromogen/substrat (testno mesto *blank*) je večja ali enaka 0,000 ter manjša ali enaka 0,150 ( $0,000 \leq BLK \leq 0,150$ ).
- Povprečna vrednost izmerjenih absorbanc negativnih kontrolnih vzorcev je večja ali enaka 0,600 ( $NC\bar{x} \geq 0,600$ ). Vrednost  $NC\bar{x}$  smo izračunali kot aritmetično sredino vrednosti izmerjenih absorbanc vseh treh negativnih kontrolnih vzorcev v danem testu (mikrotitrski ploščici).
- Povprečna vrednost izmerjenih absorbanc pozitivnih kontrolnih vzorcev je manjša ali enaka 0,080 ( $PC\bar{x} \leq 0,080$ ). Vrednost  $PC\bar{x}$  smo izračunali kot aritmetično sredino vrednosti izmerjenih absorbanc obeh pozitivnih kontrolnih vzorcev v danem testu (mikrotitrski ploščici).
- Razlika med povprečno vrednostjo absorbanc negativnih kontrolnih vzorcev in povprečno vrednostjo absorbanc pozitivnih kontrolnih vzorcev je večja ali enaka 0,500 ( $NC\bar{x} - PC\bar{x} \geq 0,500$ ).

Če niso izpolnjeni vsi zgoraj navedeni pogoji, je test neveljaven in ga je treba ponoviti.

Mejno vrednost za kvalitativno opredelitev prisotnosti protiteles anti-HDV v posameznih preiskovanih vzorcih smo za vsak posamezen test izračunali po formuli  $0,5(NC\bar{x} + PC\bar{x})$ , pri čemer je  $NC\bar{x}$  povprečna vrednost absorbanc negativnih kontrolnih vzorcev v tem testu,  $PC\bar{x}$  pa povprečna vrednost absorbanc pozitivnih kontrolnih vzorcev v tem testu. Preiskovane vzorce, katerih izmerjena vrednost absorbance je bila manjša ali enaka izračunani mejni vrednosti, smo opredelili kot anti-HDV-reaktivne, vzorce z izmerjeno vrednostjo absorbance, ki je bila višja ali enaka mejni vrednosti, pa kot anti-HDV-nereaktivne. Vzorce z izmerjeno vrednostjo absorbance okrog mejne vrednosti ( $\pm 10\%$ ) smo testirali ponovno, da bi potrdili ali ovrgli rezultat prvega testiranja. Tudi v drugo reaktivne vzorce smo opredelili kot anti-HDV-reaktivne, prvič reaktivne in drugič nereaktivne vzorce pa kot anti-HDV-nereaktivne.

### **3.2.2 Opredeljevanje akutne, kronične oz. prebolele okužbe s HDV**

V primeru, da smo pri posameznem bolniku dokazali prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV, smo na prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV, protiteles anti-HDV IgM, virusnega antiga HDV-Ag in virusne RNA dodatno testirali vse HBsAg-pozitivne serumske vzorce posameznega bolnika, da bi opredelili, ali gre za akutno, kronično ali prebolelo okužbo s HDV.

### 3.2.2.1 Kvalitativno dokazovanje prisotnosti protiteles anti-HDV IgM

Prisotnost protiteles anti-HDV IgM smo v serumskih vzorcih kvalitativno dokazovali s komercialno dostopnim kompletom kemikalij ETI-DELTA-IGMK-2 (DiaSorin), ki temelji na posredni encimskoimunski metodi z ujetjem antiga (angl. *antibody capture ELISA technique*), z 99,0 % (95 % IZ: 97,9-99,6 %) klinično specifičnostjo in 99,5 % (95 % IZ: 97,4-100 %) klinično občutljivostjo za dokazovanje prisotnosti protiteles anti-HDV IgM. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami oz. reakcijskimi posodicami (testnimi mesti). V vsaki vdolbinici, ki predstavlja trdni nosilec, je vezana določena količina mišjih monoklonskih protiteles IgG, ki vežejo človeška protitelesa anti-HDV IgM v serumu ali kontrolnem vzorcu. Na vezana anti-HDV IgM se veže dodani HDV-Ag, na katerega se naknadno vežejo dodana s HRP-označena testna protitelesa anti-HDV. Encimsko aktivnost HRP ugotavljamo z dodatkom brezbarvne raztopine kromogen/substrata, ki se ob delovanju encimaobarva, intenzitetu barve pa izmerimo spektrofotometrično. Količina vezanih, encimsko označenih protiteles in posledično encimska aktivnost je sorazmerna koncentraciji protiteles anti-HDV IgM v preiskovanem kliničnem vzorcu. Večja kot je obarvanost in s tem absorptivnost testnega mesta, več protiteles anti-HDV IgM je prisotnih v bolnikovem serumu.

Vsaka mikrotitrska ploščica je vsebovala tri testna mesta s pozitivnim kontrolnim vzorcem, dve testni mesti z negativnim kontrolnim vzorcem ter testno mesto za umerjanje spektrofotometra oz. merjenje osnovne absorbance kromogen/substrata (angl. *blank*). Oba kontrolna vzorca sta del diagnostičnega kompleta kemikalij; pozitivni kontrolni vzorec je raztopina človeških himernih protiteles anti-HDV IgM, pufra PBS, BSA, stabilizatorjev in konzervansov, negativni kontrolni vzorec pa je raztopina anti-HDV-nereaktivnega človeškega serumaplazme, pufra PBS, BSA, stabilizatorjev, konzervansov in inertnega modrega barvila.

V skladu z navodili proizvajalca smo pred testiranjem 10 µl posameznega preiskovanega serumskega vzorca najprej redčili z 1 ml priložene raztopine človeškega serumaplazme, pufra PBS, nespecifičnih človeških protiteles IgG, nespecifičnih mišjih monoklonskih protiteles IgG, BSA, stabilizatorjev, konzervansov in inertnega modrega barvila. V posamezne vdolbinice mikrotitrsko ploščico smo nato prenesli 100 µl posameznega redčenega vzorca ter pozitivno in negativno kontrolo; mikrotitrsko ploščico smo nato prelepili s folijo in jo eno uro inkubirali pri 37 °C.

Po končani inkubaciji smo vsako vdolbinico mikrotitrsko ploščico s pomočjo avtomatskega spiralca petkrat zapored sprali s 300 µl 1-kratnega spiralnega pufra, ki smo ga pripravili enako kot pri predhodno opisanem kompletu kemikalij ETI-AB-DELTAK-2.

Po spiranju smo preiskovanim in kontrolnim vzorcem dodali po 100 µl testne raztopine rekombinantnega HDV-Ag, ki vsebuje še telečji plodovni serum (angl. *fetal calf serum*), fosfatno-citratni pufer in konzervanse. Mikrotitrsko ploščico smo prelepili s folijo in jo eno uro inkubirali pri 37 °C.

Inkubaciji je sledilo spiranje mikrotitrsko ploščice, kot je opisano zgoraj. Nato smo v vsako testno mesto dodali 100 µl raztopine, ki smo jo pripravili iz enega deleža raztopine testnih človeških in mišjih monoklonskih protiteles anti-HDV, označenih s HRP, pufra TRIS, BSA, stabilizatorjev in konzervansov, ter iz 50 deležev raztopine človeškega seruma/plazme, pufra PBS, telečjega seruma in konzervansov. Enourni inkubaciji pri 37 °C je sledilo spiranje mikrotitrsko ploščice s predhodno opisanim spiralnim pufrom in po enakem postopku.

V vsako, tudi v prazno testno mesto smo nato dodali 100 µl mešanice kromogen/substrata, ki smo jo pripravili iz enakovrednega deleža kromogena (derivat tetrametilbenzidina v citratnem pufru) in encimskega substrata ( $H_2O_2$  v citratnem pufru). Mikrotitrsko ploščico smo nato 30 minut inkubirali v temi pri sobni temperaturi.

Po končani inkubaciji smo v vsako testno vdolbinico dodali 100 µl reagenta za prekinitev encimske reakcije (1 N raztopine žveplene kisline) ter v roku ene ure izmerili absorbanco vzorcev pri 450/620 nm s prej opisanim spektrofotometrom.

V skladu z navodili proizvajalca smo po merjenju absorbance za vsak posamezen test (posamezno mikrotitrsko ploščico) preverili veljavnost testiranja oz. ali sta bila izpolnjena naslednja pogoja:

- Izmerjena vrednost absorbance testnega mesta, ki vsebuje le kromogen/substrat (testno mesto *blank*), je večja ali enaka 0,000 ter manjša ali enaka 0,150 ( $0,000 \leq BLK \leq 0,150$ ).
- Razlika med povprečno vrednostjo absorbanc pozitivnih kontrolnih vzorcev in povprečno vrednostjo absorbanc negativnih kontrolnih vzorcev je večja ali enaka 0,300 ( $PC\bar{x} - NC\bar{x} \geq 0,300$ ). Povprečni vrednosti absorbanc pozitivnih in negativnih kontrolnih vzorcev smo izračunali po postopku, ki je opisan v podpoglavlju 3.2.1.1.

Če nista izpolnjena oba zgoraj navedena pogoja, je test neveljavven in ga je treba ponoviti.

Mejno vrednost za kvalitativno opredelitev prisotnosti protiteles anti-HDV IgM v posameznih preiskovanih vzorcih smo za vsak posamezen test izračunali po formuli  $NC\bar{x} + 0,100$ , pri čemer je  $NC\bar{x}$  povprečna vrednost absorbanc negativnih kontrolnih vzorcev v posameznem testu. Preiskovane vzorce, katerih izmerjena vrednost absorbance je bila večja ali enaka izračunani mejni vrednosti, smo opredelili kot anti-

HDV IgM-reakтивne, vzorce z izmerjeno vrednostjo absorbance nižjo ali enako mejni vrednosti pa kot anti-HDV IgM-nereaktivne. Vzorce z izmerjeno vrednostjo absorbance okrog mejne vrednosti ( $\pm 10\%$ ) smo testirali ponovno, da bi potrdili ali ovrgli rezultat prvega testiranja. Tudi v drugo reaktivne vzorce smo opredelili kot anti-HDV IgM-reakтивne, prvič reaktivne in drugič nereaktivne vzorce pa kot anti-HDV IgM-nereaktivne.

### 3.2.2.2 Kvalitativno dokazovanje prisotnosti virusnega antiga HDV-Ag

Virusni antigen (HDV-Ag) smo v serumskih vzorcih kvalitativno dokazovali z neposredno nekompetitivno encimskoimunsko metodo z uporabo komercialno dostopnega kompleta kemikalij ETI-DELTAK-2 (DiaSorin) z 99,0 % (95 % IZ: 98,0-99,6 %) klinično specifičnostjo in 100 % (95 % IZ: 87,2-100 %) klinično občutljivostjo za dokazovanje prisotnosti HDV-Ag. Test smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca v mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami oz. reakcijskimi posodicami (testnimi mesti). V vsaki vdolbinici, ki predstavlja trdni nosilec, je vezana določena količina človeških protiteles anti-HDV IgG. Testnemu sistemu hkrati dodamo preiskovan serumski vzorec (ozioroma pozitivni ali negativni kontrolni vzorec) in detergent, ki razgradi virusno ovojnico, kar omogoči izpostavitev HDV-Ag in vezavo na trdni nosilec. Nato dodamo s HRP-označena testna protitelesa anti-HDV, ki se vežejo na HDV-Ag iz kliničnega ali kontrolnega vzorca. Encimsko aktivnost HRP ugotavljamo z dodatkom brezbarvne raztopine kromogen/substrata, ki se ob delovanju encimaobarva, intenzitetu barve pa izmerimo spektrofotometrično. Količina vezanih, encimsko označenih protiteles in posledično encimska aktivnost je sorazmerna koncentraciji HDV-Ag v preiskovanem kliničnem vzorcu. Večja kot je obarvanost in s tem absorptivnost testnega mesta, več antiga je prisotnega v bolnikovem serumu.

Vsaka mikrotitrsko ploščica je vsebovala tri testna mesta z negativnim kontrolnim vzorcem, dve testni mesti s pozitivnim kontrolnim vzorcem ter testno mesto za umerjanje spektrofotometra oz. merjenje osnovne absorbance kromogen/substrata (angl. *blank*). Pozitivno kontrolo predstavlja raztopina rekombinantnega HDV-Ag, človeškega serum/plazme, BSA, fosfatno-citratnega puferja in konzervansov, negativno kontrolo pa raztopina anti-HDV-nereaktivnega človeškega serum/plazme, ter konzervansov.

V vsa testna mesta smo najprej prenesli 50  $\mu\text{l}$  reagenta Nonidet P-40, ki vsebuje 2 % raztopino neionskega detergenta Igepal 300 CA-630, pufer PBS (pH 7,4), konzervanse ter inertno modro barvilo, nato pa dodali po 100  $\mu\text{l}$  kontrolnih in preiskovanih serumskih vzorcev. Mikrotitrsko ploščico smo prelepili s samolepilno folijo in jo eno uro inkubirali pri 37 °C.

Po končani inkubaciji smo vsako vdolbinico mikrotitrsko ploščice s pomočjo avtomatskega spiralca petkrat zapored sprali s 300 µl 1-kratnega spiralnega pufrja, ki smo ga pripravili enako kot pri predhodno opisanem kompletu kemikalij ETI-AB-DELTAK-2. Pred nadaljevanjem testa smo se prepričali, da so vsa testna mesta povsem suha.

Po spiranju smo v vsako testno mesto dodali 100 µl raztopine, ki smo jo pripravili iz enega deleža raztopine s HRP-označenih testnih protiteles anti-HDV, pufra TRIS, BSA, stabilizatorjev in konzervansov, ter 50 deležev raztopine človeškega seruma/plazme, pufra PBS, telečjega seruma in konzervansov. Enourni inkubaciji pri 37 °C je sledilo spiranje mikrotitrsko ploščice s predhodno opisanim spiralnim pufrom in po enakem postopku.

