

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Petra Grubešić

PRIMJENA MOLEKULARNO-DIJAGNOSTIČKIH METODA U
DIJAGNOSTICI I LIJEČENJU PACIJENATA S
HERPESVIRUSNIM KERATITISOM

Doktorski rad

Rijeka, 2026.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

Petra Grubešić

PRIMJENA MOLEKULARNO-DIJAGNOSTIČKIH METODA U
DIJAGNOSTICI I LIJEČENJU PACIJENATA S
HERPESVIRUSNIM KERATITISOM

Doktorski rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tea Čaljkušić Mance, dr. med.

Komentor: prof. dr. sc. Igor Jurak

Rijeka, 2026.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Petra Grubešić

APPLICATION OF MOLECULAR DIAGNOSTIC METHODS IN
THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PATIENTS WITH
HERPESVIRUS KERATITIS

Doctoral thesis

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tea Čaljkušić Mance, MD, PhD

Co-mentor: prof. dr. sc. Igor Jurak, PhD

Rijeka, 2026.

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Tea Čaljkusić Mance, dr. med.

Komentor rada: prof. dr. sc. Igor Jurak

Doktorska disertacija obranjena je dana _____ u/na _____
_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____ (titula, ime i prezime)

2. _____ (titula, ime i prezime)

3. _____ (titula, ime i prezime)

4. _____ (titula, ime i prezime)

5. _____ (titula, ime i prezime)

Rad ima _____ listova.

UDK: _____

PREDGOVOR:

Istraživanje na kojem se temelji ovaj doktorski rad provedeno je u okviru projekta Sveučilišta u Rijeci „Ekspresija i funkcija miR-H1 herpes simpleks virusa 1 “ pod vodstvom prof. dr. sc. Igora Juraka, na Fakultetu biotehnologije i razvoja lijekova, Sveučilište u Rijeci.

ZAHVALA:

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Tei Čaljkusić Mance na ukazanom povjerenju i podršci tijekom izrade doktorskog rada. Također zahvaljujem komentoru prof. dr. sc. Igoru Juraku na izuzetnoj stručnoj pomoći i potpori. Približili ste mi svijet molekularne dijagnostike na meni razumljiv način. Uz to hvala Vašem timu u virološkom laboratoriju na uloženom trudu i vremenu.

Hvala kolegici Tamari Paravić na prikupljanju podataka i zajedničkom vremenu koji su mi bili dragocjeni. Također ovim doktoratom želim svojim mlađim kolegama dati vjetar u leđa da budu uporni i posvete se izradi svojeg doktorskog rada.

Hvala mojoj obitelji koja je uvijek bila tu uz mene i vjerovala u moj uspjeh. Draga mama, bez tvoje pomoći ovaj rad ne bi bio moguć.

Posebna zahvala mom suprugu Aronu na nesebičnoj ljubavi. Svojim znanjem i savjetima uvelike si doprinio izradi rada. Hvala ti još jednom.

Ovaj doktorski rad posvećujem svojim curicama Kali i Hani koje su se trudile biti strpljive i poslušne. Vi ste moja najveća motivacija.

SAŽETAK: Cilj istraživanja: Herpetični keratitis (HSK) najčešći je infektivni uzročnik oštećenja vidne oštine (VO) u svijetu zbog nastanka ožiljka rožnice. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi povezanost kliničke prezentacije HSK-a s ishodima testa lančane reakcije polimerazom (PCR), usporediti konvencionalni PCR s testom kvantitativnog PCR u realnom vremenu (qPCR) te analizirati postojanje mutacija u genima UL23 (timidin kinaza, TK) i UL30 (DNK polimeraza) koje uzrokuju rezistenciju herpes simpleks virusa (HSV) na aciklovir (ACV) kod pacijenata s HSK-om. Dodatno, cilj je bio uspostaviti molekularnu dijagnostiku HSK na Klinici za oftalmologiju KBC-a Rijeka uvođenjem PCR testiranja kao standardnog dijagnostičkog protokola. **Ispitanici i metode:** U studiju je uključeno 55 pacijenata s kliničkim obilježjima HSK-a te odgovarajuća kontrolna skupina. Za svakog pacijenta prikupljeni su klinički podaci. Strugotine rožnice obrađene su konvencionalnim PCR-om i qPCR-om radi kvalitativne i kvantitativne detekcije HSV-1 DNK. Sekvencirani su virusni geni UL23 (TK) i UL30 (DNK polimeraza) Sangerovom metodom kako bi se otkrile mutacije povezane s rezistencijom na ACV. **Rezultati:** PCR testiranje pokazalo je prisutnost HSV-1 DNK u značajnom dijelu uzoraka (52,7 %), pri čemu su površinski (epitelni) oblici HSK-a imali znatno višu stopu PCR pozitivnosti u odnosu na dublje (stromalne i endotelne) oblike HSK-a (63,3 % naspram 13,3 %; $\chi^2 = 9,17$; $p = 0,0025$). Dendritički oblik HSK-a (HSK-D) bio je najčešće PCR pozitivan (76,0 % slučajeva), dok su stromalni oblik HSK-a bez epitelne ulceracije (HSK-SnEU) i endotelni oblik HSK-a (HSK-En) pokazali najnižu stopu detekcije (11,1 % odnosno 16,7 %). Prethodno liječenje ACV-om statistički je značajno smanjilo vjerojatnost PCR pozitivnosti, neovisno o kliničkom obliku bolesti ($p < 0,01$). qPCR metoda omogućila je bržu, istodobnu amplifikaciju i detekciju virusne DNK u jednoj reakciji, uz kraće ukupno trajanje analize u usporedbi s konvencionalnim PCR-om. Istovremeno je osigurala kvantifikaciju virusnog opterećenja, no bila je potrebna dodatna optimizacija zbog pojave nespecifične fluorescencije pri vrlo niskim razinama virusne DNK (problem riješen analizom krivulje topljenja). Sekvenciranje gena UL23 i UL30 u uzorcima pacijenata koji su primali ACV terapiju nije otkrilo mutacije povezane s rezistencijom. **Zaključak:** Uspostavljena konvencionalna PCR metoda pokazala je visoku osjetljivost i specifičnost u detekciji HSV-1 DNK te se može smatrati pouzdanom metodom za rutinsku laboratorijsku dijagnostiku HSK-a. Primjena qPCR metode omogućuje bržu detekciju i istodobnu kvantifikaciju virusnog opterećenja, čime predstavlja značajno unaprjeđenje molekularne dijagnostike HSK-a. Sekvenciranje gena UL23 i UL30 omogućuje detekciju mutacija povezanih s rezistencijom HSV-a na ACV te može pomoći u pravovremenoj prilagodbi terapije. **Ključne riječi:** Aciklovir; Herpetični keratitis; Lančana reakcija polimerazom; Rezistencija na lijek

SUMMARY: Objectives: This study aimed to determine the relationship between the clinical presentation of herpes simplex keratitis (HSK) and polymerase chain reaction (PCR) testing results, to compare conventional PCR with real-time quantitative PCR (qPCR), and to analyze the presence of mutations in the UL23 (thymidine kinase) and UL30 (DNA polymerase) genes that confer resistance to acyclovir (ACV) in HSK patients. An additional goal was to establish molecular diagnostic testing for HSV keratitis at our institution by introducing PCR-based viral detection as standard diagnostic procedures. **Patients and Methods:** The study included 55 patients with clinical features of HSK, along with a control group. Clinical data were collected for each patient. Corneal scrapings were analyzed by conventional PCR and qPCR for qualitative and quantitative detection of HSV-1 DNA. Viral UL23 (TK) and UL30 (DNA polymerase) genes were amplified and Sanger sequenced to identify mutations associated with ACV resistance. **Results:** PCR testing for HSV-1 DNA was positive in a substantial proportion of cases, with significantly higher detection rates in superficial (epithelial) forms of HSK compared to deeper stromal/endothelial forms (63.3 % vs 13.3 %, respectively; $p = 0.0025$). Dendritic HSK (HSK-D) exhibited the highest PCR positivity (76,0 % of cases), whereas stromal non-ulcerative (HSK-SnEU) and endothelitis forms (HSK-En) had the lowest (11,1 % and 16,7 %, respectively). Prior ACV treatment was identified as an independent factor associated with reduced PCR positivity ($p < 0.01$). The qPCR method enabled rapid, one-step amplification and detection of viral DNA, considerably shortening the overall processing time relative to standard PCR. It also provided viral load quantification; however, optimization was required to eliminate non-specific fluorescence signals at very low viral DNA levels (resolved through melt-curve analysis). Sequencing of UL23 and UL30 genes from samples (including those of ACV-pretreated patients) revealed no mutations associated with ACV resistance. **Conclusion:** The established conventional PCR method demonstrated high sensitivity and specificity in the detection of HSV-1 DNA and can be considered a reliable method for routine laboratory diagnostics of HSK. The application of the qPCR method enables faster detection and simultaneous quantification of viral load, thereby representing a significant improvement in the molecular diagnostics of HSK. Sequencing of the UL23 and UL30 genes enables the detection of mutations associated with HSV resistance to ACV and can help in the timely adjustment of therapy. **Key words:** Acyclovir; Drug resistance; Herpetic keratitis; Polymerase chain reaction

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Herpes simpleks virus (HSV)	1
1.1.1. Patogeneza infekcije HSV-om.....	1
1.1.2. Uspostava faze latencije HSV-a.....	2
1.1.3. Reaktivacija latentne HSV infekcije	3
1.2. Epidemiologija HSK-a.....	4
1.3. Kliničke manifestacije i klasifikacija HSK-a na temelju smjernica Američke akademije za oftalmologiju (AAO)	5
1.4. Suvremene metode dijagnostike HSK-a	7
1.4.1. Metode neizravne virološke dijagnostike	7
1.4.1.1. Serološke pretrage za dokazivanje protutijela na antigene HSV-a.....	7
1.4.2. Metode izravne virološke dijagnostike	7
1.4.2.1. Izolacija virusa u staničnoj kulturi	7
1.4.2.2. Imunofluorescentne metode (IF) za dokazivanje antigena HSV-a.....	8
1.4.2.3. Imunoenzimski test (ELISA) za detekciju antigena HSV-a	9
1.4.2.4. Molekularna dijagnostika HSK-a pomoću PCR-a i qPCR-a	9
1.5. Standardi liječenja HSK-a.....	12
1.5.1. Antivirusna terapija.....	12
1.5.2. Kortikosteroidna terapija	13
1.5.3. Potporne mjere u liječenju HSK-a	14
1.5.4. Potencijalni novi lijekovi u liječenju HSK-a	14
1.5.5. Personalizirani pristup liječenja HSK-a prema kliničkom obliku	16
1.5.5.1. Liječenje HSK-E oblika (HSK-D i HSK-G).....	16
1.5.5.2. Liječenje HSK-S oblika (HSK-SEU i HSK-SnEU).....	17
1.5.5.3. Liječenje HSK-En oblika	18
1.6. Profilaksa HSK-a	19
1.7. Komplikacije HSK-a.....	20
1.7.1. Ožiljak rožnice	21
1.7.2. Neovaskularizacija rožnice (NV).....	22
1.7.3. Sekundarni glaukom	24

1.7.4. Perzistentni epitelni defekt (PED)	24
1.8. Rezistencija na aciklovir (ACV)	26
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	30
2.1. Cilj istraživanja	30
2.2. Hipoteza	30
3. ISPITANICI I METODE	31
3.1. Ispitanici	31
3.1.1. Odabir ispitanika za uključivanje u studiju prema kliničkim parametrima	31
3.2. Metode	34
3.2.1. Virusni sojevi i stanične kulture	34
3.2.2. Uzorkovanje rožnice i izolacija DNK	34
3.2.3. PCR analiza i elektroforeza u agaroznom gelu	35
3.2.4. Razvoj i validacija PCR protokola za detekciju HSV-1 u kliničkim uzorcima	35
3.2.4.1. Selekcija početnica za specifičnu PCR amplifikaciju HSV-1 genoma	36
3.2.4.2. Optimizacija PCR protokola: primjena touch-down metode i određivanje optimalne temperature sparivanja	36
3.2.4.3. Procjena osjetljivosti i specifičnosti PCR protokola	38
3.2.5. Optimizacija kvantitativne PCR metode (qPCR)	38
3.2.6. Analiza gena UL23 i UL30	38
3.2.7. Indeks rizika za procjenu rezistencije HSV-a na ACV	40
3.3. Statistička obrada podataka	41
3.3.1. Molekularna dijagnostika HSV-a i kriteriji interpretacije PCR nalaza	41
3.3.2. Metode statističke analize	42
3.3.2.1. Deskriptivna analiza	42
3.3.2.2. Analiza razlika među skupinama	42
3.3.2.3. Korelacijska analiza	42
3.3.2.4. Multivarijantna analiza	42
3.4. Etički aspekti istraživanja	42
4. REZULTATI	43
4.1. Demografske karakteristike pacijenata	43

4.1.1. Dob i spol pacijenata.....	43
4.2. Validacija i optimizacija PCR protokola	43
4.2.1. Inicijalna amplifikacija ciljnih HSV-1 gena	43
4.2.2. Optimizacija temperature sparivanja	45
4.2.3. Procjena analitičke osjetljivosti i specifičnosti PCR protokola	47
4.3. Raspodjela kliničkih oblika HSK-a	49
4.4. Učestalost reaktivacija HSK-a	50
4.5. Utjecaj vremena uzorkovanja na PCR detekciju HSV-a	52
4.6. Vidna oštrina (VO) prije i poslije liječenja	52
4.7. Trajanje antivirusnog liječenja ACV-om.....	54
4.8. Komplikacije HSK-a.....	56
4.9. Primjena sustava prediktivnog modela za procjenu rezistencije na ACV	56
4.10. Usporedba PCR i qPCR metode u dijagnostici HSK.....	57
4.11. Rezultati analize gena UL23 i UL30	60
5. RASPRAVA	61
6. ZAKLJUČCI.....	73
7. LITERATURA	75
Popis tablica	82
Popis slika	82
POPIS POKRATA.....	83
ŽIVOTOPIS.....	84

1. UVOD

1.1. Herpes simpleks virus (HSV)

Herpes simpleks virus tip 1 (HSV-1) pripada obitelji *Orthoherpesviridae* i podobitelji *Alphaherpesvirinae* zajedno sa herpes simpleks virusom tipa 2 (HSV-2) i virusom varicella-zoster (VZV) [1] [2]. Sva tri virusa su neurotropna i imaju sposobnost ostati latentna u senzornim i autonomnim ganglijima, iz kojih se mogu povremeno reaktivirati, čineći domaćina doživotnim prijenosnikom [3].

HSV-1 je ovijeni dvolančani DNK (deoksiribonukleinska kiselina) virus složene građe. Posjeduje lipidnu ovojnici s glikoproteinima, tegument te kapsidu koja obavija DNK genom [4]. Poznata su dva tipa HSV-a, (HSV-1 i HSV-2) koji su antigeno srodni. HSV-1 najčešće uzrokuje orofacijalne i okularne infekcije, dok je HSV-2 povezaniji s genitalnim infekcijama premda oba tipa mogu uzrokovati infekcije u bilo kojoj regiji [5]. Infekcija HSV-om jedna je od najraširenijih u svijetu te se procjenjuje da je preko dvije trećine svjetske populacije do 50. godine života seropozitivno na HSV-1 [4].

1.1.1. Patogeneza infekcije HSV-om

HSV se najčešće prenosi kapljicama zaraženih izlučevina, poput suza ili sline te izravnim kontaktom s kožnim lezijama. Iako HSV-1 primarno pokazuje tropizam prema trigeminalnom gangliju, a HSV-2 prema sakralnom gangliju, oba tipa virusa mogu biti uzročnici očnih infekcija. Ova činjenica ima kliničku važnost jer zahtijeva uključivanje oba tipa HSV-a u diferencijalnu dijagnozu herpetičnih keratitisa (HSK), neovisno o uobičajenoj anatomske lokalizaciji njihove latencije [1-4].

Primarna infekcija HSV-om često prolazi supklinički ili s blagim simptomima. U slučaju primoinfekcije oka, tipična manifestacija može biti akutni HSV konjunktivitis ili blefarokonjunktivitis, dok se primarni HSK rjeđe opaža (zabilježen je u oko 15% primarnih očnih infekcija) [5]. Nakon uspostave virusne latencije, rekurentne infekcije predstavljaju najčešću i klinički najznačajniju manifestaciju HSV-a na oku. Ponovne epizode mogu zahvatiti različite strukture oka, pri čemu je rožnica najčešće zahvaćena [5, 6]. Patogeneza HSK-a određena je slojem rožnice koji je zahvaćen infekcijom. Epitelni oblik HSK-a (HSK-E) rezultat je izravnog citopatskog učinka HSV-a, pri čemu dolazi do replikacije virusa unutar epitelnih stanica rožnice. S druge strane, stromalni HSK (HSK-S) primarno je imunološki posredovana bolest te se smatra da nastaje kao posljedica reakcije preosjetljivosti odgođenog tipa na virusne

antigene zaostale u rožnici. Ta imunološka aktivacija dovodi do infiltracije upalnih stanica i oštećenja stromalnog tkiva, često u odsutnosti aktivne virusne replikacije [5, 6]. HSV može uzrokovati i infekciju najdubljeg endotelno sloja rožnice (HSK-En) kod kojeg također važnu ulogu ima imunološka reakcija [5-7].

