

Genotipizacija izolata parvovirusa B19 iz epidemije u Hrvatskoj 2023. godine

Peček, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:648131>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Laura Peček

**Genotipizacija izolata parvovirusa B19 iz
epidemije u Hrvatskoj 2023. godine**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Laura Peček

**Molecular typing of parvovirus B19 isolates
from 2023. epidemic in Croatia**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen na Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Ivane Grgić te komentorstvom izv. prof. dr. sc. Silvije Černi. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Ovim se putem želim zahvaliti prvenstveno mentorici dr. sc. Ivani Grgić na stručnom vodstvu, savjetovanju i pomoći tijekom izvedbe, pisanja i finaliziranja ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i komentorici izv. prof. dr. sc. Silviji Černi na susretljivosti, korisnim savjetima te izdvojenom vremenu za ispravljanje rada. Veliko hvala i svim ostalim djelatnicima Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ na pomoći, razumijevanju i vrlo ugodnoj radnoj atmosferi, a posebno voditeljici Odjela, nasl. izv. prof. dr. sc. Snježani Židovec Lepej, koja me svojim savjetima i potporom vodila kroz cijeli diplomski studij. Zahvaljujem se također obitelji i prijateljima na neprekidnoj potpori tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Genotipizacija izolata parvovirusa B19 iz epidemije u Hrvatskoj 2023. godine

Laura Peček

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Parvovirus B19 jednolančani je DNA virus bez ovojnice iz porodice *Parvoviridae*, a jedini mu je domaćin čovjek. Primarno zaražava stanice prekursore eritrocita te se virusna replikacija odvija u jezgri zaražene stanice. Parvovirus B19 prenosi se kapljičnim putem, krvlju i krvnim derivatima te s majke na dijete, a uzrokuje bolest *erythema infectiosum*, koja se naziva još i „peta bolest“. Oboljevaju najčešće osobe pedijatrijske dobi koje razvijaju blage simptome, dok u trudnica, imunokompromitiranih pojedinaca i osoba s hematološkim poremećajima može izazvati težu kliničku sliku. Na temelju filogenetske analize regije NS1 virusnog genoma razlikujemo genotipove 1, 2 i 3. Genotipovi 1 i 3 dodatno su podijeljeni u podtipove A i B. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti raspodjelu genotipova i podtipova parvovirusa B19 u Hrvatskoj. U istraživanje je bilo uključeno 107 ispitanika zaraženih parvovirusom B19 čiji su uzorci krvi u periodu od ožujka do rujna 2023. godine zaprimljeni u Kliniku za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. Sekvencije dobivene Sangerovom metodom sekvenciranja filogenetski su vrlo slične te pripadaju genotipu 1A. Nukleotidne supstitucije detektirane su u šest uzoraka, od čega pet istoznačnih i jedna zamjenska mutacija. Izrazita sličnost dobivenih sekvencija potvrđuje da je riječ o epidemiji, a ne o sporadičnim slučajevima zaraze.

Ključne riječi: zaraza parvovirusom B19, genotip, sekvenciranje, molekularna filogenija (44 stranice, 16 slika, 11 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: dr. sc. Ivana Grgić, viša znanstvena suradnica

Komentor: izv. prof. dr. sc. Silvija Černi

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Silvija Černi

Izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

Prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 5. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Molecular typing of parvovirus B19 isolates from 2023. epidemic in Croatia

Laura Peček

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Parvovirus B19 is an uncoated single-stranded DNA virus from the *Parvoviridae* family. This human pathogen primarily infects erythroid progenitors while viral replication occurs in the nucleus of the infected cell. Parvovirus B19 is transmitted through respiratory secretions, blood and blood products as well as vertically, causing fifth disease or *erythema infectiosum*. Pediatric patients most commonly develop mild symptoms, while pregnant women, immunocompromised individuals and those with hematological disorders may experience more severe clinical manifestations. Based on phylogenetic analysis of the NS1 region of the viral genome, genotypes 1, 2, and 3 are distinguished. Genotypes 1 and 3 are further divided into subtypes A and B. The aim of this study was to determine the distribution of parvovirus B19 genotypes and subtypes in Croatia. The study included 107 participants infected with parvovirus B19, whose blood samples were analyzed at the University Hospital for Infectious Diseases "Dr. Fran Mihaljević" between March and September 2023. The sequences obtained by the Sanger sequencing method showed high phylogenetic similarity and all clustered to genotype 1A. Nucleotide substitutions were detected in six samples, five of which were samesense and one was a missense mutation. The results suggest a common source of infection during the epidemic.

Keywords: parvovirus B19 infection, genotype, sequencing, molecular phylogeny
(44 pages, 16 figures, 11 tables, 46 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Ivana Grgić, PhD

Co-mentor: Assoc. prof. Silvija Černi, PhD

Reviewers:

Assoc. prof. Silvija Černi, PhD

Assoc. prof. Tomislav Ivanković, PhD

Prof. Martina Šeruga Musić, PhD

Thesis accepted: September 5th, 2024

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Parvovirus B19	1
1.1.1. Struktura viriona	2
1.1.2. Organizacija genoma	3
1.1.3. Replikacijski ciklus.....	4
1.2. Patogeneza parvovirusa B19.....	9
1.3. Epidemiologija parvovirusa B19.....	11
1.4. Dijagnostika i karakterizacija parvovirusa B19	12
2. Cilj istraživanja	14
3. Materijali i metode	15
3.1. Ispitanici i biološki uzorci	15
3.2. Materijali	16
3.2.1. Reagensi i otopine.....	16
3.2.2. Kompleti reagensa	17
3.2.3. Oligonukleotidne početnice	17
3.2.4. Laboratorijski uređaji i pribor.....	18
3.2.5. Računalni programi.....	19
3.3. Metode	19
3.3.1. Lančana reakcija polimerazom	19
3.3.2. Ugniježđena lančana reakcija polimerazom	21
3.3.3. Reakcija sekvenciranja.....	22
3.3.4. Analiza rezultata	25
4. Rezultati	26
4.1. Analiza sekvencija	26
4.2. Filogenetska analiza.....	27

5. Rasprava	33
6. Zaključak	39
7. Literatura	40
8. Životopis	

Popis kratica

CDC – Centar za kontrolu i prevenciju bolesti, engl. *Centers for Disease Control and Prevention*

cRF DNA – zatvoreni replikativni oblik DNA, engl. *closed replicative form of DNA*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*

dNTP – deoksinukleotid trifosfat, engl. *deoxyribonucleotide triphosphate*

ddNTP – dideoksinukleotid trifosfat, engl. *dideoxyribonucleotide triphosphate*

ITR – obrnuti terminalni ponavljajući slijed, engl. *inverted terminal repeat*

MEGA X – Analiza molekularne evolucijske genetike X, engl. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis X*

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina, engl. *messenger ribonucleic acid*

NCBI – Nacionalni centar za biotehnoške informacije, engl. *National Centre for Biotechnology Information*

NS1 – nestrukturani protein 1, engl. *nonstructural protein 1*

NZJZ – Nastavni zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“

ORF – otvoreni okvir čitanja, engl. *open reading frame*

PCR – lančana reakcija polimerazom, engl. *polymerase chain reaction*

PLA2 – fosfolipaza A2, engl. *phospholipase A2*

RF DNA – replikativni oblik DNA, engl. *replicative form of DNA*

RNA – ribonukleinska kiselina, engl. *ribonucleic acid*

trs – mjesto krajnje razlučivosti, engl. *terminal resolution site*

VP1 – strukturalni protein VP1, engl. *viral protein 1*

VP1u – VP1-jedinstvena regija, engl. *VP1-unique region*

VP2 – strukturalni protein VP2, engl. *viral protein 2*

1. Uvod

1.1 Parvovirus B19

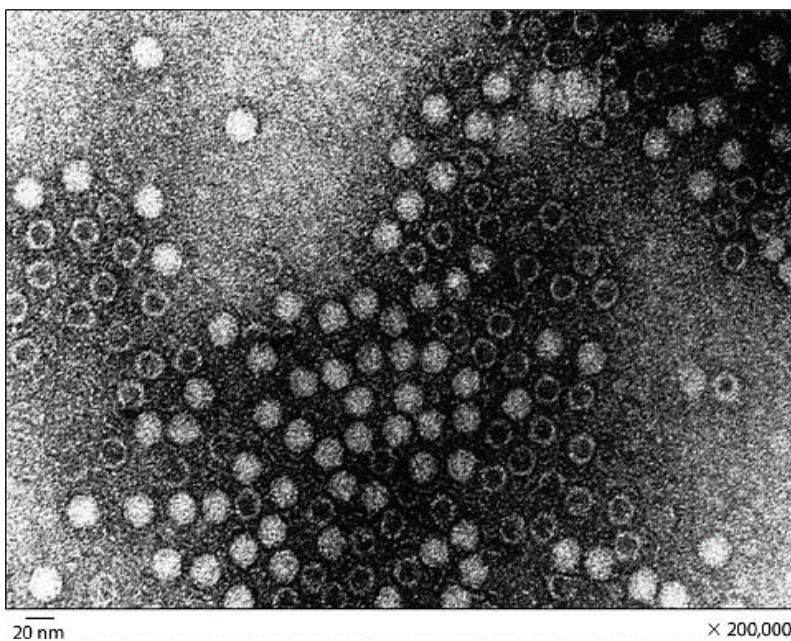
Ljudski parvovirus B19 pripada rodu *Erythroparvovirus* unutar porodice *Parvoviridae* (Cotmore i sur., 2019). Ime porodice dolazi od latinske riječi *parvus*, što znači malen, a sukladno tome parvovirus B19 smatra se jednim od najmanjih virusa patogenih za čovjeka (Jain i Kant, 2018). Izometrična virusna čestica promjera nešto većeg od 20 nm sadrži linearnu jednolančanu molekulu DNA (engl. *single-stranded DNA*, ssDNA) genoma od oko 5,6 kb (Ganaie i Qiu, 2018).

Jedini domaćin parvovirusa B19 je čovjek, a primarno zaražava stanice prekursora eritrocita u koštanoj srži u čijoj se jezgri replicira (Carter i Saunders, 2007). Virus koristi stanične enzime poput DNA-polimeraze, RNA-polimeraze II i DNA-ligaze, prisutne u jezgri diobeno aktivnih stanica (Carter i Saunders, 2007; Luo i Qiu, 2015). Prisutnost receptora, krvnog antigena P, na površini prekursora eritrocita uzrok je virusnog tropizma prema toj vrsti stanica (Zakrzewska i sur., 2023). Leisi i sur. (2013) iznose mogućnost postojanja i sekundarnog receptora (koreceptora) nužnog za ulazak virusa u stanicu koji i dalje nije definiran. Parvovirus B19 može zaražavati i druge vrste stanica, poput stanica endotela ili vezivnog tkiva, no one nisu permisivne. Prilikom infekcije takvih stanica virus potencijalno koristi neki drugi još neotkriveni receptor ili ulazi stanicu drugim mehanizmima (Pyöriä i sur., 2017; Zakrzewska i sur., 2023).

Zaraza ovim virusom najčešće dovodi do razvoja „pete bolesti“, koja se još naziva *erythema infectiosum* ili bolest ispljuskanih obraza (engl. *slapped cheek disease*) (Carter i Saunders, 2007). Ovaj je naziv dobila zbog svog glavnog obilježja, pojave crvenila na obrazima karakterističnog mrežastog izgleda. Naziv „peta bolest“ (engl. *fifth disease*) odnosi se na poredak u nizu zaraznih bolesti koje izazivaju osip, poput ospica i rubeole (CDC, 2024). Obolijevaju najčešće osobe pedijatrijske dobi koje razvijaju blage simptome, dok u trudnica, imunokompromitiranih pojedinaca i osoba s hematološkim poremećajima klinička slika može biti teža (Qiu i sur., 2016).

Parvovirus B19 otkriven je igrom slučaja 1974. godine, kada su australska virologinja Yvonne Cossart i suradnici analizirali uzorke pacijenata u kojih se sumnjalo na zarazu virusom hepatitisa B (HBV). Tijekom testiranja uzoraka seruma na površinski antigen HBV-a (engl.

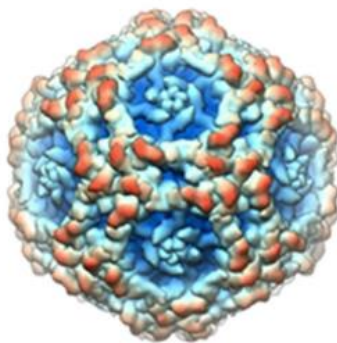
hepatitis B virus surface antigen, HBVsAg) detektirane su anomalije u uzorku broj 19 na panelu B. Kasnije su u navedenom uzorku elektronskom mikroskopijom otkrivene čestice promjera 23 nm slične animalnim parvovirusima (Cossart i sur., 1975; Jain i Kant, 2018). Čestice parvovirusa B19 vizualizirane elektronskom mikroskopijom prikazane su na **Slici 1**.



Slika 1. Prikaz virusnih čestica parvovirusa B19 izoliranih iz seruma dobiven transmisijom elektronskom mikroskopijom pod povećanjem od 200 000 ×. Preuzeto iz Servant-Delmas i sur. (2010).

1.1.1 Struktura viriona

Čestica parvovirusa B19 izometričnog je oblika, promjera 23 – 26 nm i ne sadrži ovojnica. Virion se sastoji od kapside unutar koje se nalazi virusni genom. Kapsida sadrži 5% manjeg strukturnog proteina VP1 (engl. *viral protein 1*) i 95% većeg strukturnog proteina VP2 (engl. *viral protein 2*) (Zakrzewska i sur., 2023). Izometrična kapsida triangulacijskog broja $T = 1$ sastavljena je od 60 proteinskih podjedinica organiziranih u 12 peterokutnih struktura (engl. *penton*) (**Slika 2.**). Triangulacijski broj u virologiji označava broj različitih strukturnih jedinica koje tvore svaku stranicu ikozaedra (Manaresi i Gallinella, 2019; Zakrzewska i sur., 2023). Primarna je uloga kapside zaštita genoma i izbjegavanje imunskog odgovora organizma da bi se omogućio prijenos viriona do jezgre, gdje se odvija replikacija (Carter i Saunders 2007; Zakrzewska i sur., 2023).



Slika 2. Strukturni model kapside parvovirusa B19. Kapsida je izometrična i sastavljena u konformaciji s triangulacijskim brojem 1. Preuzeto iz Zakrzewska i sur. (2023).

1.1.2 Organizacija genoma

Linearna ssDNA od 5596 nukleotida pakira se u izometrične kapside (Zakrzewska i sur., 2023), a virioni jednako učestalo sadrže genome pozitivnog i negativnog smisla (Qiu i sur., 2016). Genom je organiziran u tri otvorena okvira čitanja (engl. *open reading frame*, ORF). Prvi kodira za dva strukturna proteina VP1 i VP2 koji formiraju kapsidu i nestrukturni protein mase 7,5 kDa. Drugi kodira za nestrukturni protein mase 11 kDa, a treći za nestrukturni protein NS1 (Luo i Qiu, 2015). Sva tri okvira čitanja pod regulacijom su promotora P6, a na krajevima genoma nalaze se identične regije obrnutih terminalnih ponavljajućih sljedova (engl. *inverted terminal repeats*, ITR) od 401 nukleotida koje tvore nepotpune palindrome u obliku omča (**Slika 3.**). Omče se uvijaju na nukleotidnim položajima 199 i 5410 (Luo i Qiu, 2015; Qiu i sur., 2016).



Slika 3. Prikaz strukture genoma parvovirusa B19. Na krajevima genoma regije obrnutih ponavljajućih sljedova (ITR) tvore nepotpune palindrome u obliku omča. Na 3' kraju genoma nalazi se slobodna skupina OH. Preuzeto iz Qiu i sur. (2016).