V vsako, tudi prazno testno mesto, smo nato dodali 100 µl že pripravljenega reagenta kromogen/substrat (raztopina tetrametilbendizina in vodikovega peroksida) ter ploščico 30 minut inkubirali v temi pri sobni temperaturi .

Po končani inkubaciji smo v vsako testno mesto dodali 100 µl reagenta za prekinitev encimske reakcije (0,4 N raztopine žveplene kisline) ter v roku ene ure izmerili absorbanco vzorcev pri 450/620 nm s prej opisanim spektrofotometrom.

V skladu z navodili proizvajalca smo po merjenju absorbance za vsak posamezen test (posamezno mikrotitrsko ploščico) preverili veljavnost testiranja oz. ali so bili izpolnjeni naslednji pogoji:

- Izmerjena vrednost absorbance testnega mesta, ki vsebuje le kromogen/substrat (testno mesto *blank*), je večja ali enaka 0,000 ter manjša ali enaka 0,150 ( $0,000 \leq BLK \leq 0,150$ ).
- Razlika med povprečno vrednostjo absorbanc pozitivnih kontrolnih vzorcev in povprečno vrednostjo absorbanc negativnih kontrolnih vzorcev je večja ali enaka 0,500 ( $PC\bar{x} - NC\bar{x} \geq 0,500$ ). Povprečni vrednosti absorbanc pozitivnih in negativnih kontrolnih vzorcev smo izračunali po postopku, ki je opisan v podpoglavlju 3.2.1.1.
- Povprečna vrednost absorbanc negativnih kontrolnih vzorcev je manjša od 0,100 ( $NC\bar{x} < 0,100$ ).
- Vrednost absorbance vsakega posameznega negativnega kontrolnega vzorca je manjša od 0,110 ( $NCx_n < 0,110$ ), pri čemer je  $NCx_n$  vrednost absorbance negativnega kontrolnega vzorca v n-ti ponovitvi danega testa (mikrotitracijski ploščici),  $n = 3$ . Če vrednost absorbance katerekoli ponovitve negativnega kontrolnega vzorca ne ustreza temu kriteriju, jo zanemarimo in povprečno vrednost absorbance negativnih kontrolnih vzorcev ponovno izračunamo iz preostalih dveh ponovitev negativnih kontrolnih vzorcev. Če kriteriju ne ustreza

vrednost absorbance več kot ene ponovitve negativnega kontrolnega vzorca, je celoten poskus neveljaven in ga je treba ponoviti.

Če niso izpolnjeni vsi zgoraj navedeni pogoji, je test neveljaven in ga je treba ponoviti.

Mejno vrednost za kvalitativno opredelitev prisotnosti HDV-Ag v posameznih preiskovanih vzorcih smo za vsak posamezen test izračunali po formuli  $NC\bar{x} + 0,100$ , pri čemer je  $NC\bar{x}$  povprečna vrednost absorbanc negativnih kontrolnih vzorcev v posameznem testu. Preiskovane vzorce, katerih izmerjena vrednost absorbance je bila večja ali enaka izračunani mejni vrednosti, smo opredelili kot HDV-Ag-reaktivne, vzorce z izmerjeno vrednostjo absorbance, ki je bila nižja od mejne vrednosti, pa kot HDV-Ag-nereaktivne. Vzorce z izmerjeno vrednostjo absorbance okrog mejne vrednosti ( $\pm 10\%$ ) smo testirali ponovno, da bi potrdili ali ovrgli rezultat prvega testiranja. Tudi v drugo reaktivne vzorce smo opredelili kot HDV-Ag-reaktivne, prvič reaktivne in drugič nereaktivne vzorce pa kot HDV-Ag-nereaktivne.

### 3.2.2.3 Dokazovanje prisotnosti HDV RNA

#### 3.2.2.3.1 Osamitev celokupnih nukleinskih kislin

Osamitev celokupnih nukleinskih kislin (NK) iz serumskih vzorcev smo izvedli s pomočjo komercialno dostopnega kompleta kemikalij MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) in instrumenta MagNA Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics), po prilagojenem internem protokolu. Pred avtomatsko osamitvijo celokupnih NK smo izvedli eksterno lizo vzorcev s pufom MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit – Lysis/Binding Buffer Refill (Roche Diagnostics), ki vsebuje surfaktant Triton X-100 in kaotropni denaturant beljakovin (gvanidinijev izotiocianat) ter lizira celice, inaktivira prisotne encime (npr. ribonukleaze) in z vezavo zaščiti NK v vzorcu. 200 µl posameznega serumskega vzorca smo dodali 300 µl omenjenega pufra, vsebino reakcijske posodice premešali na mešalu  $2x^3$  (Velp Scientifica, Usmate, Italija) in jo 30 minut inkubirali v termobloku Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) pri  $25^\circ C$  in 350 obratih na minuto (angl. *rotations per minute*, rpm). Sledila je avtomatska osamitev celokupnih NK po protokolu Total\_NA\_Plasma\_external\_lysis. Celokupne NK smo eluirali s 100 µl elucijskega pufra in takoj pripravili alikvote po 10 µl ter se tako izognili večkratnemu odmrzovanju celotnega izolata, ki je neprimerno zaradi temperaturne občutljivosti RNA.

#### 3.2.2.3.2 Preverjanje kakovosti osamljene RNA in odsotnosti zaviralcev PCR

Kakovost osamljene RNA in odsotnost zaviralcev reakcije PCR smo preverili s pomnoževanjem 85 bp dolgega dela človeške ribosomske RNA (rRNA), ki nosi zapis

za beljakovino S9. Za pomnoževanje človeške RNA smo uporabili oligonukleotidne začetnike (OZ) RibPS9-F in RibPS9-R ter lovko RibPS9-Probe (Wang-Johanning in sod., 2002), ki so prikazani v preglednici 3.

Preglednica 3: Oligonukleotidni začetniki in lovka za pomnoževanje 85 bp dolgega dela gena človeške ribosomske RNA, ki nosi zapis za beljakovino S9

Oligonukleotidni začetnik (OZ) ali lovka	Nukleotidno zaporedje
RibPS9-F	5'-ATCCGCCAGCGCCATA-3'
RibPS9-R	5'-TCAATGTGCTTCTGGGAATCC-3'
RibS9-Probe	5'-LC610-AGCAGGTGGTGAACATCCGTCCTT-BBQ-3'

Za izvedbo verižne reakcije s polimerazo v realnem času z obratno transkripcijo (angl. *reverse transcription real-time polymerase chain reaction; rt-RT-PCR*) smo uporabili računalniško voden sistem LightCycler 480 II RT-PCR Instrument (Roche Diagnostics) in komplet kemikalij LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes (Roche Diagnostics).

Reakcijsko mešanico, ki je prikazana v preglednici 4, smo pripravili v skladu z navodili proizvajalca.

Preglednica 4: Vsebina posamezne reakcijske posodice za pomnoževanje 85 bp dolgega dela gena človeške ribosomske RNA, ki nosi zapis za beljakovino S9

Reagenti (začetna koncentracija)	Količina za 1 vzorec (µl)	Končna koncentracija
LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes (2,7x)	7,4	1x
Activator (50 mM)	1,3	3,25 mM Mn(OAc) <sub>2</sub>
Enhancer (20x)	1	1x
OZ RibPS9-F (50 µM)	0,2	0,5 µM
OZ RibPS9-R (50 µM)	0,2	0,5 µM
Lovka RibPS9-Probe (20 µM)	0,25	0,25 µM
Sterilna deionizirana voda	9,65	
Skupni volumen reakcijske mešanice	20	
RNA	5	
Skupni reakcijski volumen	25	

Protokol pomnoževanja 85 bp dolgega dela človeške ribosomske RNA (rRNA), ki nosi zapis za beljakovino S9, je prikazan v preglednici 5.

Preglednica 5: Potek pomnoževanja 85 bp dolgega dela človeške ribosomske RNA (rRNA), ki nosi zapis za beljakovino S9

Potek reakcije	Število ciklov	Temperaturni cikel (hitrost spreminjanja temperature, angl. ramp rate)
Obratna transkripcija	1	3 min pri 63 °C (4,4 °C/s)
Aktivacija DNA polimeraze in denaturacija DNA	1	30 s pri 95 °C (4,4 °C/s)
Pomnoževanje cDNA	45	15 s pri 95 °C (4,4 °C/s) 1 min pri 60 °C (2,2 °C/s) 1 s pri 72 °C (4,4 °C/s) <sup>a</sup>
Hlajenje	1	10 s pri 40 °C (2,2 °C/s)

<sup>a</sup> merjenje fluorescence pri valovni dolžini 610 nm

Vse vzorce s Ct vrednostjo 40 ali manj smo opredelili kot primerne za nadaljnjo analizo prisotnosti HDV RNA.

### 3.2.2.3.3 Dokazovanje prisotnosti HDV RNA z obratno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (rt-RT-PCR)

Za dokazovanje prisotnosti HDV RNA v anti-HDV-reaktivnih serumskih vzorcih smo uporabili *rt-RT-PCR* z OZ HDV-F1, HDV-F2 in HDV-R ter lovko HDV-probe (Le Gal in sod., 2005; Mederacke in sod., 2010), ki omogočajo pomnoževanje 71 bp dolgega dela gena, ki nosi zapis za HDV-Ag, in so prikazani v preglednici 6.

Preglednica 6: Oligonukleotidni začetniki in lovka za pomnoževanje dela gena, ki nosi zapis za HDV-Ag

Oligonukleotidni začetnik (OZ) ali lovka	Nukleotidno zaporedje	Nukleotidno mesto naleganja v genomu HDV
HDV-F1	5'-TGGACGTCGTCCTCCT-3'	837-853
HDV-F2	5'-TGGACGTCTGTCCTCCTT-3'	837-854
HDV-R	5'-TCTTCGGGTGGCATGG-3'	907-891
HDV-probe FAM	5'-FAM-ATGCCAGGTCGGAC-BHQ-3'	858-872

Za pomnoževanje dela gena, ki nosi zapis za HDV-Ag smo uporabili komercialno dostopen komplet kemikalij LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes (Roche Diagnostics); reakcijsko mešanico, ki je prikazana v preglednici 7, smo pripravili v skladu z navodili proizvajalca.

Preglednica 7: Vsebina posamezne reakcijske posodice za pomnoževanje 71 bp dolgega dela gena za HDV-Ag

Reagenti (začetna koncentracija)	Količina za 1 vzorec (µl)	Končna koncentracija
LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes (2,7x)	7,4	1x
Activator (50 mM)	1,3	3,25 mM Mn(OAc) <sub>2</sub>
Enhancer (20x)	1	1x
OZ HDV-F1 (50 µM)	0,2	0,5 µM
OZ HDV-F2 (50 µM)	0,2	0,5 µM
OZ HDV-R (50 µM)	0,2	0,5 µM
Lovka HDV-probe FAM (20 µM)	0,25	0,25 µM
Sterilna deionizirana voda	4,45	
Skupni volumen reakcijske mešanice	15	
RNA	5	
Skupni reakcijski volumen	20	

Protokol pomnoževanja HDV RNA, ki je prikazan v preglednici 8, smo prav tako razvili v skladu z navodili proizvajalca uporabljenega kompleta kemikalij in ga ustreznostil predvideni dolžini pridelkov PCR, lastnostim tarčnega nukleotidnega zaporedja in lastnostim sintetiziranih OZ in lovke. HDV rt-RT-PCR smo izvedli z računalniško vodenim sistemom LightCycler 480 II RT-PCR Instrument (Roche Diagnostics).

S testiranjem HDV-RNA-pozitivnih kliničnih vzorcev z znano koncentracijo virusne RNA (300 – 11x10<sup>6</sup> virusnih kopij/ml) smo določili, da je analitična občutljivost HDV rt-RT-PCR vsaj 300 virusnih kopij/ml.

Preglednica 8: Potek HDV rt-RT-PCR

Potek reakcije	Število ciklov	Temperaturni cikel (hitrost spremenjanja temperature, angl. ramp rate)
Obratna transkripcija	1	3 min pri 63 °C (4,4 °C/s)
Aktivacija DNA polimeraze in denaturacija DNA	1	30 s pri 95 °C (4,4 °C/s)
Pomnoževanje	45	15 s pri 95 °C (4,4 °C/s) 1 min pri 55 °C (2,2 °C/s) 1 s pri 72 °C (4,4 °C/s) <sup>a</sup>
Hlajenje	1	10 s pri 40 °C (2,2 °C/s)

<sup>a</sup> merjenje fluorescence pri valovni dolžini 533 nm

### 3.2.3 Izračun 95 % intervala zaupanja za prevalenco okužbe s HDV v populaciji bolnikov s kroničnim hepatitisom B v Sloveniji

Vsak testiran serumski vzorec oz. bolnik je lahko na prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV bodisi pozitiven bodisi negativen, zato je statistična spremenljivka  $X$  (anti-HDV-reaktivnost ali -nereaktivnost) dvojiška in ima binomsko verjetnostno porazdelitev, kar zapišemo kot  $X \sim bin(n, p)$ , pri čemer je  $p$  verjetnost za pozitiven rezultat pri danem poskusu (bolniku),  $n$  pa število poskusov (testiranih bolnikov). Binomska porazdelitev spremenljivke  $X$  ima pričakovano vrednost  $np$  in varianco  $npq$ . Pri naraščajočem številu poskusov ( $n \rightarrow \infty$ ) postaja binomska porazdelitev vedno bolj podobna normalni porazdelitvi z enako povprečno vrednostjo in enakim standardnim odklonom, torej  $bin(n, p) \rightarrow N(np, \sqrt{npq})$ . Pri dovolj velikem  $n$  binomska porazdelitev lokalno (v točki) aproksimira normalna porazdelitev (Košmelj, 2007).

