

# DIJAGNOSTIKA HEPATITISA B

---

**Tičinović, Ana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:255790>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU  
Podružnica  
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Ana Tičinović**

**DIJAGNOSTIKA HEPATITISA B**

**Završni rad**

Split, 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
Podružnica  
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Ana Tičinović**

**DIJAGNOSTIKA HEPATITISA B**

**DIAGNOSTIC OF HEPATITIS B**

**Završni rad / Bachelor'sthesis**

Mentor:

doc. prim. dr. sc. Vanja Kaliterna, dr. med  
spec. medicinske mikrobiologije s parazitologijom

Split, 2019.

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Vanji Kaliterni na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog završnog rada. Najveće hvala mojim roditeljima na razumijevanju i podršci tijekom studiranja.*

## POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU

ALT – Alanin aminotransferaza

anti-HBc – Protutijelo na jezgreni antigen (engl. Anti-hepatitis B core)

anti-HBe – Protutijelo na antigen ovojnice (engl. Anti-hepatitis B envelope)

anti-HBs – Protutijelo na površinski antigen (engl. Anti-hepatitis B surface)

cccDNA – Kovalentno zatvorena kružna DNK (engl. Covalently closedcircle DNA)

cDNA – Komplementarna DNK (engl. Complementary DNA)

DNK – Deoksiribonukleinska kiselina

HBcAg – Hepatitis B jezgreni antigen (engl. Hepatitis B core antigen)

HBeAg – Hepatitis B antigen ovojnice (engl. Hepatitis B envelope antigen)

HBsAg – Hepatitis B površinski antigen (engl. Hepatitis B surface antigen)

HBV – Hepatitis B virus

HBV DNK – Deoksiribonukleinska kiselina hepatitis B virusa

HCV – Hepatitis C virus

ID-NAAT – Individualno testiranje nukleinske kiseline davatelja (engl. Individual donor nucleic acid testing)

NAAT – Test amplifikacije nukleinske kiseline (engl. Nucleic acid amplification testing)

OBI – Okultna hepatitis B virusna infekcija (engl. Occult hepatitis B virus infection)

PCR – Lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase chain reaction)

RNK – Ribonukleinska kiselina

WP – „Dijagnostički prozor“ (engl. Window period)

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. SVOJSTVA VIRUSA .....	2
2.1. Građa i sastav virusa .....	3
2.2. Umnožavanje virusa .....	3
3. VIRUS HEPATITISA B .....	4
3.1. Građa i svojstva hepatitis B virusa .....	6
3.2. Umnožavanje virusa hepatitisa B .....	8
4. EPIDEMIOLOGIJA INFEKCIJE HEPATITISOM B .....	9
5. PATOGENEZA INFEKCIJE HEPATITISOM B .....	11
6. INTERAKCIJA IZMEĐU VIRUSA I DOMAĆINA .....	12
7. KLINIČKA SLIKA INFEKCIJE HEPATITISOM B .....	13
7.1. Akutni hepatitis .....	13
7.2. Fulminantni hepatitis .....	13
7.3. Kronični hepatitis .....	14
7.4. Okultne infekcije .....	14
7.5. Ostale bolesti .....	15
8. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA HBV INFEKCIJE .....	15
8.1. Laboratorijski nalazi .....	17
8.2. Serološka dijagnostika .....	17
ELISA .....	18
8.3. Molekularne metode .....	21
PCR .....	21
9. LIJEČENJE INFEKCIJE HBV VIRUSOM .....	23
10. PREVENCIJA I KONTROLA HBV INFEKCIJE	
11. CILJ RADA .....	25
12. METODE .....	25

13. REZULTATI.....	35
14. ZAKLJUČAK .....	38
15. SAŽETAK.....	39
16. ABSTRACT .....	40
17. LITERATURA.....	41
18. ŽIVOTOPIS .....	43

## 1. UVOD

**Virusni hepatitis** je sustavna bolest koja primarno zahvaća jetru i dovodi do oštećenja ili uništenja njezinih stanica. Očituje se tipičnim kliničkim znakovima: povišenom tjelesnom temperaturom, mučninom, povraćanjem i žuticom. Tijekom akutne faze virusne bolesti, histopatološka oštećenja su jednaka neovisno o tipu virusa. No virusi se međusobno razlikuju po građi, načinu umnožavanja i tijeku bolesti. Ukupno je poznato **šest virusa hepatitisa** označenih slovima od A do G. Većina akutnih virusnih hepatitisa uzrokovana je virusom hepatitisa A (HAV), virusom hepatitisa B (HBV), virusom hepatitisa C (HCV) i virusom hepatitisa D (HDV).

HAV i HEV prenose se feko-oralnim putem i uzrokuju akutne infekcije bez kroničnih posljedica.

HBV, HCV, i HDV prenose se spolnim putem, tijekom porođaja i parenteralnim putem, preko transfuzije krvi i krvnih pripravaka, putem zajedničkih igala intravenskih ovisnika o drogama i ostalog pribora u zdravstvenim ustanovama. Ovi virusi, osim akutne infekcije uzrokuju i kronične infekcije koje mogu završiti kao kronični hepatitis, hepatocelularni karcinom i ciroza jetre.

Budući da je ovim virusima zajedničko umnožavanje u tkivu jetre, nazivaju se hepatotropnim virusima.

**Hepatitis B virus** pripada porodici *Hepadnaviridae*.

**Hepadnavirusi** su mali (40 - 48 nm) virusi s kružnom dvolančanom DNK molekulom veličine 3,2 kbp. DNK sadrži veliki jednolančani međuprostor. Replikacija uključuje popunjavanje tog međulančanog prostora u DNK, transkripciju RNK s ciljem sinteze genomske DNK. Površinski protein se stvara u suvišku tijekom replikacije virusa koja se odvija u jetri te se oslobađa u krvotok. Hepadnavirusi uzrokuju akutni i kronični hepatitis. Infekcije su povezane s visokim rizikom nastanka karcinoma jetre.



## 2. SVOJSTVA VIRUSA

Virusi su najmanji infektivni agensi (od 20 do 300 nm u promjeru) i sadrže samo jednu vrstu genomske nukleinske kiseline (DNK ili RNK). Nukleinska kiselina je smještena u proteinskoj ljusci, kapsidi, te zajedno tvore nukleokapsidu. Kompletna infektivna jedinica virusa naziva se **virion**.

Virusi su **obligatni stanični paraziti**, umnožavaju se samo u živim stanicama, parazitirajući na genetskoj razini. Virusna nukleinska kiselina sadrži podatke potrebne za programirane inficirane stanice domaćina za sintezu virusno specifičnih makromolekula koje su nužne za sintezu novih virusa. Stanica domaćina daje energiju, biokemijske prekursore i biosintetske aparate. Tijekom ciklusa umnažanja stvara se velik broj kopija virusnih nukleinskih kiselina i proteina ovojnice. Svijet virusa je izrazito raznolik. Virusi se uvelike razlikuju u strukturi, organizaciji i ekspresiji genoma te strategijama umnožavanja i prenošenja, te mogu inficirati jednostanične organizme ali i složenije organizme. Infekcija virusom može imati ograničen ili nikakav učinak na stanice domaćina, ali može rezultirati i oštećenjem te smrću stanice.



**Slika 1.** Virus (sciencemag.org)

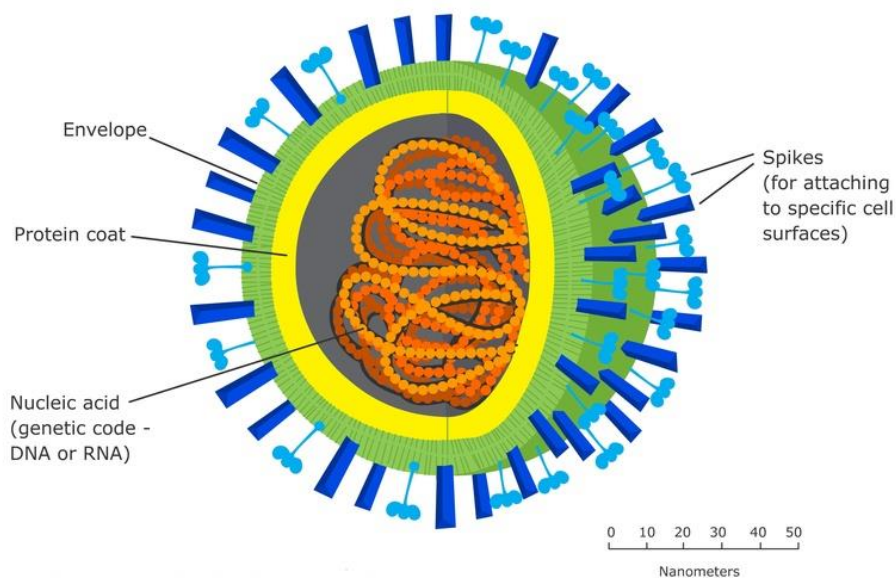
## 2.1. Građa i sastav virusa

**Nukleinska kiselina** je ili DNK ili RNK i s obzirom na to virusi se dijele na DNK i RNK viruse. Proteini ovojnice izgrađuju **kapsidu** koja ovija i štiti virusnu nukleinsku kiselinu od izvanstaničnog okoliša te omogućuje vezivanje i prodiranje virusa u kontaktu s novim osjetljivim stanicama. Kapsida može biti višeslojna i razlikujemo strukturnu i morfološku jedinicu. Strukturna jedinica ili protomer je osnovni gradivni element kapside i najmanja funkcionalna jedinica. Morfološka jedinica ili kapsomera je oblikovni element koji se vidi elektronskim mikroskopom.

**Nukleokapsida** je kompleks sastavljen od proteina i nukleinske kiseline koji predstavlja upakiranu formu virusnog genoma.

Neki virusi imaju vanjsku **lipidnu ovojnicu**. To je jednoslojna ili dvoslojna lipidna membrana koja sadrži različite funkcionalne elemente. Potječe od stanice domaćina u kojoj se virus razmnožavao. Osjetljivi su na organska otapala koja razaraju ovojnicu.

**Glikoproteinski izdanci** su nastavci na površini virusa koje imaju neki virusi, a kodirani su od strane virusnog genoma. Pomoću njih se virus prihvaća na površinu stanice primatelja (adsorpcija), također služe kao antigeni.