Strukturni proteini VP1 i VP2 imaju jednak C-terminalni kraj koji sadrži jezgrin lokalizacijski signal (engl. *nuclear localization signals*, NLS). Protein VP1 sadrži 273 dodatne

aminokiseline na N-terminalnom kraju (Zakrzewska i sur., 2023). Taj dodatni dio naziva se VP1-jedinstvena regija (engl. *VP1-unique region*, VP1u), a specifičan je jer posjeduje aktivnost fosfolipaze A2 (engl. *phospholipase A2*, PLA2) uz pomoć koje se virion oslobađa iz lizosoma, što olakšava njegov ulazak u jezgru (Carter i Saunders 2007; Zakrzewska i sur., 2023). Usljed prve interakcije viriona s antigenom P dolazi do ispoljavanja VP1u fragmenata koji se nalaze u središtu svake peterokutne strukture kapside. Njihovo im otkrivanje omogućava interakciju s nedefiniranim koreceptorom koji se također nalazi na membrani prekursora eritrocita (Manaresi i Gallinella, 2019). Posljedica interakcije VP1u fragmenta s koreceptorom je ulazak viriona u ciljanu stanicu procesom endocitoze (Ganaie i Qiu, 2018).

Nestrukturani protein mase 11 kDa više je lokaliziran u citoplazmi nego u jezgri zaražene stanice. Prisutan je u otprilike 100 puta više kopija od proteina NS1 (Ganaie i Qiu, 2018). Sudjeluje u procesu poticanja apoptoze zaražene stanice jer stupa u interakciju s kaspazom 10, čime se pokreće kaskada signala u vanjskom putu apoptoze (Chen i sur., 2010). Funkcija nestrukturnog proteina mase 7,5 kDa do sada nije istražena (Ganaie i Qiu, 2018).

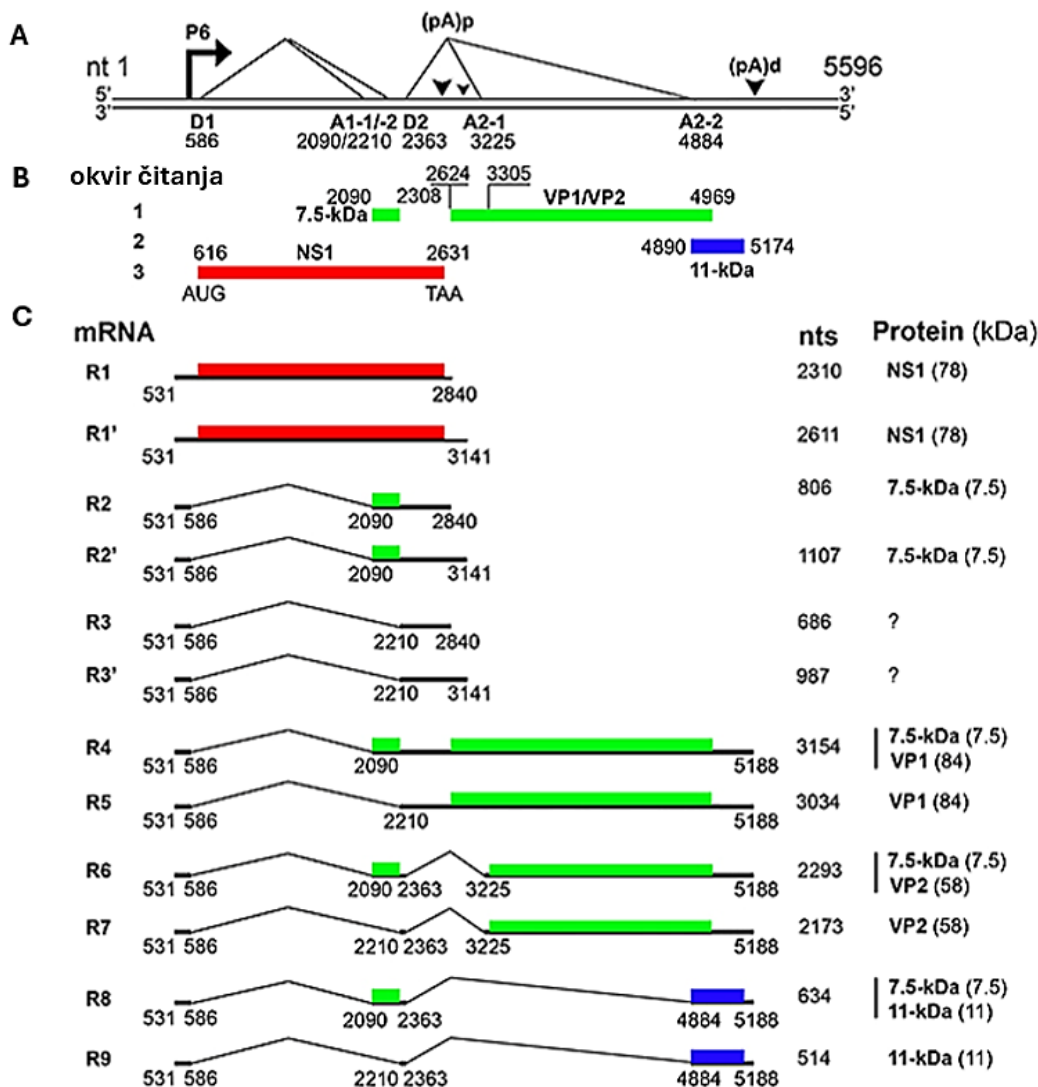
Istraživanjima na mutiranim klonovima parvovirusa B19 potvrđeno je da je jedino protein NS1 nužan za replikaciju virusnog genoma, dok su strukturni proteini i nestrukturani protein mase 11 kDa neophodni za formiranje viriona nove generacije (Zhi i sur., 2006).

1.1.3 Replikacijski ciklus

Nakon ulaska viriona u jezgru, jednolančani se genom parvovirusa B19 formira u dvolančani replikativni oblik DNA (engl. *replicative form*, RF DNA) koji predstavlja ishodišni intermedijer za replikaciju i za transkripciju. Transkripcijska karta ovog virusa prikazana je na **Slici 4**. S jedinog se virusnog promotora P6 uz pomoć stanične RNA-polimeraze II prepisuje zajednička prekursorska mRNA (pre-mRNA). Uzvodno od promotora P6 nalazi se pojačivačka regija (engl. *enhancer region*) koja veže transkripcijske faktore, kao i NS1-vezujući elementi (Qiu i sur., 2016).

Alternativno prekrajanje (engl. *alternative splicing*) vrlo je važna evolucijska prilagodba organizama s malim i vrlo kondenziranim genomima poput parvovirusa B19. Iz pre-mRNA alternativnim prekrajanjem i poliadenilacijom nastaje 12 zrelih mRNA transkripata u tri ORF-a.

Devet glavnih i tri sporedne virusne mRNA kodiraju za strukturne proteine VP1 (84 kDa) i VP2 (58 kDa) te za tri nestrukturna proteina: najveći NS1 (78 kDa) i dva manja, od 11 kDa i 7 kDa. Pre-mRNA sadrži dva donorska mjesta prekrajanja (engl. *splice donor sites*), D1 i D2 te četiri mjesta prihvaćanja (engl. *splice acceptor sites*), A1-1, A1-2, A2-1 i A2-2. Također sadrži dva proksimalna, (pA)p1 i (pA)p2 te jedno distalno poliadenilacijsko mjesto, (pA)d (Ganaie i Qiu, 2018; Luo i Qiu, 2015).



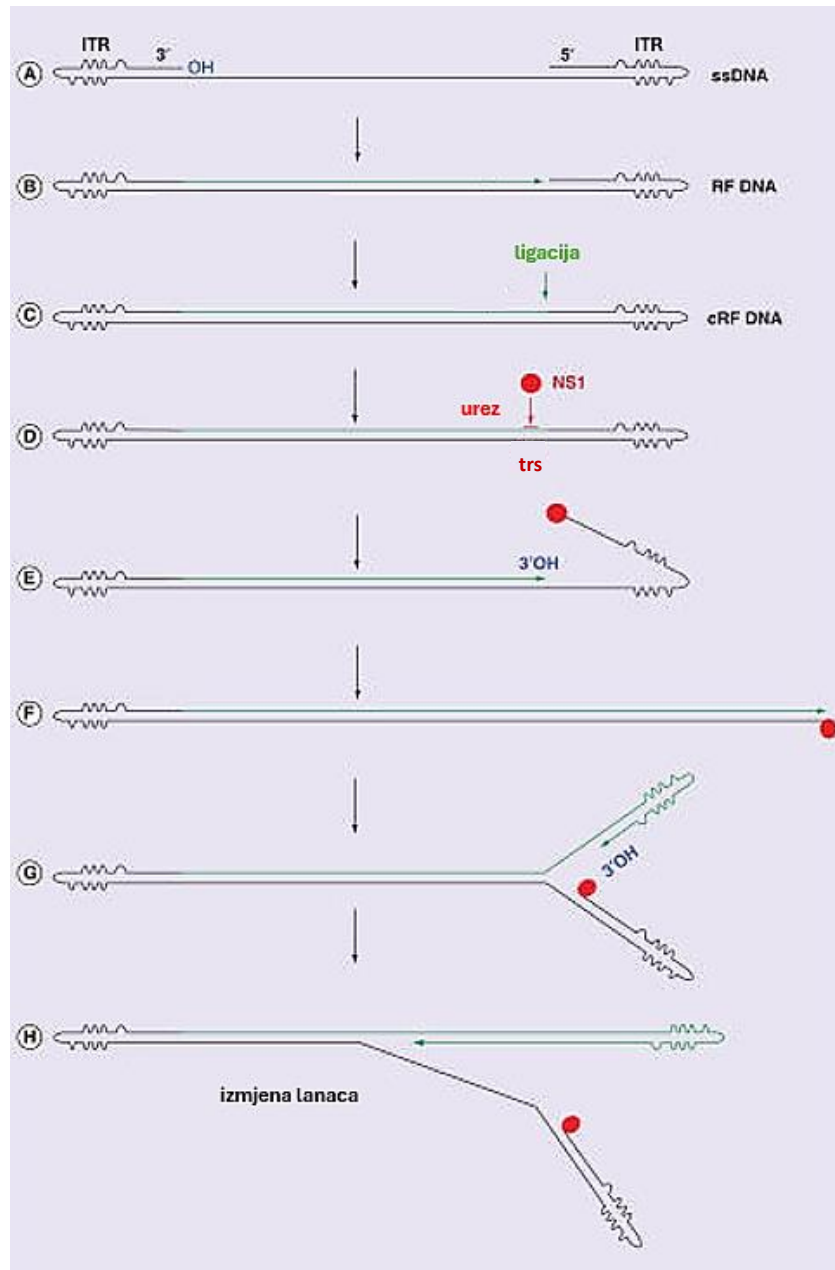
Slika 4. Transkripcijska karta parvovirusa B19. Tijekom transkripcije virus koristi staničnu RNA-polimerazu II. A) struktura dvolančanog genoma s otvorenim krajevima, B) prikaz triju otvorenih okvira čitanja i njihovih proteinskih produkata, C) 12 mRNA transkripata nastalih alternativnim prekrajanjem i njihove molekulske mase; devet glavnih (R1 – R9) i tri sporedne virusne mRNA (R1', R2' i R3'). Preuzeto i prilagođeno prema Ganaie i Qiu (2018).

Replikacija parvovirusa B19 odvija se u jezgri stanice prekursora eritrocita prema modelu kotrljajuće ukosnice (**Slika 5.**). Protein NS1 ključan je za njegovu replikaciju zbog replikazne, helikazne i mjesno-specifične endonukleazne aktivnosti. (Zakrzewska i sur., 2023). Sadrži dva NLS-a i DNA-vezujuću domenu (engl. *DNA binding domain*) (Ganaie i Qiu, 2018).

Replikacija se zbiva tijekom faze S replikacijskog ciklusa ciljane stanice uz pomoć stanične DNA-polimeraze. Polimeraza kao početnicu koristi palindromski slijed na 3' kraju lijeve regije ITR sa slobodnom skupinom OH (engl. *self-priming*) u obliku omče i sintetizira komplementaran lanac DNA do stvaranja dvolančane strukture, odnosno RF DNA. Pretpostavlja se da se zatim 3' kraj novosintetiziranog lanca uz pomoć stanične DNA-ligaze spaja s 5' krajem desne regije ITR, čime nastaje zatvoreni replikativni oblik genoma (engl. *closed replicative form*, cRF DNA) (Luo i Qiu, 2015).

Virusni protein NS1 specifično se veže na mjesto ishodišta replikacije (engl. *replication origin site*, Ori) pomoću svoje DNA-vezujuće domene i stvara jednolančani urez (engl. *nick*) na mjestu krajnje razlučivosti (engl. *terminal resolution site*, trs) koje se nalazi u blizini mjesta ligacije originalne 5' omče i novosintetiziranog lanca DNA. Urezivanjem se potiče odmatanje omče, a na drugom se kraju oslobađa nova 3' skupina OH koja će poslužiti kao početnica za daljnju sintezu novosintetiziranog lanca. Time će se formirati dvolančana DNA struktura otvorenog kraja (engl. *open-ended duplex*) (Luo i Qiu, 2015).

Helikaznom aktivnošću proteina NS1 razdvaja se formirana dvolančana struktura na tome kraju i ponovno dolazi do stvaranja palindroma u obliku omče, ovog puta na oba kraja razdvojene DNA. Ovaj se korak naziva ponovnim uspostavljanjem omča (engl. *reinitiation*). Jedan od novih takvih palindroma ponovno sadrži slobodnu 3' skupinu OH koja će poslužiti kao početnica za produljenje tog lanca uz istovremeno istiskivanje drugog lanca u procesu umnažanja izmjenom lanaca (engl. *strand-displacement amplification*) (Luo i Qiu, 2015; Qiu i sur., 2016).

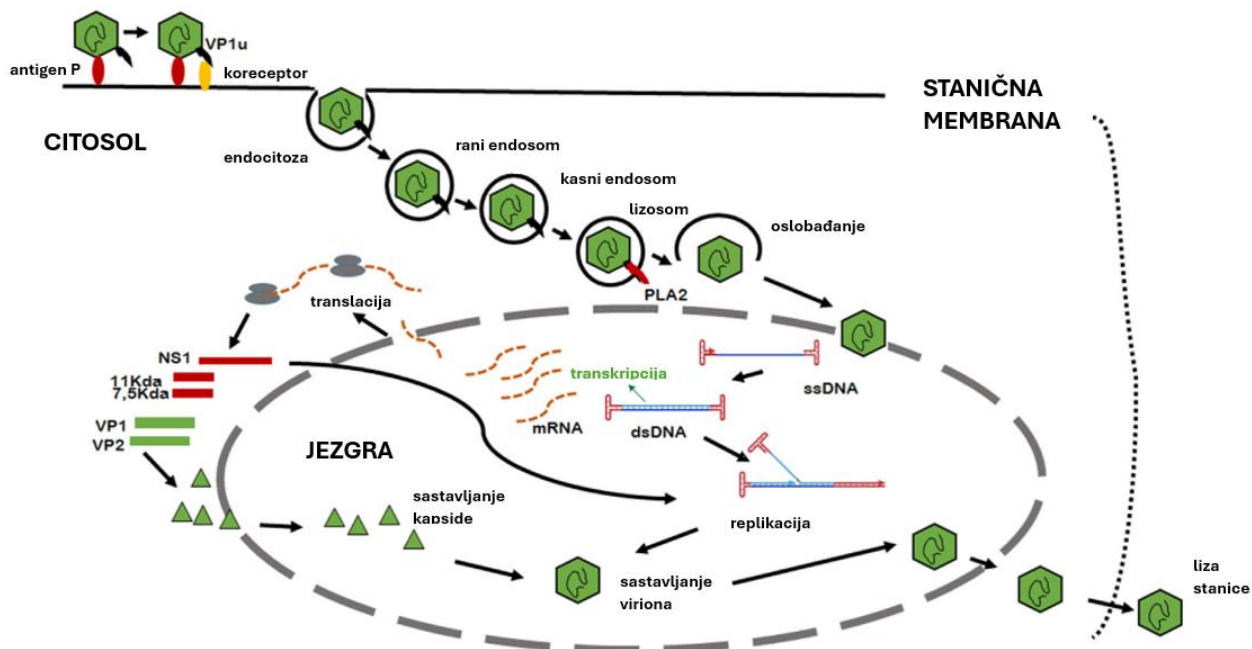


Slika 5. Replikacija genoma parvovirusa B19 mehanizmom kotrljajuće ukosnice. Tijekom replikacije virus koristi staničnu DNA-polimerazu. **A)** jednolančani DNA genom parvovirusa B19 (ssDNA) gdje palindromski slijed sa slobodnom 3' skupinom OH u obliku omče u lijevoj regiji ITR polimerazi služi kao početnica, **B)** sintezom gornjeg lanca formira se replikativni oblik genoma (RF DNA), **C)** spajanje novosintetiziranog lanca s desnom regijom ITR rezultira stvaranjem zatvorenog replikativnog oblika genoma (cRF DNA), **D)** protein NS1 specifično se veže na mjesto ishodišta replikacije i radi urez gornjeg lanca na mjestu *trs*, **E)** urezivanjem lanca oslobađa se nova 3' skupina OH koja će poslužiti kao početnica, a struktura ukosnice na toj strani se odmata, **F)** sintezom gornjeg lanca formira se dvolančana struktura otvorenog kraja, **G)** reinicijacija: protein NS1 helikaznom aktivnošću razdvaja dvolančanu strukturu, što rezultira stvaranjem dvaju palindromskih struktura omča, od kojih jedna ponovno sadrži 3' skupinu OH koja će poslužiti kao početnica za produljenje tog lanca, **H)** umnažanje izmjenom lanaca: produljenje jednog lanca uz odmicanje drugog. Preuzeto i prilagođeno prema Luo i Qiu (2015).