Ponavljane infekcije i upale dovode do trajnog oštećenja rožnice. Kronične promjene uključuju smanjenje osjeta rožnice (zbog oštećenja n. trigeminusa), neurotrofične ulkuse, vaskularizaciju i zamućenje rožnice [8, 9]. Svakom epizodom HSK-a dodatno se oštećuje rožnica, gubi se njezina prozirnost što dovodi do pada vidne oštine (VO). Zapravo, HSK-S jedan je od vodećih uzroka sljepoće rožnice u razvijenim zemljama [5]. Globalno gledano, procjenjuje se da HSV uzrokuje oko 1,5 milijuna novih slučajeva očnih infekcija godišnje, od kojih približno 40 tisuća rezultira trajnim oštećenjem vida [4]. Stoga HSV infekcije predstavljaju veliki javnozdravstveni problem, što je posljedica i činjenice da unatoč desetljećima istraživanja još uvijek ne postoji odobreno cjepivo koje bi spriječilo HSV infekcije [10]. Patogeneza infekcije HSV-om složena je i temelji se na sposobnosti virusa da uspostavi latenciju u osjetnim ganglijima nakon primarne infekcije epitela te da se povremeno reaktivira. Ključnu ulogu u perzistenciji virusa imaju mehanizmi imunoevazije. HSV inhibira signalne puteve interferona tipa I (IFN-I), čime smanjuje antivirusni odgovor stanice, te ometa aktivaciju transkripcijskih faktora uključenih u urođeni imunitet. Istodobno smanjuje prezentaciju virusnih antigena putem MHC (od engl. *Major Histocompatibility Complex*) molekula [10, 11], osobito MHC klase I, čime izbjegava prepoznavanje od strane citotoksičnih limfocita T, a dodatno koristi virusne proteine i mikroRNK za modulaciju apoptoze i upalnog odgovora.

Zahvaljujući tim strategijama, HSV uspijeva uspostaviti latenciju u osjetnim ganglijima, s mogućnošću periodične reaktivacije bez potpune eliminacije. Ta sposobnost perzistencije, uz izbjegavanje imunološkog nadzora, predstavlja ključnu prepreku u razvoju učinkovitog cjepiva ili kurativne terapije. Iako je predmet brojnih istraživanja, HSV cjepivo još uvijek ne postoji, a infekcija HSV-1 prisutna je kod više od dvije trećine svjetske populacije. Stoga se suvremeni terapijski pristupi usmjeravaju na kontrolu virusne replikacije i upale te sprječavanje recidiva što će biti obrađeno u nastavku rada [10-12].

1.1.2. Uspostava faze latencija HSV-a

HSV ulazi u stanicu domaćina posredstvom glikoproteina smještenih u virusnoj ovojnici. Inicijalna adhezija ostvaruje se vezanjem glikoproteina gB i gC za heparan-sulfatne receptore na površini stanice. Nakon toga glikoprotein gD stupa u interakciju sa specifičnim staničnim receptorima, poput nektina-1 na neuronima ili HVEM-a (posrednik ulaska herpes virusa od

engl. *Herpesvirus entry mediator*) na epitelnim stanicama, čime se omogućuje fuzija virusne ovojnice sa staničnom membranom i ulazak virusa u citoplazmu.

Virusni genom i proteini zatim se unose u jezgru gdje preuzimaju stanične mehanizme za transkripciju i replikaciju. Rezultat akutne (litičke) infekcije je stvaranje novih virusnih čestica koje dovode do dezintegracije stanica domaćina i širenja na okolne stanice [4, 12-14].

Nakon infekcije orofacijalnog područja, HSV se retrogradno transportira aksonima osjetnog živca do odgovarajućeg senzornog ganglija gdje prelazi u latentno stanje [4, 10, 12-14]. Latencija predstavlja sposobnost HSV-a da održi barem jedan intaktan virusni genom unutar jezgre stanice domaćina, bez aktivne replikacije i stvaranja novih virusnih čestica. U tom stanju, genom DNK od 152 kb (kilobaza, od engl. *kilobase pair*) održava se kao više kopija kružnih episoma, za razliku od linearnog oblika koji se nalazi u virusnoj čestici [3]. Latencija se javlja kao dio ciklusa od tri koraka: uspostavljanje, održavanje i reaktivacije. U fazi latencije virusni genom je transkripcijski potisnut, osim za regiju koja kodira dugačku nekodirajuću RNK (ribonukleinska kiselina) molekulu (lncRNA, od engl. *Long non-coding RNA*) tj. glavni marker HSV-1 latencije LAT (od engl. *Latency associated transcript*) i veliki broj miRNK (mikroRNK, od engl. *microRNA*). Virus tako "skriven" izmiče imunološkom nadzoru, a u domaćinu perzistira doživotno [3, 15].

LAT-u se pripisuje niz važnih funkcija, iako njihovi točni mehanizmi djelovanja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Smatra se da LAT sudjeluje u regulaciji reaktivacije HSV-a, uspostavljanju i održavanju latencije, povećanju preživljavanja virusa i njegove virulencije, kao i u sprječavanju apoptoze te neuroprotektivnim procesima koji omogućuju dugotrajnu perzistenciju virusa u živčanim stanicama domaćina [16]. Druga faza latencije, tj. faza održavanja, traje cijeli život domaćina. U tom razdoblju zabilježena je obilna ekspresija samo LAT transkripata, dok je ekspresija ostalih virusnih gena u velikoj mjeri potisnuta. Uz LAT, u latentno inficiranim neuronima prisutne su i virusne miRNK, koje dodatno doprinose suzbijanju litičke replikacije i stabilnosti latentnog stanja [17]. Treća faza latencije, tj. faza reaktivacije, može biti spontana ili inducirana vanjskim podražajima poput vrućice, psihičkog stresa, umora, hipotermije, hipertermije. Tada se virusne čestice anterogradnim transportom prenose duž aksona prema periferiji, što rezultira reaktivacijom infekcije i ponovnim pojavljivanjem kliničke bolesti [18].

1.1.3. Reaktivacija latentne HSV infekcije

Reaktivacija je ključna faza u životnom ciklusu HSV-a, jer omogućuje virusu dovršetak replikacijskog ciklusa i prijenos na nove stanice domaćina. Međutim, ona ne zahvaća sve

latentno inficirane neurone istovremeno; naprotiv, reaktivacija je sporadičan i lokaliziran događaj koji se javlja samo u ograničenom broju neurona unutar senzornog ganglija [19, 20]. Učestalost reaktivacije pozitivno korelira sa količinom latentno zaraženih stanica trigeminalnog ganglija [21, 22]. Precizni molekularni mehanizmi koji reguliraju reaktivaciju HSV-a još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Ipak, pokazano je da određene mutacije u genomu HSV-a, koje nepovoljno utječu na održavanje latencije ili na sposobnost virusne replikacije, mogu značajno modulirati proces reaktivacije. Enzim timidin kinaza (TK) je potreban za ekspresiju litičkih gena u HSV-1 [21].

Imunosni sustav ima ključnu ulogu u održavanju HSV-a u latentnom stanju. Citotoksični CD8+ T limfociti te lokalno producirani citokini doprinose kontroli virusne aktivnosti u osjetnim ganglijima i sprječavaju reaktivaciju. Međutim, oslabljen lokalni ili sistemski imunوسي odgovor, uslijed stresa, bolesti ili imunosupresije, može narušiti tu ravnotežu i omogućiti reaktivaciju virusa iz latencije. Važno je napomenuti da za razliku od primarne infekcije, rekurentne epizode HSV-a obično se javljaju u istom dermatomu, odnosno području koje inervira zahvaćeni senzorni ganglij. Tako latentni HSV-1 u trigeminalnom gangliju najčešće uzrokuje ponovne lezije na oku ili usnici [5]. Međutim, sve je više dokaza da se reaktivacija HSV-a može dogoditi i u odsutnosti poznatih okidača, djelomično zbog učestalog asimptomatskog izlučivanja virusa (od engl. *viral shedding*) [23, 24]. Reaktivacija bi tada mogla biti posljedica faktora stanice domaćina, a ne isključivo ekspresije gena HSV-1 [25]. U usporedbi s primarnom infekcijom, vrijeme ponovnog pojavljivanja je kraće zbog bržeg stečenog imunološkog odgovora [10, 26]. Većina rekurentnih epizoda nastaje reaktivacijom latentnog HSV-a, no pojedine studije ukazuju da se na istom mjestu može dogoditi i reinfekcija s novim sojem virusa [3].

1.2. Epidemiologija HSK-a

Na svjetskoj razini godišnje ima oko 1 000 000 novih slučajeva te 9 000 000 rekurentnih slučajeva očnih HSV infekcija [6]. Prevalencija HSK u razvijenim zemljama je 150 na 100 000 stanovnika, dok je godišnja incidencija oko 10 – 30 na 100 000 stanovnika. HSK je ozbiljan javnozdravstveni problem te je odgovoran za 40 000 slučajeva teškog jednostranog oštećenja vida ili sljepoće u svijetu [7, 27]. Prema multicentričnoj prospektivnoj studiji u Francuskoj koja je provedena 2002. godine incidencija prvih epizoda HSK-a bila je 13,2 na 100 000 osoba godišnje, a rekurentni slučajevi HSK-a (rHSK) procijenjeni su na 31,5 na 100 000 osoba godišnje [28].

HSV-1 i HSV-2 inficiraju do 90 % odraslih osoba u svijetu, s time da samo HSV-1 zarazi 66 % svjetske populacije. Iako je oko 50 - 90 % stanovništva seropozitivno na protutijela HSV, ovisno o dobi i zemlji, većina ljudi je asimptomatska [7, 27]. U nekim dijelovima svijeta, poput Latinske Amerike i subsaharske Afrike, prevalencija HSV-1 prelazi i 90 % [29]. Ipak, epidemiološki podaci za HSK izvan razvijenih zemalja ograničeni su; pretpostavlja se da je incidencija veća u zemljama u razvoju zbog više stope infekcije HSV. U nekim populacijama zabilježen je porast incidencije HSK-a tijekom vremena. Retrospektivne studije u gradu Rochester u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) pokazale su povećanje godišnje incidencije novih očnih HSV slučajeva s 8,4 na 11,8 na 100 000 stanovnika godišnje. Kao moguće objašnjenje navodi se dulji životni vijek (više vremena za reaktivacije) i promjene u izloženosti virusu [28, 30]. Naposljetku, HSK predstavlja značajan globalni teret bolesti jer zahtijeva česte posjete oftalmologu i odgovoran je za značajan gubitak rada i produktivnosti. Kada je trajno, oštećenje rožnice od HSK-a može zahtijevati kiruršku intervenciju i rezultirati u više od 1000 penetrantnih keratoplastika godišnje u SAD-u [6].

Na temelju ovih podataka, procijenjenih 58 milijuna dana rada (444 000 u SAD-u) izgubljeno je u liječenju HSK-a u cijelom svijetu svake godine [6, 30]. Prosječno vrijeme od pojave simptoma do povlačenja aktivne očne HSV infekcije procijenjeno je na 17,6 dana za prvu epizodu i 28,4 dana za ponavljajuće epizode [6, 28]. Istraživanjem literature došli smo do zaključka o malo dostupnih studija koje su se bavile epidemiološkim karakteristikama HSK-a. Treba imati na umu da će, kako populacija sve više stari, teret povezan sa smanjenom vidnom funkcijom, gubitkom radne produktivnosti te povećanom potrebom za redovitim oftalmološkim praćenjem i liječenjem također značajno rasti [28].

1.3. Kliničke manifestacije i klasifikacija HSK-a na temelju smjernica Američke akademije za oftalmologiju (AAO)

Ispravna klasifikacija bolesti ključ je uspješnog i pravovremenog izlječenja. HSK pravi je primjer takvog pristupa jer, zbog svojih brojnih kliničkih prezentacija, terapijski algoritam uvelike ovisi o točnom klasificiranju oblika HSK-a, što izravno određuje protokol liječenja. Pregledom literature uočava se niz različitih termina kojima su se opisivali pojedini oblici HSK-a, što je dodatno doprinosilo konfuziji u nomenklaturi te naglasilo potrebu za jedinstvenom i uniformnom klasifikacijom. Ta je potreba vrlo uspješno riješena objavom klasifikacije Američke akademije za oftalmologiju (AAO) iz 2014. godine, koja se temelji na

sloju rožnice zahvaćenom bolešću, a u samoj tablici navedeni su i brojni ranije netočno korišteni nazivi [6].

Prema klasifikaciji AAO, epitelni herpetični keratitis (HSK-E) dijeli se na dendritički oblik (HSK-D) i geografski oblik (HSK-G), pri čemu su oba uzrokovana aktivnom replikacijom virusa na površini rožnice. HSK-S se dijeli se na stromalni oblik HSK-a sa epitelnom ulceracijom (HSK-SEU) ili stromalni oblik bez epitelne ulceracije (HSK-SnEU) ovisno o nalazu fluoresceinskog testa. Kod HSK-En prisutna je upala u obliku stromalnog i epitelnog edema sa precipitatima ali bez ostalih promjena vezanih za prednju uveitis [6].

Ova klasifikacija ima značajnu ulogu u pojednostavljivanju postavljanja dijagnoze i primjene odgovarajućih terapijskih protokola. Kao što je ranije istaknuto, osobit prijepor u nomenklaturi predstavlja HSK-S, koji mnogi oftalmolozi pogrešno klasificiraju kao „imuno stromalni”, čime se stvara pogrešan dojam da nisu svi oblici HSK-S posredovani imunološkim mehanizmima. Dodatno, rožnica za koju se pretpostavlja da je zahvaćena stromalnim nekrotizirajućim HSK-om ne mora uvijek imati stvarnu nekrozu, iako sam termin to sugerira. U osnovi, HSK-S predstavlja inflamatornu bolest u kojoj kemokini imaju ključnu ulogu u migraciji leukocita prema mjestu infekcije i upale, dok citokini aktiviraju stanice uključene u destrukciju tkiva. Smatra se da je bolest rezultat kompleksne interakcije između virusa i imunološkog sustava domaćina, a ne izravne virusne citolize stanica rožnice [31]. Slična nepreciznost u terminologiji prisutna je i kod HSK-E, koji se u literaturi često opisuju kao disciformni. Međutim, disciformni keratitis predstavlja samo jedan oblik kliničke prezentacije HSK-E, dok u drugim slučajevima može biti zahvaćen cijeli endotel. Dodatnu konfuziju stvara činjenica da pojedini autori termin disciformni koriste i za opis HSK-S [6]. Upravo zbog ovakvih nejasnoća navedena klasifikacija HSK-a trebala bi poslužiti kao standardna osnova za sve oftalmologe, kako bi se u kliničkoj praksi koristila uniformna i ispravna terminologija (Tablica 1).

Tablica 1. Klasifikacija HSK-a prema smjernicama AAO. HSV - herpes simplex virus, HSK - herpetični keratitis, AAO - Američka akademija za oftalmologiju (od engl. American Academy of Ophthalmology).

Sloj rožnice	Nomenklatura	Alternativni nazivi
Epitel	HSV epitelni keratitis	Dendritički epitelni ulkus
		Geografski epitelni ulkus
Stroma	HSV stromalni keratitis bez ulceracije	Ne-nekrotizirajući keratitis, Intersticijski keratitis, Imuno stromalni keratitis
	HSV stromalni keratitis sa ulceracijom	Nekrotizirajući keratitis
Endotel	HSV endotelni keratitis	Disciformni keratitis

1.4. Suvremene metode dijagnostike HSK-a

Dijagnoza HSK-a u pravilu se postavlja klinički, oslanjajući se na anamnezu i tipične biomikroskopske nalaze, poput dendritičnog ulkusa rožnice karakterističnog za HSK-E. Ipak, u atipičnim ili nejasnim slučajevima preporučuje se potvrda HSV infekcije. Budući da je riječ o bolesti obilježenoj kroničnim tijekom s fazama latencije i rekurencije, smatra se da bi svaki pacijent s dijagnozom HSK-a barem jednom tijekom bolesti trebao imati etiološki potvrđenu dijagnozu. Time bi se i potvrdila ispravnost provođenja odgovarajuće terapije koja ponekad traje i do godinu dana. U ovom odjeljku raspravljati ćemo o karakteristikama i ograničenjima korištenih dijagnostičkih testova.

1.4.1. Metode neizravne virološke dijagnostike

1.4.1.1. Serološke pretrage za dokazivanje protutijela na antigene HSV-a

Serološka dijagnostika HSV infekcije temelji se na detekciji specifičnih protutijela razreda imunoglobulina M (IgM) i imunoglobulina G (IgG). Međutim, u dijagnostici HSK-a njezina je vrijednost ograničena, budući da se HSK gotovo uvijek javlja kao rekurentna infekcija u osoba koje su već ranije bile izložene HSV-u. U većine odraslih pacijenata s HSK-om prisutan je pozitivan nalaz IgG protutijela na HSV-1, što odražava prethodnu izloženost virusu, ali samo po sebi ne potvrđuje aktivnu infekciju. Međutim, dinamika titra HSV-1 IgG protutijela u parnim uzorcima seruma može upućivati na reaktivaciju virusa. IgM protutijela mogu biti prisutna tijekom primoinfekcije ili reaktivacije HSV-a, no zbog ograničene pouzdanosti ne preporučuju se za rutinsku dijagnostičku primjenu. Ipak, serologija može imati dijagnostičku vrijednost u posebnim slučajevima, osobito u pedijatrijskoj populaciji. Ako dijete nema detektabilna IgG ni IgM protutijela, vjerojatnost HSK-a je niska i treba razmotriti druge

diferencijalne dijagnoze [36]. Pozitivan nalaz HSV specifičnih IgM protutijela u serumu djeteta s kliničkom slikom HSK-a može biti u skladu s primarnom infekcijom, ali sam po sebi nije dijagnostički dovoljan. Stoga prema smjernicama, serologija ima sporednu ulogu u dijagnostici HSK-a, osim u slučajevima sumnje na primoinfekciju u pedijatrijskoj populaciji [6].