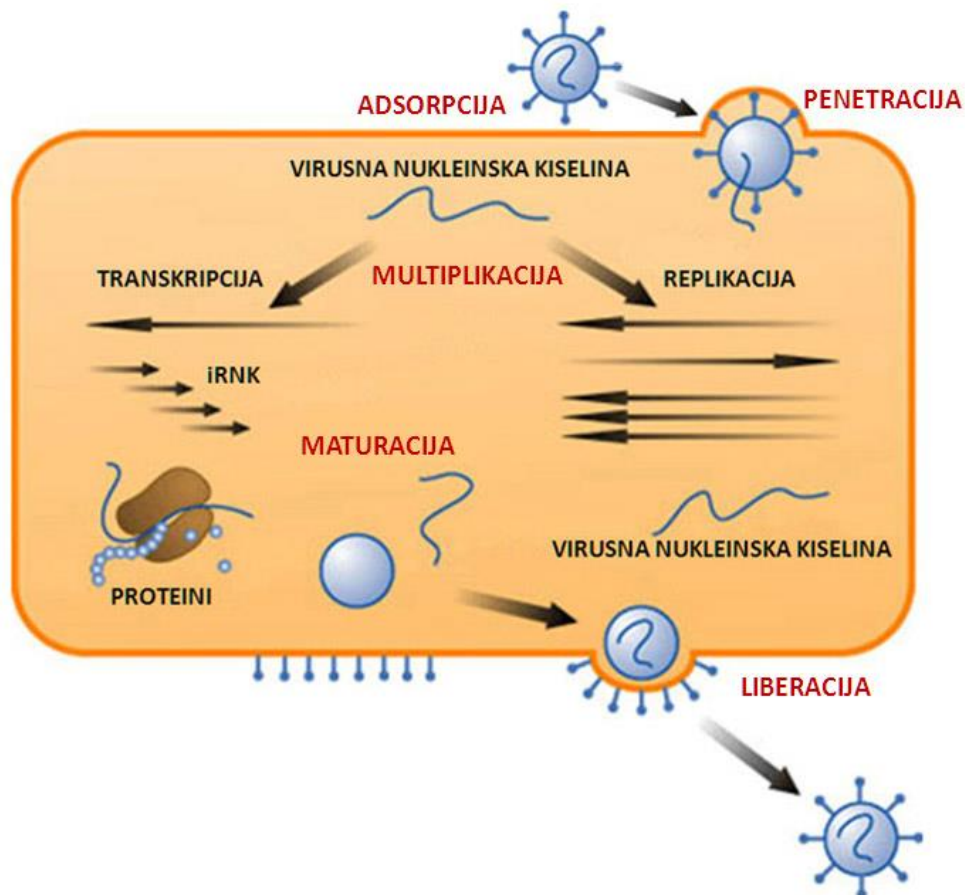


**Slika 2.** Građa virusa (produzizivot.com)

## 2.2. Umnožavanje virusa

Umnožavanje (replikacija) virusa je enzimski proces prepisivanja vlastitog genoma kojeg čini jedna od nukleinskih kiselina. Ono se razlikuje od razmnožavanja ostalih mikroorganizama jer se odvija samo u živoj stanici. Za vrijeme umnožavanja virusa nastaju promjene na površini i u unutrašnjosti inficirane stanice.

Faze umnožavanja virusa uključuju: vezivanje za stanicu putem specifičnih receptora na staničnoj površini, ulazak u stanicu, oslobađanje virusnog genoma, reguliranu ekspresiju virusnih transkriptata, sintezu virusnih proteina, replikaciju virusne genomske nukleinske kiseline, sklapanje novih virusnih čestica i oslobađanje novih viriona iz stanice. Ne uzrokuju sve virusne infekcije nužno stvaranje novog potomstva virusa.



**Slika 3.** Umnožavanje virusa (svet-biologije.com)

### 3. VIRUS HEPATITISA B

Virus hepatitisa B (HBV) je DNK virus iz porodice *Hepadnaviridae* roda *Orthohepadnavirus*. On je okrugla čestica promjera 42 nm. HBV je mali virus sastavljen od lipidne ovojnice i unutarnje nukleokapsidne strukture. Patogen je samo za ljude i neke čovjekolike majmune. Poznat je i kao uzročnik tzv. „serumskog hepatitisa“. Ostaje infektivan za ljude tijekom šest mjeseci u serumu čuvanom na 4°C, a čak do pet godina ako je serum smrznut na -20°C. Infektivnost seruma se gubi u potpunosti na 60 °C tijekom 10 sati.

HBV uspostavlja kroničnu infekciju, osobito ako se infekcija pojavila u djetinjstvu.

Prvi put je detektiran 1965. godine kada je Baruch Blumberg u serumu jednog Aboridžina detektirao površinski antigen HBsAg koji je povezoao s posttransfuzijskim hepatitisom.

**Tablica 1.** Svojstva virusa hepatitisa B

<b>Virus</b>	<b>Hepatitis B</b>
Porodica	Hepadnaviridae
Rod	Orthohepadnavirus
Virion	42 nm, kuglast
Ovojnica	da (HBsAg)
Genom	dl DNK
Veličina genoma	3,2 kbp
Stabilnost	osjetljiv na kiselinu
Prijenos	parenteralno
Prevalencija	Visoka
Fulminantna bolest	Rijetka
Kronična bolest	Često
Onkogenost	Da

### 3.1. Građa i svojstva hepatitis B virusa

S obzirom na površinski antigen virusa (HBsAg, engl. *Hepatitis B surface antigen*) otkrivena su tri morfološka oblika virusa hepatitisa B, pomoću elektronske mikroskopije seruma.

Najbrojnije su **kuglaste čestice** promjera 22nm koje su građene isključivo od HBsAg. **Tubularni i filamentozni oblici** (promjera 22nm), građeni su također isključivo od HBsAg, ali mogu biti dugi i više od 200 nm. Ta dužina rezultat je prekomjernog stvaranja (hiperprodukcije) HBs antigena.

Virusna čestica, **Danneova čestica**, kuglastog je oblika i veći je kuglasti virion (42 nm). Danneova čestica rjeđe se opaža. Njezinu ovojnicu čine HBsAg, lipidi, i glikoproteini. Vanjska ovojnica okružuje jezgru unutarnje nukleokapside veličine 27 nm koja sadržava HBcAg (engl. *Hepatitis B core antigen*). Nukleokapsidni dio sastoji se od HBcAg i virusne HBV DNK s DNK polimerazom / reverznom transkriptazom. Između vanjskog omotača i jezgre nalazi se antigen omotača HbeAg (engl. *Hepatitis B envelope antigen*).

Protein jezgre koji slobodno cirkulira u serumu je HBeAg. U serumu se slobodno nalazi i HBV DNK i DNK polimeraza

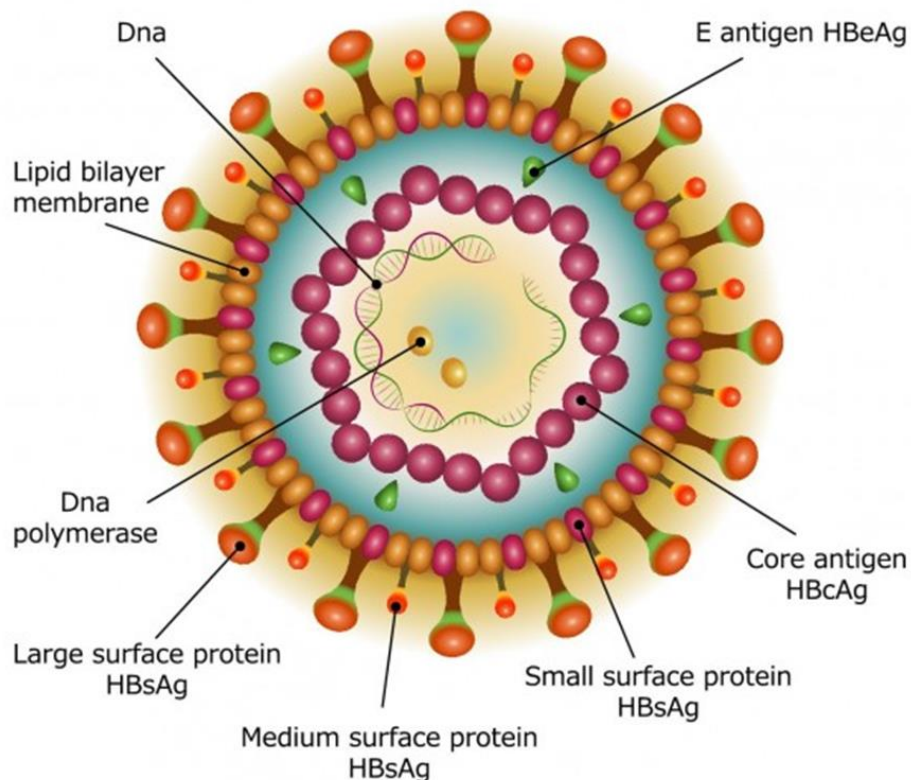
Genom čine 3,2 kbp kružne i djelomično dvolančane DNK molekule. Zbog varijabilne dužine jednolančanog područja kružnog DNK genoma nastaju genetički heterogene čestice širokog raspona u gradijentu gustoće. Izolati HBV-a pokazuju 90 – 98% homologije nukleotidne sekvencije.

Negativni lanac DNK je pune dužine (L, dugački lanac) i komplementaran je svim mRNK HBV-a. Pozitivni DNK lanac (S, kratki lanac) je varijabilan i ima dužinu između 50 i 80% cijele DNK.

Genom sadržava **četiri okvira čitanja**, a kodiraju 7 peptida:

1. C gen (core ili nukleokapsida) kodira HBcAg i HBeAg. Gen C ima dva start kodona kojikodiraju HBcAg i protein HBe koji nadalje služi za stvaranje HBeAg. HBeAg je topljivi protein koji se izlučuje u serum i može se spajati s albuminima i imunoglobulinima i cirkulirati krvotokom. Za razliku od HbeAg, HBcAg je jezgrin strukturni protein i tvori nukleokapsidu. C gen je pouzdani pokazatelj infektivnosti i aktivnog umnožavanja virusa.

2. S gen (surface ili ovojnica) kodira HBsAg koji je građen od 3 polipeptida. S small, M medium i L large. S je glavni polipeptid i ima grupno specifični antigen a i 4 osnovna podtipa, fenotipa HBsAg (adw, ayw, adr i ayr) određeni su tkivno specifičnim determinantama d ili y i w ili r. U SAD-u je adw predominantni podtip. Ovi biljezi su korisni u epidemiološkim istraživanjima.
3. P gen (pol ili polimeraza) kodira DNK polimerazu i reverznu transkriptazu.
4. X gen kodira polipeptid koji je transkripcijski aktivator.



**Slika 4.** Shematski prikaz virusa hepatitisa B ([infectiousdiseaseadvisor.com](http://infectiousdiseaseadvisor.com))

Infektivna virusna čestica i HBsAg mogu se čuvati na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tako su stabilni i duže od 20 godina. Virus je također stabilan na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 60 min. Održava se nakon sušenja i pohranjivanja na  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  tjedan dana. HBV, ali ne i HBsAg, je osjetljiv na više temperature oko  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min, pri kojoj i gubi zaraznost. HBsAg je stabilan pri pH 2,4 tijekom 6 sati, dok se zaraznost HBV-a gubi. Izlaganjem virusa 0,5 % otopini natrijeva hipoklorita (npr. natrijev hipoklorit u razrjeđenju 1:10) uništava antigenost, nastaje razgradnja antigena. Ultraljubičasto zračenje ne uništava HBsAg ni u plazmi ni u drugim krvnim pripravcima, virusna infektivnost se također održava.

### **3.2. Umnožavanje virusa hepatitisa B**

Zarazni virion se veže za jetrenu stanicu i pri tome gubi ovojnici. To se odigrava preko virusnog proteina ovojnice HBsAg. Ulaskom virusa u stanicu u jezgri se djelomično dvolančani genom virusa preobraća u kovalentno zatvorenu kružnu dvolančanu DNK (cccDNK). cccDNK je predložak (kalup) za sve virusne transkripte uključujući i progenomsku RNK. Najveća mRNK nosi zapis za tvorbu početnica proteinskog sastava za umnožavanje DNK, HBcAg i HbeAg. Unutar jezgre virusna polimeraza pomoću reverzne transkripcije sintetizira kopiju negativnog lanca DNK. Čim se stvori DNK, RNK lanac se odmah razgrađuje, te iz negativnog lanca nastaje pozitivan. Polimeraza započinje i sintezu pozitivnog lanca ali taj proces ne bude dovršen. Zbog razgradnje preostale RNK nastaje djelomično dvolančana DNK.

Dozrijevanje i oblikovanje virusne čestice odvija se u endoplazmatkom retikulumu. Kapside nastaju iz pre Golgijevih membrana. Pri tom dobivaju ovojnici koja se sastoji od HBsAg i mogu napustiti stanicu. Djelomično napuštaju hepatocite, a djelomično ostaju u istoj stanici u jezgri i ponovno pokreću umnožavanje. Virusni genom se može ugraditi u kromatin jezgrinih stanica i na taj način dolazi do nastanka hepatocelularnog karcinoma.