Virion prvi kontakt s permisivnom stanicom ostvaruje prilikom interakcije s receptorom antigenom P na njenoj površini (**Slika 6.**). Ova interakcija uzrokuje konformacijsku promjenu kapside i ispoljavanje domene VP1u proteina VP1, koja veže nepoznati sekundarni receptor. Interakcija sa sekundarnim receptorom potiče ulazak viriona u stanicu procesom endocitoze. Oko virusne čestice formira se rani endosom, koji dozrijeva u kasni endosom. Kasnije, unutar lizosoma (pH = 4) dolazi do aktivacije PLA2, koja narušava lizosomalnu membranu (Zakrzewska i sur., 2023). Oslobođeni virioni u citosolu do jezgre putuju aktivno mikrotubulima (Carter i Saunders, 2007), a u nju ulaze kroz jezgrine pore (Qiu i sur., 2016).

Unutar jezgre dolazi do ispuštanja virusnog ssDNA genoma pozitivnog ili negativnog smisla iz kojeg nastaje dvolančana RF DNA i pokreću se procesi transkripcije i replikacije genoma. Zreli transkripti izlaze iz jezgre te se translacija odvija u citosolu. Svi proteinski produkti prolaze posttranslacijske modifikacije i pravilno smatanje, a proteini VP1 i VP2 se dodatno grupiraju u trimere i čine kapsidne prekursore (Ganaie i Qiu, 2018; Qiu i sur., 2016).

Formirani virusni proteini zatim ponovno prolaze kroz jezgrine pore i ulaze u jezgru, gdje kopije proteina NS1 sudjeluju u procesu replikacije (**Slika 5.**), a strukturni proteini VP1 i VP2 te nestrukturni protein mase 11 kDa u pakiranju novih virusnih čestica. Nakon sastavljanja viriona, protein NS1 inducira zaustavljanje replikacijskog ciklusa stanice prekursora eritrocita u fazi G2 te uz nestrukturni protein mase 11 kDa sudjeluje u pokretanju procesa apoptoze. Dolazi do lize jezgrine i stanične membrane i novoformirani se virioni ispuštaju iz stanice (Qiu i sur., 2016; Zakrzewska i sur., 2023).



Slika 6. Prikaz replikacijskog ciklusa parvovirusa B19. Virion se prvo prihvaća na receptor antigen P, uslijed čega dolazi do konformacijske promjene kapside i ispoljavaju se fragmenti VP1u koji stupaju u interakciju s nedefiniranim koreceptorom. Slijedi ulazak viriona u stanicu procesom endocitoze i oslobađanje iz lizosoma u citosol uz pomoć fosfolipaze A2 (PLA2). Slobodni virioni kroz jezgrine pore ulaze u jezgru gdje se virusni genom oslobađa i započinju procesi transkripcije i replikacije. Zrele mRNA izlaze iz jezgre u citosol i transliraju se. Sintetizirani strukturni i nestrukturni virusni proteini ulaze nazad u jezgru i sudjeluju u replikaciji genoma (NS1) i sastavljanja novih virusnih čestica. Sastavljeni virioni otpuštaju se iz stanice koja potom odlazi u apoptozu. Preuzeto i prilagođeno prema Zakrzewska i sur. (2023).

1.2 Patogeneza parvovirusa B19

„Peta bolest“, koju uzrokuje zaraza parvovirusom B19, češća je u osoba pedijatrijske dobi, no mogu se zaraziti i odrasli. Prenosi se kapljičnim putem, krvlju i krvnim derivatima te s majke na dijete (Zakrzewska i sur., 2023). Zaraza je moguća i prilikom transplantacije koštane srži i solidnih organa (Qiu i sur., 2016). Prema informacijama Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention, CDC*), osim na obrazima, osip se nakon nekoliko dana može pojaviti i na prsima, udovima, leđima i stražnjici. Nekoliko dana prije pojave osipa javljaju se simptomi koji nalikuju na prehladu: povišena tjelesna temperatura, opća slabost, curenje iz nosa, bol u grlu i glavobolja, a često je i bolno oticanje zglobova, odnosno artropatija. Tijekom njihove manifestacije osoba je zarazna i mogućnost prijenosa patogena je najviša. U nekih

pojedinačnu bolest može proći i asimptomatski. Nakon pojave osipa zaražena osoba prestaje biti zarazna. Period inkubacije bolesti traje od pet do sedam dana, dok sama bolest traje od jednog do nekoliko tjedna. Iznimka je bol u zglobovima, koja se češće javlja u odraslih, a može potrajati i nekoliko mjeseci nakon oboljenja (CDC, 2024). Bolest se najčešće pojavljuje zimi i u rano proljeće, što ponekad dovodi do epidemija, no u pravilu je obolijevanje moguće u bilo kojem dijelu godine (Qiu i sur., 2016).

Virusna se DNA ne ugrađuje u genom domaćina, ali poznato je da nakon zaraze može ostati prisutna u organizmu. Unatoč različitim genotipovima postoji samo jedan serotip virusa te se preboljenjem stječe doživotna imunost (Jain i Kant 2018; Qiu i sur., 2016).

Prema Adamson-Small i sur. (2014), genom parvovirusa B19 perzistira u mnogim tkivima poput srca, jetre, štitnjače, testisa, sinovijalne tekućine i kolona. Virus se nakon zaraze u tim tkivima može zadržati i nekoliko desetljeća. Također, autori ukazuju i na povezanost strukturnih proteina parvovirusa B19 ili njihovih mRNA s pojačanom ekspresijom gena uključenih u upalne procese.

Virus krvlju putuje do koštane srži gdje zaražava prekursore eritrocita. Zaraza je za njih citotoksična, a njihova deplecija uzrokuje zastoj eritropoeze (proces stvaranja eritrocita) i pojavu gigantskih eritroblasta karakterističnih za parvovirusnu infekciju (Zakrzewska i sur., 2023). U zdravih pojedinaca zastoj eritropoeze je kratkotrajan (do tjedan dana) i asimptomatski te se rješava spontano kroz nespecifični imunski odgovor (Lindblom i sur., 2005). S druge strane, čak i kratkotrajni zastoj eritropoeze može u imunokompromitiranih pojedinaca i onih s hematološkim poremećajima uzrokovati teške i trajne oblike anemije (Zakrzewska i sur., 2023).

Osim stanica prekursora i zreli eritrociti na svojoj površini ispoljavaju antigen P, no u njima ne dolazi do replikacije zbog nemogućnosti ulaska parvovirusne čestice (nepermisivni su) (Ganaie i Qiu, 2018). Tijek infekcije u nepermisivnim stanicama vrlo je slabo istražen, no postoje istraživanja koja potvrđuju da postoje posljedice zaraze takvih stanica parvovirusom B19, kao što su poticanje proizvodnje raznih citokina i aktivacija nespecifičnog imunskog odgovora (Arvia i sur., 2020; Zakrzewska i sur., 2019).

Jedna od rizičnih skupina su i trudnice koje nisu ranije bile zaražene, a riječ je o otprilike 25 do 50% žena reproduktivne dobi (Gigi i Anumba, 2021). Čestice parvovirusa B19 dovoljno su

malene za prolazak kroz placentarnu barijeru. Time je omogućena zaraza fetusa u majčinoj utrobi, s pretpostavljenom vjerojatnošću zaraze od 25 do 50% (Qiu i sur., 2016). U većini slučajeva, zaraza prolazi asimptomatski za fetus, no može doći i do teških komplikacija. Posljedice zaraze fetusa ovise o stadiju trudnoće i razvitku fetalne eritropoeze, a uključuju akutnu i kroničnu fetalnu anemiju, hipoksiju tkiva, razvitak sindroma *hydrops fetalis* (prekomjerno nakupljanje tekućine, odnosno pojava edema u tkivima i organima fetusa) i spontane pobačaje (Xiong i sur., 2019; Zakrzewska i sur., 2023). Posljedice su teže ako se zaraza pojavi u prva dva tromjesečja trudnoće (Enders i sur., 2004). Procjenjuje se da je vjerojatnost prekida trudnoće u zaraženih trudnica oko 10% (Qiu i sur., 2016).

Vakcina, kao ni bilo koji oblik direktno djelujuće antivirusne terapije zasad nisu razvijeni zbog toga što je zaraza u većini slučajeva subklinička; simptomi su kratkotrajni i samoograničavajući (Zakrzewska i sur., 2023). Ukoliko je potrebno, liječenje se provodi simptomatski; u ponekim slučajevima anemije potrebne su transfuzije, a u slučajevima artropatije prepisuju se protuupalni lijekovi i analgetici (Zakrzewska i sur., 2023).

Ne postoje specifične mjere prevencije zaraze, već se preporuča postupati kao i u slučaju drugih respiratornih bolesti. Ovdje spadaju uobičajeni postupci prevencije svih zaraznih bolesti poput čestog pranja ruku i ograničavanja kapljičnog prijenosa patogena te izbjegavanje direktnog kontakta s oboljelima, trudnicama i imunokompromitiranim osobama (NZJZ, 2023).

1.3 Epidemiologija parvovirusa B19

Zaraza parvovirusom B19 globalno je rasprostranjena (Zakrzewska i sur., 2023). Najčešća je u pedijatrijskoj dobi, posebno od pet do 15 godina starosti, no zaraziti se mogu i odrasli koji ranije nisu bili zaraženi. Osobe koje žive i rade u stalnom i bliskom kontaktu s djecom pod povećanim su rizikom od zaraze (Qiu i sur., 2016).

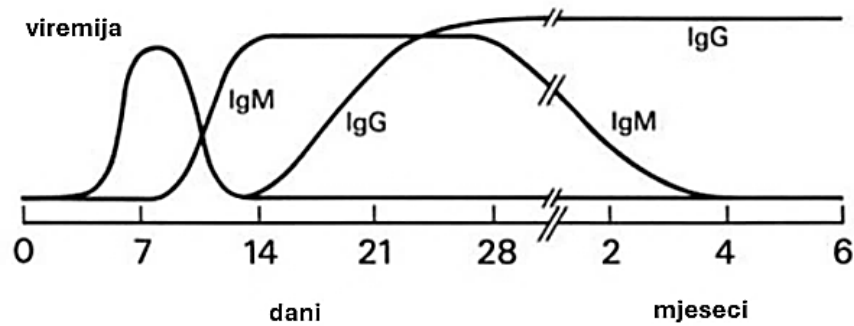
Pretpostavlja se da je otprilike polovica odrasle populacije bila izložena ovom virusu. Prisutnost specifičnih antitijela na parvovirus B19 varira u odnosu na dob ispitanika. U prosjeku su zastupljena u manje od 20% osoba mlađih od pet godina, u oko 40% osoba između pet i 18 godina starosti te u 40 do 80% odraslih (Qiu i sur., 2016).

Na temelju filogenetske analize regije NS1 virusnog genoma, parvovirus B19 može se podijeliti u tri genotipa: 1, 2 i 3 (Jain i Kant, 2018). Najrasprostranjeniji je genotip 1, koji predstavlja prototip genoma parvovirusa B19. Genotipovi 2 i 3 razlikuju se od referentnog genoma (genotipa 1) u više od 10% nukleotida, a međusobno u oko 5% nukleotida (Corcoran i sur., 2010; Seetha i sur., 2021). Genotipovi 1 i 3 klasificirani su u dodatna dva podtipa: 1A i 1B te 3a i 3b (Parsyan i sur., 2007; Toan i sur., 2006) s razlikom od oko 5% nukleotida među podtipovima (Seetha i sur., 2021). Sukladno tome, genotip 3 ima najvišu stopu različitosti (Qiu i sur., 2016). Pretpostavlja se da je genotip 1 nastao iz genotipa 2, koji je u današnje vrijeme manje prisutan i češći u gerijatrijskih ispitanika (Jain i Kant 2018; Zakrzewska i sur., 2023). S druge strane, rasprostranjenost genotipa 3 uglavnom je epidemijska i ograničena na područje Južne Amerike i subsaharske Afrike (posebno Gane), no pojavljuje se sporadično u Europi i Indiji (Qiu i sur., 2016).

Također, grupa njemačkih znanstvenika dokazala je da zaraza jednog pojedinca nije ograničena samo na jedan od parvovirusnih genotipova. Analizirali su prisutnost virusne DNA u uzorcima jetre 87 odraslih ispitanika. Prisutnost dvaju genotipova zabilježili su u četiri uzorka, od čega su u tri uzorka bili prisutni genotipovi 1 i 2, dok su u jednome uzorku detektirani genotipovi 1 i 3 (Schneider i sur., 2008).

1.4 Dijagnostika i karakterizacija parvovirusa B19

Glavni dijagnostički parametar zaraze parvovirusom B19 proizvodnja je specifičnih protutijela. Otprilike tjedan dana nakon zaraze započinje proizvodnja protutijela IgM, koja u serumu zaostaju nekoliko mjeseci. Proizvodnja neutralizirajućih protutijela IgG započinje oko dva tjedna nakon zaraze i vrlo su učinkovita u suzbijanju virusa. Akutna faza zaraze određuje se dakle dokazivanjem IgM protutijela u serumu (Al Shukri i sur., 2015). Tijekom idućih nekoliko mjeseci razine protutijela IgM opadaju sve do nedetektibilne razine, dok IgG zaostaje trajno (Manaresi i sur., 2002), što je prikazano na **Slici 7**. Također su detektirana i protutijela IgA koja se razvijaju radi zaštite nazofaringealne sluznice (Zakrzewska i sur., 2023). Humoralna imunost, odnosno proizvodnja protutijela velikom je većinom usmjerena na epitope strukturnih proteina VP1 i VP2 (Heegaard i Brown, 2002; Qiu i sur., 2016).



Slika 7. Tijek infekcije parvovirusom B19. Prikazane su razine viremije i specifičnih protutijela IgM i IgG u serumu kroz nekoliko mjeseci od zaraze. Stopa viremije najviša je otprilike sedam dana nakon zaraze, kada započinje i proizvodnja protutijela IgM. Proizvodnja neutralizirajućih protutijela IgG započinje otprilike 14 dana nakon zaraze. IgM u serumu zaostaje nekoliko mjeseci, dok IgG ostaje trajno prisutan. Preuzeto i prilagođeno prema Heegaard i Brown (2002).