$X$  je torej dvojiška spremenljivka, ki jo proučujemo na slučajnem vzorcu velikost  $n$ . Če v populaciji testiramo vse možne vzorce velikost  $n$ , vsak vzorec velikosti  $n$  generira svoj vzorčni delež  $\hat{p} = \frac{x}{n}$ , kjer je  $x$  število enot, ki imajo neko lastnost. Zanima nas verjetnostna porazdelitev pripadajoče slučajne spremenljivke  $\frac{X}{n}$ , torej porazdelitev vzorčnih deležev. Če lahko binomsko porazdelitev  $b(n, p)$  aproksimiramo z normalno  $N(np, \sqrt{npq})$ , je porazdelitev slučajne spremenljivke  $\frac{X}{n}$  (vzorčnih deležev) približno normalna  $\frac{X}{n} \sim N\left(p, \sqrt{\frac{pq}{n}}\right)$  (Košmelj, 2007).

Normalna porazdelitev  $N(\mu, \sigma)$  ima parametra  $\mu$  (povprečno vrednost) in  $\sigma$  (standardni odklon). Vsako normalno porazdelitev lahko prevedemo v standardizirano normalno porazdelitev  $N(0, 1)$ ; če je  $X \sim N(\mu, \sigma)$ , je slučajna spremenljivka  $Z = \frac{X-\mu}{\sigma}$  porazdeljena po standardizirani normalni porazdelitvi, torej  $Z \sim N(0, 1)$ . Za poznавanje normalnih porazdelitev torej zadošča poznavanje  $N(0, 1)$ , izračunavanje verjetnosti za  $N(0, 1)$  z določenim integralom pa nadomeščajo statistične tabele, v katerih je za izbrano vrednost  $z$  ( $z > 0$ ) podana verjetnost  $p$  v "desnem repu" porazdelitve. Tako pri izbrani stopnji tveganja  $\alpha$  za vrednost  $z_\alpha$  velja:  $P(Z > z_\alpha) = \alpha$  in  $P(-z_{\alpha/2} < Z < z_{\alpha/2}) = 1 - \alpha$  (Košmelj, 2007).  $z_{\alpha/2}$  je  $(1 - \frac{\alpha}{2})$ -ti kvantil oz. percentil standardizirane normalne porazdelitve.

Zanima nas IZ za prevalenco določenega dejavnika v preiskovani populaciji, saj točkovna ocena parametra zaradi napak vzorčenja po navadi ni enaka pravi vrednosti parametra v populaciji. Naj  $p$  označuje parameter, ki ga ocenjujemo, vrednost  $\alpha$  je vnaprej predpisana verjetnost med 0 in 1. Interval  $(L_1, L_2)$  imenujemo IZ za parameter  $p$ , če velja, da je verjetnost  $P(L_1 < p < L_2) = 1 - \alpha$ . Verjetnost  $\alpha$  imenujemo tveganje,

verjetnost  $1 - \alpha$  pa zaupanje.  $L_1$  in  $L_2$  sta spodnja in zgornja meja IZ in sta slučajni spremenljivki, torej imata pri vsakem vzorcu drugo vrednost – vsak slučajni vzorec velikosti  $n$  generira svoj IZ ( $l_1, l_2$ ), v populaciji vseh vzorcev velikosti  $n$  pa je odstotek IZ, ki vsebujejo parameter  $p$ , enak  $100 \cdot (1 - \alpha)$ . Za posamezni IZ ne vemo, ali vsebuje  $p$  ali ne, temveč lahko le trdimo, da je ta interval z verjetnostjo  $(1 - \alpha)$  eden tistih, ki vsebujejo parameter  $p$ . Poznamo torej vzorčno prevalenco  $\hat{p}$ , na podlagi katere izračunamo 95 % IZ, ki s 95 % verjetnostjo vsebuje “pravo” vrednost prevalence v populaciji, z vrednostjo  $\alpha=0,05$  pa s 5 % tvegamo, da izračunani IZ ne vsebuje prave vrednosti prevalence v populaciji.

Za izračun IZ binomskega deleža je na voljo več različnih metod, ki uporabljajo nekoliko različne predpostavke in so primerne za različne vrednosti  $n$  in  $\hat{p}$ .

Na predpostavki, da binomsko porazdelitev vzorčnih deležev lahko aproksimiramo s standardizirano normalno porazdelitvijo, temelji Waldova metoda, ki neznana populacijska  $p$  in  $q$  nadomesti z vzorčnima ocenama  $\hat{p}$  in  $\hat{q}$  in poda formulo za približni meji IZ za  $p$ :

$$l_{1,2} = \hat{p} \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\hat{p}\hat{q}}{n}} \quad \dots(1)$$

(Brown in sod., 2001).

Verjetnost, da IZ vsebuje pravo prevalenco, je idealno čim bliže naši izbrani stopnji zaupanja. Strokovna literatura odsvetuje uporabo Waldove metode, saj pri njej verjetnost, da izračunan IZ vsebuje pravo prevalenco, v mnogih primerih ne doseže naše izbrane vrednosti zaupanja, zlasti pri vrednostih  $p$ , ki so blizu 0 ali 1 ter pri zelo velikih vrednostih  $n$ . Po tej metodi ima lahko spodnja meja IZ tudi negativno vrednost. Pri ekstremnih vrednostih  $p$  (blizu 0 ali 1) je primernejša uporaba drugih metod (Brown in sod., 2001).

Za vrednosti  $n > 40$  je za izračun IZ priporočljiva uporaba metod Wilson Score, Agresti-Coull ali Jeffreys, ki so tudi medsebojno primerljive (Brown in sod., 2001).

Wilson Score metoda  $p$  in  $q$  ne zamenja s  $\hat{p}$  in  $\hat{q}$ , in meji IZ računa po formuli

$$l_{1,2} = \frac{\hat{p} + \frac{z_{\alpha/2}^2}{2n} \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\hat{p}\hat{q}}{n} + \frac{z_{\alpha/2}^2}{4n^2}}}{1 + \frac{z_{\alpha/2}^2}{n}} \quad \dots(2)$$

(Brown in sod., 2001).

Agresti-Coull metoda je prilagojena Waldova metoda, ki namesto  $\hat{p} = \frac{X}{n}$  uporabi  $\tilde{p} = \frac{\tilde{X}}{\tilde{n}}$ , pri čemer je  $\tilde{X} = X + \frac{z_{\alpha/2}^2}{2}$  in  $\tilde{n} = n + z_{\alpha/2}^2$ , meji IZ pa

$$l_{1,2} = \tilde{p} \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\tilde{p}\tilde{q}}{\tilde{n}}} \quad \dots(3).$$

Za primer  $\alpha = 0,05$  metoda namesto  $z_{\alpha/2} = 1,96$  uporabi  $z_{\alpha/2} = 2$ , kar pomeni, da številu enot s preučevano lastnostjo in številu enot brez preučevane lastnosti prišteje še 2 in s tem številu vseh testiranih enot  $n$  prišteje 4 (Brown in sod., 2001).

Waldova, Wilson Score in Agresti-Coull metoda temeljijo na klasični oz. frekventistični statistiki, ki parameter  $p$  obravnavajo kot določeno fiksno vrednost in meji IZ kot slučajni spremenljivki; stopnja zaupanja pomeni, s kakšno verjetnostjo IZ vsebuje populacijski parameter  $p$ . Jeffreys in Clopper-Pearson metodi temeljita na Bayesovi statistiki, ki parameter  $p$  obravnava kot verjetnostno porazdelitev in kot rezultat poda kredibilnostni interval, ki je analogen IZ in prav tako pomeni verjetnost, da je parameter  $p$  znotraj tega intervala; pomeni, da določen odstotek (npr. 95 %) aposteriorne verjetnostne porazdelitve leži med mejama kredibilnostnega intervala. Bayesovo statistično sklepanje temelji na Bayesovem teoremu:

$$P(H | E) = \frac{P(E|H) \cdot P(H)}{P(E)} \quad \dots(4),$$

pri čemer je  $H$  neka hipoteza oz. parameter,  $P(H)$  pa apriorna verjetnost za hipotezo, preden so znani kakšni novi dokazi oz. podatki  $E$ , torej vnaprejšnja ocena za verjetnost hipoteze.  $P(E)$  je verjetnost, da dobimo podatke oz. dokaze  $E$ , in je neodvisna od hipoteze  $H$ .  $P(E | H)$  je verjetnost, da dobimo dokaze  $E$ , pod pogojem, da velja hipoteza  $H$ ;  $P(E | H)$  imenujemo tudi verjetje (angl. *likelihood*). Zanima pa nas  $P(H | E)$ , to je aposteriorna verjetnost oz. verjetnost za hipotezo  $H$ , pod pogojem, da smo dobili dokaze  $E$  oz. potem, ko smo dobili dokaze  $E$ . Bayesovo statistično sklepanje iz znanih podatkov statistično modelira apriorno verjetnost, nato pa na podlagi apriorne verjetnosti, verjetja in novih znanih podatkov izračuna izboljšano, aposteriorno verjetnost hipoteze.

Za računanje kredibilnostnega intervala (oz. IZ) v primeru  $X \sim bin(n, p)$  se parametru  $p$  pripiše apriorna verjetnostna porazdelitev  $Beta(a, b)$  s povprečjem  $\frac{a}{a+b}$  in aposteriorna verjetnostna porazdelitev  $Beta(X + a, n - X + b)$ . Beta porazdelitev je družina zveznih verjetnostnih porazdelitev, definiranih na intervalu  $[0, 1]$  in se uporablja za ocenjevanje vedenja spremenljivk na tem intervalu; beta porazdelitev ima parametra  $a$  in  $b$ , ki v funkciji gostote verjetnosti nastopata kot eksponenta slučajne spremenljivke in določata

obliko porazdelitve.  $100(1 - \alpha)\%$  dvostranski Bayesov interval je podan z  $\left[ B\left(\frac{\alpha}{2}; X + b, n - X + b\right), B\left(1 - \frac{\alpha}{2}; X + a, n - X + b\right) \right]$ , pri čemer je  $B(\alpha; m_1, m_2)$   $\alpha$ -ti kvantil porazdelitve  $Beta(m_1, m_2)$  (Brown in sod., 2001).

Jeffreys metoda za apriorno verjetnostno porazdelitev privzame  $Beta\left(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}\right)$ ,  $100(1 - \alpha)\%$  dvostranski Jeffreys apriorni interval je potem  $\left[ B\left(\frac{\alpha}{2}; X + \frac{1}{2}, n - X + \frac{1}{2}\right), B\left(1 - \frac{\alpha}{2}; X + a, n - X + b\right) \right]$ . Interval zavzame  $(1 - \alpha)\%$  sredniskega dela intervala aposteriorne verjetnostne porazdelitve, torej ostane po  $\frac{\alpha}{2}\%$  aposteriorne verjetnostne porazdelitve v vsakem repu. Meji Jeffreys apriornega intervala sta  $\frac{\alpha}{2}$ -ti kvantil in  $(1 - \frac{\alpha}{2})$ -ti kvantil porazdelitve  $Beta\left(x + \frac{1}{2}, n - x + \frac{1}{2}\right)$ . Formula za približen izračun spodnje meje  $100(1 - \alpha)\%$  dvostranskega Jeffreys apriornega intervala je

$$l_1 = \frac{x+1/2}{n+1+(n-x+\frac{1}{2})(e^{2\omega}-1)} \quad \dots(5),$$

pri čemer je

$$\omega = \frac{\frac{z_{\alpha/2}\sqrt{4\hat{p}\hat{q}}}{n} + (z_{\alpha/2}^2 - 3)/(6n^2)}{4\hat{p}\hat{q}} + \frac{(\frac{1}{2} - \hat{p})(\hat{p}\hat{q}(z_{\alpha/2}^2 + 2) - \frac{1}{n})}{6n(\hat{p}\hat{q})^2} \quad \dots(6).$$

Za izračun zgornje meje  $z_{\alpha/2}$  v izrazu (6) nadomesti  $-z_{\alpha/2}$ . Jeffreys interval je vedno znotraj Clopper-Pearson intervala in pomeni nekakšen popravek konservativnosti eksaktne metode (Brown in sod., 2001).

Clopper-Pearson interval za spodnjo in zgornjo mejo intervala predpostavi različni apriorni verjetnostni porazdelitvi. Spodnja meja Clopper-Pearson intervala je rešitev enačbe  $P_p(X \geq x) = \frac{\alpha}{2}$  za  $p$  in je  $\frac{\alpha}{2}$ -ti kvantil porazdelitve  $Beta(x, n - x + 1)$ . Zgornja meja Clopper-Pearson intervala je  $P_p(X \leq x) = \frac{\alpha}{2}$  za  $p$  in je  $1 - \frac{\alpha}{2}$ -ti kvantil porazdelitve  $Beta(x + 1, n - x)$ . Eksaktna metoda (Clopper-Pearson interval) zagotavlja, da verjetnost, da IZ res vsebuje pravo vrednost prevalence, nikoli ne pade pod našo izbrano vrednost zaupanja; ta verjetnost je pogosto mnogo večja od želenega IZ in velikokrat rezultira v »nepotrebno« široki in s tem nenatančni oceni IZ (Brown in sod., 2001).

## 4 REZULTATI

### 4.1 ANALIZA TESTIRANEGA VZORCA POPULACIJE

Na prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV smo testirali 668 slovenskih bolnikov s kroničnih hepatitisom B, pri katerih smo prisotnost HBsAg prvič opredelili v obdobju med letoma 2002 in 2015. Pri vsakem bolniku smo testirali en, kronološko zadnji odvzet, HBsAg-reaktiven serumski vzorec. V testiran vzorec populacije bolnikov s kroničnim hepatitisom B smo vključili 411 moških (411/668; 61,5 %) in 255 žensk (255/668; 38,2 %); za dve osebi podatki o spolu niso bili dostopni (2/668; 0,3 %). Za vse udeležence smo starost izračunali ob prvem HBsAg-pozitivnem vzorcu. Povprečna starost vseh bolnikov, izračunana kot aritmetična sredina, je bila 44,5 let, vrednost mediane je bila 45 let. Starost najmlajše testirane osebe je bila 0 let, najstarejše testirane osebe pa 92 let. Povprečna starost moških je bila 45,6 let, povprečna starost žensk pa 42,6 let.