## 4. EPIDEMIOLOGIJA INFEKCIJE HEPATITISOM B

Hepatitis B je **javnozdravstveni problem** diljem svijeta. Procjenjuje se da je u svijetu kronično zaraženo virusom hepatitisa B više od 257 milijuna ljudi, od čega ih većina živi u subsaharskoj Africi, Kini i jugoistočnoj Aziji. Prevalencija u europskim zemljama je 0,5 – 2% (ukupno oko 1,5 milijuna ljudi). Put prijenosa i odgovor na infekciju razlikuje se ovisno o životnoj dobi u vrijeme zaraze virusom. Kod većine osoba zaraženih tijekom dojenačke dobi razvija se kronična infekcija, ostaju kliconoše i u odrasloj dobi su skloni razvoju hepatocelularnog karcinoma. Kronični hepatitis razvija 25% kliconoša.

Za infekciju HBV-om ne postoji sezonski trend, jer se infekcije javljaju tijekom cijele godine. Također nema visoke predilekcije za bilo koju dobnu skupinu, iako postoje visokorizične skupine.

### **Tri su načina prijenosa virusa:**

- Spolnim putem (sjeme, vaginalni sekret, slina, menstrualna tekućina)
- Parenteralnim putem (transfuzija zaražene krvi i krvnih pripravaka, presadbom organa, zajedničke igle intravenskih narkomana, tetoviranje, „piercing“, četkice za pranje zuba, brijaći pribor, ubodni incident zdravstvenih djelatnika)
- Perinatalno (u tijeku porođaja kada dolazi do miješanja krvi majke i novorođenčeta)

Sukladno ovom, osobe koje su izražene visokom riziku zaraze su: promiskuitetne osobe, članovi obitelji i bliski prijatelji zaraženih osoba, osobe koje primaju opetovane transfuzije krvi, korisnici i.v. droga, imunokompromitirane osobe prilikom transplantacije organa, osobe koje se liječe hemodijalizom (do 50% bolesnika na hemodijalizi koji budu zaraženi HBV-om, postaju kronični nositelji HBsAg), zdravstveni djelatnici (kirurzi, patolozi, medicinske sestre, laboratorijsko osoblje, osoblje na transfuzijama).

Od uvođenja obaveznog ispitivanja dobrovoljnih davatelja na HBsAg, dramatično je smanjen broj hepatitisa povezanog s transfuzijom krvi i krvnih pripravaka. Prijenos feko-oralnim putem nije dokazan. Može se pretpostaviti da su sve tjelesne tekućine osobe inficirane HBV-om potencijalno zarazne. U krvi zaražene osobe pozitivne na HBeAg može biti više od 1 milijarde viriona po ml.



Čovjek je jedini rezervoar virusa hepatitisa B. Hepatitis B virusna infekcija spada u 10 vodećih uzroka smrtnosti od zaraznih infekcija u svijetu. Smrt nastupa nakon insuficijencije jetre ili karcinoma jetre. 50% svih karcinoma jetre povezano je s kroničnim hepatitisom. HBV je posebno raširen u nerazvijenim zemljama (vertikalni prijenos s majke na dijete), a u razvijenim zemljama češći je horizontalni prijenos (s osobe na osobu).

Hepatitis B se najčešće pojavljuje u supsaharskoj Africi i istočnoj Aziji (u 5 - 10 % stanovništva), južnim i istočnim dijelovima središnje Europe i Amazoni.

Procjenjuje se da je u zapadnoj Europi i Sjevernoj Americi zaraženo manje od 1 % stanovništva. Hrvatska također spada u zemlje s niskom učestalošću hepatitisa B, koji je zadnjih dvadesetak godina nakon uvođenja cijepljenja u padu, ali i dalje predstavlja važan javnozdravstveni problem. Razdvajanjem prijave hepatitisa B od ostalih hepatitisa 1976. godine, u Hrvatskoj se godišnje bilježi prosječno 200 slučajeva, što čini incidenciju od 0,5 na 10 000 stanovnika. Od 1998. zasebno se prati kronično vironoštvo. Prevalencija HbsAg pozitivnih osoba u hrvatskoj populaciji razmjerno je niska i iznosi 0,4 % (na temelju rezultata sveobuhvatnog testiranja neselekcioniranih davatelja krvi) (7). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo 2017. u Hrvatskoj od kroničnog hepatitisa B boluje oko 25.000 ljudi. Posljednjih se godina u Hrvatskoj bilježi stotinjak prijava novootkrivenih slučajeva hepatitisa B godišnje. U Hrvatskoj su 2017. godine, temeljem prijava zaraznih bolesti koje je zaprimio Hrvatski zavod za javno zdravstvo od hepatitisa B oboljele 22 osobe.

U Hrvatskoj se protiv hepatitisa B od 1999. godine cijepi djeca u dobi od 12 godina, a od 2007. godine i dojenčad. Otkad je cijepljenje uvedeno u program obveznog cijepljenja u Hrvatskoj (2009. g.), učestalost hepatitisa B se smanjila za 79 %, a najveći dobno-specifični pad učestalosti je zabilježen kod djece i adolescenata (11).

Svake se godine u svijetu 28. srpnja obilježava Svjetski dan hepatitisa u cilju podizanja svijesti javnosti o javnozdravstvenom značaju virusnih hepatitisa, prvenstveno hepatitisa B i C.

## 5. PATOGENEZA INFEKCIJE HEPATITISOM B

Hepatitis je opći pojam i označava upalu jetre. Najčešći uzročnici hepatitisa su virusi, ali određene vrste hepatitisa mogu prouzročiti razne toksične tvari (alkohol) ili autoimune bolesti. Krv zaražene osobe najčešći je izvor zaraze. Virus hepatitisa je moguće pronaći u slini, sjemenoj tekućini, sekretu rodnice, majčinom mlijeku... Najveći rizik zaraze predstavlja ulazak virusa direktno u krvotok. Krvlju dospijeva u jetru, gdje se umnožava. Nešto niži rizik je spolnim putem ili tijekom porođaja.

Kod **akutnog hepatitisa** umnožavanje virusa počinje tijekom prva tri dana od početka zaraze. Oštećenje jetre ovisi o infektivnoj dozi, mjestu ulaska virusa i o imunosnom sustavu zaražene osobe. Riječ je o degeneraciji parenhimalnih jetrenih stanica, nekrozi hepatocita, upali i propadanju jetrenih režnjeva (lobula). Često su opažena lokalizirana područja nekroze.

Interferon i antigeni tkivne kompatibilnosti potiču izlaganje virusnih antigena (HBs, HBe, HBc) citotoksičnim limfocitima T. Neučinkovit odgovor ovih stanica izaziva blage znakove bolesti, osoba ubrzo više ne može svladati reakciju i razvija se **kronični hepatitis**.

Tijekom infekcije, HBsAg koji je u serumu, spaja se s neutralizacijskim protutijelima anti-HBs. Tako nastaju imunokompleksi koji pridonose reakciji preosjetljivosti, koja nadalje uzrokuje da protutijela gube svoju zaštitnu aktivnost.

Kronični nositelji HBs antigena mogu ali i ne moraju imati vidljive znakove hepatitisa. **Perzistirajući hepatitis** je blaga bolest (8-10% bolesnika) i uzrokuje povremene patološke vrijednosti aminotransferaza. Ovakva bolest se opaža kod asimptomatskih bolesnika. Ne napreduje u pravcu ciroze i ima povoljnu prognozu.

Svladavanjem infekcije jetreni se parenhim može oporaviti. Dakle, tijekom bolesti, nastaje nakupljanje makrofaga uz oštećene hepatocite. Očuvanje strukture retikuluma omogućuje regeneraciju hepatocita. Oštećeno jetreno tkivo obično se obnovi nakon 8-12 tjedana.

Također, može nastati i veće oštećenje nakon akutne infekcije. Takvo oštećenje ne dopušta regeneraciju hepatocita. To je **fulminantni oblik hepatitisa**. Češći je kod HDV virusa.

Niti jedan od hepatitisa nije u pravilu citopatogen. Pretpostavlja se da je oštećenje stanica posredovano imunološki. HBV i HBC imaju značajnu ulogu u razvoju hepatocelularnog karcinoma koji se može pojaviti nakon mnogo godina (50-60 nakon kronične infekcije).

## 6. INTERAKCIJA IZMEĐU VIRUSA I DOMAĆINA

Pretpostavlja se da pojedinačna infekcija nekim od virusa hepatitisa daje homolognu ali ne i heterolognu zaštitu od reinfekcije. Moguća iznimka je HCV. Izgleda da infekcija hepatitis B virusom određenog podtipa (npr. HBsAg/adw) daje imunost na ostale podtipove HBsAg vjerojatno zbog zajedničke specifičnosti za skupinu.

Budući da virus sam po sebi nije citopatogen, oštećenje jetre za vrijeme akutne bolesti je zbog imunosnog napada domaćina na hepatocite inficirane virusom. Genetski i imunosni odgovori domaćina su razlog za učestale kronične infekcije HBV-om kod djece inficirane u dojenačkoj dobi. Oko 95% djece inficirane pri porodu postaju kronični nositelji čak i doživotno. Rizik inficirane odrasle osobe da postane kliconoša je 10%.

Hepatocelularni karcinom nastaje najčešće kod osoba koje su doživjele infekciju HBV-om u vrlo ranoj životnoj dobi i koje su potom postale kliconoše. Da bi cijepljenje protiv hepatitisa B bilo što učinkovitije, u ovakvih osoba, treba ga provesti za vrijeme prvog tjedna nakon poroda.

## 7. KLINIČKA SLIKA INFEKCIJE HEPATITISOM B

Nakon inkubacije od 30 do 180 dana, slijedi prodromalni stadij koji traje od 3 do 10 dana. Karakteristika kliničke manifestacije hepatitisa B je **raznolikost simptoma bolesti**. Mogu se javiti blagi oblici koji podsjećaju na gripu ili teži oblici s izraženim ikterusom. Osim febrilnosti, mučnine i povraćanja mogu se javiti i bolovi u zglobovima i mišićima, svrbež i osip po koži, krvarenja kože i sluznice, pojava smeđe do crvene boje mokraće, žutilo bjeloočnica itd. Infekcija se može očitovati u nekoliko oblika.

### 7.1. Akutni hepatitis

Ovaj oblik može proći klinički neopaženo ili počinje nespecifičnim znakovima: opća slabost, umor, gubitak apetita, mučnina i povraćanje. Kasnijim fizikalnim pregledom nađu se žutica, tamna mokraća i svijetla stolica. Omjer zaraženih bez žutice naspram onih sa žuticom je 4:1.

Akutna infekcija se dijeli na dvije faze, inicijalnu i ikteričnu. **Inicijalna faza** je karakterizirana simptomima umora, gubitkom teka, bolovima u mišićima, povraćanjem i mučninama. Ti simptomi traju relativno kratko, do 2 tjedna. U tom je vremenu u krvi moguće dokazati visoki titar antigena HBsAg, HBeAg te HBV DNK, dok su bilirubin i ALT u granicama normale. U **ikteričnoj fazi** javlja se žutica te jako povišene vrijednosti serumskih aminotransferaza (ALT, AST) i bilirubina.

Normalizacija laboratorijskih nalaza, nemogućnost detektiranja HBsAg, te pojava protutijela na HBsAg, HBcAg i HBeAg ukazuje na oporavak zaražene osobe. Prisutnost anti-HBs protutijela ukazuje na stečenu imunost.



**Slika 5.** Žutilo bjeloočnica (narodnilijek.com)

## 7.2. Fulminantni hepatitis

Ovo je najteži i najrjeđi oblik hepatitisa B. Manifestira se insuficijencijom jetre, edemom mozga s poremećajima svijesti pa čak može dovesti i do kome, krvarenjima iz želuca i teškim metaboličkim promjenama. Od 0,1% do 0,5% akutnih infekcija prijeđu u fulminantni oblik. Definiran je kao hepatična encefalopatija. Javlja se u prvih 8 tjedana bolesti. Još teži oblik je udružena fulminantna bolest zajedno s HBV i HDV. Većina bolesnika koji prežive u pravilu imaju kompletnu obnovu jetrenog parenhima i funkcije jetre.