Osim seroloških metoda za detekciju antitijela, u dijagnostici zaraze parvovirusom B19 široko su raširene i molekularne metode detekcije virusne DNA poput *in situ* hibridizacije razmaza uzorka koštane srži, lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR-a) ili lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR-a). Navedene metode služe za potvrđivanje rezultata seroloških pretraga, a koriste se i za analizu doniranih uzoraka krvi i krvnih derivata. No, zbog zadržavanja genoma virusa u organizmu, sama detekcija parvovirusne DNA ne mora nužno ukazivati na akutno stanje zaraze (Qiu i sur., 2016).

2. Cilj istraživanja

Ovo istraživanje pružit će uvid u raspodjelu genotipova i podtipova parvovirusa B19 u Republici Hrvatskoj, temeljeno na molekularnoj karakterizaciji izolata virusa prikupljenih tijekom epidemije iz 2023. godine. Ciljevi ovog istraživanja su:

- Sangerovom metodom sekvenciranja odrediti slijed nukleotida regije NS1 parvovirusa B19 izoliranog iz uzoraka krvi osoba zaraženih u Hrvatskoj u periodu od ožujka do rujna 2023. godine;
- koristeći dobivene sekvencije izraditi filogenetsko stablo s ciljem retrospektivnog utvrđivanja srodnosti virusnih izolata i njihove genotipizacije.

Očekujem da će se sekvencije virusnih izolata zbog lokalizacije epidemije na području Republike Hrvatske i vrlo niske genetske varijabilnosti ovog virusa pokazati filogenetski srodnima te da će pripadati istom genotipu, a moguće i podtipu.

3. Materijali i metode

3.1 Ispitanici i biološki uzorci

U istraživanje je uključeno 107 ispitanika zaraženih parvovirusom B19 čiji su uzorci zaprimljeni u Kliniku za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u periodu od ožujka do rujna 2023. godine.

Svim osobama čiji su simptomi ukazivali na infekciju parvovirusom B19 su pri ulasku u kliničku obradu u Klinici venepunkcijom prikupljeni uzorci periferne krvi u Vacutainer epruvete od 3,5 ml s antikoagulansom K3EDTA te su pohranjeni pri temperaturi od -20 °C. Virusna je DNA izolirana korištenjem standardiziranog komercijalnog kompleta reagensa *QLAamp® DNA Blood Mini Kit (250)* (Qiagen, Hilden, Njemačka) i sačuvana u Klinici pri temperaturi od -80 °C do daljnje uporabe. Prisutnost i koncentracija parvovirusne DNA (viremija), određene su iz uzoraka pune krvi pomoću komercijalnog kompleta reagensa *AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5* (Altona Diagnostics, Hamburg, Germany), prema uputama proizvođača na uređaju *The LightCycler® 480 Instrument II* (Roche Diagnostic, Pleasanton CA, USA).

U ovo istraživanje uvršteni su ispitanici čiji su uzorci bili raspoloživi i kojima je detektirana parvovirusna DNA u koncentraciji višoj od 5000 IU/ml krvi (internacionalnih jedinica, engl. *international units*). Istraživanje je provedeno na Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike.

Demografski podaci o ispitanicima prikazani su u **Tablici 1**. Ispitanika muškog spola bilo je gotovo dvostruko više od ispitanika ženskog spola (64,5% naspram 35,5%). Raspon starosti ispitanika kreće se od svega nekoliko mjeseci pa do 76 godina s medijanom od 13 godina. Medijan detektiranih logaritamskih vrijednosti viremije iznosi 6,81. Ukupno 58%, odnosno 62 ispitanika bila su mlađa od 18 godina u vrijeme prikupljanja uzoraka, dok su ostalih 42%, odnosno 45 ispitanika bili odrasli. Iz omjera pedijatrijskih i odraslih ispitanika vidljivo je da prevladavaju pedijatrijski. Medijan logaritamskih vrijednosti viremija pedijatrijskih ispitanika iznosi 12,1, a odraslih ispitanika 12,38.

Provedba ovog istraživanja odobrena je od strane Etičkog povjerenstva Klinike 6. veljače 2024. godine pod urudžbenim brojem 01-304-3-2024.

Tablica 1. Biološki i demografski parametri ispitanika.

Ukupan broj ispitanika (n)	107	
Dob (godine; medijan, minimum – maksimum)	13, 0 – 76	
Vrijednosti viremije (log(IU/ml); medijan, minimum – maksimum)	6,81, 3,96 –13,97	
	Muškarci	Žene
Spol (n, %)	38 (35,5%)	69 (64,5%)
Omjer spolova (M/Ž)	≈1:2 (0,55)	
	Pedijatrijski ispitanici	Odrasli ispitanici
Broj (n, %)	62 (58%)	45 (42%)
Omjer (pedijatrijski/odrasli)	≈13:10 (1,38)	
Medijan vrijednosti viremija u log(IU/ml)	12,10	12,38

3.2 Materijali

3.2.1 Reagensi i otopine

Tablica 2. Reagensi korišteni tijekom provedbe eksperimenta.

NAZIV	KRATAK OPIS	PROIZVOĐAČ
puferska otopina natrijevog acetata, pH = 5 (NaAc)	sol za taloženje DNA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
70% etanol (EtOH)	etilni alkohol za taloženje DNA	Claro-prom d.o.o., Zagreb, Hrvatska
96% etanol (EtOH)		
visoko deionizirani formamid, „Hi-Di™ Formamide“	reagens za otapanje taloga i denaturaciju	Applied Biosystems, Warrington, UK
polimerni matriks, „POP-7™ (384) Performance Optimized Polymer 3500 Series“	matriks za razdvajanje DNA fragmenata tijekom kapilarne elektroforeze	Applied Biosystems, Warrington, UK
anodni pufer, „Anode Buffer Container, 3500 Series“	puferi za kapilarnu elektroforezu	Applied Biosystems, Warrington, UK
katodni pufer, „Cathode Buffer Container, 3500 Series“		Applied Biosystems, Warrington, UK
voda za PCR, engl. PCR grade H ₂ O	pročišćena voda za korištenje u PCR-u	Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka

3.2.2 Kompleti reagensa

Tablica 3. Kompleti reagensa korišteni tijekom provedbe eksperimenta.

NAZIV	SADRŽAJ	PROIZVOĐAČ
komplet reagensa za umnažanje PCR-om i ugniježđenim PCR-om, „FastStart™ High Fidelity PCR System“	<ul style="list-style-type: none"> ○ smjesa enzima „FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5U/μl)“ ○ reakcijski pufer „FastStart High Fidelity“, 10× koncentriran uz 18 mM MgCl₂ ○ reakcijski pufer „FastStart High Fidelity“, 10× koncentriran bez 18 mM MgCl₂ ○ otopina MgCl₂, 25 mM ○ dimetil sulfoksid (DMSO) ○ otopina dNTP-ova (10 mM) 	Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka
komplet reagensa za reakciju sekvenciranja, „BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“	<ul style="list-style-type: none"> ○ reakcijska smjesa „BigDye™ Terminator v3.1. Ready Reaction Mix“ ○ pufer za sekvenciranje „BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1“, 5× koncentriran 	Applied Biosystems, Warrington, UK

3.2.3 Oligonukleotidne početnice

Prilikom umnažanja fragmenata gena NS1, koristila sam dva para početnica komplementarnih sekvencijama unutar gena NS1, preuzetih iz Corcoran i sur. (2010). Sekvencije i ostali podaci o početnicama navedeni su u **Tablici 4**. Početnice „PVB-1“ i „PVB-2“ koristila sam za provođenje inicijalnog PCR-a, a početnice „PVB-3“ i „PVB-4“, koje se nazivaju i unutrašnjima, koristila sam za umnažanje prvotnih produkata PCR-a tijekom ugniježđenog PCR-a.

Tablica 4. Oligonukleotidne početnice korištene za lančanu reakciju polimerazom i ugniježdenu lančanu reakciju polimerazom, preuzeto iz (Corcoran i sur., 2010).

POČETNICA	SEKVENCIJA POČETNICE	POZICIJA U GENOMU	ORIJENTACIJA
PVB-1	5' CACTATGAAAACACTGGGCAATAAAC 3'	1747 - 1770	nizvodna
PVB-2	5' AATGATTCTCCTGAACTGGTCC 3'	1988 - 1967	uzvodna
PVB-3	5' ATAAACTACACTTTTGATTCCCTG 3'	1765 - 1789	nizvodna
PVB-4	5' TCTCCTGAACTGGTCCCG 3'	1982 - 1965	uzvodna

3.2.4 Laboratorijski uređaji i pribor

Tablica 5. Laboratorijski uređaji korišteni prilikom provedbe eksperimenta.

NAZIV	PROIZVOĐAČ
mikrobiološki zaštitni kabinet	Klimaoprema d.d., Zagreb, Hrvatska
centrifuga, „Centrifuge 5430“	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
uređaj za PCR, „ProFlex™ PCR System, 96-well“	Applied Biosystems, Warrington, UK
uređaj za PCR, „ProFlex™ 3 × 32-well PCR System“	Applied Biosystems, Warrington, UK
vertložna miješalica, „Agitateur Top-Mix 11118“	Fisher Bioblock Scientific S.A., Illkirch, Francuska
uređaj za sekvenciranje, „ABI Hitachi 3500 Series Genetic Analyzer“	Applied Biosystems, Warrington, UK

Tablica 6. Laboratorijski pribor korišten prilikom provedbe eksperimenta.

NAZIV	PROIZVOĐAČ
automatske pipete različitih volumena	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
automatske pipete različitih volumena	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
multikanalne automatske pipete	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
nastavci za automatske pipete s filterom raznih veličina	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
mikropruvete od 1,5 ml i 2 ml	Sarsted, Numbrecht, Njemačka
blok za hlađenje	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
plastični stalci za pločice od 96 jažica, engl. 96-well PCR plates racks	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
8 mikropruveta za PCR u nizu, „MicroAmp® 8-Tube Strip“, 0,2 ml	Applied Biosystems, Warrington, UK
čepovi za 8 mikropruveta za PCR u nizu, „MicroAmp® 8-Tube Caps“	Applied Biosystems, Warrington, UK
pločice od 96 jažica, „MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode“	Applied Biosystems, Warrington, UK
gumeni pokrovi za pločice od 96 jažica, „Septa for 96-Well Plates, 3500 Series“	Applied Biosystems, Warrington, UK
kapilare za elektroforezu, „3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array, 50 cm“	Applied Biosystems, Warrington, UK
baza i poklopac za pločice od 96 jažica, „Retainer & Base Set (Standard) for 3500/3500xL Genetic Analyzers, 96-Well“	Applied Biosystems, Warrington, UK

3.2.5 Računalni programi

Tablica 7. Računalni programi korišteni za analizu rezultata.

KRATAK OPIS	NAZIV	PROIZVOĐAČ
računalni program za analizu i uređivanje sekvencija	<i>SnapGene</i>	GSL Biotech LLC, Boston, Massachusetts, SAD
paket računalnih programa za obradu sekvencija i filogenetsku analizu	<i>MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>	Institute for Genomics and Evolutionary Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, SAD
računalni program za statističku selekciju modela supstitucije	<i>jModelTest 2</i>	Free Software Foundation, Boston, Massachusetts, SAD

3.3 Metode

3.3.1 Lančana reakcija polimerazom

Vremije ispitnika bile su različite te sam volumene izolirane DNA parvovirusa B19 koje sam dodavala reakcijskoj smjesi prilikom provođenja oba PCR-a prilagodila na način koji je prikazan u **Tablici 8.**, kako bih postigla optimalnu koncentraciju DNA u reakciji.

Tablica 8. Prikaz raspona vremije i volumena izolirane DNA parvovirusa B19 korištene u obje lančane reakcije polimerazom (PCR).

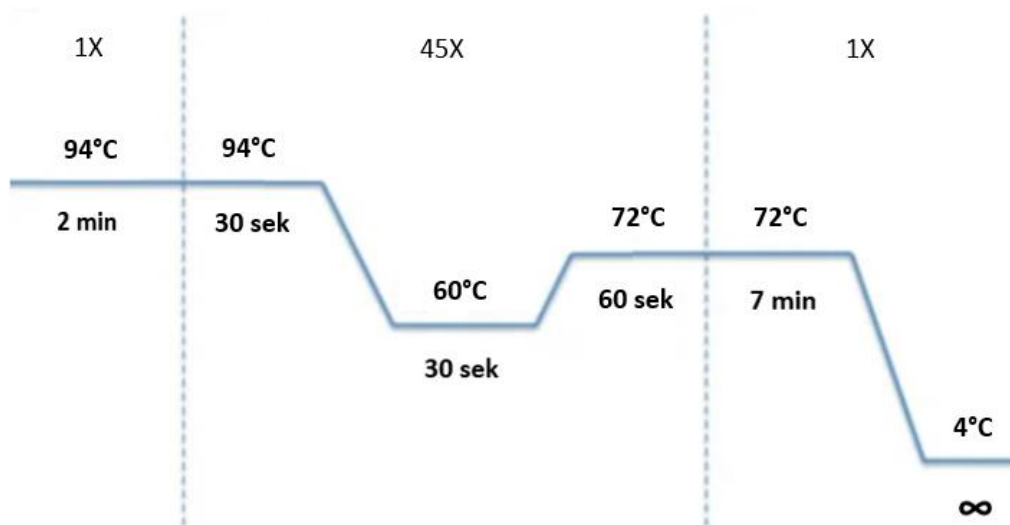
RASPON VIREMIJE (IU/ml)	VOLUMEN DNA PARVOVIRUSA B19 KORIŠTEN U PCR-u (µl)	VOLUMEN DNA PARVOVIRUSA B19 KORIŠTEN U UGNIJEŽĐENOM PCR-u (µl)
<10 ⁴	5	2
10 ⁴ - 10 ⁷	2	1
10 ⁷ - 10 ¹⁰	1	0,5
10 ¹⁰ - 10 ¹³	0,5	0,25

Reakcijske smjese za umnažanje ciljane regije unutar gena NS1 pripremila sam koristeći komercijalni komplet reagensa *FastStart™ High Fidelity PCR System* (Tablica 3) i specifične početnice „PVB-1“ i „PVB-2“ iz **Tablice 4**. Volumeni vode za PCR i izolirane parvovirusne DNA varirale su za svaku skupinu uzoraka prema rasponu viremija iz **Tablice 8**. Pripremila sam reakcijsku smjesu i stavila je u blok za hlađenje. Sastav i volumen svih komponenti reakcijske smjese za skupinu uzoraka u kojima je viremija detektirana u rasponu $10^4 - 10^7$ IU/ml, kada sam pomiješala 23 μ l reakcijske smjese i 2 μ l izolirane DNA, prikazani su u **Tablici 9**.

Tablica 9. Sastav reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom (PCR) za skupinu uzoraka u kojima je viremija detektirana u rasponu $10^4 - 10^7$ IU/ml.

KOMPONENTE REAKCIJSKE SMJESE	VOLUMEN (μ l)
voda za PCR	19
reakcijski pufer „ <i>FastStart High Fidelity</i> “, 10× koncentriran uz 18 mM MgCl ₂	2,5
smjesa dNTP-ova, 10 mM	0,6
početnica PVB-1, 50 mM	0,6
početnica PVB-2, 50 mM	0,6
smjesa enzima „ <i>FastStart High Fidelity Enzyme Blend</i> “, 5U/ μ l	0,6
konačni volumen reakcijske smjese	23
DNA parvovirusa B19	2
ukupno	25

Uzorke sam stavila u uređaj za PCR „*ProFlex™ 3 × 32-well PCR System*“, a uvjeti reakcije prikazani su na **Slici 8**. Nakon završetka reakcije, dobivene sam amplikone koristila u ugniježđenom PCR-u.



Slika 8. Uvjeti obje lančane reakcije polimerazom: inicijalna denaturacija pri 94 °C u trajanju od dvije minute, denaturacija pri 94 °C u trajanju od 30 sekundi, prijanjanje specifičnih početnica pri 60 °C u trajanju od 30 sekundi, elongacija pri 72 °C u trajanju od 60 sekundi, završna elongacija pri 72 °C u trajanju od sedam minuta, hlađenje pri 4 °C. Procesi denaturacije, prijanjanja i elongacije ponavljaju se u 45 ciklusa. Izrađeno u programu *BioRender*.