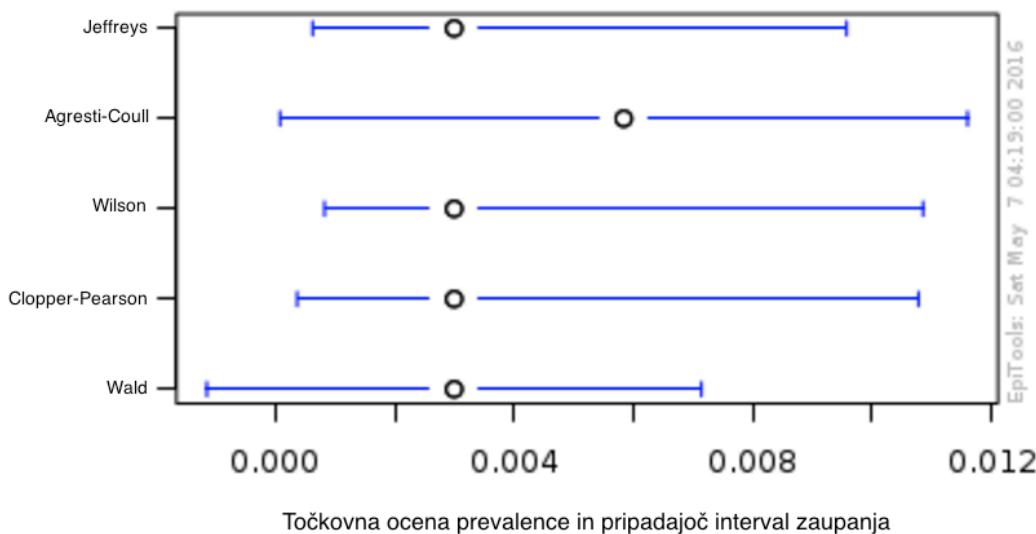
### 4.2 IZRAČUN PREVALENCE OKUŽBE S HDV V POPULACIJI BOLNIKOV S KRONIČNIM HEPATITISOM B V SLOVENIJI

Izmed 668 testiranih serumskih vzorcev, odvzetih istemu številu bolnikov s kroničnim hepatitisom B, smo prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV dokazali pri dveh bolnikih, kar predstavlja 0,299 % testiranega vzorca oz. vzorčni delež.

Preglednica 9 vsebuje rezultate izračuna 95 % IZ po različnih modelih s spletnim orodjem EpiTools Epidemiological Calculators (Sergeant, 2016), slika 7 pa grafični prikaz izračunov (Sergeant, 2016).

Preglednica 9: Izračunane vrednosti 95 % intervala zaupanja za prevalenco HDV v populaciji bolnikov s kroničnim hepatitisom B v Sloveniji, ki so bili kot nosilci HBsAg prvič opredeljeni med letoma 2002 in 2015 (Sergeant, 2016: 1).

	Wald interval zaupanja (aproximacija z normalno porazdelitvijo)	Clopper-Pearson interval zaupanja (eksaktna metoda)	Wilson score interval zaupanja	Agresti-Coull interval zaupanja	Jeffreys interval zaupanja
Točkovna ocena prevalence $\hat{p}$	0,00299	0,00299	0,00299	0,00584	0,00299
Spodnja meja 95 % intervala zaupanja	-0,00115	0,00036	0,00082	0,00008	0,00062
Zgornja meja 95 % intervala zaupanja	0,00714	0,01077	0,01085	0,0116	0,00957



Slika 7: Grafični prikaz izračuna točkovne prevalence in pripadajočih intervalov zaupanja (Sergeant, 2016: 1)

Waldova metoda ima v našem primeru negativno vrednost spodnje meje IZ, zato ta način izračuna mej IZ za naš vzorec ni primeren.

Točkovna ocena prevalence (0,00584), izračunana z metodo Agresti-Coull, je bistveno višja od točkovne ocene, izračunane z ostalimi uporabljenimi metodami (0,00299) (preglednica 7). V naši raziskavi smo kot anti-HDV-reakтивna opredelili dva vzorca, metoda Agresti-Coull pa temu prišteje še dva, kar v našem primeru pomeni kar 100 % več enot s preučevano lastnostjo.

Z metodami Clopper-Pearson, Wilson Score in Jeffreys smo dobili primerljive vrednosti mej 95 % IZ (0,036-1,077 %; 0,082-1,085 %; 0,062-0,957 %); z vsemi tremi metodami smo dobili tudi enako točkovno oceno prevalence (0,299 %).

V raziskavi Šunfove in sod. (2005) so v vzorcu populacije bolnikov s kroničnim hepatitisom B, ki so bili kot nosilci HBsAg prvič opredeljeni med letoma 1998 in 2002, določili 0,25 % prevalenco okužbe s HDV; pripadajoči 95 % IZ, izračunani po različnih metodah, so prikazani v Preglednici 10.

Preglednica 10: Izračunane vrednosti 95 % intervala zaupanja za prevalenco HDV v populaciji bolnikov s kroničnim hepatitisom B v Sloveniji, ki so bili kot nosilci HBsAg prvič opredeljeni med letoma 1998 in 2002 (Sergeant, 2016)

	Wald interval zaupanja (aproksimacija z normalno porazdelitvijo)	Clopper-Pearson interval zaupanja (eksaktna metoda)	Wilson score interval zaupanja	Agresti-Coull interval zaupanja	Jeffreys interval zaupanja
Točkovna ocena prevalence $\hat{p}$	0,00250	0,00250	0,00250	0,00723	0,00250
Spodnja meja 95 % intervala zaupanja	-0,00239	0,00006	0,00044	-0,00103	0,00027
Zgornja meja 95 % intervala zaupanja	0,00739	0,01385	0,01402	0,0155	0,01162

Z metodo Agresti-Coull smo tudi v tem primeru izračunali višjo točkovno oceno prevalence kot z ostalimi metodami. Z Waldovo in Agresti-Coullovo metodo smo dobili negativno vrednost spodnje meje IZ, zato izračun mej IZ po teh dveh metodah v tem primeru ni ustrezan. Z metodama Wilson Score (0,044-1,402 %) in Jeffreys (0,027-1,162 %) smo izračunali primerljivi spodnji meji 95 % IZ, z metodama Clopper-Pearson (0,006-1,385 %) in Wilson Score (0,044-1,402 %) pa primerljivi zgornji meji 95 % IZ.

Za primerjavo prevalence okužbe s HDV pri slovenskih bolnikih s kroničnim hepatitisom B v dveh časovnih obdobjih, 1998-2002 in 2002-2015, smo izbrali točkovno oceno prevalence in pripadajoč 95 % interval zaupanja, ki sta bila izračunana po metodi Wilson Score.

Prevalenca okužbe s HDV pri slovenskih bolnikih s kroničnim hepatitisom B, ki so bili kot nosilci HBsAg prvič opredeljeni med letoma 1998 in 2002, znaša 0,250 % (95 % IZ: 0,044-1,402 %). Prevalenca okužbe s HDV pri slovenskih bolnikih s kroničnim hepatitisom B, ki so bili kot nosilci HBsAg prvič opredeljeni med letoma 2002 in 2015, pa 0,299 % (95 % IZ: 0,082-1,085 %). 95 % IZ za izračunano prevalenco HDV je zaradi manjšega števila testiranih bolnikov v prvem časovnem obdobju širši od 95 % IZ za prevalenco HDV v letih 2002-2015.

#### 4.3 OPREDELJEVANJE AKUTNE, KRONIČNE OZ. PREBOLELE OKUŽBE S HDV

Prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV smo dokazali pri dveh posameznikih. Bolnik, s stalnim prebivališčem v Postojni, pri katerem smo prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV dokazali v serumskem vzorcu, ki smo ga v laboratorij prejeli 6. 12. 2011, je bil kot HBsAg-pozitiven prvič opredeljen leta 2007, ob starosti 60 let. Na prisotnost označevalcev okužbe s HDV in HBV smo nato testirali še preostalih šest HBsAg-

pozitivnih serumskih vzorcev, ki so bili odvzeti istemu bolniku. Kot je razvidno iz preglednice 11, smo prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV, protiteles anti-HDV IgM ter prisotnost virusne RNA dokazali v vseh sedmih serumskih vzorcih, ki so bili odvzeti 60-letnemu bolniku, nasprotno pa v nobenem izmed testiranih vzorcev nismo dokazali prisotnosti HDV-Ag. V vseh sedmih serumskih vzorcih smo dokazali prisotnost HBV DNA ter opredelili, da je bil bolnik okužen s HBV genotipa A. V kronološko prvem vzorcu, ki je bil odvzet 60-letnemu bolniku, smo dokazali tudi prisotnost celokupnih protiteles anti-HBc. Razen osnovnih podatkov o bolniku (spol in starost), klinično pomembni podatki niso bili dostopni.

Preglednica 11: Rezultati opredeljevanja prisotnosti označevalcev okužbe s HDV in HBV v serumskih vzorcih 60-letnega bolnika

Datum prejema vzorca	celokupna protitelesa anti-HDV	HDV				HBV			
		protitelesa anti-HDV IgM	HDV-Ag	RibPS9 rt-RT-PCR	HDV RNA rt-RT-PCR	HBsAg	HBV DNA (IU/ml)	celokupna protitelesa anti-HBc	HBV genotip
10. 10. 2007	+	+	-	+	+	+	65	+	/
17. 9. 2008	+	+	-	+	+	/	34	/	/
20. 10. 2009	+	+	-	+	+	/	58	/	/
1. 2. 2011	+	+	-	+	+	/	370	/	/
24. 5. 2011	+	+	-	+	+	/	68452	/	A
5. 9. 2011	+	+	-	+	+	/	646	/	/
6. 12. 2011	+	+	-	+	+	/	<15	/	/

+: pozitivno, -: negativno, /: ni bilo opredeljeno

Bolnica s stalnim prebivališčem v Kranju, pri kateri smo prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV dokazali v serumskem vzorcu, ki smo ga v laboratorij prejeli 8. 12. 2009, je bila kot HBsAg-pozitivna prvič opredeljena leta 2008, ob starosti 28 let. Na prisotnost označevalcev okužbe s HDV in HBV smo nato testirali še preostale tri HBsAg-pozitivne serumске vzorce, ki so bili odvzeti isti bolnici. Kot je razvidno iz preglednice 12, smo prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV, protiteles anti-HDV IgM, prisotnost HDV RNA in HBV DNA dokazali v vseh dostopnih serumskih vzorcih, ki so bili odvzeti 28-letni bolnici, nasprotno pa v nobenem izmed testiranih vzorcev nismo dokazali prisotnosti HDV-Ag. V kronološko prvem vzorcu, ki je bil odvzet 28-letni bolnici, smo dokazali prisotnost celokupnih protiteles anti-HBc. Razen osnovnih podatkov o bolnici (spol in starost), klinično pomembni podatki niso bili dostopni.

Preglednica 12: Rezultati opredeljevanja prisotnosti označevalcev okužbe s HDV in HBV v serumskih vzorcih 28-letne bolnice

Datum prejema vzorca	HDV					HBV		
	celokupna protitelesa anti-HDV	protitelesa anti-HDV IgM	HDV-Ag	RibPS9 rt-RT-PCR	HDV RNA rt-RT-PCR	HBsAg	HBV DNA IU/ml	celokupna protitelesa anti-HBc
7. 11. 2008	+	+	-	+	+	+	/	+
11. 11. 2008	+	/	/	+	+	/	232	/
3. 2. 2009	+	+	-	+	+	/	1020	/
8. 12. 2009	+	+	-	+	+	/	<6	/

+: pozitivno, -: negativno, /: ni bilo opredeljeno

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

HDV je eden izmed petih primarnih povzročiteljev virusnega hepatitisa. Okužba s HDV je možna le ob predhodni ali sočasni okužbi s HBV, saj se HDV ne more pomnoževati neodvisno od HBV. Ob sočasni okužbi s HDV in HBV akutnemu hepatitisu D ponavadi sledi spontana izguba HDV in ozdravitev, medtem ko se ob nacepljeni okužbi s HDV pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B pogosteje razvije kronični hepatitis povzročen z obema virusoma. V primerjavi z bolniki s kroničnim hepatitisom B se pri bolnikih s kroničnim hepatitisom B in D bistveno pogosteje razvijejo ciroza, dekompenzacija jeter in jetrnocelični karcinom.

Laboratorijske znake prebolelega ali aktivnega hepatitisa D lahko dokažemo pri 0-15 % bolnikov s kroničnim hepatitisom B (Seme in sod., 2011), zato ocenjujejo, da je na svetu med 15 in 20 milijonov ljudi okuženih s HDV (Alfaiale in sod. 2015). Štunf in sod. so izvedli doslej edino raziskavo prevalence HDV v Sloveniji, v katero so vključili 400 serumskih vzorcev, ki so bili bolnikom s kroničnim hepatitisom B odvzeti med letoma 1998 in 2002, ter ocenili, da je v Sloveniji 0,25 % (95 % IZ: 0,044-1,402 %) bolnikov s kroničnim hepatitisom B okuženih tudi s HDV (Štunf in sod., 2005).

V sklopu diplomske naloge smo v retrospektivno raziskavo vključili 668 serumskih vzorcev, ki so bili istemu številu bolnikov s kroničnim hepatitisom B odvzeti med letoma 2002 in 2015 ter dokazali 0,299 % (95 % IZ: 0,082-1,085 %) prevalenco okužbe s HDV. Rezultati naše raziskave so v skladu z rezultati Štunf in sod. (2005).