## 7.3. Kronični hepatitis

Kronična infekcija je prisutna kod ljudi kojima je HBV pozitivan dulje od 6 mjeseci nakon prvih rezultata testa. Njihov imunološki sustav nije bio u mogućnosti eliminirati hepatitis B virus, te on ostaje u njihovoj krvi i jetri. Razvija se u 5 - 10% odraslih osoba s akutnim hepatitisom. Kronično zaražene osobe su glavni izvor prijenosa virusa te su izložene visokom riziku za razvoj fulminantnog hepatitisa. Skloni su također razvoju terminalne jetrene bolesti i hepatocelularnog karcinoma. To se događa kod 15 – 40 % kroničnih infekcija. Kronični hepatitis može proći i klinički neopaženo. Često se slučajno otkriva tijekom rutinskog pregleda (budu povišene aktivnosti jetrenih enzima). Tijekom kroničnog hepatitisa javljaju se i stanja koja su posljedica reakcije preosjetljivosti tj. stvaranja imunokompleksa (bolovi u zglobovima, osip, oštećenje bubrega). Većina ljudi nema nikakvih simptoma i hepatitis B može biti dijagnosticiran i desetljećima nakon prvog kontakta s virusom.



**Slika 6.** Zdrava i cirozna jetra (plivazdravlje.hr)

## 7.4. Okultne infekcije

Okultne infekcije HBV-om česte su kod oboljelih od kroničnog hepatitisa B. Prema definiciji, okultnu HBV infekciju (OBI) karakterizira prisutnost HBV DNK u krvi bez detektabilnog hepatitis B antigena (HBsAg). Najčešći razlozi okultne HBV infekcije su nereplikativna faza HBV infekcije, razne mutacije virusa, virusna interferencija ili perzistencija nakon ozdravljenja.

## 7.5. Ostale bolesti

Ostale virusne bolesti koje se mogu manifestirati kao hepatitis su: žuta groznica, mononukleoza, te infekcije virusima: CMV (citomegalovirus), herpes simplex i rubela. Hepatitis se može pojaviti i kao komplikacija sifilisa, tuberkuloze, toksoplazme i amebijaze. Sve ove reakcije osjetljive su na specifičnu terapiju lijekovima.

Nezarazni uzroci hepatitisa B su: toksični lijekovi, Wilsonova bolest, bilijarna opstrukcija, primarna bilijarna ciroza.

U virusnom hepatitisu žutici često prethode gastrointestinalni problemi, primjerice mučnina, povraćanje i gubitak apetita.

Ekstrahepatične manifestacije virusnog hepatitisa uključuju prolazne bolesti kao što su serumska bolest koja se sastoji od vrućice, kožnog osipa i poliartritisa.



**Slika 7.** Urtikarija (ordinacija.vecernji.hr)

## 8. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA HBV INFEKCIJE

Kako bi se otkrile različite faze hepatitis B virusne infekcije, koriste se različiti markeri pojedinačno ili u kombinaciji. Prisutnost odnosno odsutnost pojedinog antigena i specifičnog protutijela ukazuje na fazu infekcije. Hepatitis B virusni markeri su skup testiranja na antigene i protutijela HBV-a. Pomoću njih se određuje ima li pacijent akutnu ili kroničnu HBV infekciju, je li imun na hepatitis B zbog prijašnje infekcije ili cijepljenja, te je li osjetljiv na infekciju. Ukoliko je organizam nakon kontakta s HBV-om uspio stvoriti specifična protutijela i spriječio virusnu replikaciju, u serumu su prisutna protutijela na određene dijelove HBV-a. Protutijela u serumu ukazuju na kontakt s HBV-om, a infekcije više nema.

Markeri HBV-a su:

1. **HBsAg** (engl. *hepatitis B surface antigen*) upućuje na osobu koja je nositelj virusa, odnosno potencijalno infektivnu osobu. Takvo stanje traje mjesecima sve do oporavka ili čak godinama kod kroničnih nositelja.
2. **HBeAg** (engl. *hepatitis B envelope antigen*) marker aktivne infekcije, antigen omotača hepatitisa B. Pokazatelj je aktivne infekcije i visoke infektivnosti. Dugotrajna prisutnost u serumu ukazuje na mogućnost kroničnog oštećenja jetre.
3. **HBcAg** (engl. *hepatitis B core antigen*) prisutan je u jetrenim stanicama, a ne u serumu bolesnika te se stoga rutinski ne određuje.
4. **anti-HBs** je protutijelo na površinski antigen, marker imunosti, pojavljuje se u serumu u stadiju oporavka. Ova protutijela su dugo nakon cijepljenja prisutna u serumu.
5. **anti-HBc** je protutijelo na jezgreni antigen, marker sadašnje ili prošle infekcije.
6. **anti-Hbe** je protutijelo na antigen omotača hepatitisa B, marker neaktivnosti virusa. Upućuje na djelomični oporavak i nisku razinu infektivnosti.

## 8.1. Laboratorijski nalazi

Na poremećaj funkcije jetre kod pacijenata oboljelih od hepatitisa B upućuju nas brzi krvni nalazi kao što su alanin aminotransferaza u serumu (ALT) i bilirubin. Vrhunac im je u ikteričnoj fazi. ALT bolje prikazuje aktivnost bolesti, dok je bilirubin marker za težinu bolesti. Kod ikteričnih oblika hepatitisa direktni i indirektni bilirubin su otprilike jednako povišeni. U težim oblicima hepatitisa B protrombinsko vrijeme (PV) u serumu može biti znatno produženo. Neki faktori koagulacije su sniženi. U krvoj slici je normalan broj leukocita ili blaga leukopenija uz limfocitozu i pojavu reaktivnih limfocita. Povišen je broj bazofila, eozinofila i plazma stanica.

## 8.2. Serološka dijagnostika

Najčešći način serološke detekcije je imunoenzimski test (ELISA, engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) specifičnih protutijela i virusnih antigena. To su tzv. markeri ili biljezi hepatitisa B. Osim potvrde etiološke dijagnoze ovi testovi daju prosudbu imunosnog stanja zaražene osobe. Također prognoziraju tijek bolesti i određuju stupanj zaraženosti.

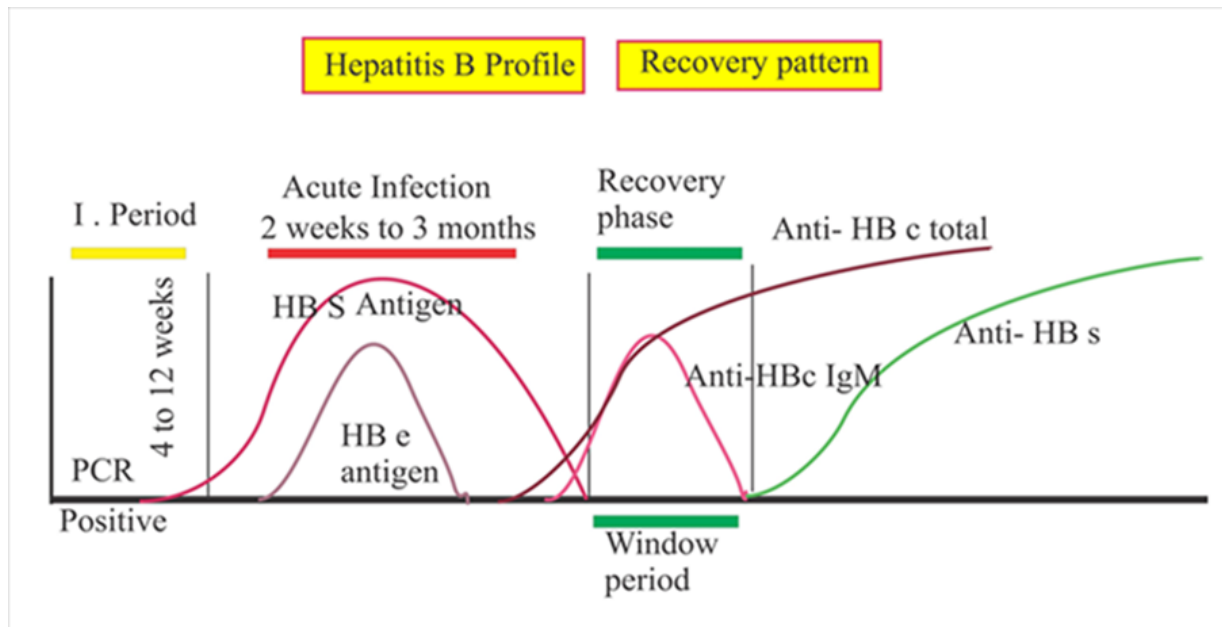
Kratko nakon pojavljivanja HBsAg pojavljuju se i HBV DNK i HBeAg koji su karakteristični za viremičnu fazu hepatitisa B. Za vrijeme inicijalne faze infekcije visoka je koncentracija HBV-a u krvi, a u to vrijeme je i zaraznost najviša. HBsAg se može utvrditi obično 2 - 6 tjedana prije kliničkih i biokemijskih znakova hepatitisa i prisutan je tijekom cijelog trajanja kliničke bolesti. Nestaje uobičajeno 6 mjeseci nakon ekspozicije.

Visoke razine IgM anti-HBc protutijela na HBcAg često se otkrivaju na početku kliničke bolesti. Njihovo pojavljivanje ukazuje na virusnu replikaciju jer su to antitijela na antigen u jezgri. Anti-HBs se pojavljuje nakon što nestane HBsAg. Netom prije nego što nestane HBsAg, nastaje zamjena HBeAg protutijelom anti-HBe.

Dijagnostički prozor, odnosno „**Window period**“, je vrijeme proteklo od infekcije do pozitivnog rezultata testiranja na HBV. Postoji razlika u trajanju „window perioda“ za serološka i za molekularna testiranja. Prosječni „window period“ za hepatitis B virus je 35 - 40 dana (u prosjeku 38 dana) za serološki test, a za molekularni ID-NAAT test iznosi 15 dana. Kronični nositelji su one osobe kod kojih HbsAg perzistira dulje od 6 mjeseci, uz prisutnost HBeAg ili anti-HBe. HBsAg može perzistirati godinama nakon HBeAg. Visoki titrovi IgM



anti-HBc protutijela prisutni su kod akutne infekcije, dok su kod kronične infekcije niski titrovi. Male količine HBV DNK prisutne su u serumu toliko dugo dok je prisutan i HBsAg.



**Slika 8.** Tijek HBV infekcije (wikidoc.org)

## ELISA

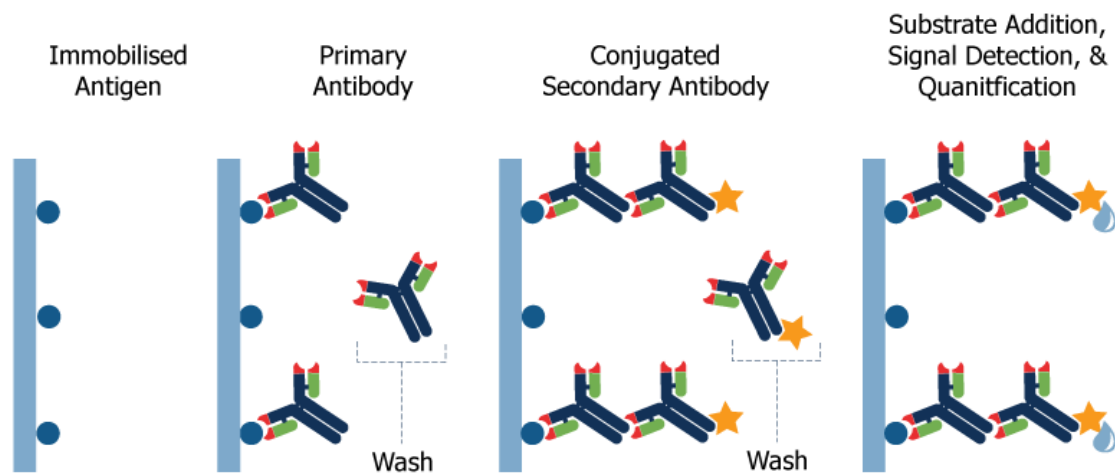
Imunoenzimskim ELISA testom određuje se prisutnost i količina antigena ili protutijela. Reakcija ELISA se temelji na vezanju protutijela i antigena, te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije, do koje dolazi zbog promjene boje. Ovom visoko osjetljivom i selektivnom metodom moguće je odrediti vrlo nisku koncentraciju analita.