1.4.2. Metode izravne virološke dijagnostike

1.4.2.1. Izolacija virusa u staničnoj kulturi

Izolacija virusa tradicionalno se smatrala "zlatnim standardom" za dijagnozu HSK-a [6, 32]. Uzorci poput strugotina rožnice, tekućine iz vezikula ili suza inokuliraju se na osjetljive stanične linije. Infekcija se prati mikroskopski kroz razvoj citopatskog efekta (CPE), karakterističnog za HSV, koji uključuje zaobljavanje stanica, spajanje više stanica u multinuklearne strukture i lizu stanica. Prednosti kulture su vrlo visoka specifičnost, gotovo 100 %. Osjetljivost izolacije virusa u staničnoj kulturi u HSK-E obično iznosi 50 – 70 %, dok je u stromalnim i endotelnim oblicima (HSK-S i HSK-En) znatno niža te najčešće manja od 30 %. Uz to izolacija virusa može trajati više dana, čak do 10 dana, što odgađa potvrdu dijagnoze. Potrebno je pravilno rukovati uzorkom (držati ga na 4 °C tijekom transporta) kako bi se održala vijabilnost virusa. Danas je virusna kultivacija u rutinskim laboratorijima sve rjeđa zbog uvođenja brzih molekularnih testova; uglavnom je dostupna u referentnim laboratorijima ili u sklopu istraživanja [6, 32, 33].

1.4.2.2. Imunofluorescentne metode (IF) za dokazivanje antigena HSV-a

Imunofluorescentne (IF) metode koriste fluorescentno obilježena protutijela koja prepoznaju antigene HSV-a u uzorku rožnice. Postoje dvije glavne tehnike: direktna (izravna) i indirektna (neizravna) IF metoda. Direktna (izravna) imunofluorescencija (DFA) koristi jedno protutijelo, konjugirano s fluoroforom. Protutijelo prepoznaje ciljnu molekulu (antigen) i veže se na specifično područje koje se naziva epitop. Priloženi fluorofor može se detektirati fluorescentnom mikroskopijom, koja će, ovisno o vrsti fluorofora, emitirati određenu valnu duljinu svjetlosti nakon pobuđivanja [34, 35]. Indirektna imunofluorescencija (IFA) je metoda u kojoj se primarno protutijelo specifično veže za epitop ciljne molekule, dok sekundarno protutijelo, konjugirano s fluoroforom, prepoznaje i veže primarno protutijelo. Zbog mogućnosti vezanja više sekundarnih protutijela na jedno primarno protutijelo, IFA pokazuje veću osjetljivost, ali potencijalno nižu specifičnost u usporedbi s DFA-om. DFA se radi toga odlikuje većom specifičnošću, budući da koristi izravno obilježeno primarno protutijelo bez dodatne amplifikacije signala. Osjetljivost IF detekcije antigena HSV-a doseže oko 80 % u

iskusnim laboratorijima, što je znatno više nego kod kulture virusa [32]. Neka istraživanja su pokazala da IFA može detektirati do 33 % više pozitivnih slučajeva nego kultura [8]. Međutim, specifičnost je nešto niža oko 70 - 85 %, ovisno o korištenim protutijelima [32].

Mogući su lažno pozitivni rezultati, koji nastaju kao posljedica križne reakcije ili nepravilne interpretacije fluorescencije, kao i lažno negativni (ako je mala količina antigena ili je uzorak uzet prekasno). Važno je naglasiti da navedena ograničenja nisu specifična za fluorescein izotiocijanat (FITC, od engl. *Fluorescein isothiocyanate*) kao fluorescentni konjugat, već se općenito odnose na uporabu fluorescentno obilježenih sekundarnih protutijela, neovisno o vrsti fluorofora. Zbog toga se uzorak za IF analizu treba uzeti prije primjene fluoresceina kako bi se izbjegla mogućnost lažno negativnih ili nepravilnih nalaza [32]. Prednost metode IF je što brzo potvrđuje prisutnost virusa u epitelu rožnice tijekom aktivne infekcije, što može biti korisno kod prvih epizoda ili atipičnih ulkusa. Nedostatak je ograničena korisnost kod HSK-SnEU, tj. u slučajevima gdje nema površinskog oštećenja epitela iz kojeg bi se dobio uzorak. Danas, IF testovi za HSK koriste se rjeđe zbog širine upotrebe lančane reakcije polimeraze (PCR, od engl. *Polymerase chain reaction*) ali mogu biti korisni gdje PCR nije dostupan ili kao dodatna potvrda uz kulturu [6, 8]. Iako IFA metoda pokazuje dobre dijagnostičke karakteristike u otkrivanju HSK-a u usporedbi sa staničnom kulturom, u svakodnevnoj kliničkoj praksi primjenjuje se rijetko. Razlog tome su visoki troškovi potrebne opreme, poput fluorescentnog mikroskopa, te potreba za posebno educiranim laboratorijskim osobljem koje može pravilno izvesti i interpretirati test [6, 8].

1.4.2.3. Imunoenzimski test (ELISA) za detekciju antigena HSV-a

Imunoenzimski test (ELISA, od engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) se primjenjuje u dijagnostici HSK-a najčešće za detekciju antigena HSV-a ili za mjerenje lokalnih protutijela u suznom filmu. Postoje komercijalno dostupni testovi (poput *Herpcheck* ELISA testa) koji detektiraju antigen HSV-a iz brisa rožnice ili konjunktive. Prednost takvih testova jest mogućnost paralelne obrade većeg broja uzoraka, kako u automatiziranom tako i u ručnom načinu rada, uz relativno kratko vrijeme dobivanja rezultata, najčešće unutar jednog dana. Specifičnost ELISA testa iznosi približno 80 – 85 %, dok je osjetljivost znatno niža, svega oko 50 % (49 – 55 %). Upravo zbog te ograničene osjetljivosti, test *Herpcheck* nije pronašao širu primjenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi, osobito imajući u vidu dostupnost superiornijih metoda poput PCR-a [6, 36]. Stoga ELISA pokazuje stopu detekcije usporedivu s virusnom kulturom, s prijavljenom osjetljivošću u rasponu od približno 70 - 80 %, ovisno o fazi bolesti i metodološkim razlikama [37]. Prednost ELISA metode je što ne zahtijeva mikroskop nego se

očitava spektrofotometrijski, te što rezultat ne ovisi subjektivno o promatraču. Drugi pristup ELISA-e je mjerenje lokalnog imunološkog odgovora kao npr. određivanje sekretornih HSV imunoglobulina A (IgA) u suzama. Pokazano je da povišen IgA u suzama korelira s aktivnom infekcijom, no uz osjetljivost oko 30 – 40 % stoga se takvi serološki ELISA testovi na uzorku suza rijetko koriste u praksi. Antigenski ELISA test danas nije standardna rutina u razvijenim centrima (gdje je PCR preuzeo primat), ali može biti koristan kada druge metode nisu dostupne ili kao dopuna [38].

1.4.2.4. Molekularna dijagnostika HSK-a pomoću PCR-a i qPCR-a

PCR predstavlja jednu od najznačajnijih metoda molekularne biologije, omogućujući eksponencijalno umnažanje odabrane sekvence DNK u kratkom vremenu. Metodu je razvio Kary Mullis 1983. godine (dobitnik Nobelove nagrade za kemiju 1993. god.) kako bi prevladao problem nedovoljne količine DNK za analizu. Osnovni princip PCR-a jest ponavljano provođenje ciklusa denaturacije dvostruke uzvojnice DNK zagrijavanjem, hibridizacije specifičnih oligonukleotidnih početnica tzv. primera na ciljno mjesto pri sniženoj temperaturi te elongacije novog lanca pomoću nukleotida i termostabilne DNK polimeraze. Korištenje termostabilne Taq-polimeraze iz bakterije *Thermus aquaticus* od 1988. godine bilo je prekretnica koja je omogućila provedbu PCR-a u zatvorenoj reakcijskoj epruveti bez dodavanja enzima u svakom ciklusu. Time je metoda postala znatno brža, jeftinija i pouzdanija, a PCR se ubrzo proširio u brojne discipline, od genetičkog inženjerstva do forenzike [39-42]. Sljedeći važan iskorak bio je razvoj PCR u realnom vremenu (qPCR, od engl. *quantitative PCR*), koja omogućuje praćenje amplifikacije DNK u realnom vremenu uz kvantifikaciju nastalog proizvoda. Početkom 1990-ih Higuchi i sur. otkrili su da se u reakciju može dodati fluorescentna boja ili sonda koja emitira signal proporcionalan količini umnoženog DNK, čime je omogućeno kontinuirano praćenje reakcije. Taj je pronalazak 1993. god. otvorio put modernom kvantitativnom PCR-u. Današnji qPCR platforme koriste interkalirajuće fluorescirajuće boje (npr. SYBR Green) ili specifične oligonukleotidne probe (npr. TaqMan) koje emitiraju signal prilikom amplifikacije ciljne sekvence, omogućujući detekciju već nakon 30 - 40 ciklusa bez potrebe za naknadnom elektroforezom. Time je uvelike smanjena mogućnost kontaminacije uzorka, a dobiveni Ct (broj ciklusa, od engl. *cycle threshold*) vrijednosti pružaju uvid u početnu količinu DNK. Ct vrijednost predstavlja broj ciklusa amplifikacije pri kojem fluorescentni signal prelazi unaprijed definirani prag detekcije te je obrnuto proporcionalna početnoj količini ciljane DNK u uzorku [36, 39-42].

Tradicionalne metode poput kultivacije virusna zahtijevale su vijabilan virus i više dana inkubacije, dok PCR može izravno detektirati virusnu DNK u uzorku te pružiti rezultat unutar nekoliko sati. Najnoviji sustavi čak integriraju brzu ekstrakciju i amplifikaciju te primjerice u jednom istraživanju kvantitativni mikrofluidni PCR detektirao je HSK DNK u suzama pacijenta za oko 40 minuta od uzorkovanja. Osim brzine, glavna prednost PCR-a je izrazito visoka osjetljivost i specifičnost. PCR može amplificirati i minimalne količine virusne DNK, što je ključno u oftalmologiji gdje su uzorci često oskudni (npr. tanki sloj rožnice ili uzorci suza) i mogu sadržavati tek tragove patogena. Pokazano je da PCR metoda može uspješno detektirati prisutnost HSV-a čak i u slučajevima kada klasične dijagnostičke metode, poput stanične kulture ili IF ne daju pouzdane rezultate. Pramod i sur. izvijestili su da je PCR identificirao HSV DNK u slučajevima HSK-a kod kojih su izolacija, IF metode i serološki testovi dali negativne rezultate. Dodatna je prednost što PCR omogućuje tipizaciju HSV-a tj. primeri se mogu dizajnirati tako da razlikuju HSV-1 od HSV-2. [39-44].

Iako je PCR brži, specifičniji i znatno osjetljiviji od klasičnih metoda ipak detekcija može varirati ovisno o kliničkom obliku HSK-a [38]. qPCR nadograđuje klasični PCR i rezultat je Ct vrijednost, koja je obrnuto proporcionalna početnoj količini HSV DNK u uzorku. Na taj način qPCR omogućuje ne samo potvrdu prisutnosti virusa, nego i kvantifikaciju virusa. Ovo je osobito korisno u praćenju terapijskog odgovora i procjeni prognoze. Ct je obrnuto proporcionalan početnoj količini ciljane DNK: niske Ct vrijednosti (npr. < 20) ukazuju na vrlo visok titar virusa u uzorku, dok visoke Ct vrijednosti (npr. > 35) znače da je virusna DNK prisutna u vrlo niskoj količini, na granici detekcije.

Samo kvantitativni rezultat može razlikovati slučajeve s izraženom virusnom replikacijom od onih u kojima je prisutna tek minimalna količina virusne DNK. To je osobito važno u kliničkim situacijama kada je PCR pozitivan, ali nije jasno ima li nalaz kliničku relevantnost. Drugo, praćenje terapijskog odgovora predstavlja važnu primjenu qPCR-a. U idealnim okolnostima, uspješna antivirusna terapija dovodi do postupnog smanjenja razine virusa tijekom vremena. Pad razine virusa (porast Ct vrijednosti) nakon uvođenja antivirusne terapije ukazivao bi na dobar terapijski odgovor, dok bi perzistiranje niskog Ct (odnosno visoke razine virusa) moglo upućivati na razvoj rezistencije ili nedovoljnu penetraciju lijeka u tkivo rožnice.

U budućnosti bi kvantifikacija virusnog opterećenja mogla imati terapijski usmjeravajuću ulogu u donošenju kliničkih odluka. Primjerice, odluke o trajanju antivirusne terapije ili o sigurnom uvođenju kortikosteroidnih kapi kod HSK-S mogle bi se temeljiti i na stupnju virusne replikacije. Preporučuje se da se protuupalna terapija uvede tek kada je razina virusa niska, čime se smanjuje rizik pogoršanja infekcije. Konačno, prognostički značaj kvantifikacije

virusnog opterećenja sve se više istražuje. Premda još nije čvrsto potvrđena korelacija između visoke početne količine virusa i težine bolesti kod HSK-a, studije na drugim oblicima HSV infekcija, poput encefalitisa, pokazale su da visoko inicijalno razina virusa može predviđati teži klinički ishod ako se terapija ne primijeni na vrijeme. Slična se hipoteza istražuje i u oftalmologiji, gdje bi broj virusnih kopija mogao biti povezan s većim rizikom komplikacija ili lošijim vidnim ishodom.

Važno je, međutim, naglasiti da interpretacija Ct vrijednosti mora biti oprezna. Različite PCR platforme, sonde i protokoli mogu proizvesti različite apsolutne Ct vrijednosti za istu količinu virusa. Stoga je, radi usporedivosti među laboratorijima, preporučljivo rezultate izražavati kao broj kopija virusne DNK koristeći standardnu kalibracijsku krivulju s poznatim koncentracijama HSV genoma [38, 44, 45].

1.5. Standardi liječenja HSK-a

Zbog potencijalno teških ishoda neliječenog HSK-a uključujući trajno zamućenje rožnice i gubitak VO pravovremeno i pravilno liječenje od kritične je važnosti [4].

Globalno najpoznatija serija randomiziranih placebo kontroliranih kliničkih studija *Herpetic Eye Disease Study* (HEDS) započelih 1989. godine imala je veliku ulogu u stvaranju protokola liječenja HSK-a kombinacijom antivirusne i kortikosteroidne terapije kao i važnost uvođenja profilakse kod rekurentnih slučajeva [6, 46]. Terapijski pristup temelji se na dvije glavne komponente: (1) antivirusne terapije za suzbijanje replikacije HSV-a i (2) protuupalnoj terapiji za kontrolu imunopatološke upale u rožnici. Pored toga, koriste se i potporne mjere (poput debridmana ulkusa rožnice, midrijatika, antiglaukomske terapije, vitamina C) te, u određenim slučajevima, dugotrajna profilaksa radi sprečavanja recidiva bolesti [4, 5].

1.5.1. Antivirusna terapija

Antivirusna terapija predstavlja temelj liječenja aktivne HSV infekcije na oku. Od otkrića aciklovira (ACV) 1970-ih, nukleozidni analozi postali su standard u liječenju HSK-a. Djeluju kao lažni supstrati virusne DNK polimeraze te inhibiraju sintezu virusne DNK i umnožavanja virusa. Prva linija su klasični antivirusni lijekovi: ACV i njegovi oralni prolijekovi valaciklovir (VACV) i famciklovir (FCV), te lokalni antivirusni lijekovi poput ganciklovir (GCV) gela 0,15 % i trifluridinske kapi [4, 6]. Analozi nukleozida imaju sličan antivirusni mehanizam. Oni se selektivno fosforiliraju do monofosfatnog oblika u inficiranim stanicama pomoću virusne TK-e. ACV ima približno 200 puta veću afinitet za HSV-TK nego za ljudsku TK, što ga čini sigurnim lijekom. Stanične kinaze tada pretvaraju ACV-monofosfat u difosfatni i trifosfatni

aktivni oblik. ACV-trifosfat djeluje kao kompetitivni inhibitor virusne DNK polimeraze, a osim toga se ugrađuje u rastući lanac virusne DNK. Budući da mu nedostaje 3'-hidroksilna skupina, njegova inkorporacija dovodi do prekida elongacije DNK lanca i time učinkovito zaustavlja daljnju replikaciju virusnog genoma [28, 47].