V zadnjih 20 letih se je, predvsem zaradi uvedbe cepljenja proti HBV in testiranja vseh krvodajalcev na prisotnost HBsAg, prevalenca okužbe s HDV v nekaterih evropskih državah, predvsem južnoevropskih, znižala. V zaporednih raziskavah, ki so vključevale več sto HBsAg-pozitivnih posameznikov z bolezni jo jeter, so prevalenco okužbe s HDV v Italiji leta 1983 ocenili na 24,6 %, leta 1987 na 23 %, leta 1992 na 14 %, leta 1997 na 8,3 % in leta 2007 na 8,1 %; prevalenca HDV se v omenjeni državi v zadnjih letih ne spreminja več (Smedile in sod., 1983; Sagnelli in sod., 1992; Sagnelli in sod., 1997; Gaeta in sod., 2000; Stroffolini in sod., 2009). V nasprotju s številnimi raziskavami prevalence HDV v Italiji, so podatki o prevalenci HDV v ostalih Sloveniji sosednjih državah pomanjkljivi oz. so bile raziskave izvedene pred letom 1994. V Avstriji so tako leta 1985 pri nosilcih HBsAg dokazali 2,9 % prevalenco okužbe s HDV (Frisch-Niggemeyer in Kunz, 1985). Na Hrvaškem so leta 1994 pri kroničnih nosilcih HBsAg dokazali 19 % prevalenco okužbe s HDV (Jelić D in Jelić O, 1994) ter podobno leta 1993 na Madžarskem 13,6 % prevalenco okužbe s HDV (Horváth in sod., 1992-1993). Kljub starejšim podatkom o prevalenci okužbe s HDV iz nekaterih sosednjih držav lahko zaključimo, da je prevalenca HDV med slovenskimi bolniki s kroničnim

hepatitisom B med najnižjimi v južni Evropi. V Sloveniji okužbo s HBV uspešno preprečujemo z obveznim testiranjem krvodajalcev, nosečnic in partnerjev HBsAg-pozitivnih oseb ter s cepljenjem proti HBV. Cepljenje proti HBV je v naši državi od leta 1983 obvezno za vse zdravstvene in druge delavce, ki so pri opravljanju svojega dela izpostavljeni možnosti okužbe s HBV, od leta 1988 za vse novorojenčke kroničnih nosilk HBsAg ter spolne partnerje nosilcev HBsAg, od leta 1990 za vse dijake in študente zdravstvenih šol ter bolnike na hemodializi ter od leta 1993 za vse IUD ter bolnike s spolno prenosljivimi boleznimi; leta 1998 je bilo cepljenje proti HBV vključeno tudi v obvezni program cepljenja vseh otrok pred vstopom v osnovno šolo (Seme in sod., 2011). Kljub temu, da so tudi v Italiji leta 1991 uvedli obvezno cepljenje proti HBV za vse novorojenčke in 12-letne otroke in da je incidenca akutne okužbe s HBV v obeh državah primerljiva (1 na 100.000 prebivalcev v Italiji in 0,8 na 100.000 prebivalcev v Sloveniji) je prevalenca okužbe s HDV v Sloveniji še vedno veliko nižja (Seme in sod., 2011; Velati in sod., 2011). V Evropi najverjetneje obstajata dve skupini s HDV-okuženih bolnikov: mlajši posamezniki, ki se priseljujejo z endemskih področij in starejši posamezniki, ki so preživeli epidemijo HDV v osemdesetih letih prejšnjega stoletja (Cross in sod., 2008; Rizzetto, 2009; Wedemeyer, 2011). Zaradi pomanjkljivih epidemioloških podatkov lahko le predvidevamo, da so razlike v prevalenci HDV v Italiji in Sloveniji posledica italijanskega rezervoarja posameznikov, ki so se s HDV okužili v času epidemije, in razlik v tveganem vedenju (injiciranje nedovoljenih drog, promiskuiteta) HDV-pozitivnih posameznikov med obema državama.

Zaradi izredno nizke prevalence okužbe s HDV v Sloveniji menimo, da je rutinsko opredeljevanje okužbe s HDV v diferencialni diagnostiki poslabšanja bolezni jeter pri slovenskih bolnikih s kronično okužbo s HBV trenutno neupravičeno.

V nasprotju z južnoevropskimi državami je drugod po Evropi (npr. v Franciji, Nemčiji in Združenem kraljestvu) prevalenca okužbe s HDV v zadnjih letih ponovno začela naraščati zaradi priseljevanja ljudi z endemskih področij (predvsem iz Afrike, vzhodne Evrope ter Turčije). Zaradi priseljevanja/prehoda ljudi iz endemskih področij tudi v/skozi Slovenijo, predlagamo spremljanje prevalence okužbe s HDV tudi v prihodnje.

Kljub temu, da smo za 99,7 % bolnikov, vključenih v raziskavo, zbrali podatke o spolu, starosti in kraju stalnega prebivališča, zaradi nizke prevalence okužbe s HDV v testirani populaciji nismo mogli opredeliti povezav med demografskimi značilnostmi posameznikov in okužbo s HDV. Glede na to, da smo prisotnost okužbe s HDV dokazali pri 28-letni bolnici in 60-letnem bolniku s stalnim prebivališčem v različnih krajih, gre najverjetneje za dva nepovezana primera okužbe s HDV.

V naši raziskavi smo v vseh dostopnih HBsAg-pozitivnih serumskih vzorcih obeh anti-HDV-reaktivnih bolnikov dokazali prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV, protiteles

anti-HDV IgM ter prisotnost HDV RNA. Vztrajna prisotnost protiteles anti-HDV IgM ter HDV RNA je značilna za kronično obliko okužbe s HDV, med katero se virus nenehno pomnožuje (Seme in sod., 2011). Na podlagi predhodno objavljenih podatkov zato sklepamo, da gre pri obeh bolnikih, ki smo ju kot anti-HDV-reakтивna opredelili v naši raziskavi, za aktivni kronični hepatitis D. V nobenem izmed HBsAg-pozitivnih serumskih vzorcev obeh bolnikov nismo dokazali prisotnosti HDV-Ag, kar je v skladu s predhodno objavljenimi raziskavami, ki poročajo, da lahko pri kroničnem hepatitisu D prisotnost HDV-Ag v serumu občasno dokažemo le pri imunsko-kompromitiranih bolnikih, ki imajo delno ali popolnoma okvarjen imunski odziv (Grippon in sod., 1987; Alfaiate in sod., 2015), pri imunsko-kompetentnih posameznikih pa prisotna protitelesa anti-HDV HDV-Ag nevtralizirajo.

Prisotnost HDV RNA smo v HBsAg-pozitivnih serumskih vzorcih dokazovali s kvalitativnim rt-RT-PCR, zato na podlagi naših rezultatov ne moremo sklepati o časovnem nihanju aktivnosti HDV. Pri obeh bolnikih smo preko nihanja koncentracije serumске HBV DNA opazili nihanje aktivnosti HBV. V raziskavi, v kateri so spremljali časovni potek bolezni in spremjanje virusne aktivnosti preko nihanja koncentracije HBV DNA in HDV RNA v krvi, so dokazali, da HBV in HDV lahko v telesu med potekom bolezni interagirata na sedem različnih načinov: lahko sta oba virusa enako aktivna ali je aktiven le eden, en virus lahko z aktivnostjo prevladuje nad drugim, prav tako njuni aktivnosti lahko nihata, in sicer vzporedno ali izmenično ter bodisi v medsebojni odvisnosti bodisi neodvisno ena od druge (Schaper in sod., 2010).

Pri 90-95 % imunsko-kompetentnih odraslih oseb sočasni okužbi s HBV in HDV sledi ozdravitev, saj po akutnem hepatitisu D pride do spontane izgube obeh virusov. Pri superinfekciji s HDV je ozdravitev redka, saj v 90 % primerov pride do razvoja kroničnega hepatitisa D (Seme in sod., 2011). Na podlagi predhodno objavljenih podatkov zato sklepamo, da gre pri obeh bolnikih, pri katerih smo v raziskavi dokazali prisotnost označevalcev okužbe s HDV, najverjetnejše za nacepljeno okužbo s HDV.

## 5.2 SKLEPI

Prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV smo dokazali pri 2/668 (0,299 %) slovenskih bolnikov s kroničnim hepatitisom B, pri katerih smo prisotnost HBsAg prvič dokazali med letoma 2002 in 2015, ter potrdili hipotezo, da bomo prisotnost celokupnih protiteles anti-HDV dokazali pri manj kot 1 % vzorcev bolnikov s kroničnim hepatitisom B.

Rezultati naše raziskave se ujemajo z rezultati predhodno izvedene raziskave v Sloveniji (Štunf in sod., 2005), v kateri so v primerljivi skupini bolnikov določili 0,25 %

prevaleenco okužbe s HDV. Z rezultati naše raziskave smo tako potrdili hipotezo, da se prevalenca okužbe s HDV v Sloveniji v zadnjih 15 letih ni pomembno spremenila, kar je najverjetneje posledica uspešnega preprečevanja okužbe s HBV z obveznim testiranjem krvodajalcev, nosečnic in partnerjev HBsAg-pozitivnih oseb ter cepljenja proti HBV.

Na podlagi podatkov o prevalenci okužbe s HDV v drugih državah lahko zaključimo, da je prevalenca HDV med slovenskimi bolniki s kroničnim hepatitisom B med najnižjimi v južni Evropi in na svetu. Zaradi pomanjkljivih epidemioloških podatkov lahko le predvidevamo, da so razlike v prevalenci HDV med sosednjo Italijo (8,1 %) in Slovenijo (0,299 %) posledica italijanskega rezervoarja posameznikov, ki so se s HDV okužili v času epidemije, in razlik v tveganem vedenju HDV-pozitivnih posameznikov med obema državama.

Zaradi izredno nizke prevalence okužbe s HDV v Sloveniji menimo, da je rutinsko opredeljevanje okužbe s HDV v diferencialni diagnostiki poslabšanja bolezni jeter pri slovenskih bolnikih s kronično okužbo s HBV trenutno neupravičeno.

V nasprotju s postavljenou hipotezo, da bomo pri večini posameznikov dokazali, da so hepatitis D preboleli v preteklosti in niso več aktivno okuženi, smo na podlagi opredeljevanja prisotnosti kazalcev okužbe s HDV (celokupna protitelesa anti-HDV, protitelesa anti-HDV IgM, HDV-Ag in HDV RNA) v vseh dostopnih HBsAg-pozitivnih vzorcih obeh bolnikov, ki smo ju kot anti-HDV-reaktivna opredelili v naši raziskavi, dokazali, da imata aktivni kronični hepatitis D. Na podlagi predhodno objavljenih podatkov sklepamo, da gre pri obeh bolnikih najverjetneje za nacepljeno okužbo s HDV.

## 6 POVZETEK

Laboratorijske znake prebolelega ali aktivnega hepatitisa D lahko dokažemo pri 0-15 % bolnikov s kroničnim hepatitisom B, zato ocenjujejo, da je na svetu med 15 in 20 milijonov ljudi okuženih s HDV.

Štunf in sod. (2005) so izvedli doslej edino raziskavo prevalence HDV v Sloveniji, v katero so vključili 400 serumskih vzorcev, ki so bili bolnikom s kroničnim hepatitisom B odvzeti med leti 1998 in 2002, ter ocenili, da je v Sloveniji 0,25 % (95 % IZ: 0,044-1,402 %) bolnikov s kroničnim hepatitisom B okuženih tudi s HDV (Štunf in sod., 2005).

V sklopu diplomske naloge smo v retrospektivno raziskavo vključili 668 serumskih vzorcev, ki so bili istemu številu bolnikov s kroničnim hepatitisom B odvzeti med letoma 2002 in 2015, ter dokazali 0,299 % (95 % IZ: 0,082-1,085 %) prevalenco okužbe s HDV. Rezultati naše raziskave so v skladu z rezultati Štunf in sod. (2005) in nakazujejo, da se prevalence HDV v Sloveniji v drugem časovnem obdobju (2002-2015) ni bistveno spremenila.

V zadnjih 20 letih se je, predvsem zaradi uvedbe cepljenja proti HBV in testiranja vseh krvodajalcev na prisotnost HBsAg, prevalence okužbe s HDV v nekaterih evropskih državah, predvsem južnoevropskih, znižala. Na podlagi podatkov o prevalenci okužbe s HDV v drugih državah lahko zaključimo, da je prevalence okužbe s HDV med slovenskimi bolniki s kroničnim hepatitisom B med najnižjimi v južni Evropi in na svetu. Zaradi izredno nizke prevalence okužbe s HDV v Sloveniji menimo, da je rutinsko opredeljevanje okužbe s HDV v diferencialni diagnostiki poslabšanja bolezni jeter pri slovenskih bolnikih s kronično okužbo s HBV trenutno neupravičeno. V nasprotju z južnoevropskimi državami je drugod po Evropi (npr. v Franciji, Nemčiji in Združenem kraljestvu) prevalence okužbe s HDV v zadnjih letih ponovno začela naraščati zaradi priseljevanja ljudi z endemskih področij (predvsem iz Afrike, vzhodne Evrope ter Turčije). Zaradi priseljevanja oz. prehoda ljudi z endemskih področij tudi v oz. skozi Slovenijo predlagamo spremljanje prevalence okužbe s HDV tudi v prihodnje.

Na podlagi opredeljevanja prisotnosti kazalcev okužbe s HDV (celokupna protitelesa anti-HDV, protitelesa anti-HDV IgM, HDV-Ag in HDV RNA) v vseh dostopnih HBsAg-pozitivnih vzorcih obeh bolnikov, ki smo ju kot anti-HDV-reakтивna opredelili v naši raziskavi, smo dokazali, da imata aktivni kronični hepatitis D. Na podlagi predhodno objavljenih podatkov sklepamo, da gre pri obeh bolnikih najverjetnejše za nacepljeno okužbo s HDV.