Postoji više vrsta tehnika imunološkog određivanja pomoću testa ELISA: indirektna, "sendvič", konkurentna i indirektna ili direktna metoda pomoću mikrotitarskih pločica.

Uvođenju ELISA metode u istraživanja prethodilo je otkriće da se topljivi antigen ili protutijela mogu vezati za čvrstu podlogu tako da se ne isperu pufiranom fiziološkom otopinom. U tu se svrhu rabe polistirenske mikrotitarske pločice četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12 x 8) jažica.

Sama metodologija ELISA tehnika uključuje imobilizaciju jedne ili dvije komponente, tj. antigena ili antitijela na čvrstu podlogu. To uklanja probleme separacije, obzirom da nakon

reakcije između vezane i nevezane komponente jedna komponenta ostaje pričvršćena na čvrstu podlogu, a ostatak se jednostavno uklanja pri čemu ostavlja vezani reaktant u obliku u kojem ga je moguće izmjeriti. Za mjerenje se koristi detektor protutijelo obilježeno enzimom. Ukoliko su se prethodno vezali odgovarajući antigeni i protutijela, na ovaj „sendvič“ se veže detektor protutijelo obilježen enzimom. Nakon dodatka supstrata za enzim, reakcija rezultira mjerljivim promjenama intenziteta obojenja. Izmjerena apsorbancija je direktno proporcionalna koncentraciji analita.



**Slika 9.** ELISA (rockland-inc.com)

Imunoenzimski testovi dolaze u mnogim oblicima i imaju brojne primjene. Analitičarima su dostupni komercijalni testovi ili pak razvijaju specifične testove za svoje vlastite primjene. Konačni odabir ovisi o opremi u laboratoriju.

**Tablica 2.** Interpretacija seroloških biljega virusa hepatitisa B kod bolesnika s hepatitisom

<b>HBs Ag</b>	<b>Anti-HBs</b>	<b>Anti HBc</b>	<b>Anti HBc (IgM)</b>	<b>Vrsta infekcije</b>
+	-	+	+	<b>Akutna infekcija</b>
+	-	+	-	<b>Kronična infekcija</b>
-	+	+	-	<b>Preboljena infekcija/ imunost</b>
-	-	+	-	<b>Davna infekcija / dijagnostički prozor</b>
-	+	-	-	<b>Posljedica cijepljenja</b>
-	-	-	-	<b>Osjetljivost na infekciju</b>

### 8.3. Molekularne metode

Osim serološki, infekcija se može dokazati i molekularnim metodama od kojih je najčešće korištena metoda lančana reakcija polimerazom, PCR (engl. *Polymerase chain reaction*). PCR dokazuje virusnu DNK. Te se metode upotrebljavaju za tipizaciju podtipova sojeva hepatitisa B, u epidemiološkim istraživanjima te u praćenju uspjeha liječenja. U okultnoj vrsti infekcije HBV-DNK nađe se u serumu, a HBsAg je odsutan.

#### PCR

Godine 1983. Kary Mullis je otkrio i opisao metodu kojom se in vitro umnožava DNK bez kloniranja i to iz malih količina DNK. Ova metoda je imala presudni utjecaj na primjenu molekularno bioloških metoda u znanstvenim istraživanjima, a osobito u novom području molekularne dijagnostike, u razvoju dijagnostičkih testova u mikrobiologiji, virusologiji, dijagnostici nasljednih bolesti, dijagnostici malignih bolesti, izboru usmjerenih «pametnih» lijekova, forenzičkim i identifikacijskim testiranjima.

**Lančana reakcija polimerazom** PCR je prepisivanje, umnožavanje DNK molekula. To je metoda kojom se relativno kratki dio DNK umnožava u veliki broj identičnih kopija. Ciljni dio molekule DNK koji želimo umnožiti određuje se kratkim oligonukleotidnim početnicama (primerima). Početnice su komplementarne krajevima dijela DNK koju umnožavamo. Ove početnice su pokretači serijske reakcije pomoću enzima DNK polimeraze. DNK polimeraza na kalupu jednog DNK lanca sintetizira novi komplementarni lanac. Dužina sintetiziranog dijela DNK molekule odgovara dužini koju omeđuju izabrane početnice.

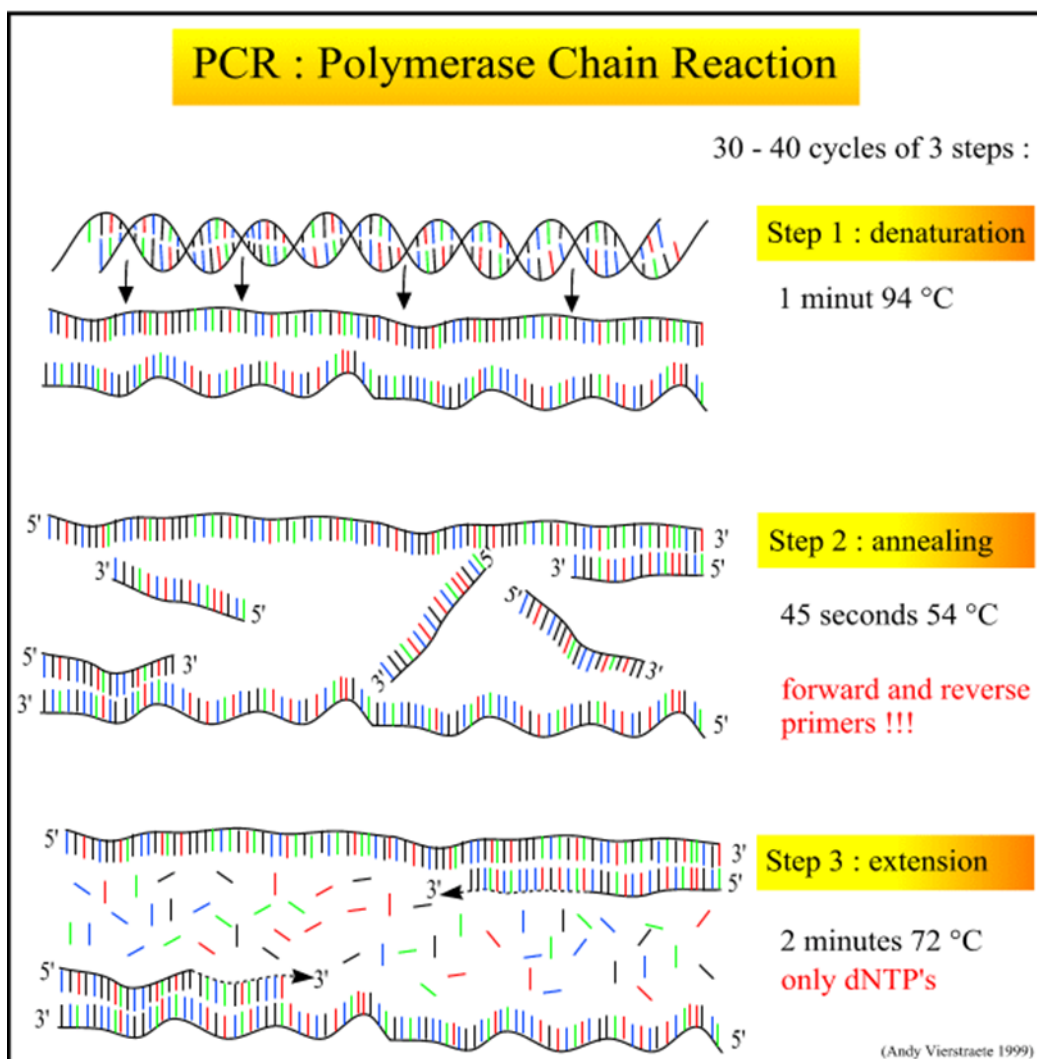
PCR se izvodi ponavljanjem jednakih ciklusa (30 - 40 ciklusa) a svaki ciklus ima iste tri faze:

1. Razdvajanje DNK (engl. *denaturation*): inicijalno denaturiranje DNK u trajanju jedne minute na 94 °C. Pritom se razdvajaju sparni lanci DNK koji zatim služe kao kalupi za amplifikaciju.
2. Sparivanje početnica s komplementarnim dijelovima DNK (engl. *annealing*): hibridizacija početnica na komplementarne dijelove DNK, u tom procesu se temperatura snižava na 55 °C (50 - 60 °C). Faza traje 45 sekundi u zavisnosti o dužini primera. Dužim primerima je potrebno duže vrijeme vezivanja.

3. Produljenje lanca (engl. *extension*): sinteza komplementarnog lanca, produljenje lanca odvija se na temperaturi 72 °C. Na toj temperaturi polimeraza započinje polimerizaciju i doseže maksimum aktivnosti. Ova faza traje 2 minute.

Trajanje pojedinih faza je 1-2 min, ovisno o dužini fragmenta kojeg želimo umnožiti. Budući da se na oba lanca događaju ovi procesi, broj DNK molekula se u svakom ciklusu udvostručuje. Postupak se u cijelosti ponavlja 30 - 40 puta, te se na taj način od jedne DNK dobije milijardu kopija.

Reakcija će konačno biti ohlađena na 4 °C.



**Slika 10.** Ciklus PCR-a (genome.gov)

## 9. LIJEČENJE INFEKCIJE HBV VIRUSOM

Liječenje hepatitisa B je suportivno. Ovisi o stadiju infekcije oboljele osobe. Usmjereno je na omogućavanje samostalnog oporavka i obnavljanja jetre. Za HBV i HCV ovakvo liječenje je samo djelomično učinkovito.

Liječenje je simptomatsko. Nema specifičnog lijeka. Temelji se na mirovanju za vrijeme aktivne faze. Povišene su vrijednosti enzima ALT u serumu. Jetrena dijetalna prehrana temelji se na obilju ugljikohidrata uz redukciju masti. U slučaju fulminantnog hepatitisa moguće je i presađivanje jetre. Apstinencija od spolnog odnosa je bitna za sprječavanje prijenosa infekcije.

Liječenje kroničnog hepatitisa provodi se lijekovima koji zaustavljaju virus ili pojačavaju obrambeni sustav organizma. Razni antivirusni lijekovi dostupni su u liječenju kroničnih oblika. Rekombinantni IFN- $\alpha$  i pegilirani IFN- $\alpha$  trenutno imaju dokazanu korist u liječenju kronične bolesti. Ova terapija povezana je s mnogim nuspojavama. Primjenom analoganukleotida, lamivudina, smanjuju se razine HBV-DNK. Noviji lijekovi su adefovir, tenofovir, kombinacija tenofovira i emtricitabina (truvad).

Često se nakon terapije javlja ponovna virusna replikacija kod većine oboljelih. Stoga ova metoda liječenja nije baš najpouzdanija. Glavni problem je nastanaka virusnih mutanata otpornih na lijekove. Transplantacija jetre je terapija završnog stadija kroničnog oblika.