ACV se može primjenjivati i oralno i topički, a izbor načina primjene ovisi o određenim faktorima. Stanja kada se preporuča oralna primjena ACV-a jesu pacijenti kod kojih je otežana lokalna primjena lijeka radi npr. tremora i/ili reumatoidnog artritisa, nosioca kontaktnih leća, pedijatrijska populacija refraktorna na topičku terapiju, pacijenti koji koriste lokalnu terapiju duže od 21 dana, ako od ranije imaju oštećenje površine oka npr. sindrom suhog oka kao i izbor za profilaksu nakon operacije. Stanja kada se preporuča topička terapija jesu pacijenti sa oštećenjem bubrega budući da su svi oralni antivirusni lijekovi su u određenoj mjeri nefrotoksični, trudnice (svi oralni antivirusni lijekovi spadaju u kategoriju B tj. nema pouzdanih podataka o štetnosti te se ne preporučuje primjena u trudnoći) kao i dojilje jer je dokazana prisutnost ACV u mlijeku [6, 27]. Bitno je znati da prema HEDS studiji istovremena primjena kombinacije oralnog i lokalnog ACV nije se povećala učinkovitost lijeka. Također treba biti upoznat sa time da je i oralni i topički ACV jednako djelotvoran i sposoban postići adekvatnu koncentraciju u tkivu rožnice [6, 17].

Iako je ACV učinkovita terapija HSK-a ima i nekoliko nedostataka. Prvo, djeluje isključivo na replikaciju novo sintetizirane virusne DNK, čime inhibira stvaranje novih virusnih čestica, ali ne eliminira stanice koje su već zaražene virusom. Uz to ACV ima nisku bioraspoloživost što zahtjeva više doze lijeka i češću učestalost primjene. Treći puno značajniji nedostatak je razvoj rezistencije na ACV o čemu ćemo više u narednom poglavlju. Terapija druge linije obuhvaća foscarnet i cidofovir, koji zbog manje selektivnosti prema virusnoj DNK pokazuju veću toksičnost u usporedbi s ACV-om i njegovim prolijekovima. Uz to, ovi lijekovi su skupi, često nisu rutinski dostupni a uz to ne postoje ni jasno definirane smjernice o optimalnom doziranju, trajanju terapije ili načinu primjene kod očnih infekcija. Zbog navedenih razloga, cidofovir i foscarnet koriste se samo u iznimnim slučajevima, najčešće kod teških i ACV rezistentnih (ACVR) HSK-a, i to pod strogim nadzorom oftalmologa i infektologa [6, 8, 29, 48, 49].

1.5.2. Kortikosteroidna terapija

Oblici HSK-a koji zahvaća dublje slojeve rožnice (HSK-S i HSK-En), u čijoj patogenezi dominira imunološki odgovor na virusne antigene neophodno je primijeniti topičke kortikosteroide (prednizon 1 % ili deksametazon 0,1 %) uz kontinuiranu antivirusnu zaštitu [7]. HEDS klinička ispitivanja pokazala su da primjena topičkih kortikosteroida uz antivirusni

lijek kod HSK-S značajno smanjuje upalnu infiltraciju, ubrzava oporavak vida i smanjuje vjerojatnost terapijskog neuspjeha u odnosu na placebo skupinu, potvrđujući važnost kombinirane antivirusne i protuupalne terapije u liječenju ovog oblika bolesti [4, 6-7]. Kortikosteroidi djeluju na upalu rožnice putem više mehanizama koji zajedno dovode do smanjenja imunološkog odgovora i očuvanja strukture rožnice. Potiskuju aktivnost lokalnih limfocita B, čime smanjuju stvaranje protutijela koja doprinose upalnom procesu. Osim toga, inhibiraju sintezu mukopolisaharida i kolagena u stromi rožnice, čime sprečavaju razvoj edema i nastanak fibroze. Dodatno, kortikosteroidi smanjuju infiltraciju polimorfonuklearnih stanica (neutrofila) u upalno tkivo, što dovodi do smanjenja lokalne destrukcije tkiva i posljedično ublažavanja simptoma upale. Nakon uvođenja kortikosteroida u terapiju, nužno je osigurati njihovu dovoljno dugu primjenu uz postupno smanjivanje doze. Zbog dugotrajne primjene kortikosteroida nužno je redovito praćenje pacijenata zbog mogućih nuspojava, uključujući povišenje očnog tlaka, razvoj katarakte, suhoće oka ili nastanak epitelnih defekata rožnice [49, 50]. Kod nekih pacijenata dovoljan je i blaži kortikosteroid (fluorometolona 0,1 % ili loteprednola 0,2 %) primjenjivati svaki drugi dan kroz nekoliko mjeseci, uz postupno smanjivanje doze do potpunog ukidanja terapije [51]. Kao pomoć pri smanjenju doze kortikosteroida može se uvesti topički imunomodulator poput ciklosporina A 0,05 % osobito ako postoji istodobna epitelna lezija kada je kortikosteroid rizično davati u punoj dozi [6, 50]. Također su dobra zamjena za lokalne kortikosteroide kod pacijenata sa rHSK stromalnog oblika i steroidom induciranim glaukomom [6, 50]. Sistemski kortikosteroidi rijetko su potrebni, osim kod težih HSK-SEU ili zahvaćenosti unutarnjih struktura oka (npr. nekrotizirajući retinitis), a i tada se primjenjuju isključivo uz adekvatnu antivirusnu terapiju [52].

1.5.3. Potporne mjere u liječenju HSK-a

Osim glavnih lijekova, liječenje HSK-a uključuje i niz potpornih postupaka. Kod klasičnog HSK-D često se izvodi mehaničko čišćenje tzv. debridman epitela tj. sterilnim tupferom uklanja se zaraženi epitel na rubovima ulkusa, čime se uklanjaju stanice pune virusa i potiče zacjeljivanje. Debridman može skratiti trajanje infekcije te smanjiti količinu virusnih antigena koji potiču razvoj stromalne upale. Naravno, uvijek se kombinira s antivirusnom terapijom kako bi se spriječila ponovna infekcija iz preostalih virusnih čestica. Međutim, iako je klinička primjena debridmana kod HSK-E poznata od ranije, dokazi koji podupiru tu tehniku su ograničeni i nedostaje im koherentnost [6].

Kod HSK-En ili razvoj prednjeg uveitisa daje se midrijacil i/ili cikloplegik (poput topikalnog atropina) radi sprečavanja stražnjih sinehija i ublažavanja boli zbog cilijarnog spazma [6, 53]. U fazi cijeljenja epitelnih defekata korisno je intenzivno podmazivanje oka umjetnim suzama kako bi se epitel brže regenerirao. Za HSK praćen težim neurotrofičkim oštećenjem površine rožnice, mogu biti potrebne mjere poput terapijskih mekih kontaktnih leća, transplantacije amnijske membrane [6, 54].

Transplantacija rožnice je posljednji izbor kada HSK uzrokuje nepovratno oštećenje rožnice. Idealno vrijeme za keratoplastiku je nakon 3 mjeseca nakon zadnje reaktivacije tj. kada je bolest pod kontrolom topičkim kortikosteroidima i oralnom profilaksom ACV [55].

1.5.4. Potencijalni novi lijekovi u liječenju HSK-a

Unatoč dostupnosti navedenih terapija koje su u mnogim slučajevima vrlo učinkovite, valja naglasiti da trenutno liječenje ne eliminira potpuno virus iz organizma. HSV ostaje latentno prisutan u živčanim ganglijima, stoga postojeća terapija samo skraćuje trajanje akutnih epizoda i smanjuje rizik od recidiva, ali ne izliječi infekciju u potpunosti [5]. Noviji lijekovi se testiraju kao alternative za liječenje HSV-a. Ove molekule djeluju na različite faze HSV-1 infekcije. Prvo tu je riječ o novoj skupini antivirusnih lijekova tzv. inhibitori helikaza-primaza kompleksa koji sprečavaju sintezu virusne DNK [4].

Primjeri lijekova u ovoj klasi uključuju protelivir i amenamevir, koji su pokazali učinkovitost kod VZV i HSV-2 [56]. Ovi lijekovi djeluju na HSV helikaza-primazni kompleks, koji predstavlja cilj djelovanja različit od virusne DNK polimeraze i TK-e, na koje djeluju ACV i njegovi derivati. Helikaza-primazni kompleks, ključan za replikaciju virusnog genoma, sastoji se od triju virusnih proteina, produkata gena (UL5, UL8 i UL52) koji zajedno omogućuju razdvajanje dvolančane virusne DNK i sintezu kratkih RNK primera potrebnih za inicijaciju replikacije putem virusne DNK polimeraze [57, 58].

Jedna studija predložila je upotrebu BX795, inhibitora TANK-vezujuće kinaze 1 (od engl. *Tank-binding kinase 1*, TBK1), za blokiranje HSV-1 u zaraženim stanicama time što blokira sintezu proteina. Antivirusna aktivnost BX795 temelji se na inhibiciji fosforilacije Akt-a u zaraženim stanicama, što dovodi do smanjene sinteze virusnih proteina. Akt (protein kinaza B) je serin/treonin kinaza uključena u regulaciju staničnog rasta, preživljenja i sinteze proteina, a njegova aktivacija fosforilacijom ključna je za učinkovitu replikaciju brojnih virusa. Budući da njegov mehanizam djelovanja ne ovisi o virusnoj TK ili DNK polimerazi, BX795 bi mogao biti učinkovit i protiv sojeva HSV-1 rezistentnih na ACV, čime se otvara mogućnost njegove primjene kao perspektivne alternative postojećim antivirusnim lijekovima [4, 59].

Nedavno je FDA (Agencija za hranu i lijekove, od engl. *Food and Drug Administration*) odobrila primjenu CRISPR-Cas9 (od engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated protein*) tehnologije u liječenju nasljednih bolesti poput β -talasemije, anemije srpastih stanica i Leberove kongenitalne amauroze. Osim u genskoj terapiji, CRISPR-Cas9 pokazuje potencijal u blokiranju replikacije i uklanjanju latentnih oblika virusa, uključujući viruse iz porodice herpesa kao što su Epstein – Barr virus, humani citomegalovirus i HSV-1 [4, 68].

Daljnji istraživački naponi usmjereni su na inhibiciju interakcije HSV-a s receptorima stanica domaćina, poput heparan sulfata s 3-O-sulfatnim modifikacijama, kao i s glikoproteinima virusne ovojnice. Inhibicija ovih molekula može spriječiti ulazak HSV-a u stanicu i time zaustaviti širenje infekcije [4, 14]. Park i sur. pokazali su da kombinacija kationskog peptida G2, koji se veže na 3-O-sulfatirani heparan sulfat i ACV ima snažniji antivirusni učinak u modelima očne infekcije, uključujući sustave sporog oslobađanja kroz kontaktne leće [69].

Istražuju se i terapije usmjerene na imunomodulaciju, s obzirom na važnu ulogu upale u patogenezi HSK-a. Lijekovi poput azacitidina i retinoične kiseline mogu povećati broj i funkcionalnu aktivnost regulatornih T-stanica, čime se smanjuje upala i stabilizira imunološki odgovor [70, 71].

Posebno zanimljiv novi terapijski cilj u liječenju HSV-1 infekcija je Rac1 protein (od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), mali GTP-vezni protein koji sudjeluje u staničnoj signalizaciji i dinamici citoskeleta. Pokazano je da Rac1 pozitivno korelira s replikacijom HSV-1, a da inhibicija njegove aktivnosti molekulama NSC23766 i Ehop016 značajno potiskuje replikaciju virusa [72,73]. Stoga Rac1 predstavlja potencijalni terapijski cilj za razvoj novih antivirusnih lijekova.

Ovi inovativni pristupi od genetskih tehnologija poput CRISPR-a, preko inhibicije ulaska virusa u stanicu, modulacije upale, do ciljanja intracelularnih signalnih putova predstavljaju perspektivne strategije za buduće terapije HSV-1 infekcija, uključujući HSK. Trenutno se najveća očekivanja polažu u razvoj cjepiva protiv HSV-a te imunoterapijskih i drugih pristupa usmjerenih na smanjenje latentnog virusnog rezervoara. Do tada, prevencija reaktivacija i prijenosa virusa temelji se prvenstveno na primjeni antivirusnih lijekova i općim mjerama očuvanja zdravlja.

1.5.5. Personalizirani pristup liječenja HSK-a prema kliničkom obliku

HSK nije jedinstvena klinička jedinka, već spektar bolesti rožnice uzrokovanih HSV-om. Klasifikacija HSK-a temelji se na primarnoj anatomskoj lokalizaciji zahvaćenosti rožnice i

patofiziološkom mehanizmu lezije. Svaki od ovih tipova HSK-a ima svoje karakteristike, tijekom i optimalni terapijski pristup [6]. Personalizirani pristup liječenju podrazumijeva da terapiju prilagodimo konkretnom kliničkom tipu HSK-a kod pacijenta, umjesto jedinstvenog pristupa za sve. U nastavku su prikazani specifičnosti liječenja za svaki od navedenih kliničkih tipova.

1.5.5.1. Liječenje HSK-E oblika (HSK-D i HSK-G)

Ovaj tip HSK-a karakterizira aktivna replikacija HSV-a u površinskom epitelu rožnice. Klinički se vidi karakteristična dendritička lezija obojena fluoresceinom tj. razgranati defekt epitela s na kraju bulbarnim zadebljanjima. Osnova liječenja je antivirusna terapija koja eliminira virus iz epitela i omogućuje zacjeljivanje. Lijekovi izbora su topički i to ACV, GCV te trifluridin koji je dostupan u SAD-u. Od sistemskih antivirusnih lijekova to su ACV, FCV i VACV. Oralni ACV u dozi od 400 mg pet puta dnevno postiže terapijske koncentracije u prednjoj očnoj sobici [7]. Dokazano je da i lokalno primijenjeni ACV može prodrijeti kroz intaktan epitel rožnice, međutim to se ne odnosi i na GCV [60]. Uz redovitu primjenu antivirusnih masti/gelova, većina dendritičkih ulkusa zacijeli unutar 2 tjedna te lokalna terapija ne bi smjela biti duža od 21 dana radi potencijalne očne toksičnosti. Ako se uvodi oralna terapija, preporučena doza ACV iznosi 400 mg tri do pet puta dnevno tijekom 7 do 10 dana za pacijente s HSK-D, dok se kod HSK-G koji ima težu kliničku prezentaciju i zahtijeva dulje liječenje, primjenjuje 800 mg pet puta dnevno ACV tijekom 14 do 21 dan. Sam debridman ulkusa bez osnovne terapije se ne preporuča kao terapija izbora za HSK-E. Tijekom liječenja epitelnih lezija strogo se izbjegava uporaba lokalnih kortikosteroida jer oni pogoršavaju infekciju epitela i mogu dovesti do progresije ulkusa. U ovoj fazi bolesti upalna komponenta je minimalna i nije potreban kortikosteroid. Također se izbjegavaju lokalni lijekovi koji potiču upalu, poput miotika (npr. pilokarpina) ili analoga prostaglandina. Nakon uspješnog liječenja HSK-E općenito ostavlja minimalne ožiljke. Ipak, pacijenta treba pratiti zbog mogućih recidiva. Kod pacijenata sa epitelnim HSK-E postoji mali rizik od razvoja HSK-S te nije potrebna profilaksa ACV-om osim u slučajevima rekurencije [6, 7, 61].

1.5.5.2. Liječenje HSK-S oblika (HSK-SEU i HSK-SnEU)

Prema HEDS skupini pacijenti koju su imali desetotjedni režim koji je uključivao lokalne kortikosteroide sa postepenim smanjivanjem i antivirusni lijek imali su bolji odgovor na liječenje u odnosu na pacijente koji su liječeni samo antivirusnom terapijom [6, 62]. Radi dugotrajnosti terapije preporuča se uvođenje oralnih antivirusnih lijekova budući da topički antivirusni lijekovi mogu dovesti do toksičnosti površine oka u obliku toksičnog

keratokonjunktivitisa, alergijskog konjunktivitisa ili stenoze punktuma [63]. Kao što je već ranije navedeno, a što se često potvrđuje i u kliničkoj praksi, dodavanje oralnog antivirusnog lijeka uz topičku terapiju ne donosi dodatnu korist, budući da do danas nijedna studija nije pokazala statistički značajnu prednost kombinirane primjene dvaju antivirusnih lijekova u odnosu na monoterapiju bilo oralnu ili topičku [76]. Ipak, Dutt i sur. su u seriji slučajeva HSK-SEU utvrdili da kombinacija lokalnog i sistemskog ACV može ubrzati cijeljenje epitelnog defekta, što upućuje na mogućnost selektivne koristi u određenim kliničkim situacijama [77].

Prema smjernicama AAO, HSK-SnEU liječi se terapijskom dozom topičkih kortikosteroida u kombinaciji sa profilaktičkom dozom oralnih antivirusnih lijekova. To uključuje topički 1 % prednizolon 6 - 8 puta dnevno sa postepenim smanjivanjem više od 10 tjedana uz oralni ACV u dozi od 400 mg 2 x dnevno. Ključ uspješnog liječenja je odmah započeti topikalni kortikosteroid kako bi se suzbila upalna destrukcija strome.

Kod HSK-SEU imamo drugačiji terapijski režim što se tiče doziranja antivirusnih lijekova i kortikosteroida. Radi epitelne ulceracije imamo limitiranu dozu topičkih kortikosteroida tj. 1 % prednizolon dva puta dnevno zajedno sa terapijskom dozom oralnih antivirusnih lijekova tj. ACV 800 mg 3 do 5 puta dnevno kroz 7 - 10 dana. Nakon toga doza oralnih antivirusnih lijekova se smanjuje na profilaktičku dozu i traje dokle god traje kortikosteroida terapija. Ne postoji klinička studija o potrebnoj dužini liječenja te se ona određuje na temelju kliničke prezentacije i odgovora na terapiju, međutim oslanjajući se na rezultate. Prema HEDS skupini liječenje bi trebalo trajati duže od deset tjedana [6, 61]. Cilj ispravnog liječenja HSK-S je naći balans između kortikosteorida kako bi se suprimirala imunološka reakcija, a sa druge strane odgovarajuća doza antivirusnih lijekova kako ne bi došlo do povećanja koncentracije virusa i razvoja HSK-E [27]. Unatoč pravovremenoj i optimalnoj terapiji nakon HSK-S često zaostaje ožiljak rožnice koji kompromitira vid. U takvim slučajevima, nakon minimalno 3 - 6 mjeseci od zadnje aktivnosti može se razmatrati keratoplastika [6, 64].