## 7 VIRI

- Abbasi A., Bhutto A.R., Butt N., Mahmood K. 2014. HDV seroprevalence in HBsAg positive patients. *Journal of the College of Physicians and Surgeons – Pakistan*, 24, 9: 624-627
- Abrahem A., Pelchat M. 2008. Formation of an RNA polymerase II initiation complex on an RNA promoter derived from the hepatitis delta virus RNA genome. *Nucleic Acids Research*, 36, 16: 5201-5211
- Alfaiate D., Dény P., Durantel D. 2015. Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Research*, 122: 112-129
- Amini N., Alavian S.M., Kabir A., Aalaei-Andabili S.H., Saiedi Hosseini S.Y., Rizzetto M. 2013. Prevalence of hepatitis d in the eastern mediterranean region: systematic review and meta analysis. *Hepatitis Monthly*, 13, 1: e8210, doi: 10.5812/hepatmon.8210: 12 str.
- Andernach I.E., Leiss L.V., Tarnagda Z.S., Tahita M.C., Otegbayo J.A., Forbi J.C., Omilabu S., Gouandjika-Vasilache I., Komas N.P., Mbah O.P., Muller C.P. 2014. Characterization of hepatitis delta virus in sub-Saharan Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 5: 1629-1636
- Arakawa Y., Moriyama M., Taira M., Hayashi N., Tanaka N., Okubo H., Sugitani M. 2000. Molecular analysis of hepatitis D virus infection in Miyako Island, a small Japanese island. *Journal of Viral Hepatitis*, 7, 5: 375-381
- Baatarkhuu O., Kim do Y., Bat-Ireedui P., Han K.H. 2011. Current situation of hepatocellular carcinoma in Mongolia. *Oncology*, 81, Suppl. 1: 148-151
- Bahcecioglu I.H., Aygun C., Gozel N., Poyrazoglu O.K., Bulut Y., Yalniz M. 2011. Prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic hepatitis B patients in eastern Turkey: still a serious problem to consider. *Journal of Viral Hepatitis*, 18, 7: 518-524
- Beard M.R., MacNaughton T.B., Gowans E.J. 1996. Identification and characterization of a hepatitis delta virus RNA transcriptional promoter. *Journal of Virology*, 70, 8: 4986-4995

Beeharry Y., Rocheleau L., Pelchat M. 2014. Conserved features of an RNA promoter for RNA polymerase II determined from sequence heterogeneity of a hepatitis delta virus population. *Virology*, 450-451: 165-173

Bensabath G., Hadler S.C., Soares M.C., Fields H., Dias L.B., Popper H., Maynard J.E. 1987. Hepatitis delta virus infection and Labrea hepatitis. Prevalence and role in fulminant hepatitis in the Amazon Basin. *JAMA*, 258, 4: 479-483

Bielawski K.P., Zietkowski D., Charmuszko U., Sikorska K., Stalke P. 2006. Hepatitis delta virus infection in chronically HBV-infected patients from northern Poland. *Archives of Virology*, 151, 6: 1207-1215

Børresen M.L., Olsen O.R., Ladefoged K., McMahon B.J., Hjuler T., Panum I., Simonetti J., Jones C., Krarup H., Koch A. 2010. Hepatitis D outbreak among children in a hepatitis B hyper-endemic settlement in Greenland. *Journal of Viral Hepatitis*, 17, 3: 162-170

Brancaccio G., Giuberti T., Verucchi G., Levantesi M., Sacchini D., Fattovich G., Madonia S., Fasano M., Gavrila C., Nardi A., Gaeta G.B., on behalf of the MASTER-B study group. 2014. Epidemiological evolution of chronic hepatitis delta in Italy. An analysis of the Master-B cohort. *Digestive and Liver Disease*, 46, Suppl. 1: e12-e13

Brown L.D., Cai T.T., DasGupta A. 2001. Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science*, 16, 2: 101-117

Chan H.L., Wong V.W., Wong G.L., Tse C.H., Chan H.Y., Sung J.J. 2010. A longitudinal study on the natural history of serum hepatitis B surface antigen changes in chronic hepatitis B. *Hepatology*, 52, 4: 1232-1241

Chlabcz S., Grzeszczuk A., Lapiński T.W., Prokopowicz D., Panasiuk A. 2003. Search for hepatitis delta virus (HDV) infection in hepatitis C patients in north-eastern Poland. Comparison with anti-HDV prevalence in chronic hepatitis B. *European Journal of Epidemiology*, 18, 6: 559-561

Choi S.H., Jeong S.H., Hwang S.B. 2007. Large hepatitis delta antigen modulates transformng growth factor-beta signaling cascades: implication of hepatitis delta virus-induced liver fibrosis. *Gastroenterology*, 132, 1: 343-357

Chudy M., Hanschmann K.-M., Bozdayi M., Kreß J., Nübling M., Collaborative Study Group. 2013. Collaborative study to establish a World Health Organization

international standard for hepatitis D virus RNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. Geneva, World Health Organization: 29 str.  
[https://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/10665/96341/1/WHO\\_BS\\_2013.22\\_27\\_eng.pdf](https://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/10665/96341/1/WHO_BS_2013.22_27_eng.pdf) (28. 4. 2016)

Ciancio A., Rizzetto M. 2002. Clinical patterns, epidemiology and disease burden of hepatitis D virus chronic liver disease. V: Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Margolis H., Alter M., Liang T., Dienstag T. (eds.). Atlanta, International Medical Press: 271-275

Ciancio A., Rizzetto M. 2014. Chronic hepatitis D at a standstill: where do we go from here? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 1: 68-71

Contini C., Badia L., Culteria R., Grilli A., De Togni A. 2012. Epidemiological, clinical and laboratory features of chronic hepatitis B infection in a cohort of immigrant and Italian patients from Ferrara, Italy. *Annals of Hepatology*, 11, 6: 862-869

Crispim M.A., Fraiji N.A., Campello S.C., Schreifer N.A., Stefani M.M., Kiesslich D. 2014. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC Infectious Diseases*, 14: 94, doi: 10.1186/1471-2334-14-94: 9 str.

Cross T.J.S., Rizzi P., Horner M., Jolly A., Hussain M.J., Smith H.M., Vergani D., Harrison P.M. 2008. The increasing prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in South London. *Journal of Medical Virology*, 80, 2: 277-282

Cuenca-Gómez J.A., Salas-Coronas J., Soriano-Pérez M.J., Vázquez-Villegas J., Lozano-Serrano A.B., Cabezas-Fernández M.T. 2016. Viral hepatitis and immigration: a challenge for the healthcare system. *Revista Clinica Espanola*, 216, 5: 248-252

Dandri M., Locarnini S. 2012. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut*, 61, Suppl. 1: i6-i17

Delić D., Gotić M., Ostrić V., Fridman V., Nikolić P., Jemuović L., Nikolov V., Zerjav S., Groza S. 1993. Epidemiology of hepatitis D virus (delta) infection in Yugoslavia. *Liver*, 13, 6: 302-304

Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M. 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1, 7649: 695-698

- De Paschale M., Manco M.T., Belvisi L., Magnani C., Re T., Viganò P., Biagiotti S., Capelli F., Mazzone A., Baldacci M.P., Ferrara A., Neri A.L., Guastoni C.M., Bonazzina R.A., Brando B., Clerici P. 2012. Epidemiology of hepatitis D virus (HDV) infection in an urban area of northern Italy. *Infection*, 40, 5: 485-91
- Dunford L., Carr M.J., Dean J., Nguyen L.T., Ta Thi T.H., Nguyen B.T., Connell J., Coughlan S., Nguyen H.T., Hall W.W., Thi L.A. 2012. A multicentre molecular analysis of hepatitis B and blood-borne coinfections in Viet Nam. *PLoS One*, 7, 6: e39027, doi: 10.1371/journal.pone.0039027: 11 str.
- Fernández-Montero J.V., Vispo E., Barreiro P., Sierra-Enguita R., de Mendoza C., Soriano V. 2014. Hepatitis delta is a major determinant of liver decompensation events and death in HIV-infected patients. *Clinical Infectious Diseases*: 58, 11: 1549-1553
- Flodgren E., Bengtsson S., Knutsson M., Strebkova E.A., Kidd A.H., Alexeyev O.A., Kidd-Ljunggren K. 2000. Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing hepatitis B and D strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 9: 3311-3316
- Fouad R., Abdo M., Eldeen H.G., Sabry D., Atef M., Ahmed R., Zayed N. 2016. Influence of delta virus infection on the virologic status in Egyptian patients with chronic hepatitis B virus genotype D. *Journal of Medical Virology*, 88, 5: 837-842
- Freitas N., Abe K., Cunha C., Menne S., Gudima S.O. 2014a. Support of the infectivity of hepatitis delta virus particles by the envelope proteins of different genotypes of hepatitis B virus. *Journal of Virology*, 88, 11: 6255-6267
- Freitas N., Cunha C., Menne S., Gudima S.O. 2014b. Envelope proteins derived from naturally integrated hepatitis B virus DNA support assembly and release of infectious hepatitis delta virus particles. *Journal of Virology*, 88, 10: 5742-5754
- Frisch-Niggemeyer W., Kunz C. 1985. Delta virus: now also detected in Austria. A defective virus as a pathogenic agent. *Wiener klinische Wochenschrift*, 97, 10: 460-463
- Gaeta G.B., Stroffolini T., Chiaramonte M., Ascione T., Stornaiuolo G., Lobello S., Sagnelli E., Brunetto M.R., Rizzetto M. 2000. Chronic hepatitis D: a vanishing disease? An Italian multicenter study. *Hepatology*, 32, 4, Pt. 1: 824-827

Genné D., Rossi I. 2011. Hepatitis delta in Switzerland: a silent epidemic. *Swiss Medical Weekly*, 141: w13176, doi: 10.4414/smw.2011.13176: 4 str.

Giersch K., Allweiss L., Volz T., Helbig M., Bierwolf J., Lohse A.W., Pollok J.M., Petersen J., Dandri M., Lütgehetmann M. 2015. Hepatitis delta co-infection in humanized mice leads to pronounced induction of innate immune responses in comparison to HBV mono-infection. *Journal of Hepatology*, 63, 2: 346-353

Giersch K., Dandri M. 2015. Hepatitis B and delta virus: advances on studies about interactions between the two viruses and the infected hepatocyte. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 3, 3: 220-229

Giersch K., Helbig M., Volz T., Allweiss L., Mancke L.V., Lohse A.W., Polywka S., Pollok J.M., Petersen J., Taylor J., Dandri M., Lütgehetmann M. 2014. Persistent hepatitis D virus mono-infection in humanized mice is efficiently converted by hepatitis B virus to a productive co-infection. *Journal of Hepatology*, 60, 3: 538-544

Gish R., Jia J.D., Locarnini S., Zoulim F. 2012. Selection of chronic hepatitis B therapy with high barrier to resistance. *Lancet Infectious Diseases*, 12, 4: 341-353

Gish R.G., Given B.D., Lai C.-L., Locarnini S.A., Lau J.Y.N., Lewis D.L., Schlueter T. 2015. Chronic hepatitis B: virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. *Antiviral Research*, 121: 47-58

Gish R.G., Yi D.H., Kane S., Clark M., Mangahas M., Baqai S., Winters M.A., Proudfoot J., Glenn J.S. 2013. Coinfection with hepatitis B and D: epidemiology, prevalence and disease in patients in Northern California. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28, 9: 1521-1525

Goto T., Kato N., Yoshida H., Otsuka M., Moriyama M., Shiratori Y., Koike K., Matsumura M., Omata M. 2003. Synergistic activation of the serum response element-dependent pathway by hepatitis B virus x protein and large-isoform hepatitis delta antigen. *Journal of Infectious Diseases*, 187, 5: 820-828

Griffin B.L., Chasovskikh S., Dritschilo A., Casey J.L. 2014. Hepatitis delta antigen requires a flexible quasi-double-stranded RNA structure to bind and condense hepatitis delta virus RNA in a ribonucleoprotein complex. *Journal of Virology*, 88, 13: 7402-7411

Grippon P., Ribiere O., Cadranel J.F., Pelletier S., Pillot B., Emerit J., Opolon P. 1987. Long-term antigenaemia without appearance of delta antibody in two immunodeficient patients. Lancet, 1, 8540: 1031-1031

Gudima S., Wu S.Y., Chiang C.M., Moraleda G., Taylor J. 2000. Origin of hepatitis delta virus mRNA. Journal of Virology, 74, 16: 7204-7210

Han M., Littlejohn M., Yuen L., Edwards R., Devi U., Bowden S., Ning Q., Locarnini S., Jackson K. 2014. Molecular epidemiology of hepatitis delta virus in the Western Pacific region. Journal of Clinical Virology, 61, 1: 34-39

Hirzel C., Wandeler G., Owczarek M., Gorgievski-Hrisoho M., Dufour J.F., Semmo N., Zürcher S. 2015. Molecular epidemiology of hepatitis B virus infection in Switzerland: a retrospective cohort study. BMC Infectious Diseases, 15: 483, doi: 10.1186/s12879-015-1234-z: 9 str.

Ho E., Deltenre P., Nkuize M., Delwaide J., Colle I., Michielsen P.; Belgian Association for the Study of the Liver. 2013. Coinfection of hepatitis B and hepatitis delta virus in Belgium: a multicenter BASL study. Prospective epidemiology and comparison with HBV mono-infection. Journal of Medical Virology, 85, 9: 1513-1517

Hong M., Sandalova E., Low D., Gehring A.J., Fieni S., Amadei B., Urbani S., Chong Y.-S., Guccione E., Bertoletti A. 2015. Trained immunity in newborn infants of HBV-infected mothers. Nature Communications, 25, 6: 6588, doi: 10.1038/ncomms7588: 12 str.