3.3.2 Ugniježdjena lančana reakcija polimerazom

Nakon provođenja prvog PCR-a, dobivene sam produkte specifično umnožila ugniježđenim PCR-om. Unutarnje početnice „PVB-3“ i „PVB-4“ (**Tablica 4.**) vežu se na dio prethodno umnožene regije NS1, od oko 240 parova baza, što rezultira većom specifičnošću umnoženih fragmenata. Produkti ove reakcije imali su oko 220 parova baza. Reakcijske smjese pripremila sam koristeći isti komercijalni komplet reagensa kao i u prethodnom umnažanju, *FastStart™ High Fidelity PCR System* (**Tablica 3.**).

Ponovno su volumeni vode za PCR i produkata prvog PCR-a varirali za svaku skupinu uzoraka prema rasponu viremija iz **Tablice 8.** Pripremila sam reakcijsku smjesu i stavila je u blok za hlađenje. Sastav i volumen svih komponenti reakcijske smjese za skupinu uzoraka u kojima je viremija detektirana u rasponu $10^4 - 10^7$ IU/ml, kada sam pomiješala 24 µl reakcijske smjese i 1 µl PCR produkta, prikazani su u **Tablici 10.**

Tablica 10. Sastav reakcijske smjese za ugniježđenu lančanu reakciju polimerazom (PCR) za skupinu uzoraka u kojima je viremija detektirana u rasponu $10^4 - 10^7$ IU/ml.

KOMPONENTE REAKCIJSKE SMJESE	VOLUMEN (μ l)
voda za PCR	20
reakcijski pufer „FastStart High Fidelity“, 10× koncentriran uz 18 mM MgCl ₂	2,5
smjesa dNTP-ova, 10 mM	0,6
početnica PVB-1, 50 mM	0,6
početnica PVB-2, 50 mM	0,6
smjesa enzima „FastStart High Fidelity Enzyme Blend“, 5U/ μ l	0,6
konačni volumen reakcijske smjese	24
produkt prvog PCR-a	1
ukupno	25

Uzorke sam stavila u uređaj za PCR „ProFlexTM 3 × 32-well PCR System“, a uvjeti reakcije bili su isti kao i u prvom PCR-u (**Slika 8.**). Nakon završetka reakcije, dobivene sam amplikone pohranila pri -20 °C te kasnije koristila za reakciju sekvenciranja.

3.3.3 Reakcija sekvenciranja

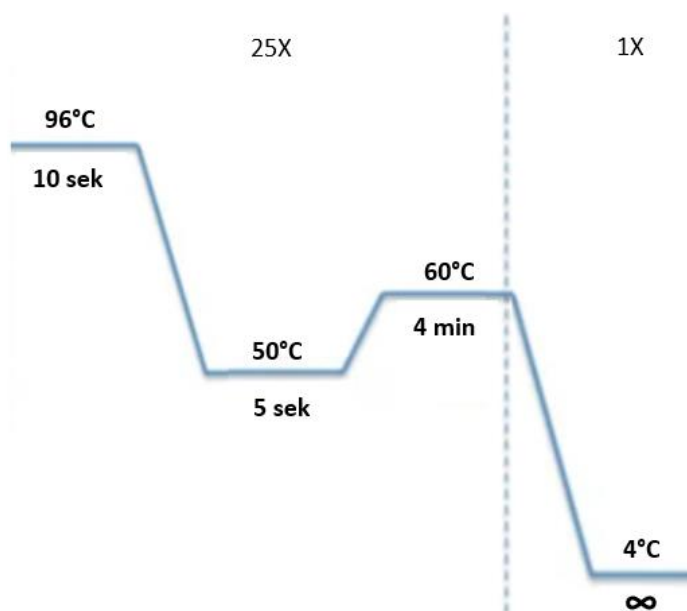
Produkte ugniježđenog PCR-a upotrijebila sam za očitavanje primarne strukture umnožene regije NS1 DNA parvovirusa B19 Sangerovom dideoksi metodom sekvenciranja, temeljenoj na terminaciji PCR sinteze komplementarnog lanca DNA uzrokovanoj ugradnjom fluorescentno obilježenog dideoksinukleotid trifosfata (ddNTP-a) na njegovom 3' kraju.

Reakcijske smjese za reakciju sekvenciranja pripremila sam koristeći komercijalni komplet reagensa „BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (**Tablica 3.**). Pripremila sam dvije reakcijske smjese (**Tablica 11.**), tako da svaka sadrži po jednu od početnica, nizvodnu „PVB-3“ ili uzvodnu „PVB-4“. Štok otopine početnica koncentracije 20 mM sam za reakciju sekvenciranja razrijedila 20 puta. Za svaki uzorak pripremila sam dvije reakcije, u prvu sam mikroepruvetu dodala 9 μ l reakcijske smjese s nizvodnom, a u drugu jednaki volumen reakcijske smjese s

uzvodnom početnicom, s obzirom da se fragmenti DNA ovom metodom mogu sekvencirati samo u jednom smjeru. Po potrebi sam uzorak razrijedila u vodi za PCR u odgovarajućem omjeru u odnosu na početni raspon viremije i u obje mikropruvete dodala po 1 μ l razrijeđenog produkta. Uzorke sam stavila u uređaj za PCR „ProFlex™ PCR System, 96-well“. Uvjeti reakcije sekvenciranja prikazani su na **Slici 9**.

Tablica 11. Sastav reakcijske smjese za jednu reakciju sekvenciranja.

KOMPONENTE REAKCIJSKE SMJESE	VOLUMEN (μ l)
voda za PCR	5,9
pufer za sekvenciranje „BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1“, 5× koncentriran	2
nizvodna (PVB-3) ili uzvodna (PVB-4) početnica	0,6
reakcijska smjesa „BigDye™ Terminator v3.1. Ready Reaction Mix“	0,5
konačni volumen reakcijske smjese	9
produkt ugniježđenog PCR-a, razrijeđen po potrebi	1
ukupno	10

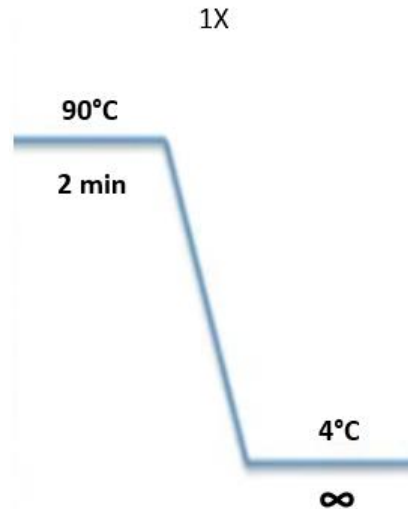


Slika 9. Uvjeti reakcije sekvenciranja: denaturacija pri 96 °C u trajanju od deset sekundi, prijanjanje početnica pri 50 °C u trajanju od pet sekundi, produžena elongacija pri 60 °C u trajanju od četiri minute, hlađenje pri 4 °C. Proces denaturacije, prijanjanja i elongacije ponavljaju se u 25 ciklusa. Izrađeno u programu *BioRender*.

Produkte reakcije sekvenciranja potrebno je prije postavljanja u uređaj za sekvenciranje pročitati od neiskorištenih ili krivo spojenih početnica i neugrađenih deoksinukleotid trifosfata (dNTP-ova) i ddNTP-ova. Za pročišćavanje se koristi smjesa natrijevog acetata (NaAc) i apsolutnog (96%-tnog) etanola (EtOH).

U svaku od osam mikroepruveta za PCR u nizu dodala sam po 2 μ l NaAc i 50 μ l EtOH, ukupno 52 μ l smjese. Uzorke sam poklopila odgovarajućim čepovima u nizu, dobro promiješala okretanjem niza epruveta u plastičnome stalku te centrifugirala 20 minuta pri $2000 \times g$. Odmah po isteku vremena uklonila sam čepove u nizu i otvorene mikroepruvete prekrila papirnatim ručnicima. Uzorke sam u stalku preokrenula i s otvorom okrenutim prema dolje centrifugirala jednu minutu pri $150 \times g$. Zatim sam u svaku od mikroepruveta dodala po 150 μ l hladnog 70%-tnog etanola, zatvorila novim nizom čepova, dobro promiješala okretanjem u stalku te ponovno centrifugirala, ovog puta pet minuta pri $2000 \times g$. Nakon centrifugiranja odmah sam uklonila čepove u nizu, prekrila mikroepruvete papirnatim ručnicima i još jednom centrifugirala preokrenute uzorke jednu minutu pri $150 \times g$.

Uzorke sam denaturirala tako što sam svaki talog dobiven posljednjim centrifugiranjem resuspendirala u 20 μ l visoko deioniziranog formamida. Poklopila sam uzorke odgovarajućim čepovima u nizu te ih postavila u uređaj za PCR „ProFlexTM PCR System, 96-well“. Uvjeti reakcije denaturacije prikazani su na **Slici 10**. Nakon završetka programa, multikanalnom automatskom pipetom razdijelila sam po 10 μ l svakog uzorka u jažice pločice od 96 jažica koja se nalazila na odgovarajućoj bazi, poklopila ju gumenim pokrovom i poklopcem te stavila u uređaj za sekvenciranje „ABI Hitachi 3500 Series Genetic Analyzer“. Pokrenula sam uređaj kako bi se kapilarnom elektroforezom razdvojili fragmenti DNA s ugrađenim fluorescentno obilježenim ddNTP-ovima. Koristila sam skraćeni program analize *FastSeq50_POP7_Z* u trajanju od jednog sata.



Slika 10. Uvjeti reakcije denaturacije uzoraka koja prethodi reakciji sekvenciranja: denaturacija pri 90 °C u trajanju od dvije minute, hlađenje pri 4 °C. Izrađeno u programu *BioRender*.

3.3.4 Analiza rezultata

Rezultate sekvenciranja analizirala sam u računalnom programu *SnapGene*. Obradila sam i sastavila ukupno 107 eksperimentalno dobivenih sekvencija adekvatne duljine koje obuhvaćaju dio regije NS1 u genomu parvovirusa B19.

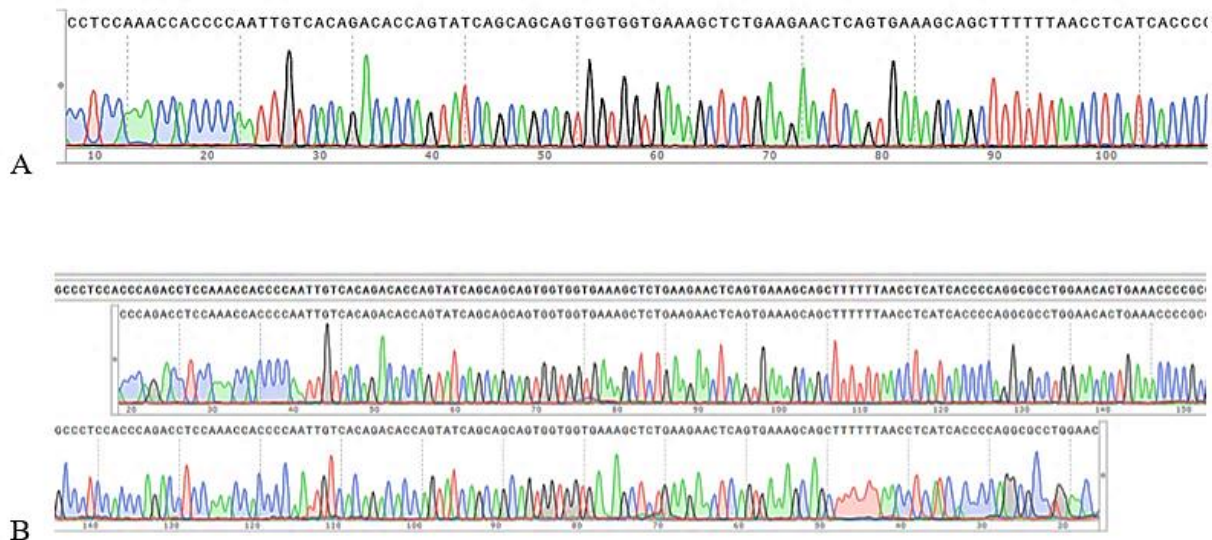
Radi preciznije analize rezultata, skratila sam nečitke krajeve sekvencija te preklopila očitavanja iz obje orijentacije kako bih dobila sastavljenu sekvenciju (engl. *contig*). Pregledala sam kromatograme sastavljenih sekvencija i ručno ispravila moguće greške, poput preklapanja dviju baza, preskočenog ili pogrešno zabilježenog signala.

Uredne sam sekvencije pohranila u formatu *FASTA* i sravnila koristeći program *ClustalW* unutar paketa računalnih programa *MEGA X* zajedno s četiri referentne sekvencije preuzete iz baze podataka *NCBI*. Spomenute referentne sekvencije poslužile su mi za određivanje genotipa i podtipa dobivenih sekvencija usporedbom njihovih sljedova. Ujednačila sam duljinu svih obrađenih sekvencija na 181 nukleotid. Filogenetsko stablo konstruirala sam metodom najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*, *ML*) unutar paketa *MEGA X*, koristeći metodu samoučitanja (mjera podržanosti grananja, engl. *bootstrapping*) s 1000 ponavljanja i *General Time Reversible* (*GTR*) model nukleotidne supstitucije, kojeg sam prethodno odabrala pomoću računalnog programa *jModelTest 2*.

4. Rezultati

4.1 Analiza sekvencija

U istraživanje je uključeno 107 ispitanika kojima je u sklopu rutinske dijagnostičke obrade u perifernoj krvi detektirana parvovirusna DNA u koncentraciji većoj od 5000 IU/ml. Izoliranu virusnu DNA prvo sam umnožila PCR-om pa ugniježđenim PCR-om, a zatim amplikone podvrgnula reakciji sekvenciranja. Umnažanje svih uzoraka odmah se pokazalo uspješnim, dok sam reakciju sekvenciranja u nekih uzoraka morala ponoviti. Reakcije sekvenciranja istih uzoraka ponavljala sam sve dok uzorke nisam razrijedila u odgovarajućem omjeru u odnosu na početni raspon viremije, što je rezultiralo jasnim kromatogramima u oba smjera. Kromatogram dobiven sekvenciranjem jednog uzorka u reakciji koja je sadržavala nizvodnu početnicu vizualiziran u računalnom programu *SnapGene* prikazan je na **Slici 11. a)**, dok je na **Slici 11. b)** prikazan primjer sastavljanja sekvencije preklapanjem očitavanja iz obje orijentacije.



Slika 11. Djelomični prikaz sekvencije DNA regije NS1 parvovirusa B19 vizualiziran u računalnom programu *SnapGene*. **A)** prikaz sekvencije dobivene umnažanjem u reakciji koja je sadržavala nizvodnu početnicu, **B)** prikaz preklapanja sekvencija dobivenih umnažanjem u nizvodnoj i uzvodnoj orijentaciji s ciljem dobivanja sastavljene sekvencije.

4.2 Filogenetska analiza

Filogenetsku analizu provela sam s ciljem određivanja virusnih genotipova i podtipova. Sastavljene sam sekvencije sravnila pomoću alata *ClustalW* unutar računalnog programa *MEGA X* te usporedila s referentnim sekvencijama preuzetima iz baze podataka *NCBI*, koje odgovaraju genotipovima 1A, 1B, 2 i 3. Uzorci se u genotipove, odnosno podtipove, svrstavaju na temelju sličnosti u nukleotidnom slijedu. Uzorci koji pripadaju istome genotipu podudaraju se u više od 90% nukleotida, a među uzorcima koji pripadaju istome podtipu razlike u sekvenciji nisu veće od 5% nukleotida. Sravnjene sekvencije parvovirusa B19 korištene pri izradi filogenetskog stabla uniformne su, duge 181 nukleotid i kodiraju za peptidne lance od 60 aminokiselina (**Slika 12.**).