U pacijenata kod kojih je primjena kortikosteroida kontraindicirana, primjerice zbog povišenog intraokularnog tlaka, nuspojava ili rizika od reaktivacije infekcije, ciklosporin A predstavlja vrijednu alternativu jer pruža protuupalni učinak bez tipičnih steroidnih komplikacija. Peyman i sur. u malom randomiziranom kliničkom ispitivanju pacijenata sa HSK-S pokazali da je 2 % ciklosporin A jednako učinkovit kao i 1 % prednizolon acetat. Ciklosporin A djeluje imunosupresivno blokirajući proliferaciju pomoćničkih limfocita T (CD4+) i inhibirajući sintezu interleukina-2 (IL-2) koji imaju ključnu ulogu u upalnom odgovoru i patogenezi HSK-S [79].

1.5.5.3. Liječenje HSK-En oblika

HSK-En označava upalu endotelnih stanica koja se prezentira sa precipitatima rožnice, edemom rožnice i blagom reakcijom prednje sobice [6, 64]. Smatra se da je uzrok imunološka reakcija na virusne antigene u endotelu. Terapija HSK-En je slična terapiji HSK-SnEu gdje se primjenjuje terapijska doza lokalnih kortikosteroida tj. prednizolon 1 % 6 - 8 puta dnevno uz istovremeno antivirusno liječenje oralnim ACV 400 mg 3 - 5 x dnevno. Kortikosteroid se potom postupno smanjuje tijekom nekoliko tjedana ili mjeseci, ovisno o odgovoru [9, 46]. Kod HSK-En pojava povišenog IOT-a može nastati zbog upale trabekularne mrežice. Moguće je da se HSV luči putem trabekuluma, koji je inerviran trigeminalnim živcem. Ovu hipotezu podržava kliničko opažanje da edem strome rožnice obično počinje s periferije kod pacijenata s HSK En. Amano i sur. su u ekscidiranom tkivu rožnice, primjenom monoklonalnih antitijela, dokazali prisutnost HSV-1 antigena u trabekulumu, što podupire tezu o izravnoj ulozi HSV-a u razvoju trabekulitisa [65, 66].

1.6. Profilaksa HSK-a

Recidivirajući HSK-S povezan je sa trajnim gubitkom VO radi stvaranja ožiljka rožnice i nepravilnog astigmatizma, te se radi toga u kliničkoj praksi provodi dugotrajna profilaksa oralnim antivirusnim lijekovima kako bi se spriječile ponovne epizode HSK-a.

Rezultati HEDS-a pokazali su da 6 mjeseci nakon prestanka uzimanja profilakse nije bilo statistički značajne razlike nastupa rekurencije između pacijenata koji su uzimali profilaksu i onih koji nisu što govori u prilog da nema prolongiranog učinka nakon što se prekine uzimanje ACV [6, 61, 62]. Zanimljivo je da pacijenti koji su imali epizodu HSK-a koji ne uključuje stromu rožnice, rijetko imaju recidiv HSK-S. Čak i nakon godine dana, odluka o prekidanju terapije ovisi o težini dosadašnjih epizoda tj. neki pacijenti s vrlo čestim recidivima nastavljaju profilaksu i duže (neki čak i doživotno, uz kontrolu potencijalnih nuspojava), dok se drugima terapija može oprezno ukinuti uz praćenje. Treba spomenuti da su neke kasnije analize HEDS podataka dovele u pitanje koliko korist profilaksa daje dugoročno svim pacijentima. Ipak, opći konsenzus jest da profilaksa ima smisla kod pacijenata s visokim rizikom od recidiva ili teškim prvim epizodama [6, 61, 62].

Optimalno trajanje profilaktičke terapije nije jednoznačno za sve pacijente. Kao što je navedeno, 1 godina smatra se minimalnim trajanjem kod težih tipova. HEDS je koristio 12 mjesечnu shemu; međutim, praćenja nakon HEDS-a sugerirala su da se nakon prestanka terapije učestalost recidiva može povećati, posebno u prva 2 mjeseca nakon prekida (tzv. *rebound* efekt). Stoga neki stručnjaci preporučuju 18 do 24 mjeseca kontinuirane profilakse

kod pacijenata koji su tek nakon godinu dana postigli stabilnu remisiju. Doze lijekova prilagođene su dugotrajnoj primjeni: ACV 400 mg 2 × dnevno standardna je doza za imunokompetentne pacijente [5, 6, 67].

Nakon penetrantne keratoplastike kod pacijenta sa rHSK predlaže se oralni ACV u dozi od 800 mg 3 x dnevno inicijalno te se kasnije doza smanjuje na 400 mg 2 x dnevno najmanje godinu dana. Alternativno, VACV 500 mg 1× dnevno pruža ekvivalentnu zaštitu. VACV je prolijek ACV-a s boljom oralnom biodostupnošću (3 - 5 puta većom), što omogućuje rjeđe doziranje i potencijalno bolju suradljivost pacijenata. Doista, studije su pokazale da je VACV (500 mg dnevno) jednako učinkovit kao i ACV (400 mg dvaput dnevno) u sprječavanju recidiva HSK-a [6, 68]. Valja napomenuti da u profilaksi FCV također ima mjesto te doza od 250 mg dvaput dnevno koristila se u nekim radovima, no u praksi se rjeđe propisuje zbog cijene i dostupnosti [6, 61].

Najnovija istraživanja usmjerena su na individualizaciju profilakse, s ciljem da se identificiraju pacijenti koji će od nje imati najveću korist. U tom kontekstu, istražuje se utjecaj genetskih čimbenika, poput određenih HLA (od engl. *Human leukocyte antigen*) genotipova, koji su povezani s povećanom sklonošću ponovnim epizodama HSK-a [85]. Ovakav pristup mogao bi u budućnosti omogućiti personaliziranu profilaksu, koja bi se primjenjivala samo kod pacijenata s najvećim rizikom od recidiva. Do tada se odluka o uvođenju profilaktičke terapije temelji na kliničkoj procjeni tj. broju i težini prethodnih epizoda, funkcionalnom statusu vida na zahvaćenom oku, suradljivosti pacijenta, mogućim kontraindikacijama za antivirusne lijekove, te preferencijama samog pacijenta [5, 6, 61, 67].

Osim standardnih antivirusnih lijekova, sve se više prepoznaje potporna uloga vitamina C (askorbinske kiseline) u prevenciji HSK. Vitamin C je poznat po svojim antioksidativnim i imunomodulacijskim svojstvima, a novija istraživanja ukazuju da visokodozna suplementacija može smanjiti rizik reaktivacije HSV-a.

Retrospektivna studija iz Južne Koreje, Yoon i sur. ispitala je učinak dodatka oralnog vitamina C (2 × 1000 mg dnevno) uz standardnu antivirusnu profilaksu kod pacijenata s HSK-om. Rezultati su pokazali da su recidivi bili značajno rjeđi u skupini koja je primala vitamin C. Univarijatna analiza potvrdila je da su i profilaktički ACV i vitamin C samostalno smanjili rizik od ponovne pojave bolesti tj. ACV približno četiri puta, a vitamin C za oko 50 % u usporedbi s pacijentima bez profilakse [94].

Sustavnom suplementacijom postiže se povećana koncentracija askorbinske kiseline u očnoj vodi, što stvara antivirusno mikrookruženje i dovodi do manjih stopa recidiva [86, 87]. Vitamin C dodatno smanjuje oksidativni stres neutralizirajući slobodne radikale i

prooksidativne metabolite tijekom upale, te ubrzava epitelno zacjeljivanje stimulacijom matičnih stanica epitela rožnice. Uz to, ima ključnu ulogu u sintezi kolagena i očuvanju strukturnog integriteta strome rožnice, čime pridonosi većoj otpornosti rožnice [88, 89].

Iako su potrebna opsežnija prospektivna istraživanja za potvrdu ovih nalaza, rezultati dostupnih studija sugeriraju da vitamin C može biti koristan dodatak antivirusnoj profilaksi kod pacijenata s učestalim recidivima HSK-a. Neki autori stoga već preporučuju dnevnu suplementaciju od 1 g vitamina C kao adjuvantnu mjeru uz standardnu antivirusnu terapiju [94].

1.7. Komplikacije HSK-a

Kao što je već navedeno, klinički tijek HSK obilježen je rekurentnim epizodama te svaka ponovna reaktivacija virusa povećava kumulativno oštećenje oka i rizik za trajne komplikacije. Među najznačajnijim komplikacijama su ožiljci rožnice, neovaskularizacija rožnice (NV), sekundarni glaukom i perzistentni epitelni defekt (PED). Upravo te četiri komplikacije bit će detaljno obrađene u nastavku uz osvrt na njihovu patofiziologiju, učestalost u različitim oblicima HSK, kliničku prezentaciju, posljedice po vid te mogućnosti liječenja i prevencije [6, 32].

1.7.1. Ožiljak rožnice

Replikacija virusa u rožnici aktivira urođene imunološke signalne putove, što dovodi do pojačane produkcije citokina i kemokina u epitelnim i stromalnim stanicama rožnice. Počevši unutar 24 sata, dolazi do priljeva upalnih stanica, pretežno neutrofila, odnosno stanica NK (od engl. *Natural killer cells*) te dendritičnih stanica i makrofaga, koji u ovoj fazi funkcioniraju kako bi ograničili širenje virusa izvan zaraženog tkiva. Dendritične stanice su glavne stanice koje prezentiraju antigen, fagocitiraju virusne čestice i zaražene stanice te se kreću prema drenažnim limfnim čvorovima kako bi stvorile stečeni imunološki odgovor. U ranoj fazi infekcije dolazi do prvog vala neutrofilne infiltracije rožnice, koji je dio urođenog imunološkog odgovora i ima zaštitnu ulogu u ograničavanju virusne replikacije. Počevši od sedmog dana, infiltracija CD4⁺ T stanica i njihova produkcija citokina poput IFN- γ i IL-17 potiču nastanak drugog, kasnog vala neutrofila, koji je povezan s imunopatološkim oštećenjem rožnice. Daljnja proizvodnja citokina i proteaza koje razgrađuju izvanstanični matriks od strane ovih neutrofila pokreće karakterističnu upalu i uništavanje tkiva koje se vidi kod HSK-a. Time regrutiranje upalnih stanica uzrokuje zamućenje rožnice koje zaklanja vidnu os i može dovesti do sljepoće. Mjesto ožiljavanja rožnice ima važnu ulogu u procesu regeneracije i obnovi osjeta rožnice.

Istraživanja su pokazala da središnje ožiljavanje rožnice značajnije narušava regeneraciju rožničnih živaca u odnosu na periferno ožiljavanje. Budući da su živčana vlakna najgušće raspoređena u središnjem dijelu rožnice, oštećenja u tom području mogu rezultirati smanjenim osjetom rožnice (hipoestezijom) te u težim slučajevima razvojem neurotrofične keratopatije. Takvo stanje dovodi do smanjenog cijeljenja epitela i povećanog rizika za daljnja oštećenja rožnice, uključujući ulceracije i trajni gubitak prozirnosti [69, 70].

U HSK-E virus inficira površinske stanice te defekti epitela uglavnom cijele bez trajnih zamućenja, pogotovo ako su ograničeni na površini rožnice. Nasuprot tome, kod HSK-S dolazi do duboke upale i nekroze kolagenih lamela strome što aktivira fibroblaste i posljedično dovodi do stvaranja fibrozne ožiljne pregrade u rožnici. Također pretjerani imunološki odgovor na virus uzrokuje kolateralnu štetu stromi. Kod HSK-En upala primarno zahvaća endotel i duboku stromu te premda često uzrokuje prolazno zamućenje zbog edema, može ostaviti trajnije ožiljke u stromi u slučaju ponavljanih upala ili neadekvatnog liječenja.

Stoga kod HSK-S u čak 50 – 60 % slučajeva razvije se klinički značajan ožiljak. Kod HSK-En ožiljci su rjeđi, ali ponavljane epizode mogu dovesti do trajne subepitelne fibroze ili taloženja u stromi koja nalikuju ožiljku. Ukratko, ožiljci su najčešći i najizraženiji nakon HSK-SEU, dok su relativno rijetki i minimalni nakon HSK-E te umjereni kod težih HSK-En [6, 32]. Za razlikovanje ožiljka od aktivne infiltracije pomaže činjenica da se ožiljno tkivo ne boji fluorescentinom i obično nema okolnog edema ni precipitata na endotelu. Topografski pregled često pokazuje nepravilni astigmatizam zbog iskrivljenja rožnične kupole. Posljedice za vid ovisne su o lokalizaciji i gustoći ožiljka. Centralno smješteni i gusti ožiljak uzrokuje trajno zamućenje slike. Osim smanjenja VO, prisutan je i nepravilan astigmatizam i optičke aberacije zbog narušene glatkoće rožnice. Pacijenti se žale na zamagljen vid, odbljeske i dvoslike (monokularnu diplopiju) kod gledanja jednim okom. I periferni ožiljci mogu uzrokovati smetnje poput odsjaja, osobito ako su opsežni. Studije pokazuju da oko 11 % pacijenata s povijesti HSK-a naposljetku razvije trajno teško oštećenje vida (ispod 0,1) upravo zbog ožiljaka i optičkih poremećaja [32].

Rane i agresivne terapije akutnog HSK-a smanjuju opseg oštećenja tkiva i posljedično veličinu ožiljaka. Također, profilaktička dugotrajna primjena oralnih antivirusnih lijekova dokazano smanjuje učestalost recidiva, a time indirektno štiti od progresivnog ožiljavanja rožnice. U fazi cijeljenja akutnih lezija, pažljivim nadzorom i pravodobnim uvođenjem kortikosteroida (u stromalnim oblicima) nastoji se kontrolirati imunološka komponenta upale kako bi se minimaliziralo stvaranje ožiljne pregrade. Ukratko, optimalno liječenje svake epizode HSK i

supresija recidiva ključni su za sprječavanje teškog ožiljavanja rožnice i očuvanje vidne funkcije [71].

1.7.2. Neovaskularizacija (NV) rožnice

Rožnica je fiziološki avaskularno tkivo te održavanje “angiogene privilegiranosti” rezultat je ravnoteže proangiogenih i antiangiogenih faktora. Dugotrajna upala ili nekroza uzrokovana HSV-om može narušiti tu ravnotežu te potaknuti NV rožnice, tj. urastanje novonastalih krvnih žila iz limbalnog područja u inače avaskularnu stromu [72]. Kod HSK do toga obično dolazi u HSK-S, osobito ako su upale učestale ili neliječene. Ponavljajući rHSK-S dovodi do kronične upale te CD4⁺ T limfociti i druge imunostane stanice infiltriraju rožnicu i luče citokine (npr. TNF α , interleukine i dr.) koji stimuliraju epitelne i stromalne stanice da pojačano izražavaju čimbenike angiogeneze poput VEGF-a (od engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*). Istovremeno dolazi do smanjene ekspresije antiangiogenih faktora. Kao rezultat, kapilare iz limbalnog pleksusa počinju urastati u stromu prema centru rožnice. Proteolitički enzimi (matriksne metaloproteinaze) kojima endotelne stanice žila razgrađuju stromu dodatno pospješuju proces. U nekim slučajevima, NV se pojavi već tijekom akutne epizode (osobito HSK-SEU), dok se u drugima razvija postupno tijekom faze cijeljenja, osobito ako je upala bila teško kontrolirana [72]. Većina nekomplikiranih HSK-E ne dovodi do stvaranja NV. Kod HSK-S dugotrajna upalna reakcija potiče nastanak NV u oko 10 – 20 % slučajeva, prema nekim kliničkim opažanjima. U HSK-En NV je neuobičajena budući da primarno dolazi do edema i upale dubljih slojeva, ali bez značajnih upalnih infiltrata u stromi i limbalne angiogeneze. Dakle, HSK-S nosi najveći rizik te svaki ponovljeni teški HSK-S povećava kumulativnu vjerojatnost razvoja NV [73].

NV rožnice mogu biti površinske kada urastaju u površinsku stromu ispod epitela ili duboke (u dubokoj stromi), ovisno o sloju upale. Često prate mjesto prethodnog ožiljka ili ulceracije npr. oko starog ožiljka nastaju prateće žile. Aktivne novonastale žile sadržavat će krv i bit će jasno crvene, dok se kronične mogu izbijeliti (od engl. *ghost-vessels* ili prazne žile) kad krvni tok stagnira. Pacijent često nema specifične simptome zbog samih žila, ali može uočiti pogoršanje vida ako žile dosegnu optičku zonu. Novonastale NV kao i okolna fibroza raspršuje i ograničava prolazak svjetlosti kroz rožnicu, što rezultira smanjenjem VO. Uz to NV često propuštaju serumske lipide u okolno tkivo, što dovodi do razvoja lipidne keratopatije, koja se klinički očituje žućkasto-bijelim naslagama oko žila i dodatno smanjuje prozirnost rožnice. To znači da, i nakon što se upala smiri i NV žile povuku, u stromi često ostaje trajno zamućenje zbog taloženja lipida. Važno je naglasiti da NV značajno povećava rizik od odbacivanja

transplantata nakon keratoplastike jer prisutne krvne žile omogućuju brži dolazak imunoloških stanica do grafta, čime ga čine visokorizičnim. Studije su pokazale da oči s dubokim NV imaju značajno nižu stopu uspjeha transplantacije rožnice [5]. Općenito, opsežna vaskularizacija rožnice često koegzistira s drugim komplikacijama (ožiljcima, stanjivanjem), pa je i ona marker težeg oblika bolesti [72, 73].