Horvat R.T., Taylor R. 2015. Hepatitis B and D viruses. V: Manual of clinical microbiology. 11<sup>th</sup> ed. Jorgensen J.H., Pfaffer M.A., Carroll K.C., Funke G., Landry M.L., Richter S.S., Warnock D.W. (eds.). Washington DC, ASM Press: 1841-1858

Horváth G., Tolvaj G., Stotz G., Dávid K. 1992-1993. The incidence of hepatitis delta virus infection in chronic liver diseases in Hungary. Acta Medica Hungarica, 49, 1-2: 109-117

Huang I.C., Chien C.Y., Huang C.R., Lo S.J. 2006. Induction of hepatitis D virus large antigen translocation to the cytoplasm by hepatitis B virus surface antigens correlates with endoplasmic reticulum stress and NF-kappaB activation. Journal of General Virology, 87, Pt. 6: 1715-1723

Hughes S.A., Wedemeyer H., Harrison P.M. 2011. Hepatitis delta virus. Lancet, 378, 9785: 73-85

Jardi R., Rodriguez F., Buti M., Costa X., Cotrina M., Galimany R., Esteban R., Guardia J. 2001. Role of hepatitis B, C, and D viruses in dual and triple infection: influence of viral genotypes and hepatitis B precore and basal core promoter mutations on viral replicative interference. Hepatology, 34, 2: 404-410

Jat S.L., Gupta N., Kumar T., Mishra S., S.A., Yadav V., Goel A., Aggarwal R. 2015. Prevalence of hepatitis D virus infection among hepatitis B virus-infected individuals in India. Indian Journal of Gastroenterology, 34, 2: 164-168

Jelić D., Jelić O. 1994. Epidemiological characteristics of HBV and HDV chronic liver diseases. Acta Medica Croatica: časopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti, 48, 1: 7-13

Ji J., Sundquist K., Sundquist J. 2012. A population-based study of hepatitis D virus as potential risk factor for hepatocellular carcinoma. Journal of the National Cancer Institute, 104, 10: 790-792

Kann M., Schmitz A., Rabe B. 2007. Intracellular transport of hepatitis B virus. World Journal of Gastroenterology, 13, 1: 39-47

Keshvari M., Alavian S.M., Aghaee B., Behnava B., Mahdavi M., Fesharaki M.G., Sharafi H. 2014. Seroepidemiology and clinical features of hepatitis delta among HBsAg carriers: a study from Hepatitis Clinic of Iranian Blood Transfusion Organization. Transfusion Medicine, 24, 6: 411-417

Kim H.S., Kim S.J., Park H.W., Shin W.G., Kim K.H., Lee J.H., Kim H.Y., Jang M.K. 2011. Prevalence and clinical significance of hepatitis D virus co-infection in patients with chronic hepatitis B in Korea. Journal of Medical Virology, 83, 7: 1172-1177

Kondili L.A., Cuko L., Chionne P., Candido A., Madonna E., Dentico P., Resuli B., Taliani G., Brunetto M.R., Rapicetta M. 2010. Hepatitis B, C and delta virus infections in Albanian patients with chronic liver disease: evaluation of possible changes during the last 10 years. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 22, 2: 167-171

Königer C., Wingert I., Marsmann M., Rösler C., Beck J., Nassal M. 2014. Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular

DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111, 40: E4244-E4253

Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. dop. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.  
[http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna\\_statistika\\_01.pdf](http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_01.pdf) (30. 5. 2016)

Kozhanova T.V., Il'chenko Llu., Mikhaĭlov M.I. 2014. Viral hepatitis delta. Is there the delta infection problem in the Russian Federation? Èksperimental'naiā i klinicheskaiā gastroenterologiiā = Experimental & Clinical Gastroenterology, 12: 4-12

Krogsgaard K., Mathiesen L.R., Aldershvile J., Kryger P., Andersson P., Hansson B.G., Nielsen J.O., Ranek L. 1988. Delta infection and hepatitis B virus replication in Danish patients with fulminant hepatitis B. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 20, 2: 127-133

Kuo M.Y., Goldberg J., Coates L., Gerin J., Taylor J. 1988. Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure, and applications. Journal of Virology, 62, 6: 1855-1861

Le Gal F., Castelneau C., Gault E., al Hawajri N., Gordien E., Marcellin P., Dény P. 2007. Reply to: Wedemeyer H., Heidrich B., Manns M.P. 2007. Hepatitis D virus infection – not a vanishing disease in Europe! Hepatology, 45, 5: 1331-1332. Hepatology, 45, 5: 1332-1333

Le Gal F., Gault E., Ripault M.P., Serpaggi J., Trinchet J.C., Gordien E., Dény P. 2006. Eighth major clade for hepatitis delta virus. Emerging Infectious Diseases, 12, 9: 1447-1450

Le Gal F., Gordien E., Affolabi D., Hanslik T., Alloui C., Dény P., Gault E. 2005. Quantification of hepatitis delta virus RNA in serum by consensus real-time PCR indicates different patterns of virological response to interferon therapy in chronically infected patients. Journal of Clinical Microbiology, 34, 5: 2363-2369

Liao B., Zhang F., Lin S., He H., Liu Y., Zhang J., Xu Y., Yi J., Chen Y., Liu H., Wang Z., Cai W. 2014. Epidemiological, clinical and histological characteristics of HBV/HDV co-infection: a retrospective cross-sectional study in Guangdong, China. PLoS One, 22, 9: e115888, doi: 10.1371/journal.pone.0115888: 13 str.

Liaw Y.F., Chien R.N., Chen T.J., Sheen I.S., Chu C.M. 1992. Concurrent hepatitis C virus and hepatitis delta virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Medical Virology*, 37, 4: 294-297

Lin H.H., Lee S.S., Yu M.L., Chang T.T., Su C.W., Hu B.S., Chen Y.S., Huang C.K., Lai C.H., Lin J.N., Wu J.C. 2015. Changing hepatitis D virus epidemiology in a hepatitis B virus endemic area with a national vaccination program. *Hepatology*, 61, 6: 1870-1879

Liu Y.P., Yao C.Y. 2015. Rapid and quantitative detection of hepatitis B virus. *World Journal of Gastroenterology*, 21, 42: 11954-11963

Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya S., Shibuya K., Aboyans V., Abraham J., Adair T., Aggarwal R., Ahn S.Y., Alvarado M., Anderson H.R., Anderson L.M., Andrews K.G., Atkinson C., Baddour L.M., Barker-Collo S., Bartels D.H., Bell M.L., Benjamin E.J., Bennett D., Bhalla K., Bikbov B., Bin Abdulhak A., Birbeck G., Blyth F., Bolliger I., Boufous S., Bucello C., Burch M., Burney P., Carapetis J., Chen H., Chou D., Chugh S.S., Coffeng L.E., Colan S.D., Colquhoun S., Colson K.E., Condon J., Connor M.D., Cooper L.T., Corriere M., Cortinovis M., de Vaccaro K.C., Couser W., Cowie B.C., Criqui M.H., Cross M., Dabhadkar K.C., Dahodwala N., De Leo D., Degenhardt L., Delossantos A., Denenberg J., Des Jarlais D.C., Dharmaratne S.D., Dorsey E.R., Driscoll T., Duber H., Ebel B., Erwin P.J., Espindola P., Ezzati M., Feigin V., Flaxman A.D., Forouzanfar M.H., Fowkes F.G., Franklin R., Fransen M., Freeman M.K., Gabriel S.E., Gakidou E., Gaspari F., Gillum R.F., Gonzalez-Medina D., Halasa Y.A., Haring D., Harrison J.E., Havmoeller R., Hay R.J., Hoen B., Hotez P.J., Hoy D., Jacobsen K.H., James S.L., Jasrasaria R., Jayaraman S., Johns N., Karthikeyan G., Kassebaum N., Keren A., Khoo J.P., Knowlton L.M., Kobusingye O., Koranteng A., Krishnamurthi R., Lipnick M., Lipshultz S.E., Ohno S.L., Mabweijano J., MacIntyre M.F., Mallinger L., March L., Marks G.B., Marks R., Matsumori A., Matzopoulos R., Mayosi B.M., McAnulty J.H., McDermott M.M., McGrath J., Mensah G.A., Merriman T.R., Michaud C., Miller M., Miller T.R., Mock C., Mocumbi A.O., Mokdad A.A., Moran A., Mulholland K., Nair M.N., Naldi L., Narayan K.M., Nasseri K., Norman P., O'Donnell M., Omer S.B., Ortblad K., Osborne R., Ozgediz D., Pahari B., Pandian J.D., Rivero A.P., Padilla R.P., Perez-Ruiz F., Perico N., Phillips D., Pierce K., Pope C.A. 3rd, Porrini E., Pourmalek F., Raju M., Ranganathan D., Rehm J.T., Rein D.B., Remuzzi G., Rivara F.P., Roberts T., De León F.R., Rosenfeld L.C., Rushton L., Sacco R.L., Salomon J.A., Sampson U., Sanman E., Schwebel D.C., Segui-Gomez M., Shepard D.S., Singh D., Singleton J., Sliwa K., Smith E., Steer A., Taylor J.A., Thomas B., Tleyjeh I.M., Towbin J.A., Truelsen T.,

- Undurraga E.A., Venkatasubramanian N., Vijayakumar L., Vos T., Wagner G.R., Wang M., Wang W., Watt K., Weinstock M.A., Weintraub R., Wilkinson J.D., Woolf A.D., Wulf S., Yeh P.H., Yip P., Zabetian A., Zheng Z.J., Lopez A.D., Murray C.J., AlMazroa M.A., Memish Z.A. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet, 380, 9859: 2095-2128
- Lunel-Fabiani F., Mansour W., Amar A.O., Aye M., Le Gal F., Malick F.Z., Baïdy L., Brichler S., Veillon P., Ducancelle A., Gordien E., Rosenheim M. 2013. Impact of hepatitis B and delta virus co-infection on liver disease in Mauritania: a cross sectional study. Journal of Infection, 67, 5: 448-457
- Lunemann S., Malone D.F., Grabowski J., Port K., Béziat V., Bremer B., Malmberg K.J., Manns M.P., Sandberg J.K., Cornberg M., Ljunggren H.G., Wedemeyer H., Björkström N.K. 2015. Effects of HDV infection and pegylated interferon  $\alpha$  treatment on natural killer cell compartment in chronically infected individuals. Gut, 64, 3: 469-482
- Makuwa M., Mintsa-Ndong A., Souquière S., Nkoghé D., Leroy E.M., Kazanji M. 2009. Prevalence and molecular diversity of hepatitis B virus and hepatitis delta virus in urban and rural populations in northern Gabon in central Africa. Journal of Clinical Microbiology, 47, 7: 2265-2268
- Manesis E.K., Vourli G., Dalekos G., Vasiliadis T., Manolaki N., Hounta A., Koutsounas S., Vafiadis I., Nikolopoulou G., Giannoulis G., Germanidis G., Papatheodoridis G., Touloumi G. 2013. Prevalence and clinical course of hepatitis delta infection in Greece: a 13-year prospective study. Journal of Hepatology, 59, 5: 949-956
- Matičič M. 2014. Virusni hepatitisi. V: Infekcijske bolezni. Tomažič J., Strle F. (ur.). Ljubljana, Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo: 350-369
- McMahon B.J. 2004. Viral hepatitis in the Arctic. International Journal of Circumpolar Health, 63, Suppl. 2: 41-48
- Mederacke I., Bremer B., Heidrich B., Kirschner J., Deterding K., Bock T., Wursthorn K., Manns M.P., Wedemeyer H. 2010. Establishment of a novel quantitative hepatitis D virus (HDV) RNA assay using the Cobas TaqMan platform to study HDV RNA kinetics. Journal of Clinical Microbiology, 48, 6: 2022-2029

Naoumov N.V., Gueorgiev A., Ognyanov M., Maleev A. 1986. Infection with hepatitis delta virus in patients with fulminant hepatitis B and chronic HBsAg carriers in Bulgaria. Hepatogastroenterology, 33, 2: 49-51

Nassal M. 2008. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. Virus Research, 134, 1-2: 235-249

Noureddin M., Gish R. 2014. Hepatitis delta: epidemiology, diagnosis and management 36 years after discovery. Current Gastroenterology Reports, 16, 1: 365, doi: 10.1007/s11894-013-0365-x: 8 str.

Oyunsuren T., Kurbanov F., Tanaka Y., Elkady A., Sanduijav R., Khajidsuren O., Dagvadorj B., Mizokami M. 2006. High frequency of hepatocellular carcinoma in Mongolia; association with mono-, or co-infection with hepatitis C, B, and delta viruses. Journal of Medical Virology, 78, 12: 1688-1695

Özgenç F., Ecevit Ç.Ö., Erdemir G., Sertöz R., Yağcı R.V. 2013. Prevalence of hepatitis D co-infection in children with hepatitis B infection: cross-sectional analyses from West Turkey. Turkish Journal of Gastroenterology, 24, 4: 345-348

Pohjanpelto P., Sammalkorpi K., Lahdensivu R. 1985. Delta agent in Finland. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 17, 4: 431-432

Ponzetto A., Hoyer B.H., Popper H., Engle R., Purcell R.H., Gerin J.L. 1987. Titration of the infectivity of hepatitis D virus in chimpanzees. Journal of Infectious Diseases, 155, 1: 72-78

Popescu G.A., Otelea D., Gavriliu L.C., Neaga E., Popescu C., Paraschiv S., Fratila M. 2013. Epidemiology of hepatitis D in patients infected with hepatitis B virus in Bucharest: a cross-sectional study. Journal of Medical Virology, 85, 5: 769-774

Quaglio G., Ramadani N., Pattaro C., Cami A., Dentico P., Volpe A., Pellizzer G., Berisha A., Smacchia C., Figliomeni M., Schinaia N., Rezza G., Putoto G. 2008. Prevalence and risk factors for viral hepatitis in the Kosovarian population: implications for health policy. Journal of Medical Virology, 80, 5: 833-840

Ramalho F., Carvalho G., Bonino F., Baptista A., de Moura M.C. 1987. Clinical and epidemiological significance of hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic HBV carriers in Portugal. Progress in Clinical and Biological Research, 234: 409-417

Reinheimer C., Doerr H.W., Berger A. 2012. Hepatitis delta: on soft paws across Germany. *Infection*, 40, 6: 621-625

Rex K.F., Krarup H.B., Laurberg P., Andersen S. 2012. Population-based comparative epidemiological survey of hepatitis B, D, and C among Inuit migrated to Denmark and in high endemic Greenland. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 47, 6: 692-701

Rivas P., Herrero M.D., Poveda E., Madejón A., Treviño A., Gutiérrez M., Ladrón de Guevara C., Lago M., de Mendoza C., Soriano V., Puente S. 2013. Hepatitis B, C, and D and HIV infections among immigrants from Equatorial Guinea living in Spain. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, 4: 789-794

Rizzetto M. 1983. The delta agent. *Hepatology*, 3, 5: 729-737

Rizzetto M. 2009. Hepatitis D: the comeback? *Liver International*, 29, Suppl. 1: 140-142

Rizzetto M. 2015. Hepatitis D virus: Introduction and epidemiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5, 7: a021576, doi: 10.1101/cshperspect.a021576: 10 str.