Četiri korištene referentne sekvencije označila sam odgovarajućim pristupnim brojevima i odgovarajućim genotipom iz baze podataka *NCBI*, s oznakama: „PARVO B19 NC 0008883.2 GENOTYPE 1A“, „PARVO B19 DQ357064.1 Genotype 1B“, „PARVO B19 DQ333428.1 Genotype 2“ i „PARVO B19 DQ408302.1 Genotype 3“. Eksperimentalno dobivenim sekvencijama pridružila sam nazive „B19VCro23_1 - 107“ te ih pod istim nazivima pohranila u bazu podataka *GenBank* pod pristupnim brojevima PP839100 - PP839206. Sekvencije su pod navedenim pristupnim brojevima javno dostupne od 04.06.2024.

Sequence ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35																															
#1. B19VCro23 1	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#2. B19VCro23 2	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#3. B19VCro23 3	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#4. B19VCro23 4	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#5. B19VCro23 5	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#6. B19VCro23 6	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#7. B19VCro23 7	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#8. B19VCro23 8	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#9. B19VCro23 9	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#10. B19VCro23 10	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#11. B19VCro23 11	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#12. B19VCro23 12	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#13. B19VCro23 13	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#14. B19VCro23 14	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#15. B19VCro23 15	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#16. B19VCro23 16	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#17. B19VCro23 17	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#18. B19VCro23 18	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#19. B19VCro23 19	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#20. B19VCro23 20	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#21. B19VCro23 21	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#22. B19VCro23 22	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#23. B19VCro23 23	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#24. B19VCro23 24	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#25. B19VCro23 25	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#26. B19VCro23 26	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#27. B19VCro23 27	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#28. B19VCro23 28	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#29. B19VCro23 29	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#30. B19VCro23 30	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#31. B19VCro23 31	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T	G	T	G	A	C	A	A	T	T	G	G	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	A	G
#32. B19VCro23 32	T	T	C	A	C	T	G	A	G	T	T	C	T	T	C	A	G	A	G	C	T	T	C	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	G	C	T	G	A	T	C	T																							

Svi genotipizirani uzorci pripadaju genotipu 1A (**Slika 13.**), od kojih se 101 uzorak s referentnom sekvencijom poklapa u 100% nukleotida, dok su u šest uzoraka detektirane nukleotidne supstitucije. U svakom je od tih uzoraka zabilježena po jedna supstitucija te ni u jednemu uzorku nisu zabilježene nukleotidne insercije ni delecije. Sve detektirane supstitucije su ujedno i tranzicije, odnosno mutacije u kojima se purinska dušična baza zamjenjuje purinskom ili pirimidinska pirimidinskom.

B19VCro23 70	G G G G A T G G G C G T A C T A G A G C G C G G G G T T T C A G T G T T C C A G G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A A A A A G C T
B19VCro23 71	G G G G A T G G G C G T A C T A G A G C G C G G G G T T T C A G T G T T C C A G G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A A A A A G C T
B19VCro23 72	G G G G A T G G G C G T A C T A G A G C G C G G G G T T T C A G T G T T C C A G G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A A A A A G C T
B19VCro23 73	G G G G A T G G G C G T A C T A G A G C G C G G G G T T T C A G T G T T C C A G G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A A A A A G C T
B19VCro23 74	G G G G A T G G G C G T A C T A G A G C G C G G G G T T T C A G T G T T C C A G G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A A A A A G C T
B19VCro23 75	G G G G A T G G G C G T A C T A G A G C G C G G G G T T T C A G T G T T C C A G G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A A A A A G C T
B19VCro23 76	G G G G A T G G G C G T A C T A G A G C G C G G G G T T T C A G T G T T C C A G G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A A A A A G C T
B19VCro23 77	G G G G A T G G G C G T A C T A G A G C G C G G G G T T T C A G T G T T C C A G G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A A A A A G C T
PARVO B19 NC 000883.2 GENOTYPE 1A	G G G G A T G G G C G T A C T A G A G C G C G G G G T T T C A G T G T T C C A G G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A A A A A G C T
B19VCro23 78	G G G G A T G G G C G T A C T A G A G C G C G G G G T T T C A G T G T T C C A G G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A A A A A G C T
B19VCro23 79	G G G G A T G G G C G T A C T A G A G C G C G G G G T T T C A G T G T T C C A G G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A A A A A G C T
B19VCro23 80	G G G G A T G G G C G T A C T A G A G C G C G G G G T T T C A G T G T T C C A G G C G C C T G G G G T G A T G A G G T T A A A A A A G C T

Slika 13. Usporedba referentne sekvencije genotipa 1A (označena plavo) s eksperimentalno dobivenim sekvencijama regije NS1 parvovirusa B19. Sekvencije se u potpunosti podudaraju. Izrađeno u računalnom programu *MEGA X*.

Od šest uzoraka s nukleotidnim supstitucijama, pet je istoznačnih, odnosno tihih mutacija (engl. *synonymous* or *silent mutation*), dok je jedna detektirana mutacija zamjenska (engl. *missense mutation*). Istoznačne mutacije ne dovode do promjene u aminokiselinskom slijedu, a zamjenske uzrokuju promjenu aminokiseline. Istoznačne mutacije detektirane su u uzorcima: B19VCro23_10, B19VCro23_21, B19VCro23_32, B19VCro23_56 i B19VCro23_82, a zamjenska mutacija u uzorku B19VCro23_37. Sve zabilježene istoznačne mutacije supstitucije su trećeg nukleotida u tripletu, dok je kod zamjenske mutacije došlo do supstitucije prvog nukleotida u tripletu.

Tri od pet istoznačnih mutacija odnose se na supstituciju istog nukleotida, adenina (A) u gvanin (G) na položaju 63 (63A>G), a radi se o uzorcima B19VCro23_10, B19VCro23_32 i B19VCro23_82. U navedenim uzorcima došlo je do promjene tripleta AAA u triplet AAG, koji oba odgovaraju aminokiselini lizin (Lys, K). Supstitucija u uzorku B19VCro23_21 je promjena timina (T) u citozin (C) na položaju 171 (171T>C), a radi se o promjeni tripleta ATT u ATC, gdje oba odgovaraju aminokiselini izoleucin (Ile, I). Posljednja istoznačna mutacija detektirana je u uzorku B19VCro23_56 i odnosi se na supstituciju citozina (C) u timin (T) na poziciji 30 (30C>T), gdje je riječ o promjeni tripleta TTC u triplet TTT, koji oba odgovaraju aminokiselini fenilalanin (Phe, F).

Kod zamjenske mutacije u uzorku B19VCro23_37 došlo je do promjene gvanina (G) u adenin (A) na poziciji 136 (136G>A). Radi se o promjeni tripleta GGC, koji odgovara aminokiselini glicin (Gly, G) u triplet AGC koji odgovara aminokiselini serin (Ser, S). Aminokiselina glicin sadrži nepolarni bočni lanac, a aminokiselina serin polarni nenabijeni. Na **Slici 14.** opisana je promjena vidljiva na prikazu translahiranih sekvencija iz računalnog programa *MEGA X*, gdje je navedeni uzorak označen plavom bojom.

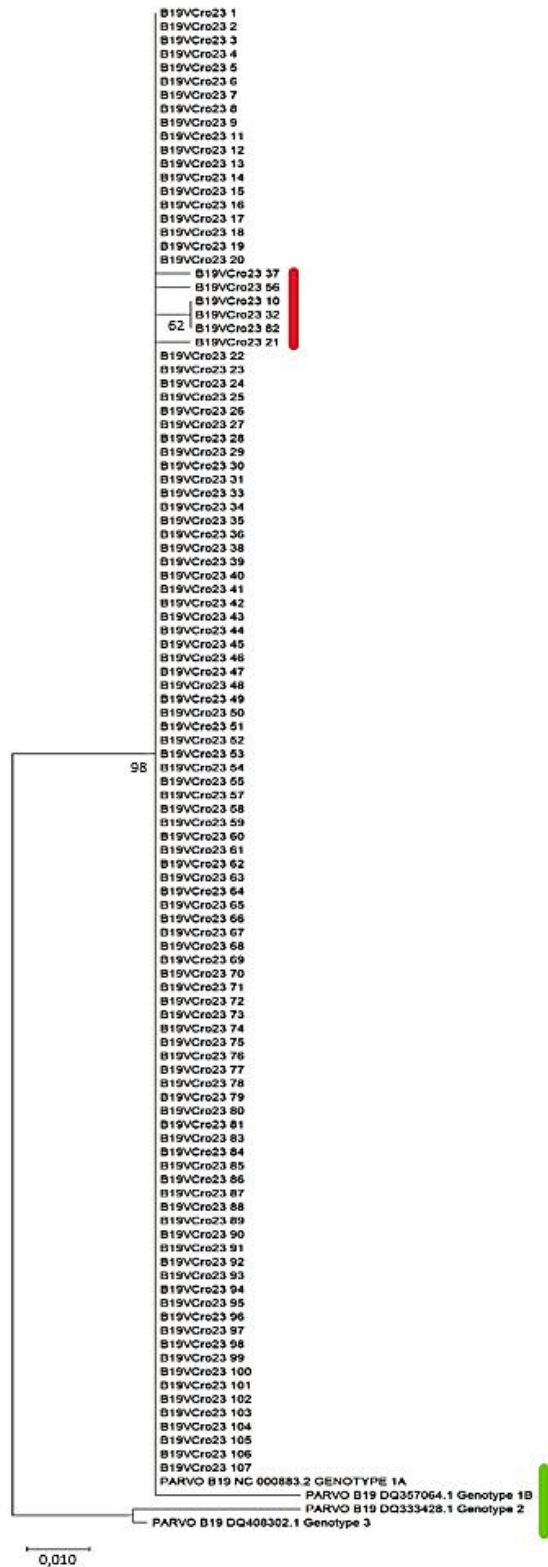
Pet od šest uzoraka u kojima su detektirane nukleotidne supstitucije potječu od pedijatrijskih ispitanika ženskog spola, dok samo uzorak B19VCro23_10 potječe od odraslog ispitanika muškog spola. Svi uzorci u kojima su detektirane nukleotidne supstitucije zaprimljeni su u svibnju i lipnju 2023. godine. Kronološki su posebno bliska tri uzorka koja sadrže istoznačnu mutaciju na istome položaju u genomu, a zaprimljeni su u istome tjednu u lipnju.

B19VCro23 35	G	D	G	R	T	R	A	R	G	F	S	V	P	G	A	W	G	D	E	V	K	K	A	A	F	T	E	F	F	R	A	F	T	T	T	A	A	D	T	G	V	C	D	N	W	G	G	L	E	V	W	V	E	G	I	C	I	N	S	R
B19VCro23 36	G	D	G	R	T	R	A	R	G	F	S	V	P	G	A	W	G	D	E	V	K	K	A	A	F	T	E	F	F	R	A	F	T	T	T	A	A	D	T	G	V	C	D	N	W	G	G	L	E	V	W	V	E	G	I	C	I	N	S	R
B19VCro23 37	G	D	G	R	T	R	A	R	G	F	S	V	P	G	A	W	G	D	E	V	K	K	A	A	F	T	E	F	F	R	A	F	T	T	T	A	A	D	T	G	V	C	D	N	W	G	G	L	E	V	W	V	E	G	I	C	I	N	S	R
B19VCro23 38	G	D	G	R	T	R	A	R	G	F	S	V	P	G	A	W	G	D	E	V	K	K	A	A	F	T	E	F	F	R	A	F	T	T	T	A	A	D	T	G	V	C	D	N	W	G	G	L	E	V	W	V	E	G	I	C	I	N	S	R
B19VCro23 39	G	D	G	R	T	R	A	R	G	F	S	V	P	G	A	W	G	D	E	V	K	K	A	A	F	T	E	F	F	R	A	F	T	T	T	A	A	D	T	G	V	C	D	N	W	G	G	L	E	V	W	V	E	G	I	C	I	N	S	R
PARVO B19 NC 000883.2 GENOTYPE 1A	G	D	G	R	T	R	A	R	G	F	S	V	P	G	A	W	G	D	E	V	K	K	A	A	F	T	E	F	F	R	A	F	T	T	T	A	A	D	T	G	V	C	D	N	W	G	G	L	E	V	W	V	E	G	I	C	I	N	S	R

Slika 14. Prikaz dijela višestrukog sravnjanja translahiranih sekvencija parvovirusa B19. Uzorak B19VCro23_37, u kojem je detektirana zamjenska mutacija, obilježen je plavom bojom. Radi usporedbe je prikazana i referentna sekvencija koja odgovara genotipu 1A ovog virusa. Izrađeno u računalnom programu *MEGA X*.

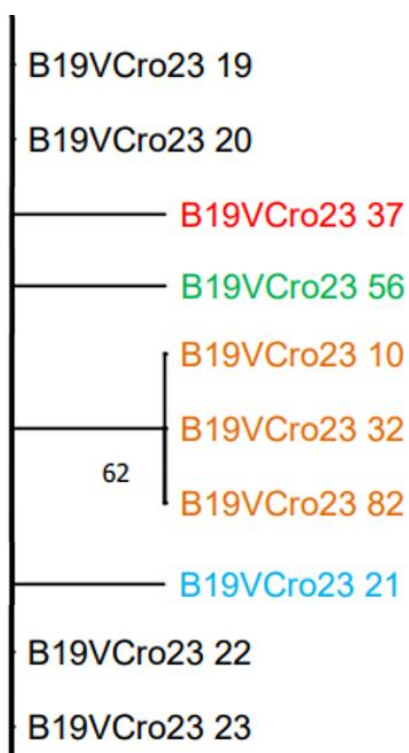
Korištenjem sravnjenih sekvencija koje obuhvaćaju dio regije NS1 u genomu parvovirusa B19, također u računalnom programu *MEGA X*, konstruirala sam filogenetsko stablo (**Slika 15.**) metodom najveće vjerojatnosti. Pri izradi stabla koristila sam model nukleotidne supstitucije GTR s parametrom gama i metodu samoučitanja s 1000 ponavljanja. Metoda samoučitanja koristi se za procjenu vjerodostojnosti konstruiranog filogenetskog stabla. Vrijednosti samoučitanja više od 50% prikazala sam ispod odgovarajućih grana. Grane filogenetskog stabla za čiju su izradu korištene filogenetski istovjetne sekvencije znatno su niže podržanosti i imaju vrlo niske vrijednosti samoučitanja, kao što je vidljivo i u rezultatima ovog istraživanja. Prema Ojha i sur. (2022), na filogenetskim je stablima uobičajeno prikazivati samo vrijednosti samoučitanja veće od 70%, koje otprilike odgovaraju statističkoj značajnosti od 95%.

Duljina grana na stablu proporcionalna je broju supstitucija, koji je izražen pomoću mjerne crtice. Priloženo je stablo s najvećom logaritamskom vjerojatnosti, koja iznosi -355,93. Za ukorjenjivanje stabla korištene su referentne sekvencije genotipova 2 i 3. Referentna sekvencija genotipa 1A grupirala se zajedno sa svim eksperimentalno dobivenim sekvencijama, što ukazuje na njihovu filogenetsku srodnost. Od njih je izdvojena referentna sekvencija genotipa 1B, no ona se i dalje nalazi na istoj grani što ukazuje na visoku srodnost genotipova 1A i 1B.



Slika 15. Filogenetsko stablo dobiveno analizom dijela regije NS1 parvovirusa B19 metodom najveće vjerojatnosti u programu *MEGA X*. Vrijednosti samoučitanja iznad 50% prikazane su na granama stabla. Duljina grana proporcionalna je broju supstitucija; mjerna crtica označava 0,01 supstituciju. Sekvencije referentnih genotipova označene su zelenom bojom, a sekvencije koje sadrže mutacije crvenom bojom.

Na filogenetskom stablu (**Slika 15.**) može se uočiti grupa sekvencija, odnosno klaster, koji se odvojio od ostalih. Klaster je uvećano prikazan na **Slici 16.** Riječ je o šest uzoraka s nukleotidnim supstitucijama. Uzorci B19VCro23_10, B19VCro23_32 i B19VCro23_82 izdvojeni su na zajedničkoj grani unutar klastera i označeni narančastom bojom jer sadrže istoznačnu mutaciju na istome položaju, što ukazuje da su te tri sekvencije istog slijeda. Uzorci B19VCro23_21 (označen plavo) i B19VCro23_56 (označen zeleno) odvojeni su jer sadrže istoznačne mutacije na drugim položajima u sekvenciji. Izdvojen je i uzorak B19VCro23_37, koji jedini sadrži zamjensku mutaciju, a na **Slici 16.** označen je crveno.