Prevenција razvoja NV temelji se na pravodobnom i adekvatnom liječenju primarne upale. Brzim suzbijanjem stromalne upale antivirusnim i protuupalnim lijekovima smanjuje se poticaj za angiogenezu. Također, profilaksa recidiva sprječava ponovne upalne epizode koje bi mogle dodatno stimulirati rast novih žila. Ukratko, održavanje rožnice što dulje bistrom i bez aktivne upale glavni je način borbe protiv NV [74-76].

1.7.3. Sekundarni glaukom

Sekundarni glaukom kod HSK-a najčešće je posljedica HSV prednjeg uveitisa koji može pratiti infekciju rožnice. Mehanizmi nastanka povišenog IOT-a su višestruki. Jedan od razloga je virusni trabekulitis jer HSV može zahvatiti trabekularnu mrežu, izazvati njezinu upalu te disfunkciju drenaže očne vodice [77]. Studije potvrđuju da je preko 90 % slučajeva HSV uveitisa praćeno sa povišenim IOT. Povišeni IOT često se može uočiti već pri prvom pregledu, istodobno s pojavom upalnih znakova, što upućuje na primarni trabekulitis virusne etiologije. Drugi mehanizam je upala prednjeg segmenta tj. šarenice i ciliarnog tijela koja dovodi do pojačanog stvaranja upalnih proteina i stanica koji mogu začepiti trabekularnu mrežu. Također, kronična upala dovodi do stvaranja sraslica i zatvaranja kuta. Treći faktor je kortikosteroidna terapija koja je neizbježna u liječenju HSK-S, HSK-En kao i prednjeg uveitisa. Dakle, kod pacijenta s HSK mogu se preklapati upalni (virusni i imunološki) i jatrogeni (steroidni) uzroci glaukoma. Površinski HSK-E rijetko prati porast IOT-a i obično vezan uz jatrogeni faktor tj. upotrebu kortikosteroida [77].

U suštini, svaki neobjašnjivo visoki IOT u sklopu prednjeg uveitisa treba pobuditi sumnju na HSV kao mogući uzročnik [78]. Sekundarni glaukom uzrokovan HSV infekcijom često ima oscilirajući tijek tj. IOT se može normalizirati nakon sanacije upale, ali ponovne epizode mogu uzrokovati nove skokove i kumulativno oštećenje očnog živca. Naime, u slučajevima kada je potrebno primijeniti kortikosteroide radi kontrole upale, oni mogu uzrokovati porast intraokularnog tlaka i time pogoršati glaukom. S druge strane, uporaba prostaglandinskih analoga, koji su često lijekovi prvog izbora u liječenju glaukoma, može potaknuti ili pogoršati upalni odgovor u oku. Takva međusobna terapijska ograničenja čine liječenje ovih pacijenata izrazito kompleksnim i zahtijevaju individualiziran pristup te pažljivo balansiranje između

kontrole upale i regulacije očnog tlaka [77, 78]. Ako unatoč maksimalnoj medikamentoznoj terapiji IOT ostaje visok ili glaukom napreduje, prelazi se na kirurško liječenje glaukoma. U takvim slučajevima preporučuje se pričekati da se upala potpuno smiri prije kirurškog zahvata, budući da aktivna upala značajno smanjuje uspješnost filtracijskih operacija [77, 78].

1.7.4. Perzistentni epitelni defekt (PED)

PED označava neuspješno cijeljenje epitelne lezije rožnice unatoč odgovarajućem suportivnom liječenju tijekom razdoblja od 10 do 14 dana. Osnova nastanka PED-a u kontekstu HSK-a jest neurotrofičko oštećenje rožnice. HSV oštećuje trigeminalni živac koji inervira rožnicu te svaki ponovljeni HSK doprinosi degeneraciji osjetnih živčanih vlakana u rožnici, smanjujući trofički stimulus potreban za zdravlje epitela. Posljedica je razvoj neurotrofičnog keratitisa tzv. metaherpetički ulkus pri čemu epitel postaje distrofičan, smanjuje se suženje zbog oslabljenog refleksa na suhoću, a epitelne stanice pokazuju smanjenu sposobnost migracije i regeneracije. Zbog toga oko s ovakvim poremećajem ne može učinkovito i pravovremeno zatvoriti epitelne defekte. Dakle, svaki teži oblik HSK može predisponirati PED, no najčešće ga vidimo nakon HSK-SEU (gdje je došlo do oštećenja živaca) ili kod produljenih HSK-E. Procjenjuje se da u SAD-u svake godine oko 20,7 ljudi na 100 000 stanovnika razvije PED rožnice nakon očne HSV infekcije, što ukazuje da je PED relativno čest ishod teških rHSK-a [71, 79]. HSK-E koji se adekvatno liječi obično zacjeljuje unutar 1 – 2 tjedna. Međutim, kod rekurentnih epitelnih ulkusa, osobito onih koji su dugo bili otvoreni (npr. kronični HSK-G) ili su liječeni neprikladno (npr. kortikosteroidima u prisustvu aktivnog virusa) može doći do razvoja PED-a. HSK-S može sekundarno dovesti do razvoja PED-a, primjerice nakon teške stromalne upale koja ostavlja područje bez epitelne pokrivenosti. U takvim slučajevima, zbog prisutne neurotrofije, epitel se ne uspijeva obnoviti i defekt perzistira unatoč liječenju. HSK-En sam po sebi nema direktnih epitelnih lezija, pa rijetko direktno uzrokuje PED. Dugotrajno otvoren epitelni defekt rožnice ima višestruke negativne posljedice. Prije svega, postoji značajan rizik od sekundarne infekcije, budući da nezaštićena stroma ispod epitelnog defekta predstavlja otvoreni ulaz za bakterije i gljive, što može rezultirati razvojem infekcijskog keratitisa na već oštećenoj i osjetljivoj rožnici. Takva superinfekcija ima katastrofalan potencijal (brzo topljenje rožnice i perforacija). I bez infekcije, kronični PED dovodi do stromalne degradacije jer zbog nedostatka epitelnih signala keratociti u stromi ne rade normalno te nastaje sterilna kolagenoliza (keratoliza). Stroma se postupno stanjuje te može nastati Descemetokela (izbočenje Descemetove membrane) i konačno perforacija rožnice [79].

Svaki put nakon zaliječenja ulkusa uzrokovanog HSV-om treba nastaviti hidrataciju oka i izbjegavati nepotrebne lokalne lijekove koji bi mogli oštetiti epitel. Rano prepoznavanje smanjene osjetljivosti rožnice bitno je jer ako pacijent ima znatnu hipoesteziju, liječnik ga može proaktivno staviti na režim zaštite površine (npr. gelove noću, vlažne komore za spavanje itd.). U pacijenata s poznatom sklonosti PED-u, planiranje bilo kakve intraokularne operacije mora uključiti profilaksu npr. mjesec dana prije elektivne operacije katarakte započeti s lubrikantima, autolognim serumom i sl. radi uspostave optimalnog funkcionalnog stanja rožnice [79-82].

Zaključno, HSK može uzrokovati niz teških komplikacija koje ugrožavaju vid od ožiljaka i vaskularizacije koji su glavni uzrok slabe VO, preko sekundarnog glaukoma koji oštećuje vidni živac, do PED-a te posljedičnih ulkusa i perforacija rožnice. Razumijevanje patofiziologije ovih komplikacija omogućuje njihovo pravodobno prepoznavanje i liječenje.

1.8. Rezistencija na aciklovir (ACV)

Prije otprilike 30 god., Menage i sur. su u svom istraživanju na 39 kliničkih izolata HSV u jednom slučaju imali rezistenciju na antivirusni lijek te su zaključili da virusna rezistencija na antivirusne lijekove nije značajan problem kod HSV-1 infekcije okularnog tipa [83]. Međutim, u današnje vrijeme zbog vrlo raširenog i često dugotrajnog uzimanja profilakse koje je neophodno kod HSK-a radi rekurentne prirode bolesti razvoj rezistencije na ACV je sve prisutniji i treba ga ozbiljno shvatiti. Pacijenti sa HSK-om uzrokovanim sojevima otpornim na ACV imaju veću incidenciju nastanka sljepoće u odnosu na pacijente sa HSK-om uzrokovanim sojevima osjetljivim na ACV [84]. Premda se rezistencija na ACV najčešće povezuje s imunokompromitiranim pacijentima, recentni radovi ukazuju na rastući broj slučajeva među imunokompetentnim osobama, osobito onima s rHSK. Molekularni mehanizmi rezistencije u većini slučajeva uključuju mutacije gena za virusnu TK (UL23), koji je odgovoran za inicijalnu fosforilaciju ACV-a. Mutacije u genu za TK, enzimu ključnom za konverziju ACV u njegov aktivni oblik, odgovorne su za oko 95 % slučajeva rezistencije na ACV. Mutacije u genu za TK mogu dovesti do različitih funkcionalnih promjena enzima koje rezultiraju razvojem rezistencije na ACV. Najčešće se opisuje nekoliko mehanizama: potpuni gubitak ekspresije enzima (TK - *negative*), pri čemu se TK uopće ne stvara; zatim smanjena aktivnost enzima (TK - *low*), kod kojih se lijek fosforilira u nedovoljnoj mjeri da bi postigao antivirusni učinak; te promjena supstratne specifičnosti (TK - *altered*), gdje enzim i dalje fosforilira prirodni supstrat timidin, ali više ne prepoznaje ACV kao supstrat. Sve navedene promjene onemogućuju konverziju ACV u njegov aktivni trifosfatni oblik, čime se virus čini otpornim na djelovanje

lijeka [49, 85]. Budući da TK nije esencijalan za replikaciju virusa (virus može preživjeti uz minimalnu aktivnost, iako uz smanjenu virulenciju), HSV može relativno lako steći ove mutacije pod selekcijskim pritiskom lijeka. Posljedica je da virus više ne može fosforilirati ACV, pa lijek ne postiže aktivni oblik i ne djeluje [49, 84-86].

Kao što je prethodno spomenuto, većina slučajeva rezistencije na ACV nastaje zbog mutacija u genu za TK. Međutim, kod preostalih otprilike 5 % rezistentnih sojeva uzrok su mutacije u genu za virusnu DNK polimerazu (UL30). Mutacije DNK polimeraze su rjeđe jer je ovaj enzim neophodan za umnožavanje virusa, pa većina promjena ozbiljno narušava sposobnost virusa da se replicira. Ipak, određene mutacije mogu smanjiti afinitet polimeraze za ACV-trifosfat, a da polimerazna funkcija ostane dovoljno očuvana za replikaciju [86-88].

Svi klinički sojevi HSV-1 sadrže viruse rezistentne na ACV (ACVR) u različitim proporcijama. Odnos između virusa ACVR i virusa osjetljivih na ACV (ACVS) određuje fenotip osjetljivosti sojeva na ACV [84, 86-88]. Van Veldez i sur. su definirali da kornealni HSV-1 sojevi sa više od 28 % ACVR virusa jesu ACV-rezistentni sojevi. Dugotrajna profilaksa ACV-om (≥ 12 mjeseci) i recidivi koji traju ≥ 45 dana predstavljaju indikatore bolesti otporne na ACV. Ova dva parametra djeluju kao neovisni čimbenici rizika za sumnju na prisutnost ACVR sojeva. Zaključak studije je da je testiranje osjetljivosti na ACV opravdano tijekom praćenja pacijenata s rHK [47]. Zanimljivo, studije su pokazale i visok stupanj polimorfizma TK gena među različitim sojevima HSV-a, što otežava izravne genetske testove rezistencije te je nužno razlikovati "benigne" polimorfizme od pravih rezistentnih mutacija. Otpornost na ACV predstavlja problem jer time nastaje i križna rezistencija na druge lijekove koji su isto ovisni o TK fosforilaciji, kao što su VACV, GCV i FCV. Anitvirusni lijekovi koji ne razvijaju rezistenciju jesu foscarnet, cidofovir i trifluridin zato jer svoju aktivnost ne oslanjaju na principu TK fosforilacije. Iako su UL30 mutacije puno rjeđe od TK mutacija, njihova pojava ima značajne kliničke posljedice jer UL30 mutirani virusi često pokazuju multirezistentnost na više klasa antivirusnih lijekova [49, 85].

Zbog rizika razvoja ACVR sojeva tijekom vremena, taj čimbenik treba uzeti u obzir pri odabiru odgovarajuće antivirusne terapije u pacijenata s rHSK-om, osobito u onih s anamnezom stromalne bolesti, koji su skloni dugotrajnim i intenzivnim antivirusnim i kortikosteroidnim terapijskim režimima [47]. Kada integritet oka nije ugrožen, kombinirani podaci idu u prilog upotrebi diskontinuirane ACV profilakse, odnosno prekidu liječenja nakon maksimalno jedne godine i agresivnijoj terapijskoj intervenciji naknadnog recidiva [61, 62].

Kombinirana terapija anti-HSV lijekovima s različitim mehanizmima djelovanja, poput ACV-a u kombinaciji s foscarnetom ili trifluridinom može biti značajna [85]. To će potencijalno

rezultirati kraćim trajanjem bolesti i moglo bi smanjiti rizik od pojave virusa otpornih na lijekove tijekom terapije. Konačno, testiranje osjetljivosti na antivirusne lijekove obrisaka rožnice indicirano je za pacijente s rHSK-om kako bi se vodio racionalan odabir odgovarajućih alternativnih antivirusnih sredstava. Testiranje osjetljivosti na ACV (od engl. *specific antiviral susceptibility testing*) je prema smjernicama AAO indicirano kod pacijenata sa učestalim, rHSK usprkos oralnoj profilaksi te kod imunokompromitiranih pacijenata koji ne odgovaraju na terapiju. Jedno 6-godišnje istraživanje na 239 pacijenata na kontinuiranoj profilaksi nije našlo značajnu razliku u osjetljivosti virusa u odnosu na kontrolnu skupinu bez profilakse. To ohrabruje da profilaksa ne inducira lako rezistenciju kod imunokompetentnih vjerojatno zato što se kod njih virus i rjeđe reaktivira. Ipak, treba biti oprezan jer rezistencija se može razviti i kod inače zdravih ljudi ako virus prođe kroz dovoljno ciklusa replikacije pod lijekom (npr. vrlo učestali recidivi ili nepotpuna adherencija na terapiju zbog koje virus ne reagira na suboptimalne doze) [86-89].

Postoji zanimljiva teza da je rožnica imunoprivilegirano mjesto, pa ACVR virus lakše perzistira u rožnici nego na koži ili sluznici. U prilog tome, neki autori navode da su opisani slučajevi klinički ACVR HSK-a. Međutim, takvi sojevi u pravilu ne uzrokuju recidive labijalne ili genitalne HSV infekcije kod imunokompetentnih osoba, budući da ih imunološki sustav na periferiji učinkovito eliminira. Bitno je naglasiti da prisutnost rezistencije ne znači da je virus virulentniji sam po sebi, već da standardna terapija ne djeluje i time virus može učiniti veća oštećenja [49, 85-89].

Kada se identificira ili posumnja da pacijent ima infekciju rezistentnim HSV-om, potrebno je promptno modificirati terapiju. Prva linija izbora su antivirusni lijekovi neovisni o virusnoj TK kao što su foskarnet i cidofovir. Foskarnet je direktni inhibitor virusne DNK polimeraze koji se veže na pirofosfatno mjesto enzima i blokira elongaciju lanca te za svoje djelovanje ne treba fosforilaciju virusnim enzimima [90]. Primjenjuje se intravenski u dozama od 40 mg/kg 3× dnevno za sistemske infekcije. Kod HSK, foskarnet se rijetko daje sistemski osim u najtežim slučajevima (kao što su opsežne bilateralne infekcije u imunokompromitiranih). Međutim, magistralno se može pripremiti 1 – 3 % otopina foskarneta za lokalnu primjenu u oko, što može pomoći ACVR HSK-E. Cidofovir je aciklički nukleotidni analog koji također zaobilazi potrebu za virusnom TK i inhibira virusnu DNK polimerazu. Sistematski se daje intravenski za retinitis ili druge teške HSV/VZV infekcije ali može i lokalno magistralno pripremiti kao cidofovir 0,5 % gel [91]. I foskarnet i cidofovir su, toksičniji od ACV i mogu uzrokovati bubrežnu disfunkciju i poremećaje elektrolita. Stoga se sistemski daju u bolničkim uvjetima i rezervirani su za životno ugrožavajuće infekcije. Što se tiče lokalne primjene terapije, kako bi se izbjegle

sistemske nuspojave tu je lijek trifluridin, koji je aktivan protiv HSV-a neovisno o virusnoj TK, jer ga i stanične kinaze mogu fosforilirati [91]. Nedostatak mu je visoka toksičnost za epitel rožnice uz dugotrajnu uporabu, pa se obično dozira 5 – 8 puta dnevno najviše 14 dana. Ipak kod rezistentnog HSK-a to je prihvatljivo, međutim trifluridin nije dostupan svugdje npr. u Europskoj uniji je njegova dostupnost ograničena. Radi toga se za topikalno liječenje češće koristi 0,15 % GCV gel koji je komercijalno dostupan. Iako GCV kako je spomenuto, može imati smanjenu učinkovitost na TK-mutante, u koncentriranom obliku gela on ponekad pokazuje klinički efekt vjerojatno zbog djelomične intracelularne aktivacije lijeka. U nekim kliničkim slučajevima rezistentnog HSK-a liječnici primjenjuju kombiniranu terapiju sustavnim foskarnetom i lokalnim trifluridinom ili GCV, čime istovremeno ciljaju moguće mutacije u DNK polimerazi i povećavaju lokalni antivirusni učinak [91, 92].