**Pokazatelji oporavka** od infekcije HBV-om su:

- Gubitak HBeAg i pojava anti-HBe protutijela u serumu
- Smanjenje HBV-DNK
- Fiziološka vrijednost jetrenih enzima
- Smanjenje nekroinflamatornih promjena u bioptičkom uzorku jetrenog tkiva

## 10. PREVENCIJA I KONTROLA HBV INFEKCIJE

Prvi korak u prevenciji i liječenju hepatitisa B su mjere zaštite od infekcije i edukacija. Edukacija o načinima prijenosa zaraze dio je javnozdravstvenih aktivnosti u vezi zaštite od virusa hepatitisa B. Pod standardnim mjerama opreza spadaju jednostavni postupci koji mogu ograničiti opasnost od infekcije kod zdravstvenih djelatnika. Sva krv, tjelesne tekućine i materijali koji su njima onečišćeni smatraju se kao potencijalno infektivni i s njima se i postupa tako. Primjeri zaštite su nošenje rukavica prilikom rukovanja svim zaraznim materijalima, radne plohe trebaju biti dekontaminirane dezinfekcijskom otopinom, osoblje ne smije jesti, piti i pušiti na radnom mjestu. Metalne instrumente treba dezinficirati autoklaviranjem. Kontinuirano se obavlja testiranje svih darivatelja krvi, tkiva i organa.

Aktivna zaštita je cijepljenje. Cjepivo protiv hepatitisa B dostupno je od 1982. godine. Prvobitna cjepiva su bila dobivena iz plazme pomoću HBs antigena. Nova cjepiva sadrže HBsAg dobiven rekombinantnom tehnologijom DNK na kvasnicama. Cijepljenje protiv HBV-a je najučinkovitija mjera prevencije. Imunosuprimirane osobe (na hemodijalizi, ili osobe koje primaju kemoterapiju) lošije podnose cjepivo nego zdrave osobe. Cijepljenje se provodi u tri navrata (0+1+6), 1 i 6 mjeseci nakon prvog cijepljenja. 5 % osoba koje su cijepljene ne može stvoriti zaštitna protutijela.

Privremena zaštita se postiže pasivnom imunizacijom s pomoću hepatitis B imunoglobulina (HBIG). Pokazuje zaštitni učinak ako se primjeni ubrzo nakon ekspozicije. Ne preporučuje se za preekspozicijsku profilaksu jer postoji cjepivo koje je učinkovito.

## 11. CILJ RADA

Rad je izrađen u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije (NZJZ SDŽ) u Laboratoriju za serološku dijagnostiku.

Dijagnostika hepatitisa B je od važnosti jer pomoću nje možemo saznati imunosno stanje zaražene osobe. Određuje stupanj zaraženosti i prognozira tijek bolesti.

Cilj rada bio je:

- objasniti postupak uzorkovanja krvi
- razraditi korištenu metodu dijagnostike HBV-a
- dijagnosticirati virus hepatitisa B (HBV) u uzetom uzorku krvi
- interpretirati dobivene rezultate



## **12. METODE**

U serološkom testiranju hepatitisa B upotrebljava se test za dokazivanje antigena i antitijela hepatitisa B. To su markeri ili biljezi hepatitisa B. Najčešći način serološke detekcije je imunoenzimski test (ELISA).

Metode dijagnostike trebaju biti što osjetljivije i specifičnije.

Izvor podataka su rezultati rutinskog rada Laboratorija za serološku dijagnostiku bolesti u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko- dalmatinske županije.

### **Uzorkovanje**

Serološka testiranja na biljege virusnog hepatitisa B izvode se iz seruma, dakle iz uzorka venske krvi. Uzorak treba uzeti u epruvetu bez antikoagulansa / epruveta s crvenim čepom. Preporučuje se uzorkovanje natašte.

Količinu uzorka potrebnu za testiranje, određuje vrsta primijenjenih testova i potreba ponavljanja testiranja. Za kompletne biljege hepatitisa potrebno je oko 1 - 2 mL seruma. Ovu količinu osigurava epruveta od 5 - 10 mL pune krvi. Epruveta s uzorkom krvi mora biti obilježena naljepnicom na kojoj su ime i prezime pacijenta i datum uzimanja uzorka krvi. Za uspješnu dijagnostiku potrebno se pridržavati uputa za uzorkovanje.

Uzorkovana venska krv se drži na sobnoj temperaturi do formiranja koaguluma (maksimalno do 4 sata na sobnoj temperaturi). Ugrušak se potom odstrani, a preostali dio se centrifugira na 10 minuta i 2000 rpm radi izdvajanja seruma. Nakon što centrifuga završi odpipetira se serum u novu epruvetu, a talog s krvnim stanicama se odlaže u infektivni otpad koji se posebno zbrinjava. Odvojeni serum može se čuvati u hladnjaku na temperaturi od 2 - 8 °C do 7 dana. Za dugotrajnu pohranu serum je potrebno čuvati na -20 °C. Opetovana zamrzavanja i odmrzavanja treba izbjegavati. Redovni uzorci se obično obrade u roku 7 dana, ovisno o broju traženih analiza, pa zamrzavanje nije potrebno.

## **Serološka dijagnostika (metoda ELISA)**

Sustav **GEMINI** služi za kvalitativno i kvantitativno otkrivanje specifičnih protutijela u kliničkim uzorcima na viruse hepatitisa B i C metodom ELISA. To su tzv. markeri ili biljezi hepatitisa. Osim potvrde etiološke dijagnoze ovi testovi daju prosudbu imunosnog stanja zaražene osobe. Također određuju stupanj zaraženosti i prognoziraju tijek bolesti.

### **Pribor i aparati**

Osnovni dijelovi uređaja GEMINI su:

1. Ekran osjetljiv na dodir
2. Sistem nosača
3. Sistem odlaganja nastavaka u otpad
4. Puferi za pranje i boca za otpad
5. Pipetor (Min / max. volumes: 10 µl to 300 µl)
6. Inkubator (Temperature range: Up to 45 °C)
7. Čitač (Photometric range: 0 to 3.0 , Spectral range: 400 nm – 700 nm)
8. Servisni poklopac
9. Prostor za transport mikroploče
10. Pozicije za stalke za nastavke
11. Pozicije za mikroploče koje se koriste za razrjeđivanje
12. Pozicija za ispiranje pipetora
13. Barkod čitač
14. Konektori za tekućine
15. Spremnik sistemske tekućine

### **Postupak provjere uređaja**

Treba provjeriti:

1. Je li uređaj ima dovoljno prazan spremnik za otpad
2. Spremnik sa sistemskom tekućinom
3. Jesu li boce s puferom i deioniziranom vodom napunjene
4. Pipetor zraka na mjehuriće zraka ili propuštanje, jer to može izazvati greške pipetiranja

Za analizator GEMINI potrebno je svakodnevno raditi rekaliibraciju s dva standarda te pozitivnom i negativnom kontrolom. Na taj način se kroz kontinuiranu kontrolu kvalitete dobije krivulja koja nam govori je li aparat funkcionira na besprijekoran način te ima li u njegovom radu kakvih neslaganja ili pogrešaka.



**Slika 11.** Analizator Gemini

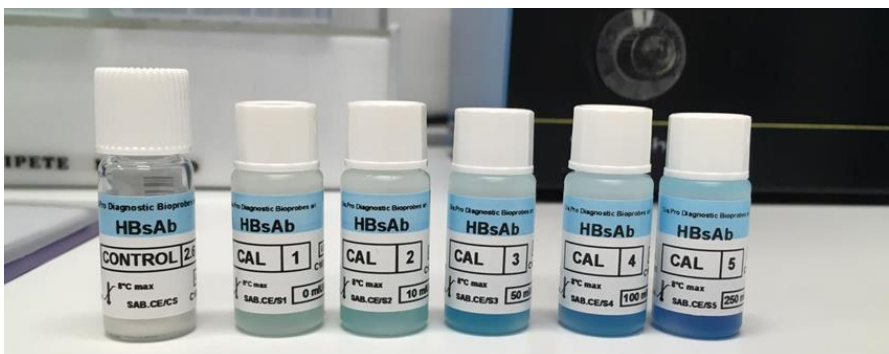
### **Software uređaja**

Za raspored uzoraka koristi se funkcija **Auto Arrange Samples**. Klikom na ekran se provjerava gdje je koji uzorak. Dakle napravi se program prema kojem će analizator uzimati uzorke, pipetirati, ispirati, mijenjati nastavke... Program vodi korisnika kroz cijeli proces. Najvažnije je pripaziti da se raspored uzoraka na nosaču podudara s redoslijedom na ekranu.

## Reagensi potrebni za dokazivanje virusa hepatitisa B u sustavu Gemini:

### Dia. Pro diagnostic Bioprobes: HBsAb kit sastoji se od:

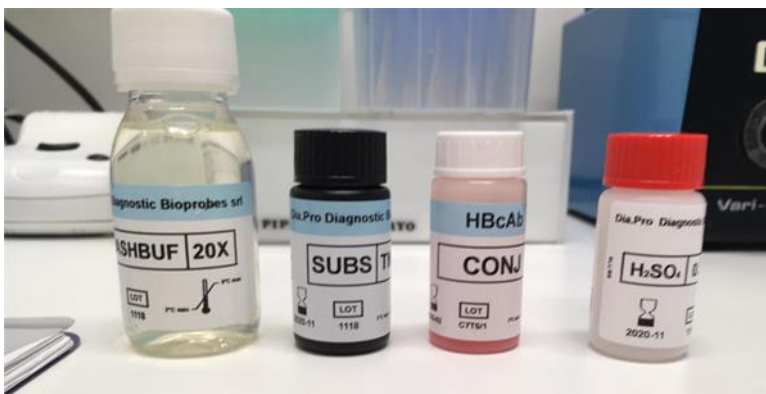
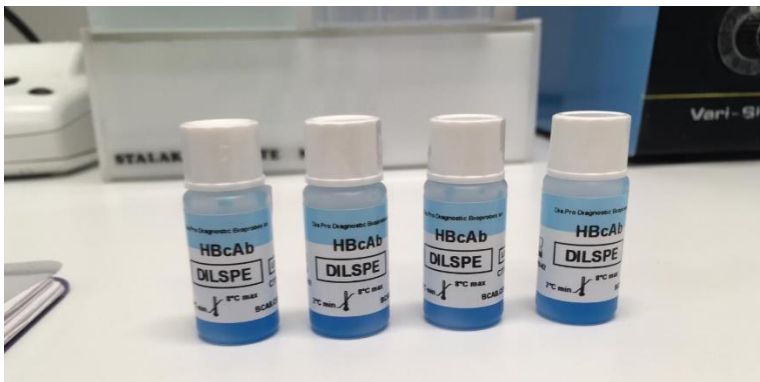
1. Mikrotitarska pločica s jažicama (8x12)
2. Wash buffer concentrate/Pufer za ispiranje WASHBUF 20X (isti za sva tri kita koji se koriste)
3. Enzyme conjugate/Enzimski konjugator CONJ
4. Chromogen/Supstrat SUBS TMB
5. Sumporna kiselina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3M
6. Diluent DILSPE
7. Control serum/kontrolni serum
8. Kalibratori (1-5)



Slike 12. i 13. Reagensi iz kita HBsAb

**Dia. Pro diagnostic Bioprobes: HBcAb kit sastoji se od:**

1. Mikrotitarska pločica s jažicama (8x12)
2. Negativna kontrola- CONTROL –
3. Pozitivna kontrola- CONTROL +
4. Kalibrator CAL
5. Washbuffer /pufer za ispiranje WASHBUF 20X
6. Diluent DILSPE
7. Enzimski konjugat CONJ
8. Kromogeni supstrat SUBSS TM
9. Sumporne kiseline  $H_2SO_4$  0.3M



**Slike 14, 15 i 16.** Reagensi iz kita HbcAb

**Dia. Pro diagnostic Bioprobes: HBsAg one version ultra kit sastoji se od:**

1. Mikrotitarska pločica s jažicama (8x12)
2. Negativna kontrola- CONTROL -
3. Pozitivna kontrola- CONTROL +
4. Kalibrator CAL
5. Washbuffer /pufer za ispiranje WASHBUF 20X
6. Enzimski konjugat CONJ
7. Konjugatnidiluent CONJ DIL
8. Kromogeni supstrat SUBSS TM
9. Sumporne kiseline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3M



**Slike 17. i 18.** Reagensi iz kita HBsAg

## Priprema

Nakon što smo pripremili uzorke seruma pacijenata, analizator pripremamo za rad na način da na nosače stavljamo uzorke, reagensne i kontrole. Aparat ima dva nosača i rade se dva po dva specifična antitijela ili antigena. Količina seruma specifična je za svaki aparat. Kod ovog aparata stavlja se za određivanje HBsAg 150 mikrolitara, a za anti HBc i anti HBs 100 mikrolitara seruma.