Slika 16. Uvećani dio filogenetskog stabla dobivenog analizom dijela regije NS1 parvovirusa B19 metodom najveće vjerojatnosti u računalnom programu *MEGA X*, s naglaskom na izdvojeni klaster sekvencija koje sadrže nukleotidne supstitucije. Crveno označeni uzorak B19VCro23_37 jedini sadrži zamjensku mutaciju, dok ostalih pet uzoraka sadrži istoznačne mutacije. U zasebno izdvojenim narančasto označenim uzorcima B19VCro23_10, B19VCro23_32 i B19VCro23_82 detektirana je nukleotidna supstitucija na istome položaju, dok su u uzorcima B19VCro23_56 i B19VCro23_21 detektirane nukleotidne supstitucije na drugim položajima. Potonji uzorci označeni su zeleno, odnosno plavo.

5. Rasprava

Istraživanja genetske raznolikosti parvovirusa B19 započela su tek devedesetih godina prošloga stoljeća (Qiu i sur., 2016). Zahvaljujući napretku znanosti i usavršavanju molekularnih metoda, u vrlo su kratkom periodu opisana i okarakterizirana tri genotipa i nekoliko podtipova ovog virusa. Istražena je njihova učestalost i globalna rasprostranjenost, a temelje se na raznolikosti regije NS1. Genotip 1 je najrasprostranjeniji na svim kontinentima, a uglavnom ga slijede genotip 2 pa genotip 3. No, postoje područja u kojima je genotip 3 zastupljeniji od genotipa 2, poput većine afričkih i južnoameričkih zemalja. Sva tri genotipa ovog virusa zabilježena su i u simptomatskih i u asimptomatskih ispitanika. Različiti detektirani genotipovi nemaju učinka na vrstu zaraze (simptomatska ili asimptomatska) niti na razvoj određenih simptoma (Jain i Kant, 2018).

Ovim je istraživanjem prvi puta određena raspodjela genotipova i podtipova parvovirusa B19 u Republici Hrvatskoj. Pritom je potvrđena postavljena hipoteza; sve dobivene sekvencije odgovaraju genotipu 1A te su genetski vrlo slične. Čak 101 od 107 sekvencija identične su referentnoj za podtip 1A. Lokalizacija epidemije na području Hrvatske, niska stopa mutacija zbog malog vanjskog selekcijskog pritiska (nedostatak razvijenih antivirusnih lijekova i vakcina) te činjenica da virus koristi replikacijsku mašineriju stanice koju zaražava (potencijalno može pridonijeti smanjenju grešaka i točnijoj replikaciji) čimbenici su koji pridonose vrlo niskoj genetskoj varijabilnosti parvovirusa B19. Nukleotidne supstitucije zabilježene su u samo šest uzoraka, od toga pet istoznačnih te samo jedna koja dovodi do promjene u aminokiselinskom slijedu. U tri sam uzorka detektirala istoznačnu supstituciju istog nukleotida na istome položaju u genomu.

Pet od šest uzoraka s nukleotidnim supstitucijama potječu od pedijatrijskih ispitanika ženskog spola, dok samo jedan uzorak potječe od odraslog ispitanika muškog spola, no da bismo mogli zaključiti javljaju li se mutacije češće u pedijatrijskih ispitanika istraživanje treba provesti na većem broju uzoraka. Također, bitno je naglasiti da su navedeni rezultati dobiveni genotipizacijom uzoraka iz epidemije te da bi sekvencije potencijalno bile raznolikije ukoliko bi se analizirali svi pozitivni uzorci prikupljeni u određenom vremenskom periodu, a čija zaraza nije nužno povezana kao što je to slučaj u vrijeme epidemije. Sekvencije dobivene ovim istraživanjem

nešto su kraće od 200 nukleotida te bi genetska raznolikost vjerojatno bila veća da je analiziran veći dio gena regije NS1.

Istraživanja o raspodjeli genotipova i podtipova parvovirusa B19 provedena su u mnogim državama. Corcioli i sur. (2008) su u Italiji u asimptomatskih ispitanika detektirali sva tri genotipa parvovirusa B19. Njihovo je istraživanje uključivalo 120 odraslih u kojih je postojala mogućnost zaraze parvovirusom B19. Analizirano je 139 uzoraka tkiva i 102 uzorka seruma prikupljenih u 2006. godini, a ispitanici su bili podijeljeni u četiri skupine (A – D). Skupina A uključivala je 44 ispitanika medijana dobi od 61 godine, skupina B 38 ispitanika medijana dobi od 71 godine, skupina C 38 ispitanika medijana dobi od 70 godina, a skupina D 19 ispitanika medijana dobi od 60 godina. Ispitanicima iz skupine A uzeti su uzorci koštane srži, ispitanicima iz skupine B uzorci sinovijalne tekućine, ispitanicima iz skupine C uzorci kože te ispitanicima iz skupine D uzorci srčanog tkiva. Uzorci seruma nisu uzimani jedino ispitanicima iz skupine D. Parvovirusna DNA detektirana je u 71 prikupljenom uzorku tkiva (51% uzoraka), od čega tek 20% u uzorcima koštane srži. Serološkom analizom uzoraka seruma metodom ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) zabilježena je parvovirus B19 IgG seroprevalencija u 73,5% uzoraka, dok protutijela IgM nisu bila detektirana niti u jednom uzorku. Genotipizaciju uzoraka proveli su na temelju dvije različite regije genoma koristeći različite metode: RFLP (engl. *restriction fragment length polymorphism*) te Sangerovu metodu sekvenciranja. Za izvođenje metode RFLP koristili su umnožene fragmente regija VP1 i NS1, a za sekvenciranje samo umnožene fragmente regije NS1. Genotip 1 detektiran je u 28% uzoraka tkiva, genotip 2 u 68%, a genotip 3 u samo 3% uzoraka. Podtipovi virusa nisu bili određeni, a svi su ispitanici bili asimptomatski.

Godinu kasnije, ista je grupa znanstvenika provela istraživanje u ispitanika oboljelih od sistemske skleroze, autoimune bolesti koju se povezuje sa zarazom parvovirusom B19 (Zakrzewska i sur., 2009). Istraživanje je provedeno na uzorcima kože 49 ispitanika oboljelih od sistemske skleroze te 28 zdravih kontrola, kao i na uzorcima koštane srži 29 oboljelih ispitanika te 10 zdravih kontrola. Uzorci su bili prikupljeni u Italiji između 1999. i 2007. godine, dok je medijan dobi osoba uključenih u istraživanje iznosio 54 godine. Parvovirusna DNA detektirana je u 80% uzoraka kože i 59% uzoraka koštane srži. Genotipizacija uzoraka provedena je metodom RFLP umnoženih fragmenata regije VP1, a uzorci su svrstani u genotipove 1 i 2. Genotip 1 se pokazao učestalijim u obje vrste uzoraka. Podtipovi virusa nisu bili određeni, no u 20% uzoraka kože te

31% uzoraka koštane srži zabilježena je istovremena prisutnost oba navedena genotipa. Veća podložnost koinfekcijama te perzistenciji parvovirusa B19 u tkivima potencijalno može biti posljedica imunokompromitiranog stanja, primjerice u osoba oboljelih od sistemske skleroze.

Bugarski znanstvenici proveli su nekoliko detaljnih istraživanja na ovu temu. Toshev i sur. (2014) proveli su retrospektivno istraživanje koje je uključivalo 194 ispitanika sa simptomima osipa koji nisu bili zaraženi rubeolom prikupljeni tijekom epidemije rubeole 2005. godine. Medijan dobi ispitanika iznosio je 29 godina, a bili su podijeljeni u četiri grupe prema dobi. Genotipizacija uzoraka provedena je metodom RFLP umnoženih fragmenata regije NS1. Među njihovim je uzorcima dominirao genotip 1, dok je genotip 3 bio potvrđen u samo 3 uzorka. Genotip 2 nije bio detektiran niti su određeni podtipovi virusa. Dvije godine kasnije Ivanova i sur. (2016) objavljuju rezultate opsežnog istraživanja provedenog na više od 1000 uzoraka seruma ispitanika također sa simptomima osipa negativnih na rubeolu, prikupljenih u Bugarskoj od 2004. do 2013. godine. Uzorke su genotipizirali koristeći Sangerovu metodu sekvenciranja fragmenata NS1/VP1u regije. Dobivene sekvencije duljine 994 nukleotida, korištene su za provedbu filogenetske analize u računalnom programu *MEGA4*. Filogenetsko su stablo ukorijenili referentnim sekvencijama genotipa 3. Od 55 dobivenih sekvencija, 54 je uzoraka pripadalo genotipu 1A, a samo jedan uzorak genotipu 2. No, prilikom usporedbe dobivene sekvencije genotipa 2 s referentnima, uočeno je grupiranje navedenog i jednog od referentnih uzoraka u zasebni klaster s vrlo visokom vrijednosti samoučitanja. Prema tome je zaključeno da bi formirani klaster mogao predstavljati novi podtip unutar genotipa 2.

Studija provedena 2008. godine u Njemačkoj uključivala je 151 ispitanika u čijim je uzorcima biopsije tkiva srca potvrđena parvovirusna DNA. Genotip 1 detektiran je u gotovo 30% uzoraka, a genotip 2 u nešto više od 70%. Tada je prvi puta bila zabilježena prisutnost genotipa 2 u srčanom tkivu, a većina ispitanika u čijim je uzorcima detektiran su bili stariji od 50 godina. Dok se genotip 2 pokazao češćim, rjeđi se genotip 1 povezuje s razvojem težih srčanih tegoba (Kühl i sur., 2008).

Rahiala i sur. (2013) u Finskoj objavljuju retrospektivno istraživanje provedeno u 53 pedijatrijska ispitanika s raznim oblicima leukemije, čiji su uzorci bili prikupljeni u razdoblju između 1977. i 2006. godine. Parvovirusna DNA detektirana je u 16 uzoraka (30%), a hibridizacijom po Southernu umnoženi fragmenti regije VP1 svrstani su u genotip 1. Slavov i sur.

2019. godine provode metagenomičku analizu uzoraka donirane krvi u južnome Brazilu, gdje su svi uzorci s detektiranom parvovirusnom DNA pripadali genotipu 1. Znanstvenici iz Republike Južne Afrike (Corcoran i sur., 2010) su na uzorku od 27 ispitanika detektirali oba podtipa genotipa 1 te genotipove 2 i 3. Genotip 1A bio je najzastupljeniji, zatim genotip 3 i najmanje je uzoraka genotipizirano kao genotip 2. Temeljem navedenih istraživanja može se zaključiti da je raspodjela genotipova parvovirusa B19 geografski specifična.

Zaraza parvovirusom B19 u pravilu je zastupljenija u osoba pedijatrijske dobi. No, iako je više ispitanika uključenih u ovo istraživanje bilo pedijatrijske dobi, tijekom epidemije je zabilježen i značajan udio odraslih. Ipak, navedena raspodjela ne prikazuje stvarne stope zaraze zbog toga što bolest vrlo često ne bude dijagnosticirana te prijavljivanje oboljenja pri dijagnozi nije obavezno (NZJZ, 2023).

Uzorci u kojima su zabilježene mutacije zaprimljeni su u periodu od dva mjeseca, a tri uzorka s istim mutacijama u periodu od tjedan dana. Detekcija istih mutacija u toliko kratkom vremenskom periodu ukazuje da se radi o epidemijskim, a ne sporadičnim slučajevima zaraze. U navedenim uzorcima vjerojatno nije došlo do pojave nasumičnih mutacija, već se radi o uzorcima troje ispitanika koji su se zarazili međusobno. U svrhu analize tijeka epidemije potrebno je provesti opsežnije istraživanje na znatno većem i reprezentativnom broju ispitanika.

Osim genotipizacije parvovirusa B19, provedene su i mnoge seroepidemiološke studije s ciljem detekcije prisutnosti protutijela protiv ovog virusa u općoj populaciji. Vilibić-Čavlek i suradnici (2021) provode prvo istraživanje takve vrste u Hrvatskoj. Analizirali su seroprevalenciju parvovirusa B19 u hrvatskoj populaciji u 1538 uzoraka sakupljenih u periodu od 11 godina (od 2010. do 2021.). Serološko testiranje uzoraka seruma provedeno je metodom ELISA u Hrvatskome zavodu za javno zdravstvo. Protutijela IgG detektirana su 64% ispitanika s najvećim udjelom u odrasloj populaciji, što ukazuje na njihovu izloženost parvovirusu B19 ranije tijekom života. Zabilježene razine IgG seroprevalencije povećavale su se proporcionalno dobi ispitanika, a nisu se razlikovale između muškaraca i žena. Razina seroprevalencije među trudnicama nije se razlikovala od razine detektirane u općoj populaciji te je iznosila 65%. Prisutnost protutijela IgM ukazuje na akutni stadij bolesti, a zabilježena je u 4% ispitanika, od čega najviše pedijatrijskih starosti od 9 mjeseci do 9 godina.

Šimunov i sur. (2022) proveli su slično istraživanje nad pojedincima kojima je u periodu između siječnja 2021. i svibnja 2022. godine u Kliničkoj bolnici Merkur u Zagrebu transplantiran bubreg, gušterača ili jetra. Osim serološkog statusa, određivali su i razine viremije parvovirusa B19 131 ispitanika iz uzoraka seruma i pune krvi prikupljenih tijekom predtransplantacijske obrade. IgG antitijela dokazana su u uzorcima 77% ispitanika, no niti jedan ispitanik nije u uzorku imao prisutna IgM protutijela niti mjerljivu razinu viremije. Nije uočena razlika u udjelu seropozitivnih muških i ženskih ispitanika. Seroprevalencija se u osoba s transplantacijama pokazala čak i višom od razine detektirane u općoj populaciji Hrvatske (64%) (Vilibić-Čavlek i sur., 2021), no naglasak se stavlja na 23% seronegativnih ispitanika koji su kao imunokompromitirani pojedinci bili u opasnosti od zaraze i razvoja teških komplikacija. Autori kao rješenje predlažu uvođenje određivanja serostatusa donora i primatelja organa na protutijela protiv parvovirusa B19 u pretransplantacijskoj obradi.

Seroepidemiološka studija provedena u Srbiji na 8692 ispitanika vojvođanske populacije, u periodu od 2008. do 2023. pokazala je da 49,5% osoba u serumu nosi IgG protutijela (Vuković i sur., 2024). Seroprevalencija je bila viša u ženskih (51,9%) nego u muških ispitanika (42,5%), a IgM protutijela su detektirana u 8,7% ispitanika. Uočeno je da se razine IgG seroprevalencije povećavaju sa životnom dobi ispitanika, što su pokazale i studije u Njemačkoj (Reinheimer i sur., 2010), Nizozemskoj (van Rijckevorsel i sur., 2009) i Hrvatskoj (Vilibić-Čavlek i sur., 2021), ali se ne navodi i u rezultatima Šimunov i suradnika (2022).

Budući da se antivirusna terapija protiv parvovirusa B19 ne smatra prijeko potrebnom ni profitabilnom, do sada nije razvijena te je u primjeni samo simptomatsko liječenje. Samoograničavajuća infekcija koja prolazi bez težih i trajnih posljedica za veliku većinu osoba koje su je preboljele jedan je od glavnih argumenata. Ipak, znanstvenici ustraju u pronalasku načina za suzbijanje zaraze (Zakrzewska i sur., 2023). Istražuju se mogućnosti zaustavljanja i onemogućavanja virusne replikacije u nekoliko ključnih koraka. Američki autori Ganaie i Qiu (2018) ističu sprječavanje ulaska viriona u prekursor eritrocita te inhibiciju stvaranja jednolančanog ureza u genomu iste. Kako je fragment VP1u nužan za invaziju stanice domaćina, moguće ga je ciljati primjerice specifičnim neutralizirajućim monoklonskim antitijelima ili koristiti peptidne analoge VP1u regije (Leisi i sur., 2013). Što se tiče drugog pristupa, Sanchez i sur. (2016) se fokusiraju na pronalazak inhibitora mjesno-specifične endonukleazne aktivnosti proteina NS1.