Iako su mutacije u genu UL30 rjeđe u kliničkoj praksi, predstavljaju značajan terapijski izazov. Virusi s takvim mutacijama postaju rezistentni ne samo na ACV, već i na druge nukleozidne i nukleotidne analoge, uključujući foskarnet i cidofovir. Mehanizam rezistencije obično uključuje promjene u aktivnom mjestu DNK polimeraze koje smanjuju vezivanje aktivnih metabolita lijekova, a da pritom ne narušavaju sposobnost virusne replikacije. Što se tiče terapije, mogućnosti su ograničene jer većina standardnih antivirusnih lijekova postaje neučinkovita. U istraživačkom kontekstu ispitivani su alternativni pristupi, poput helikaze-primaze inhibitora (npr. pritelivir), koji djeluju na različite faze virusne replikacije i pokazali su obećavajuće rezultate u kliničkim studijama [49, 85].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Cilj istraživanja

1. Utvrditi poveznicu između različitih kliničkih oblika HSK-a i mogućnosti detekcije HSV DNK

Sporedni ciljevi:

1. Usporedba PCR testa sa qPCR-om pacijenata s HSK-om
2. Utvrditi postojanje mutacija u genomu za TK i DNK pol koje bi mogle rezultirati rezistencijom na ACV
3. Uspostava PCR-a i qPCR-a u dijagnostici i liječenju HSK-a na Klinici za oftalmologiju pri KBC-u Rijeka

2.2. Hipoteza

Hipoteza istraživanja je da je prisutnost HSV-a na površini rožnice različito ispoljena kod različitih oblika HSK-a. Osim toga, naša je pretpostavka da je HSV izoliran iz strugotine rožnice pacijenata tretiranih s ACV, nosioc mutacije u genima UL23 (TK) i/ili UL30 (DNK polimeraza) koje rezultiraju rezistencijom na primljeni lijek.

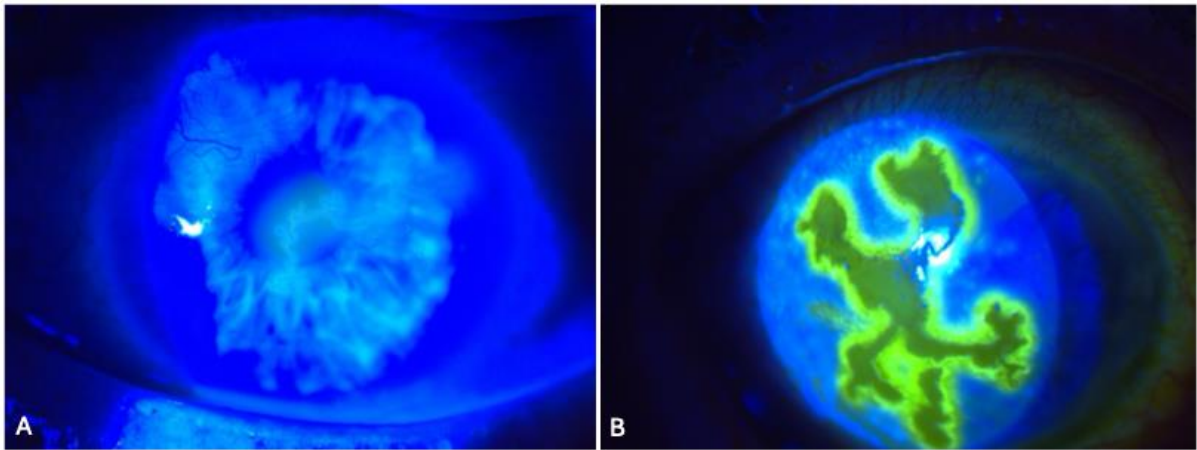
3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

3.1.1. Odabir ispitanika za uključivanje u studiju prema kliničkim parametrima

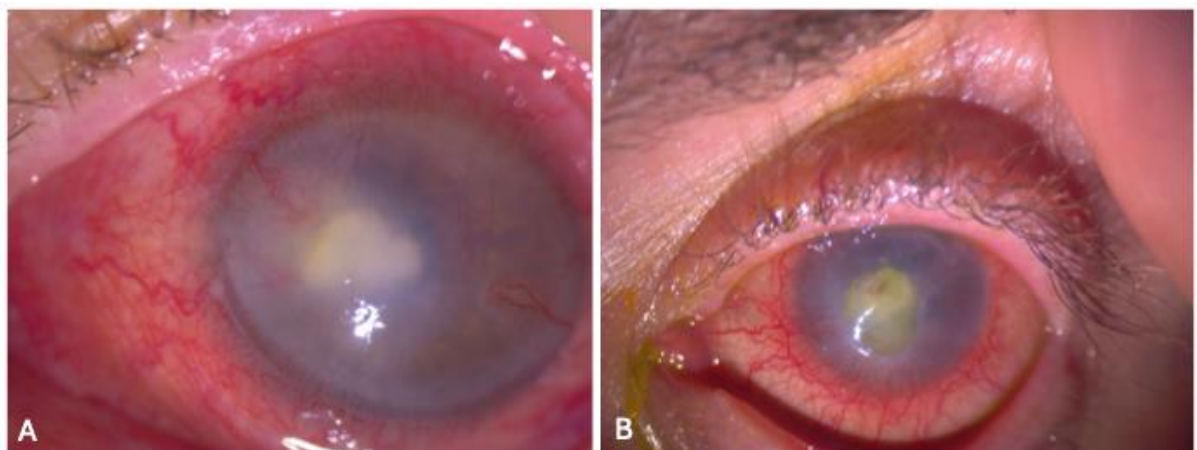
Ovo istraživanje provedeno je kao prospektivna studija koja je uključivala ukupno 100 pacijenata Klinike za oftalmologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka u razdoblju od ožujka 2019. do kolovoza 2022. godine. Ispitanici su raspoređeni u dvije skupine. Uključeno je 55 pacijenata s kliničkom dijagnozom HSK te 45 kontrolnih pacijenata bez kliničkih znakova HSK. PCR/qPCR nalaz interpretiran je kao ishodna varijabla. Uključni kriteriji za ispitivanu skupinu bili su: aktivna upala rožnice koja klinički ukazuje na infekciju HSV-om, ili postojanje anamnestičkog podatka o prethodnim epizodama HSK-a. Isključni kriteriji bili su: klinički znakovi infekcije uzrokovane bakterijama i/ili gljivama. Kontrolna skupina obuhvatila je pacijente bez aktivne upale oka te bez anamnestičkih podataka o prethodnom HSK. Uzorci rožničnog epitela kod kontrolne skupine pacijenata prikupljani su tijekom elektivnih operativnih zahvata (npr. ablacija pterigija), kao dio rutinske kliničke procedure.

Klasifikacija HSK-a u ovom istraživanju temeljila se na smjernicama AAO, prema kojima se HSK dijeli u pet kliničkih podtipova [5]. Tipizacija pojedinih kliničkih oblika HSK-a bila je ključna za ispravnu dijagnostičku kategorizaciju pacijenata te za naknadnu analizu povezanosti molekularne detekcije HSV-a s kliničkim fenotipom bolesti. HSK-D definiran je prisutnošću linearne epitelne lezije s karakterističnim terminalnim zadebljanjima, tzv. bulbusima, što predstavlja najtipičniji i najčešće viđeni oblik HSV infekcije rožnice. Suprotno tome, HSK-G bilježen je gubitkom jasnoće linearnog rasporeda te progresivnim širenjem ulceracije, što rezultira nepravilnom, razgranatom morfologijom lezije tzv. geografski ulkus. Vizualizacija obrisa i granica epitelne lezija u oba oblika najpreciznije se provodi primjenom fluoresceinskog bojenja rožnice, što omogućuje jasan uvid u zahvaćenu površinu epitela (Slika 1).



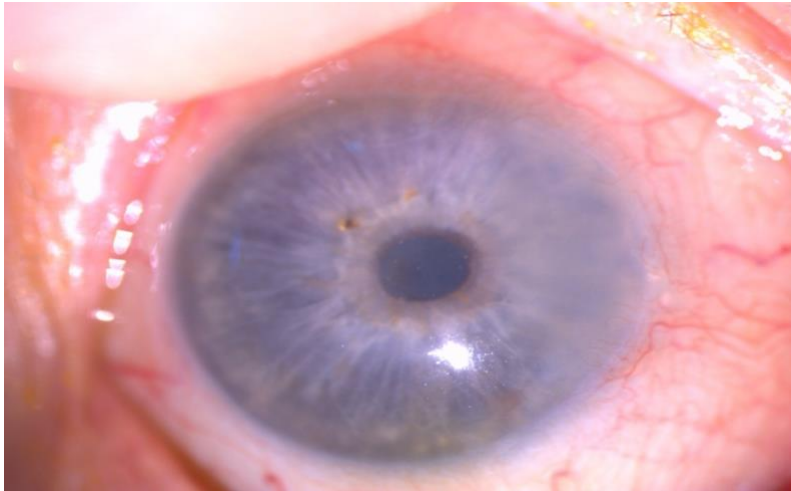
Slika 1. Prikaz HSK-E pod biomikroskopom nakon bojanja fluoresceinskom bojom (HSK-D i HSK-G). A. HSK-D - dendritički oblik herpetičnog keratitisa. B. HSK-G - geografski oblik herpetičnog keratitisa. *Izvor: osobna arhiva autora; slike su pribavljene na Klinici za oftalmologiju, KBC Rijeka.

HSK-S karakteriziran je stromalnim infiltratom koji nastaje kao posljedica intrastromalne imunološke reakcije, često praćene edemom. Ovaj oblik dodatno se dijeli prema prisutnosti ili odsutnosti epitelne ulceracije, (HSK-SnEU i HSK-SEU) što se također evaluira fluoresceinskim bojenjem (Slika 2).



Slika 2. Prikaz HSK-S (HSK-SEU i HSK-SnEU) pod biomikroskopom. A. HSK-SEU - stromalni HSK s epitelnim defektom B. HSK-SnEU - stromalni HSK bez epitelnog defekta. *Izvor: osobna arhiva autora; slike su pribavljene na Klinici za oftalmologiju, KBC Rijeka.

HSK-En, s druge strane, manifestira se kao pojava rožničnih precipitata uz prisutni stromalni edem, pri čemu je uzrok edema disfunkcija endotelne stanice tzv. endotelna dekompenzacija (Slika 3).



Slika 3. Prikaz HSK-En pod biomikroskopom. *HSK-En – endotelni herpetični keratitis.*

**Izvor: osobna arhiva autora; slike su pribavljene na Klinici za oftalmologiju, KBC Rijeka.*

VO pacijenata procjenjivana je korištenjem Snellenovog optotipa, standardnog dijagnostičkog alata u oftalmologiji, pri čemu je mjerenje provedeno s udaljenosti od 6 metara (20 stopa) u trenutku inicijalnog pregleda te po završetku liječenja. Snellenov optotip omogućuje kvantitativnu procjenu centralne VO, pri čemu brojnik označava udaljenost s koje pacijent promatra dijagram, dok nazivnik predstavlja udaljenost s koje osoba s normalnim vidom može pročitati isti redak. Na primjer, rezultat 20 / 20 označava normalnu oštrinu vida, dok vrijednost 20 / 40 implicira da pacijent s 20 stopa razaznaje ono što osoba s tipičnim vidom može vidjeti s 40 stopa. Na temelju postignutih rezultata, pacijenti su razvrstani u dvije skupine prema stupnju VO. Prvu skupinu činili su pacijenti čija je VO bila u rasponu od 20 / 20 do 20 / 40 (1,0 do 0,5), dok su drugu skupinu činili pacijenti s oštrinom vida u rasponu od 20 / 50 do 20 / 200 (0,4 do 0,1). Uz VO, prikupljeni su i sljedeći klinički parametri: dob i spol pacijenata, broj prethodnih recidiva, klinički oblik HSK-a, dan uzimanja strugotine rožnice u odnosu na početak simptoma, prisutnost i trajanje prethodne primjene ACV, ukupno trajanje liječenja te prisutnost komplikacija nakon završetka liječenja.

3.2. Metode

3.2.1. Virusni sojevi i stanične kulture

U radu je korišten HSV-1, laboratorijski niskovirulentni soj KOS, dobiven ljubaznošću prof. Donalda M. Coena (Harvard Medical School, SAD), kao i rekombinantni HSV-1 dobiven iz kloniranog genoma soja KOS u BAC, umjetnom bakterijskom kromosomu (od engl. *bacterial artificial chromosome*), označen kao BAC-HSV-1. Virusni pripravci dobiveni su ljubaznošću prof. dr. Igora Juraka (Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova), a za umnažanje virusa korištene su stanice Vero (ATCC CCL-81). Stanice su uzgajane u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD; kat. br. 11965092) uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS; Gibco; kat. br. 10270106), 1 % penicilin/streptomycin (Gibco; kat. br. 15140122) i 1 % L-glutamin (Gibco; kat. br. 25030081), pri 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂. Kao pozitivna kontrola u analizama umnažanja HSV-1 korišten je BAC-HSV-1, odnosno genom HSV-1 kloniran u BAC sustavu.

3.2.2. Uzorkovanje rožnice i izolacija DNK

Za svakog ispitanika zabilježen je broj dana od početka aktualne kliničke epizode HSK-a do uzimanja uzorka za molekularnu analizu, a većina uzoraka prikupljena je unutar prvih 14 dana od početka simptoma. Uzimanje uzoraka epitelne strugotine rožnice provedeno je pod biomikroskopom, korištenjem sterilnog instrumenta poznatog kao „hokej“. Prije zahvata, radi osiguranja bezbolnosti, lokalno je primijenjen topički anestetik (1 % tetrakain). Uzorci su neposredno nakon uzimanja pohranjeni u 50 µL virusnog transportnog medija UTM, univerzalni transportni medij (od engl. *Universal transport medium*) (UTM-RT Transport Medium, Copan, Italija; kat. br. 305 C) te zamrznuti na – 80 °C do analize. Izolacija DNK provedena je korištenjem Quick-DNA MicroPrep kita (Zymo Research, SAD; kat. br. D3020) prema uputama proizvođača. DNK je eluirana u 20 – 30 µL elucijskog pufera te pohranjena na – 20 °C do daljnje analize. Koncentracija i čistoća izolirane DNK procijenjene su spektrofotometrijski (NanoDrop, Thermo Scientific), pri čemu je prihvatljivim omjerom smatran A260/A280 između 1,8 i 2,0. DNK BAC-HSV-1 izolirana je iz bakterijske kulture primjenom PC-100 MidiPrep kita (Macherey-Nagel, Njemačka; kat. br. 740410.50), prema uputama proizvođača.

3.2.3. PCR analiza i elektroforeza u agaroznom gelu

Umnažanje ciljnih sekvenci HSV-1 provedeno je metodom PCR korištenjem Taq PCR Master Mix Kita (Qiagen, Njemačka; kat. br. 201443) prema uputama proizvođača.

PCR reakcije izvođene su u ukupnom volumenu od 25 μ L, koji je sadržavao 12,5 μ L $2 \times$ Taq PCR Master Mixa, 0,4 μ M svake početnice, 2 μ L DNK predloška i nukleazno-slobodnu vodu do konačnog volumena.

Reakcije su provedene u termocikleru (Bio-Rad T100 Thermal Cycler) uz sljedeće uvjete:

- početna denaturacija: 95 °C tijekom 3 minute
- 35 ciklusa:
 - 95 °C / 30 s
 - 60 °C / 30 s
 - 72 °C / 45 s
- završna elongacija: 72 °C tijekom 5 minuta

Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 1 – 2 % agaroznom gelu (Agarose, Sigma-Aldrich, SAD; kat. br. A9539) pripremljenom u $1 \times$ TAE puferu (Carl Roth, Njemačka; kat. br. 1055.3), pri 100 V tijekom 40 minuta. Veličina amplifikacijskih produkata određena je usporedbom s 100 bp DNK ljestvama (Thermo Scientific; kat. br. SM0241). Vizualizacija nukleinskih kiselina provedena je bojanjem GelStar Nucleic Acid Gel Stain-om (Lonza, SAD; kat. br. 50535), a dokumentacija gelova izvršena je pomoću sustava GelDoc (Bio-Rad, SAD).

3.2.4. Razvoj i validacija PCR protokola za detekciju HSV-1 u kliničkim uzorcima

Za specifičnu detekciju genoma HSV-1 razvijena je molekularna metoda temeljena na amplifikaciji odabranih sekvenci virusnog genoma primjenom PCR-a. U svrhu validacije metode provedeni su brojni testovi specifičnosti, a dodatno je uspoređena učinkovitost detekcije standardnim PCR-om i qPCR-om. Ključni koraci razvoja i optimizacije PCR protokola detaljno su opisani u nastavku.