Rizzetto M. 2016. The adventure of delta. *Liver International*, 36, Suppl. 1: 135-140

Rizzetto M., Alavian S.M. 2013. Hepatitis delta: the rediscovery. *Clinics in Liver Disease*, 17, 3: 475-487

Rizzetto M., Canese M.G., Aricò S., Crivelli O., Trepo C., Bonino F., Verme G. 1977. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*, 18, 12: 997-1003

Rizzetto M., Canese M.G., Gerin J.L., London W.T., Sly D.L., Purcell R.H. 1980a. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *Journal of Infectious Diseases*, 141, 5: 590-602

Rizzetto M., Ciancio A. 2012. Epidemiology of hepatitis D. *Seminars in Liver Disease*, 32, 3: 211-219

Rizzetto M., Shih J.W., Gerin J.L. 1980b. The hepatitis B virus-associated delta antigen: isolation from liver, development of solid-phase radioimmunoassays for delta

antigen and anti-delta and partial characterization of delta antigen. *Journal of Immunology*, 125, 1: 318-324

Roggendorf M. 2012. Perspectives for a vaccine against hepatitis delta virus. *Seminars in Liver Disease*, 32, 3: 256-261

Rossi C., Shrier I., Marshall L., Cnossen S., Schwartzman K., Klein M.B., Schwarzer G., Greenaway C. 2012. Seroprevalence of chronic hepatitis B virus infection and prior immunity in immigrants and refugees: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 7, 9: e44611, doi: 10.1371/journal.pone.0044611: 9 str.

Sagnelli E., Stroffolini T., Ascione A., Bonino F., Chiaramonte M., Colombo M., Craxi A., Giusti G., Manghisi O.G., Pastore G., Piccinino F., Rizzetto M., Stazi M.A., Toti M., Verme G. 1992. The epidemiology of hepatitis delta infection in Italy. *Journal of Hepatology*, 15, 1-2: 211–215

Sagnelli E., Stroffolini T., Ascione A., Chiaramonte M., Craxi A., Giusti G., Piccinino F. 1997. Decrease in HDV endemicity in Italy. *Journal of Hepatology*, 26, 1: 20–24

Sagnelli E., Sagnelli C., Pisaturo M., Macera M., Coppola N. 2014. Epidemiology of acute and chronic hepatitis B and delta over the last 5 decades in Italy. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 24: 7635-7643

Sakugawa H., Nakasone H., Shokita S., Nakayoshi T., Kinjo F., Saito A., Yamashiro A., Miyagi Y. 1995. Seroepidemiological study of hepatitis delta virus infection in Okinawa, Japan. *Journal of Medical Virology*, 45, 3: 312-315

Schaper M., Rodriguez-Frias F., Jardi R., Tabernero D., Homs M., Ruiz G., Quer J., Esteban R., Buti M. 2010. Quantitative longitudinal evaluations of hepatitis delta virus RNA and hepatitis B virus DNA shows a dynamic, complex replicative profile in chronic hepatitis B and D. *Journal of Hepatology*, 52, 5: 658-664

Schmitz A., Schwarz A., Foss M., Zhou L., Rabe B., Hoellenriegel J., Stoeber M., Panté N., Kann M. 2010. Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in nuclear basket. *PloS Pathogens*, 6, 1: e1000741, doi: 10.1371/journal.ppat.1000741: 15 str.

Seme K., Kovanda A., Poljak M. 2011. Virusi hepatitisa. V: Medicinska virologija. Poljak M., Petrovec M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 75-109

Sergeant E.S.G. 2016. Epitools epidemiological calculators. Bruce, AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease: spletno orodje  
<http://epitools.ausvet.com.au> (30. 4. 2016)

Servant-Delmas A., Le Gal F., Gallian P., Gordien E., Laperche S. 2014. Increasing prevalence of HDV/HBV infection over 15 years in France. Journal of Clinical Virology, 59, 2: 126-128

Shaikh M.A., Shaikh W.M., Solangi G.A., Shaikh B.A., Soomro M.A. 2011. Frequency of hepatitis D virus infection in hepatitis B surface antigen-positive liver diseases. Journal of the College of Physicians and Surgeons – Pakistan, 21, 1: 23-25

Smedile A., Lavarini C., Farci P., Aricò S., Marinucci G., Dentico P., Giuliani G., Cargnel A., Del Vecchio Blanco C., Rizzetto M. 1983. Epidemiologic patterns of infection with the hepatitis B virus-associated delta agent in Italy. American Journal of Epidemiology, 117, 2: 223–229

Stroffolini T., Almasio P.L., Sagnelli E., Mele A., Gaeta G.B. 2009. Evolving clinical landscape of chronic hepatitis B: a multicenter Italian study. Journal of Medical Virology, 81, 12: 1999-2006

Su C.W., Huang Y.H., Huo T.I., Shih H.H., Sheen I.J., Chen S.W., Lee P.C., Lee S.D., Wu J.C. 2006. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. Gastroenterology, 130, 6: 1625-1635

Sundaram V., Kowdley K. 2015. Management of chronic hepatitis B infection. BMJ, 351: h4263. doi: 10.1136/bmj.h4263: 12 str.

Sureau C., Negro F. 2016. The hepatitis delta virus: replication and pathogenesis. Journal of Hepatology, 64, 1 Suppl.: S102-S16

Sy B.T., Ratsch B.A., Toan N.L., Song le H., Wollboldt C., Bryniok A., Nguyen M.H., Luong H.V., Velavan T.P., Wedemeyer H., Kremsner P.G., Bock C.T. 2013. High prevalence and significance of hepatitis D virus infection among treatment-naïve HBsAg-positive patients in North Vietnam. PLoS One, 8, 10: e78094, doi: 10.1371/journal.pone.0078094: 12 str.

Štunf Š., Seme K., Poljak M. 2005. Virus hepatitisa D. Medicinski razgledi, 44: 463-471

Thomas E., Yoneda M., Schiff E.R. 2015. Viral Hepatitis: Past and Future of HBV and HDV. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5, 2: a021345, doi: 10.1101/cshperspect.a021345: 12 str.

Trépo C., Chan H.L., Lok A. 2014. Hepatitis B virus infection. *Lancet*, 384, 9959: 2053-2063

Tsatsralt-Od B., Takahashi M., Endo K., Buyankhuu O., Baatarkhuu O., Nishizawa T., Okamoto H. 2006. Infection with hepatitis A, B, C, and delta viruses among patients with acute hepatitis in Mongolia. *Journal of Medical Virology*, 78, 5: 542-550

Velati C., Fomiatti L., Baruffi L., Piccinini V., Prati D., Reina A., Lobbiani A., Zanetti A., Romanò L. 2011. Criteria for hepatitis B virus screening and validation of blood components in Italy: the position of the SIMTI HBV working group. *Blood Transfusion*, 9, 4: 455-461

Wang K.S., Choo Q.L., Weiner A.J., Ou J.H., Najarian R.C., Thayer R.M., Mullenbach G.T., Denniston K.J., Gerin J.L., Houghton M. 1986. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature*, 323, 6088: 508-514

Wang-Johanning F., Lu D.W., Wang Y., Johnson M.R., Johanning G.L. 2002. Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from ThinPrep Papanicolaou tests using real-time polymerase chain reaction analysis. *Cancer*, 94, 8: 2199-2210

Wedemeyer H. 2010. Re-emerging interest in hepatitis delta: new insights into the dynamic interplay between HBV and HDV. *Journal of Hepatology*, 52, 2: 627-629

Wedemeyer H., Heidrich B., Manns M.P. 2007. Hepatitis D virus infection – not a vanishing disease in Europe! *Hepatology*, 45, 5: 1331-1332

Wedemeyer H., Manns M.P. 2010. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7, 1: 31-40

Wedemeyer H. 2011. Hepatitis D revival. *Liver International*, 31, Suppl. 1:140-144

Wei Y., Ganem D. 1998. Activation of heterologous gene expression by the large isoform of hepatitis delta antigen. *Journal of Virology*, 72, 3: 2089-2096

- WHO. 2001. Hepatitis delta. Geneva, World Health Organization: 30 str.  
<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrncs20011/en/> (30. 5. 2016)
- WHO. 2014. Global immunization data. Geneva, World Health Organizaton: 4 str.  
[http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/global\\_immunization\\_data.pdf](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/global_immunization_data.pdf) (30. 5. 2016)
- William Tong C.Y., Asher R., Toby M., Ngu S.L., Tettmar K., Ijaz S., Tedder R., Kulasegaram R., Wilkinson M., Tong W. 2013. A re-assessment of the epidemiology and patient characteristics of hepatitis D virus infection in inner city London. *Journal of Infection*, 66, 6: 521-527
- Williams V., Brichler S., Radjef N., Lebon P., Goffard A., Hober D., Fagard R., Kremsdorfs D., Dény P., Gordien E. 2009. Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon inducible MxA gene. *Journal of General Virology*, 90, Pt. 11: 2759-2767
- Wranke A., Heidrich B., Ernst S., Calle Serrano B., Caruntu F.A., Curescu M.G., Yalcin K., Gürel S., Zeuzem S., Erhardt A., Lüth S., Papatheodoridis G.V., Bremer B., Stift J., Grabowski J., Kirschner J., Port K., Cornberg M., Falk C.S., Dienes H.P., Hardtke S., Manns M.P., Yurdaydin C., Wedemeyer H., HIDIT-2 Study Group. 2014. Anti-HDV IgM as a marker of disease activity in hepatitis delta. *PLoS One*, 6, 7: e101002, doi: 10.1371/journal.pone.0101002: 13 str.
- Yan H., Zhong G., Xu G., He W., Jing Z., Gao Z., Huang Y., Qi Y., Peng B., Wang H., Fu L., Song M., Chen P., Gao W., Ren B., Sun Y., Cai T., Feng X., Sui J., Li W. 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 1: e00049. doi: 10.7554/eLife.00049: 28 str.
- Yurdaydin C., Idilman R., Bozkaya H., Bozdayi A.M. 2010. Natural history and treatment of chronic delta hepatitis. *Journal of Viral Hepatitis*, 17, 11: 749-756
- Zaidi G., Idrees M., Malik F.A., Amin I., Shahid M., Younas S., Hussain R., Awan Z., Tariq A., Parveen K. 2010. Prevalence of hepatitis delta virus infection among hepatitis B virus surface antigen positive patients circulating in the largest province of of Pakistan. *Virology Journal*, 7: 283, doi: 10.1186/1743-422X-7-283: 5 str.
- Zakotnik B., Čižman M., Strle F., Tomažič J. 2014. Preprečevanje nalezljivih bolezni. V: Infekcijske bolezni. Tomažič J., Strle F. (ur.). Ljubljana, Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo: 591-604

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Mariu Poljaku, da mi je dal več kot eno priložnost za delo v svojem laboratoriju.

Somentorici dr. Lei Hošnjak se zahvaljujem za prijaznost, potrpežljivost in spodbudo, usmerjanje pri delu, izčrpne popravke besedila ter za vse, kar me je naučila o laboratorijskem delu.

Prof. dr. Katji Seme hvala za prijaznost ter hiter pregled in popravke besedila.

Dr. Boštjanu Kocjanu hvala za vse znanje, ki mi ga je predal.

Za prijaznost, pomoč in koristne nasvete se zahvaljujem tudi dr. Mateji Jelen in Maji Lunar.

Vsem zaposlenim v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitsov in aidsa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani se zahvaljujem za prijaznost in pomoč pri delovnih zagatah. Še posebej hvala Robertu Krošlju za pomoč, koristne napotke, neumorno prijaznost ter za odgovore na vsa moja preštevilna vprašanja.

Kolegom in priateljem mikrobiologom Roku, Nataši, Elizabeti, Damjani, Špeli, Maji, Tini in ostalim sem neizmerno hvaležna za neprecenljive prijateljske vezi, lepe spomine na študijska leta, njihove nasvete, sočutje, podpora in spodbudo v nemalo težkih trenutkih, ter da so vedno verjeli vame, predvsem ko sem sama obupala.

Mami, očetu in bratu hvala za neskončno podporo v vseh pogledih. Staršem, starim staršem in ostalim sorodnikom v širši družini hvala, da so mi omogočili tako lepo otroštvo in mladost.

Matiji hvala za vse, kar je in kar sva skupaj. V dobrem in slabem.

Hvala vsem, predvsem Matiji, družini in priateljem, ki se borijo skupaj z mano, na poti skozi življenje vztrajajo ob meni in me imajo radi kljub vsem mojim težavam in pomanjkljivostim. Brez vseh vas mi ne bi uspelo.