Što se tiče nastavaka, oni su od 300 mikrolitara. Aparat ima program prema kojem zna koliko nastavaka mu je potrebno u odnosu na količinu uzoraka, te na kojoj su poziciji i kada će ih promijeniti.

Primjerice, kod antigena HBs stavlja se 150 mikrolitara, zatim se inkubira na 37 stupnjeva i čitač čita uzorak na 450 nm. Takav postupak se ponavlja za svaki uzorak redom dok ne završi sve uzorke, uključujući i kontrole. U toku procesa koristi destiliranu vodu koja je priključena na aparat preko boca. Na kraju se sve ispire destiliranom vodom i puferom. Pufer smo pripremili iz koncentrata koji je došao u kitovima, razrjeđuje se sa 1100 ml vode. Reagensi koje koristimo su iz kompleta kita ili ih sami pripravljamo. Napravljeni konjugati traju do 24 h, pravi ih se onoliko koliko ima uzoraka, za svaki uzorak po jedan konjugat.

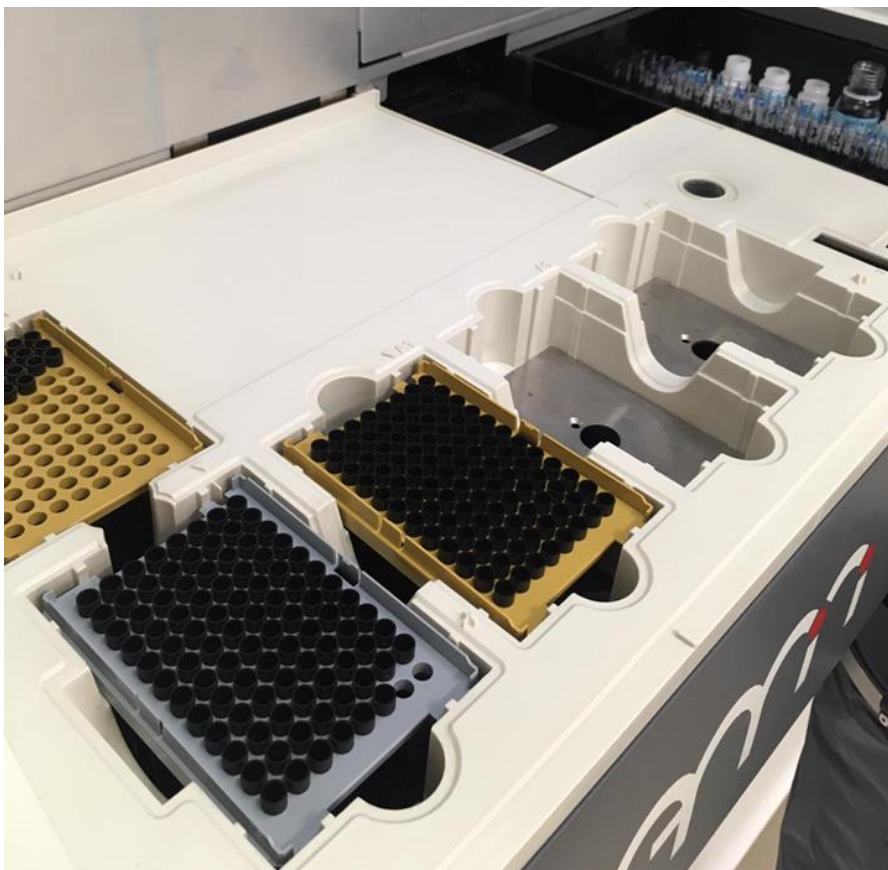
Cjelokupni proces traje oko 3 sata. Zatim se na mikrotitarskim pločicama s jažicama mogu isčitati rezultati kvalitativno, a kvantitativni se ispisuju.



**Slika 19.** Pripremljeni nosači s uzorcima,



**Slika 20.** Stalci s uzorcima, reagensima i kontrolama postavljeni u uređaj

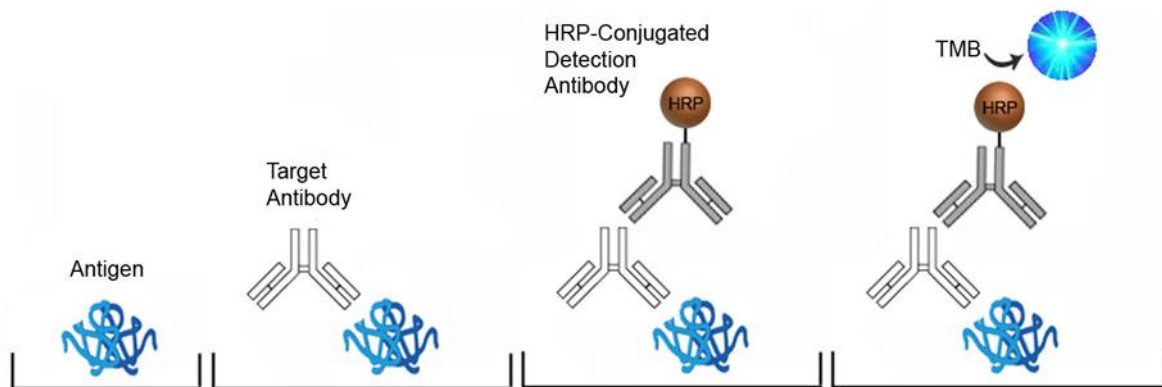


**Slika 21.** Unutrašnji dio uređaja GEMINI



## Princip rada ELISA-e

U našem slučaju, kod određivanja HBV-a, u jažicama su vezani poznati antigeni. Na antigene se vežu protutijela iz seruma pacijenta koja trebamo odrediti. Zatim se dodaje sekundarno protutijelo koje je obilježeno enzimom, te će se vezati za kompleks antigen-protutijelo ukoliko je taj kompleks prethodno i nastao. Slijedi i ispiranje nevezanog dijela. Zatim dodajemo supstrat za enzim. Nakon dodatka supstrata za enzim, reakcija rezultira mjerljivim promjenama intenziteta obojenja. Izmjerena apsorbancija je direktno proporcionalna koncentraciji analita, odnosno protutijela iz pacijentovog seruma iz kalibracijske krivulje



**Slika 22.** Shematski prikaz ELISA-e (isbio.com)

### 13. REZULTATI

Kod uređaja GEMINI, koji koristi metodu ELISA, rezultati se mogu izražavati i kvalitativno i kvantitativno.

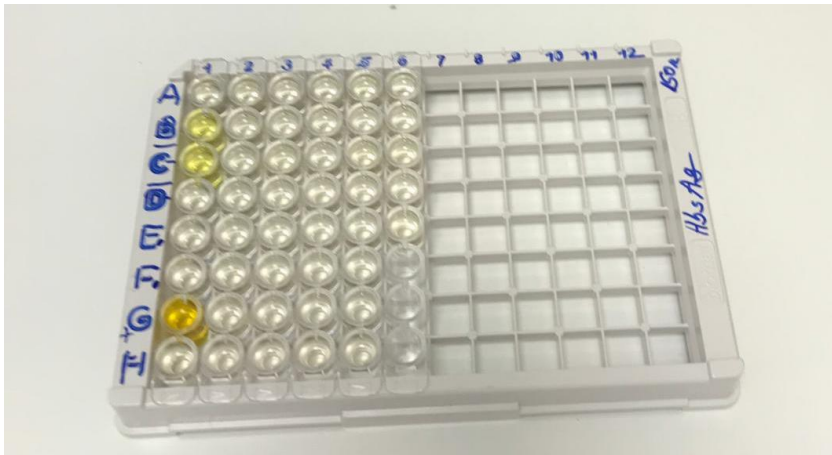
Na mikrotitarskim pločicama s jažicama rezultati se mogu isčitati kvalitativno, a kvantitativni se ispisuju. Kod anti HBc i antigena HBs rezultati su brojčani, a kod anti HBs rezultat je titar protutijela, dobivamo titracijsku krivulju.

Također postoji i kvalitativna razlika, kod anti HBs i antigena HBs žute jažice su pozitivne, a prozirne negativne. Kod anti HBc je obrnuto, žute su negativne a prozirne pozitivne.

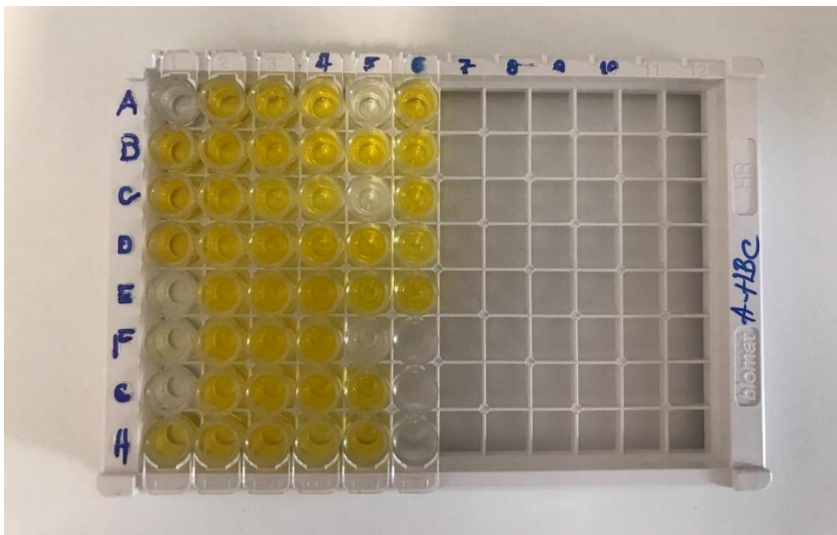
U svakom prethodno spomenutom kitu se nalazi i po jedna pločica s mikrotitarskim jažicama.