Iz istog razloga kao i u razvoju antivirusne terapije, trenutno na tržištu nema dostupne vakcine protiv parvovirusa B19. Ipak, postoji nekoliko vakcina kandidata u fazi kliničkog ispitivanja koje uglavnom sadrže čestice slične virusu (engl. *virus like particles*, VLPs). Bernstein i sur. (2011) opisuju rekombinantnu parvovirusnu vakcinu kandidata proizvedenu tako što su strukturni proteini VP1 i VP2 eksprimirani u bakulovirusnom sustavu, gdje samostalno formiraju VLPs. U ranijim istraživanjima ove vakcine kandidata veliku je prepreku predstavljala njena slaba imunogeničnosti (sposobnost da pokrene imunosni odgovor) zbog čega je pomiješana s uljnim adjuvansom *MF59*, koji se inače u SAD-u koristi u vakcinama protiv gripe. Istraživanje je provedeno u 89 odraslih parvovirus B19 seronegativnih pojedinaca podijeljenih u tri grupe po 26 osoba koje su primale vakcinu (u tri doze, u različitim koncentracijama te sa ili bez adjuvansa) i jednu grupu od 11 osoba koje su primale placebo. Studija je prekinuta nakon što su ispitanici primili drugu dozu vakcina jer je nekoliko ispitanika iz nepoznatih razloga razvilo osip i lezije na rukama i nogama. Zanimljivo je da su ove simptome razvili i neki od ispitanika koji su primali placebo. Uzevši u obzir globalnu rasprostranjenost parvovirusa B19 i rizik od pojave teških komplikacija prilikom zaraze, istraživanja s ciljem pronalaska sigurne i učinkovite vakcine će se nastaviti u budućnosti.

Brojne filogenetske analize, razumijevanje interakcija između parvovirusnih čestica i permissivnih stanica na molekularnoj razini te poboljšane i osjetljivije metode detekcije virusa pomogle su dokazati da parvovirus B19 zaražava razne vrste stanica i tkiva te da i u nepermissivnim stanicama može izazivati promjene. Važno je provoditi daljnja istraživanja kako bi se spoznao puni značaj parvovirusa B19 i bolesti uzrokovanih ovim virusom. Radi zaštite rizičnih skupina iznimno je važno nastaviti istraživanja te težiti razvitku vakcina i djelotvornih antivirusnih lijekova (Zakrzewska i sur., 2023).

6. Zaključak

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti:

- sukladno očekivanjima, molekularna analiza regije NS1 parvovirusa B19 iz uzoraka prikupljenih u Hrvatskoj u periodu od ožujka do rujna 2023. godine ukazuje na prisutnost genotipa 1, podtipa 1A u svih 107 izolata;
- analizirane su sekvencije filogenetski iznimno slične: potpuno poklapanje s referentnom sekvencijom genotipa 1A detektirano je u 101 uzorku, dok su u šest uzoraka detektirane nukleotidne supstitucije;
- od šest uzoraka s nukleotidnim supstitucijama, pet je istoznačnih, dok je jedna zabilježena mutacija zamjenska (aminokiselina glicin zamijenjena je serinom);
- istoznačna supstitucija istog nukleotida na istome položaju u genomu detektirana je u tri uzorka zaprimljena unutar istog tjedna, što ukazuje da su se te osobe zarazile jedna od druge.

7. Literatura

- Adamson-Small L.A., Ignatovich I. V, Laemmerhirt M.G., Hobbs J.A. (2014): Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: Possible role in the inflammatory and disease process. *Virus Res.* 190: 8–16.
- Al Shukri I., Hamilton F., Evans M., Cooper S., McKenzie G., Willocks L., Templeton K., Harvala H. (2015): Increased number of parvovirus B19 infections in southeast Scotland in 2012–2013. *Clin. Microbiol. Infect.* 21: 193–196.
- Arvia R., Margheri F., Stincarelli M.A., Laurenzana A., Fibbi G., Gallinella G., Ferri C., Rosso M. Del, Zakrzewska K. (2020): Parvovirus B19 activates in vitro normal human dermal fibroblasts: a possible implication in skin fibrosis and systemic sclerosis. *Rheumatology* 59: 3526–3532.
- Bernstein D.I., Sahly H.M. El, Keitel W.A., Wolff M., Simone G., Segawa C., Wong S., Shelly D., Young N.S., Dempsey W. (2011): Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. *Vaccine* 29: 7357–7363.
- Carter J., Saunders V.A. (2007): *Virology: principles and applications*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, SAD
- Centres for Disease Prevention and Control (2024): About Parvovirus B19. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/parvovirus-b19/about/index.html> [pristupljeno 27.07.2024.]
- Chen A.Y., Zhang E.Y., Guan W., Cheng F., Kleiboeker S., Yankee T.M., Qiu J. (2010): The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood* 115: 1070–1080.
- Corcioli F., Zakrzewska K., Rinieri A., Fanci R., Innocenti M., Civinini R., Giorgi V. De, Lollo S. Di, Azzi A. (2008): Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J. Med. Virol.* 80: 2005–2011.

- Corcoran C., Hardie D., Yeats J., Smuts H. (2010): Genetic Variants of Human Parvovirus B19 in South Africa: Cocirculation of Three Genotypes and Identification of a Novel Subtype of Genotype 1. *J. Clin. Microbiol.* 48: 137–142.
- Cossart Y.E., Cant B., Field A.M., Widdows D. (1975): Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 305: 72–73.
- Cotmore S.F., Agbandje-McKenna M., Canuti M., Chiorini J.A., Eis-Hubinger A.-M., Hughes J., Mietzsch M., Modha S., Ogliastro M., Pénczes J.J., Pintel D.J., Qiu J., Soderlund-Venermo M., Tattersall P., Tijssen P., Consortium I.R. (2019): ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J. Gen. Virol.* 100: 367–368.
- Enders M., Weidner A., Zoellner I., Searle K., Enders G. (2004): Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases. *Prenat. Diagn.* 24: 513–518.
- Ganaie S.S., Qiu J. (2018): Recent Advances in Replication and Infection of Human Parvovirus B19. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8: 166.
- Gigi C.E., Anumba D.O.C. (2021): Parvovirus b19 infection in pregnancy – A review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 264: 358–362.
- Heegaard E.D., Brown K.E. (2002): Human parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 485–505.
- Ivanova S.K., Mihneva Z.G., Toshev A.K., Kovaleva V.P., Andonova L.G., Muller C.P., Hübschen J.M. (2016): „Insights into epidemiology of human parvovirus B19 and detection of an unusual genotype 2 variant, Bulgaria, 2004 to 2013. *Eurosurveillance* 21: 30116.
- Jain A., Kant R. (2018): Genotypes of erythrovirus B19, their geographical distribution & circulation in cases with various clinical manifestations. *Indian J. Med. Res.* 147: 239.
- Kühl U., Lassner D., Pauschinger M., Gross U.M., Seeberg B., Noutsias M., Poller W., Schultheiss H. (2008): Prevalence of erythrovirus genotypes in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy. *J. Med. Virol.* 80: 1243–1251.

- Leisi R., Ruprecht N., Kempf C., Ros C. (2013): Parvovirus B19 Uptake Is a Highly Selective Process Controlled by VP1u, a Novel Determinant of Viral Tropism. *J. Virol.* 87: 13161–13167.
- Lindblom A., Isa A., Norbeck O., Wolf S., Johansson B., Broliden K., Tolfvenstam T. (2005): Slow Clearance of Human Parvovirus B19 Viremia following Acute Infection. *Clin. Infect. Dis.* 41: 1201–1203.
- Luo Y., Qiu J. (2015): Human parvovirus B19: a mechanistic overview of infection and DNA replication. *Future Virol.* 10: 155–167.
- Manaresi E., Gallinella G. (2019): Advances in the Development of Antiviral Strategies against Parvovirus B19. *Viruses* 11: 659.
- Manaresi E., Gallinella G., Gentilomi G., Venturoli S., Zuffi E., Bonvicini F., Cricca M., Zerbini M., Musiani M. (2002): Humoral immune response to parvovirus B19 and serological diagnosis of B19 infection. *Clin. Lab.* 48: 201–205.
- Nastavni zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar (2023): Peta bolest. Dostupno na: <https://www.stampar.hr/hr/novosti/peta-bolest> [pristupljeno 31.07.2024.]
- Ojha K.K., Mishra S., Singh V.K. (2022): Computational molecular phylogeny: concepts and applications. *Bioinformatics* 67–89.
- Parsyan A., Szmardg C., Allain J.-P., Candotti D. (2007): Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. *J. Gen. Virol.* 88: 428–431.
- Pyöriä L., Toppinen M., Mäntylä E., Hedman L., Aaltonen L.-M., Vihinen-Ranta M., Ilmarinen T., Söderlund-Venermo M., Hedman K., Perdomo M.F. (2017): Extinct type of human parvovirus B19 persists in tonsillar B cells. *Nat. Commun.* 8: 14930.
- Qiu J., Söderlund-Venermo M., Young N.S. (2016): Human Parvoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 30: 43–113.

- Rahiala J., Koskenvuo M., Norja P., Meriluoto M., Toppinen M., Lahtinen A., Väisänen E., Waris M., Vuorinen T., Saarinen-Pihkala U. (2013): Human parvoviruses B19, PARV4 and bocavirus in pediatric patients with allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 48: 1308–1312.
- Reinheimer C., Allwinn R., Doerr H.W., Wittek M. (2010): Seroepidemiology of parvovirus B19 in the Frankfurt am Main area, Germany: evaluation of risk factors. *Infection* 38: 381–385.
- Sanchez J.L., Romero Z., Quinones A., Torgeson K.R., Horton N.C. (2016): DNA binding and cleavage by the human parvovirus B19 NS1 nuclease domain. *Biochemistry* 55: 6577–6593.
- Schneider B., Höne A., Tolba R.H., Fischer H.-P., Blümel J., Eis-Hübinger A.M. (2008): Simultaneous persistence of multiple genome variants of human parvovirus B19. *J. Gen. Virol.* 89: 164–176.
- Seetha D., Pillai H.R., Nori S.R.C., Kalpathodi S.G., Thulasi V.P., Nair R.R. (2021): Molecular-genetic characterization of human parvovirus B19 prevalent in Kerala State, India. *Virol. J.* 18: 96.
- Servant-Delmas A., Lefrère J.-J., Morinet F., Pillet S. (2010): Advances in Human B19 Erythrovirus Biology. *J. Virol.* 84: 9658–9665.
- Slavov S.N., Rodrigues E.S., Sauvage V., Caro V., Diefenbach C.F., Zimmermann A.M., Covas D.T., Laperche S., Kashima S. (2019): Parvovirus B19 seroprevalence, viral load, and genotype characterization in volunteer blood donors from southern Brazil. *J. Med. Virol.* 91: 1224–1231.
- Šimunov B., Mrzljak A., Jureković Z., Židovec Lepej S., Bainrauch A., Pavičić Šarić J., Hruškar Z., Radmanić L., Vilibić-Čavlek T. (2022): Parvovirus B19 status in liver, kidney and pancreas transplant candidates: A single center experience. *World J. Transplant.* 12: 378–387.
- Toan N.L., Duechting A., Kremsner P.G., Song L.H., Ebinger M., Aberle S., Binh V.Q., Duy D.N., Torresi J., Kandolf R. (2006): Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients. *J. Gen. Virol.* 87: 2941–2949.

- Toshev A., Ivanova S., Kovaleva V., Andonova L., Mihneva Z. (2014): Detection of Human parvovirus B19 (HPVB19) in serum samples from fever-rash ill individuals during the rubella outbreak (2005) in Bulgaria. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 28: 1103–1107.
- van Rijckevorsel G.G.C., Sonder G.J.B., Schim van der Loeff M.F., van den Hoek J.A.R. (2009): Population-based study on the seroprevalence of parvovirus B19 in Amsterdam. *J. Med. Virol.* 81: 1305–1309.
- Vilibić-Čavlek T., Tabain I., Kolarić B., Mihulja K., Blažević L., Bogdanić M., Navolan D., Belder N., Mrzljak A. (2021): Parvovirus B19 in Croatia: A Large-Scale Seroprevalence Study. *Medicina* 57: 1279.
- Vuković V., Patić A., Ristić M., Kovačević G., Hrnjaković Cvjetković I., Petrović V. (2024): Seroepidemiology of Human Parvovirus B19 Infection among the Population of Vojvodina, Serbia, over a 16-Year Period (2008–2023). *Viruses* 16: 180.
- Xiong Y., Tan J., Liu Y., He Q., Li L., Zou K., Sun X. (2019): The risk of maternal parvovirus B19 infection during pregnancy on fetal loss and fetal hydrops: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Virol.* 114: 12–20.
- Zakrzewska K., Arvia R., Bua G., Margheri F., Gallinella G. (2023): Parvovirus B19: Insights and implication for pathogenesis, prevention and therapy. *Asp. Mol. Med.* 1: 100007.
- Zakrzewska K., Arvia R., Torcia M.G., Clemente A.M., Tanturli M., Castronovo G., Sighinolfi G., Giuggioli D., Ferri C. (2019): Effects of parvovirus B19 in vitro infection on monocytes from patients with systemic sclerosis: enhanced inflammatory pathways by caspase-1 activation and cytokine production. *J. Invest. Dermatol.* 139: 2125–2133.
- Zakrzewska K., Corcioli F., Carlsen K.M., Giuggioli D., Fanci R., Rinieri A., Ferri C., Azzi A. (2009): Human parvovirus B19 (B19V) infection in systemic sclerosis patients. *Intervirology* 52: 279–282.
- Zhi N., Mills I.P., Lu J., Wong S., Filippone C., Brown K.E. (2006): Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J. Virol.* 80: 5941–5950.

8. Životopis

Rođena sam 26. prosinca 2000. godine u Zagrebu, gdje živim cijeli svoj život. Završila sam Osnovnu školu Brezovica 2015. godine, a maturirala 2019. godine u I. gimnaziji Zagreb, smjer Opća gimnazija. Iste godine upisala sam Preddiplomski sveučilišni studij Biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Po završetku preddiplomskog studija 2022. godine, zvanje sveučilišne prvostupnice biologije stekla sam izradom završnog rada na temu „Predacija bakterije *Bdellovibrio bacteriovorus* nad patogenim bakterijama čovjeka“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić. Te godine sam u istoj matičnoj ustanovi upisala Sveučilišni diplomski studij Molekularna biologija. Laboratorijsku stručnu praksu odrađivala sam u dva navrata, tijekom preddiplomskog studija na Zavodu za mikrobiologiju u trajanju od listopada 2021. do lipnja 2022. godine pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić te tijekom diplomskog studija na Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u trajanju od veljače do lipnja 2023. godine, pod mentorstvom nasl. izv. prof. dr. sc. Snježane Židovec Lepej. Kao pasivni sudionik pohađala sam konferenciju „Brain - Gut Axis“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te internacionalnu konferenciju Hrvatskog društva za istraživanje raka 2022. godine. Na trećem Hrvatskom simpoziju biologa u zdravstvu 2023. godine sudjelovala sam s posterskim priopćenjem na temu „Imunofenotipizacijski profil ispitanika zaraženih parvovirusom B19“ kao prvi autor, a 2024. godine na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja „SiSB“ održala sam pozvano predavanje na temu istraživanja „Changes in the natural killer cells percentage in newly diagnosed HIV-1 positive individuals“, također kao prvi autor. Sudjelovala sam u popularizaciji znanosti na manifestacijama „Noć biologije“ 2021. i 2022. godine te „Dan i noć na PMF-u“ 2024. godine. Tijekom trajanja studija bila sam članica Udruge studenata biologije BIUS. Osim materinjeg, tečno govorim engleski jezik, dok se talijanskim jezikom služim na A2 razini, a španjolskim i njemačkim na A1 razini. Posjedujem vozačku dozvolu B kategorije.