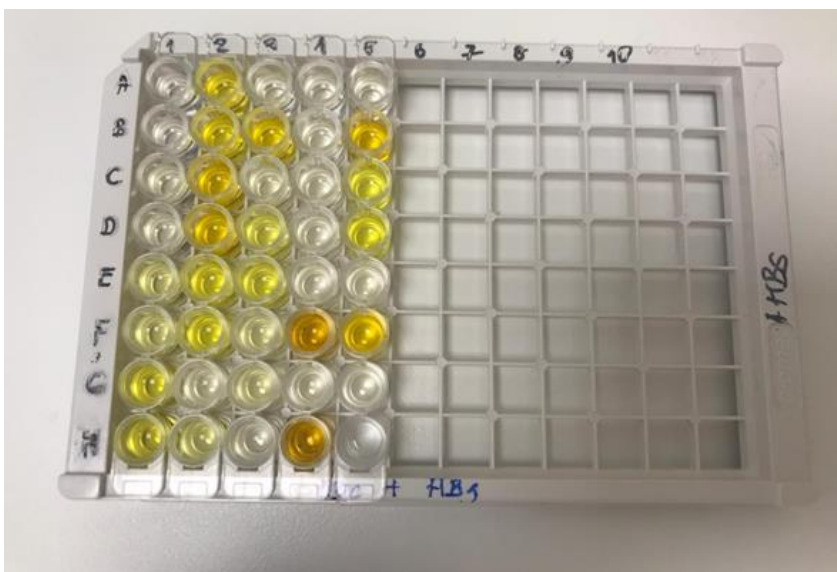
**Slika 23.** Mikrotitarska pločica s jažicama



**Slika 24.** Mikrotitarska pločica s kvalitativnim rezultatima HBsAg



**Slika 25.** Mikrotitarska pločica s kvalitativnim rezultatima anti HBc



**Slika 26.** Mikrotitarska pločica s kvalitativnim rezultatima anti HBs

Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko - dalmatinske županije  
Služba za mikrobiologiju i parazitologiju  
21 000 Split, Vukovarska 46  
Tel: (021) 401 111



T

Zaprimljeno : 08.04.2019  
Završeno : 10.04.2019

Prezime i ime : ██████████  
Uzorak : Serum  
Lab broj : 492

900011777 DZ SPLITSKO DALMATINSKE ŽUPANIJE  
Prijepis nalaza

**Nalaz mikrobiološke pretrage**

Pretraga	Rezultat	Metoda	Jedinice	Referentna vr.
HBs Ag	pozitivan	ELISA		
anti HBs	negativan	ELISA	IU/l	
anti HBc	pozitivan	ELISA		
anti HCV	pozitivan	ELISA		



*Vanja Kaliterna*  
Doc.prim.dr.sc. Vanja Kaliterna, dr.med.  
specijalist  
medicinske mikrobiologije  
Iden. Br. HZZJZ 137087

Doc. prim. dr.sc. Vanja Kaliterna, dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije

Slika 27. Primjer nalaza osobe koja je pozitivna na hepatitis B

## 14. ZAKLJUČAK

Hepatitis B je virusna bolest jetre akutnog ili kroničnog tijeka. Uzročnik, HBV, se nalazi u krvi i tjelesnim tekućinama inficirane osobe. Može se prenijeti od inficirane majke na novorođenče tijekom poroda, spolnim odnosom s inficiranom osobom ako se ne koristi zaštita, nesterilnim iglama i drugim medicinskim instrumentima koji su bili u kontaktu s krvlju i drugim tjelesnim tekućinama inficirane osobe. Najčešći put prijenosa hepatitisa B je nakon uboda ili posjekotine na zaraženu iglu ili drugi oštar predmet te spolni put. Do zaraze najčešće dolazi u doba adolescencije ili u mlađoj odrasloj dobi.

Broj novozaraženih osoba teško je odrediti zbog velikog udjela bolesnika bez simptoma bolesti. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo Hrvatska spada u zemlje s niskom učestalosti hepatitisa B i rizik infekcije tijekom života iznosi 20 – 60 %.

Infekcija se češće javlja kod: bolesnika koji su višekратно primili transfuzije krvi ili krvnih pripravaka prije 1993. godine, ovisnika o opojnim drogama, novorođenčadi majki s hepatitisom B, bolesnika na programu kronične hemodijalize, promiskuitetnih osoba, osoba u bliskom ili profesionalnom kontaktu s oboljelima.

Dijagnostika hepatitisa B infekcije provodi se najčešće serološkim metodama.

Liječenje akutnog hepatitisa je simptomatsko, dok se za liječenje kroničnog hepatitisa primjenjuju antivirusni lijekovi.

Postoji efikasno i sigurno cjepivo protiv hepatitisa B koje sprječava i akutni i kronični oblik bolesti a time i sva oštećenja vezana uz ovu bolest. Nakon cijepljenja više od 95 % djece i adolescenata, kao i više od 90 % odraslih zdravih osoba stvara odgovarajuća antitijela i na taj su način zaštićeni od akutnog hepatitisa B, kroničnog oblika hepatitisa B ali i posljedica ove infekcije kao što su oštećenja jetre, ciroza i karcinom jetre.

## 15. SAŽETAK

Virus hepatitisa B (HBV) je DNK virus iz porodice Hepadnaviridae roda Orthohepadnavirus. Patogen je samo za ljude i neke čovjekolike majmune. Većina akutnih virusnih hepatitisa uzrokovana je virusom hepatitisa A (HAV), virusom hepatitisa B (HBV), virusom hepatitisa C (HCV) i virusom hepatitisa D (HDV). Ukupno je poznato šest virusa hepatitisa označenih slovima od A do G.

Hepatitis je opći pojam i označava upalu jetre. Najčešći uzročnici hepatitisa su virusi, ali određene vrste hepatitisa mogu prouzročiti razne toksične tvari (alkohol) ili autoimune bolesti. Krv zaražene osobe najčešći je izvor zaraze. Također, virus je moguće pronaći u slini, sjemennoj tekućini, sekretu rodnice, majčinom mlijeku. Najveći rizik zaraze je ulazak virusa direktno u krvotok.

Hepatitis B je javnozdravstveni problem diljem svijeta. Procjenjuje se da je u svijetu približno 400 milijuna ljudi koji imaju kroničnu infekciju. Također se procjenjuje da više od 500 000 ljudi godišnje umire od posljedica infekcije hepatitis B virusom. Put prijenosa i odgovor na infekciju razlikuje se ovisno o životnoj dobi u vrijeme zaraze virusom. Poznato je da se u većine osoba zaraženih tijekom dojenačke dobi razvija se kronična infekcija, ostaju kliconoše i u odrasloj dobi su skloni razvoju hepatocelularnog karcinoma. Postoji više od 250 milijuna kliconoša, 25 % kliconoša razvija kronični hepatitis.

Čovjek je jedini rezervoar virusa hepatitisa B. Hepatitis B virusna infekcija spada u 10 vodećih uzroka smrtnosti od zaraznih bolesti u svijetu. Smrt nastupa nakon insuficijencije jetre ili karcinoma jetre. 50% svih karcinoma jetre povezano je s kroničnim hepatitisom.

Od uvođenja obaveznog ispitivanja dobrovoljnih darivatelja na HBsAg, dramatično je smanjen broj hepatitisa povezanog s transfuzijom krvi i krvnih pripravaka. Prijenos feko-oralnim putem nije dokazan. Može se pretpostaviti da su sve tjelesne tekućine osobe inficirane HBV-om potencijalno zarazne.

## 16. ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) is a DNA virus from the Hepadnaviridae family. These are pathogens only for humans and some apes. Most acute viral hepatitis is caused by hepatitis A virus (HAV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) and hepatitis D virus (HDV) virus. Six hepatitis viruses are known as A to G.

Hepatitis represents a common term and indicates liver inflammation. The most common causes of hepatitis are viruses, but certain types of hepatitis can cause various toxic substances (alcohol) or autoimmune diseases. Infected blood is the most common source of infection. Also, the virus can be found in the bile, seed, vaginal secretion, breast milk. The greatest risk of infection is direct virus entry directly into the blood stream.

Hepatitis B is a major public health problem worldwide. It is estimated that approximately 400 million people worldwide have a chronic infection. It is also estimated that more than 500,000 people per year die due to hepatitis B infection. The route of transmission and response to infection varies depending on age at time of virus infection. Therefore, it is well known that most people infected during early childhood develop chronic infections, remain carriers and they are more prone to development of hepatocellular carcinoma in adult age. There are over 250 million carriers, and 25% of them develop chronic hepatitis.

People are the only reservoir of hepatitis B virus. Hepatitis B infection is among the 10 leading causes of mortality from infectious diseases in the world. Death occurs after liver failure or liver cancer. 50% of all liver cancers are associated with chronic hepatitis.

Since mandatory HBsAg testing of volunteer blood donors has been introduced, it has resulted in a dramatic reduction in the number of hepatitis cases associated with blood transfusions and blood products. Oral transmission is not proven. It can be assumed that all body fluids of a person infected with HBV are potentially infectious.

## 17. LITERATURA

1. Brooks G.F, Carroll K. C, Butel J. S, Morse S. A, Mietzner T. A. Medicinska mikrobiologija. Split: Placebo; 2015. Str. 407 – 429, 507 – 526
2. Kalenić S. i sur. Medicinska mikrobiologija. 2. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 517 – 542
3. Labar B. i sur. Hematologija. Zagreb: Školska knjiga; 2017. Str 623 – 633
4. Dodig S. Imunokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2015. Str. 151 – 155
5. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović- Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. Imunologija. 7. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. Str. 144 – 154
6. Sertić J i sur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. 2. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2015. Str. 288 – 294
7. Ropac D, Puntarić D i sur. Epidemiologija zaraznih bolesti. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. Str. 47 – 51
8. Janković S, Eterović D. Fizikalne osnove i klinički aspekti medicinske dijagnostike. Zagreb: Medicinska naklada; 2002. Str. 241 – 245
9. Šercer A, Grmek M, Glesinger L, Vulčer A, Fišter V, Dürrigl T, Mišić B, Sokol B, Dugački V. Medicinska enciklopedija. Zagreb: Jugoslavenski leksikografski zavod; 1968. Str. 135 – 143
10. Desai S. P, Ivančević MD, i sur. Laboratorijske pretrage u kliničkoj medicini – Praktični pristup. Split: Placebo, 2006. Str. 665 – 674
11. Hrvatski zavod za javno zdravstvo [Internet]. Korak ka eliminaciji hepatitisa: prevencija, rano otkrivanje i liječenje; 2018 July 10 [pristupljeno 20.5.2019.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-promicanje-zdravlja/svjetski-dan-hepatitisa-2018-prevencija-rano-otkrivanje-i-lijecenje-korak-ka-eliminaciji/>
12. Vilibić-Čavlek T, Kolarić B, Pavlić J, Kosanović-Ličina ML, Nemeth-Blažić T. Seroprevalence and Risk Factors for HIV, Hepatitis B, and Syphilis in Populations with High-risk Behaviors in Croatia. 2018 Dec;26(4):3147-320.
13. Kljajić Z, Petricević J, Poljak NK, Pranić S, Mulić R. The Epidemiological Characteristics of Hepatitis B in Croatia: The Results of the Prevention. 1.2015 Sep;39(3):809-17.
14. Poljak M, Lepej SZ, Rode OD. [Recent developments in serologic and molecular diagnosis of hepatitis Band C]. 2013 Oct;67(4):281-90.



15. Kaić B, Vilibić-Cavlek T, Filipović SK, Nemeth-Blazić T, Pem-Novosel I, Vucina VV, Simunović A, Zajec M, Radić I, Pavlić J, Glamocanin M, Gjenero-Margan I. Epidemiology of viral hepatitis. 2013 Oct;67(4):273-9.
16. Morović M, Troselj-Vukić B, Klarin I, Hrstić I, Ostojić R. Chronic hepatitis B therapy. 2009 Dec;63(5):391-5.
17. Bradarić N, Pavić I, Kuzmicić N, Bradarić I. Hepatitis B: who should be treated?. 2009 Dec;63(5):385-9.

## 18. ŽIVOTOPIS

### **Opći podatci:**

Ime i prezime: Ana Tičinović

Datum rođenja: 10.12.1997.

Adresa stanovanja: Ulica sestara milosrdnica 27, Livno, Bosna i Hercegovina

e-mail: ana.ticinovic97@gmail.com

### **Obrazovanje:**

2004. – 2012. – Osnovna škola Ivan Goran Kovačić, Livno

2012. – 2016. – Opća Gimnazija Livno, Livno

2016. – 2019. – Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, preddiplomski sveučilišni studij medicinsko - laboratorijske dijagnostike