3.2.4.1. Selekcija početnica za specifičnu PCR amplifikaciju HSV-1 genoma

U ovoj studiji odabrano je nekoliko setova oligonukleotidnih početnica (primera) za specifičnu amplifikaciju definiranih regija genoma HSV-1, temeljem literature koja potvrđuje njihovu pouzdanost u detekciji virusne DNK. S obzirom na visoku cijenu i ograničenu dostupnost komercijalnih dijagnostičkih PCR kitova, primijenjen je vlastiti dizajn PCR protokola, čime su osigurane veća fleksibilnost i financijska isplativost istraživanja. Glavni cilj studije bio je ispitati povezanost prisutnosti HSV-1 s različitim kliničkim manifestacijama HSV-a te uspostaviti *proof-of-principle* važnosti uvođenja molekularne dijagnostike u rutinsku kliničku praksu na Klinici za oftalmologiju KBC-a Rijeka. Naglasak je stavljen na konceptualnu i tehničku opravdanost primjene ove metode, neovisno o konačno odabranoj platformi koja će

se standardizirati za kliničku upotrebu. U sklopu istraživanja odabrano je pet setova početnica usmjerenih na gene ICP0, ICP4, ICP27, VP16 i UL54 čime su obuhvaćene različite funkcionalne domene virusnog genoma. Dobiveni PCR produkti razlikovali su se po veličini, što je omogućilo njihovu jednostavnu kvalitativnu usporedbu detekcijom u agaroznom gelu tj. duljine produkata iznosile su redom oko 845, 94, 65, 138 i 65 parova baza (bp) (Tablica 2).

Tablica 2. Setovi početnica korišteni u PCR protokolu za detekciju HSV-1. *Prikazan je dizajn oligonukleotida korištenih za PCR amplifikaciju pet ciljanih gena HSV-1 (ICP4, ICP0, VP16, UL54, ICP27), uključujući uzvodne (od engl. forward) i nizvodne (od engl. reverse) početnice, veličinu očekivanih PCR produkata i relevantne znanstvene izvore. Početnice su odabrane na temelju prethodno objavljenih radova, a potvrđena specifičnost omogućila je njihovu primjenu u ovom protokolu detekcije HSV-1.*

Gen	Uzvodna (forward) početnica	Nizvodna (reverse) početnica	Veličina PCR produkta (bp)	Izvor
ICP4	TGGAGAGTCCGTAGGTGAC	TTGTCTCCGACGCCATC	94	Pan D et al., 2014
ICP0	AGCGAGTACCCGCGCGCTG	CAGGTCTCGGTGCGGGAAC	845	Pan D et al., 2014
VP16	TTTGACCCGCGAGATCCTAT	GCTCCGTTGACGAACATGAA	138	Mattila et al., 2015
UL54	GTCCTGCGCTCCATCTCC	GTCGTGCATGACCTGTGC	65	Mattila et al., 2015
ICP27	GTGTGCAGCCGTGTGCCA	AGCGACCGGGCCGGAATC	65	Pan D et al., 2014

Odabrani geni nalaze se u ponavljajućim sekvencama genoma (npr. ICP0 i ICP4 prisutni su u dvostrukim kopijama) te u jedinstvenoj “velikoj” regiji (UL), čime je osigurano da ciljane sekvence pokrivaju različite topološke dijelove virusne DNK.

Za potrebe optimizacije PCR protokola korišten je standardizirani DNK predložak tj. klonirani genom HSV-1 soja KOS ugrađen u bakterijski umjetni kromosom (BAC plazmid) koji sadrži cjelokupni virusni genom. Ovakav referentni uzorak omogućio je preciznu kalibraciju reakcijskih uvjeta i kontrolu specifičnosti amplifikacije tijekom razvoja protokola. Pri dizajnu PCR reakcija uzeto je u obzir da su odabrani oligonukleotidi različite dužine i sastava baza. Posebice, varijacije u udjelu guanina i citozina (G/C sadržaj) među početnicama dovele su do različitih temperatura taljenja pojedinih primer-parova, pa je za svaki esej bilo potrebno individualno prilagoditi temperaturu sparivanja (od engl. *annealing*). Te razlike u biokemijskim svojstvima početnica prikazane su u Tablici 3., a uvažene su prilikom optimizacije kako bi se postigla maksimalna osjetljivost i specifičnost detekcije ciljnih sekvenci.

Tablica 3. GC sadržaj početnica i optimalna temperatura sparivanja (od engl. annealing) za amplifikaciju HSV-1 gena PCR metodom. GC sadržaj predstavlja postotak guaninskih i citozinskih baza u svakoj početnici (uzvodna / nizvodna). Visok GC sadržaj povećava stabilnost vezanja i temperaturu taljenja, što utječe na optimizaciju PCR reakcije. Optimalna temperatura sparivanja određena je eksperimentalno kroz testiranje različitih temperaturnih uvjeta i definirana kao ona pri kojoj je postignuta maksimalna specifičnost i učinkovitost amplifikacije.

Gen	GC sadržaj početnica (uzvodna/nizvodna)	GC sadržaj ukupno (%)	Temperatura sparivanja (°C)
ICP4	57.9 / 55.6	56,8	58
ICP0	73.7 / 70.0	71,8	67
VP16	50.0 / 50.0	50	60
UL54	66.7 / 61.1	63,9	59
ICP27	63.2 / 72.2	67,7	62

Početnice korištene u ovom istraživanju isporučene su od strane proizvođača (Metabion, Njemačka) kao gotove otopine s deklariranom koncentracijom od 100 µM. Prije njihove primjene u PCR protokolima, provedena je kvalitativna analiza uzoraka putem elektroforeze u agaroznom gelu s ciljem procjene koncentracijske usklađenosti pojedinih parova početnica. Ova je analiza imala za cilj ispitati ekvimolarnost među članovima istog para početnica, budući da značajan suvišak jedne početnice u odnosu na drugu može negativno utjecati na efikasnost i specifičnost amplifikacije ciljnog fragmenta, uslijed neravnoteže u inicijaciji lančane reakcije

3.2.4.2. Optimizacija PCR protokola: primjena *touch-down* metode i određivanje optimalne temperature sparivanja

Kao inicijalni korak u optimizaciji PCR reakcije primijenjena je *touch-down* metoda s ciljem povećanja specifičnosti amplifikacije. U ovom pristupu temperatura sparivanja postavljena je početno na 68 °C, a zatim se postupno snižavala za 1 °C po ciklusu do 60 °C, nakon čega su preostali ciklusi provedeni pri konstantnoj temperaturi sparivanja. Za potrebe optimizacije korišten je standardizirani DNK predložak (BAC-HSV-1) u koncentraciji 10 ng po reakciji. Paralelne PCR reakcije provedene su pri različitim temperaturama sparivanja (52 °C, 56 °C i 60 °C) radi utvrđivanja optimalnih uvjeta amplifikacije.

Specifičnost reakcije procijenjena je analizom veličine amplifikacijskih produkata u agaroznom gelu te praćenjem pojave eventualnih nespecifičnih traka. Optimalna temperatura sparivanja definirana je kao ona pri kojoj je dobivena jasna amplifikacija ciljanog fragmenta

uz minimalnu prisutnost nespecifičnih produkata. Rezultati optimizacije prikazani su u poglavlju Rezultati.

3.2.4.3. Procjena osjetljivosti i specifičnosti PCR protokola

Analitička osjetljivost PCR protokola procijenjena je korištenjem serijskih desetorostrukih razrjeđenja HSV-1 DNK poznate koncentracije. Kao referentni predložak korišten je klonirani genom HSV-1 soja KOS ugrađen u BAC plazmid. Pripremljena razrjeđenja analizirana su zasebnim PCR reakcijama pod optimiziranim uvjetima. Granica detekcije definirana je kao najniža koncentracija virusne DNK pri kojoj je bilo moguće reproducibilno detektirati specifični amplifikacijski produkt odgovarajuće veličine.

Specifičnost PCR reakcije procijenjena je uključivanjem negativnih kontrola bez DNK predloška u svakoj seriji amplifikacija te analizom eventualne pojave nespecifičnih produkata. Rezultati procjene analitičke osjetljivosti i specifičnosti pojedinih PCR eseja prikazani su u poglavlju Rezultati.

3.2.5. Optimizacija kvantitativne PCR metode (qPCR)

Standardna dijagnostika HSV infekcija temeljena na konvencionalnom PCR-u predstavlja tehnički jednostavnu i široko primjenjivu metodu, koja ne zahtijeva visoko specijalizirano osoblje za rutinsku provedbu. Ipak, ograničenja takvog pristupa uključuju relativno dugotrajan proces amplifikacije i potrebu za dodatnim koracima (npr. elektroforeza u agaroznom gelu) nakon same reakcije, što može otežati primjenu PCR testova u svakodnevnom kliničkom radu, osobito u ustanovama s ograničenim laboratorijskim kapacitetima. Nasuprot tomu, qPCR nadilazi mnoge tehničke nedostatke standardnog PCR-a. Ova metoda omogućuje simultanu amplifikaciju i detekciju PCR produkta unutar istog sustava, eliminirajući potrebu za post-PCR obradom uzorka, a ukupno trajanje analize znatno je skraćeno (sa 3 sata kod standardnog PCR-a na manje od 1 sata kod qPCR-a). Dodatno, qPCR pruža mogućnost precizne kvantifikacije početne količine ciljane virusne DNK u uzorku. Glavno ograničenje qPCR tehnologije odnosi se na nužnost dodatne edukacije osoblja u interpretaciji Ct vrijednosti prepoznavanju potencijalnih nespecifičnih fluorescencijskih signala.

Jedan od ciljeva ove studije bio je usporediti učinkovitost i osjetljivost standardnog PCR testa s qPCR metodom. U tu svrhu provedena je paralelna amplifikacija odabranih virusnih gena (ICP4 i VP16) primjenom obje metode na serijskim desetorostrukim razrjeđenjima HSV-1 DNK poznate koncentracije, što je omogućilo kvantitativnu evaluaciju qPCR-a u odnosu na konvencionalni PCR. Dobiveni rezultati ove usporedbe opisani su poglavlju 4. Nakon

uspostave optimalnih parametara qPCR reakcije, daljnje aktivnosti bile su usmjerene na uvođenje internih kontrola i procjenu čimbenika koji mogu utjecati na osjetljivost metode (npr. kvaliteta uzorka i prisutnost humanu DNK), što je prikazano u idućim pododjeljcima.

3.2.6. Analiza gena UL23 i UL30

U svrhu analize mogućih mutacija povezanih s antivirusnom rezistencijom provedena je amplifikacija i sekvenciranje gena UL23 i UL30 HSV-1 genoma. Gen UL23, koji kodira virusnu timidinsku kinazu, amplificiran je pomoću dva preklapajuća fragmenta te jednim fragmentom koji obuhvaća cijelu kodirajuću sekvencu (1282 bp), radi osiguravanja potpune pokrivenosti analizirane regije. Gen UL30, koji kodira virusnu DNK polimerazu (3660 bp), amplificiran je u sedam preklapajućih fragmenata kako bi se omogućila pouzdana analiza cijele kodirajuće sekvence. Sekvence uzvodnih (*forward*) i nizvodnih (*reverse*) početnica korištenih za amplifikaciju pojedinih fragmenata, kao i očekivane veličine PCR produkata, prikazane su na Tablici 4.

Tablica 4. Početnice za amplifikaciju gena UL30. *Kombinacija sedam parova početnica (uzvodne i nizvodne) koje generiraju sedam preklapajućih fragmenata potrebnih za potpuno umnažanje gena UL30. Prikazane su sekvence početnica i očekivane veličine PCR produkata za svaki fragment.*

Fragment	Uzvodna (<i>forward</i>) početnica	Nizvodna (<i>reverse</i>) početnica	Veličina PCR produkta (bp)
UL30_01	GATGTTTTCCGGTGGCGG	TTCATGTAAAAGTACTGCCGCG	623
UL30_02	CCTGGAGAACGTGGAGCA	GCTAGCGTGTGTTCCGG	524
UL30_03	TCAAGAAGTACGAGGGTGGG	CACCATGCCGTTACCTTTAT	694
UL30_04	GCCAGAGCCACTTCCAGAA	AGGGAGAGCGTGCTGAAG	699
UL30_05	CATCATCCAGCCCACAAC	CGGTATCGTCGTAAAACAGCA	775
UL30_06	CGTTTATCAACCGCACCTCC	CCATGAGCTTGTAATACACCGT	287
UL30_07	TTTGTCTCACCGCCGAA	CTCTATGCAACATTCGACGAGT	597

PCR reakcije provedene su pod uvjetima opisanim u poglavlju 3.2.3. Dobiveni amplifikacijski produkti pročišćeni su QIAquick Gel Extraction Kitom (Qiagen, Njemačka; kat. br. 28704) prema uputama proizvođača. Pročišćeni PCR produkti podvrgnuti su Sangerovom

sekvenciranju (ABI 3730xl platforma, komercijalni servis). Dobivene sekvence analizirane su usporedbom s referentnim HSV-1 genomom (GenBank baza podataka) korištenjem BLAST alata (NCBI) i softverskih alata za poravnanje sekvenci. Analiza je uključivala identifikaciju nukleotidnih supstitucija i potencijalnih promjena u kodirajućim regijama. Rezultati analize mutacija prikazani su u poglavlju Rezultati.

3.2.7. Indeks rizika za procjenu rezistencije HSV-a na ACV

Na temelju kliničkih i laboratorijskih podataka prikupljenih u ovom istraživanju razvijen je prediktivni bodovni sustav s ciljem identifikacije pacijenata kod kojih postoji povećana sumnja na rezistenciju HSV-a na ACV. Model je temeljen na kliničkim čimbenicima koji su u literaturi i našim analizama povezani s težim tijekom bolesti i mogućom antivirusnom rezistencijom.

U sustav su uključene sljedeće varijable:

- ≥ 5 prethodnih reaktivacija HSK-a – 1 bod
- PCR pozitivan nalaz unatoč terapiji ACV-om – 2 boda
- Stromalni ili endotelni oblik HSK-a – 1 bod
- Prisutnost komplikacija rožnice (ožiljak, NV, PED ili sekundarni glaukom) – 1 bod

Ukupan zbroj bodova može iznositi od 0 do 5.

Na temelju ukupnog skora pacijenti su klasificirani u tri skupine rizika:

- 0 – 2 boda: nizak rizik
- 3 – 4 boda: srednji rizik
- 5 bodova: visok rizik za moguću rezistenciju HSV-a na ACV.

Ovaj sustav predviđanja koristi kombinaciju kliničkih i molekularnih parametara te je razvijen kao pomoćni alat za identifikaciju pacijenata kod kojih bi moglo biti indicirano dodatno genotipsko testiranje (sekvenciranje gena UL23 i UL30).

3.3. Statistička obrada podataka

3.3.1. Molekularna dijagnostika HSK-a i kriteriji interpretacije PCR nalaza

Ukupno je analizirano 55 strugotina rožnice pacijenata kojima smo na temelju kliničkih parametara posumnjali na dijagnozu HSK-a. Uzorci pacijenata tj. strugotine rožnice testirani su metodom qPCR na prisutnost genoma virusa HSV-1, usmjerenom na gene ICP4 i VP16, koji su specifični za aktivnu virusnu replikaciju.

Prisutnost virusa određena je na temelju Ct vrijednosti, uzimajući u obzir ograničenja testova osjetljivosti i specifičnosti, kao i rezultate negativnih kontrola. Sukladno tim parametrima, uzorci su kategorizirani u tri skupine:

- *Pozitivan uzorak:*
 - o Ct < 31 za gen ICP4
 - o Ct < 28 za gen VP16

- *Intermedijarno pozitivan uzorak:*
 - o Ct između 31.1 i 36 za ICP4
 - o Ct između 29 i 33 za VP16

- *Negativan uzorak:*
 - o Ct > 36 za ICP4
 - o Ct > 33 za VP16 ili nedetekcija virusa

Uzorci su klasificirani kao pozitivni ako je barem jedan od ciljnih gena pokazao jasnu pozitivnost. Intermedijarni slučajevi uključivali su one s graničnim vrijednostima Ct, dok su negativni uzorci bili oni bez detekcije virusa prema oba kriterija.

Uzorci u kojima nije detektirana amplifikacija kontrolnog gena 18S rRNA isključeni su iz daljnje analize zbog moguće tehničke neispravnosti.

Za potrebe statističke obrade, podaci su dodatno grupirani binarno:

- Detekcija virusa prisutna (pozitivni i intermedijarni uzorci)
- Detekcija virusa odsutna (negativni uzorci)

3.3.2. Metode statističke analize

Statistička analiza provedena je korištenjem kombinacije softverskih alata: Python 3.10 (uz biblioteke *pandas*, *scipy*, *statsmodels*, *matplotlib* i *seaborn*) te IBM SPSS Statistics v29. Granica statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

3.3.2.1. Deskriptivna analiza

Za sve numeričke varijable izračunati su: srednja vrijednost, medijan, standardna devijacija i raspon. Kategorizirane varijable (npr. PCR status, oblik HSK-a, prisutnost komplikacija) prikazane su pomoću apsolutnih i relativnih frekvencija.

3.3.2.2. Analiza razlika među skupinama

Za usporedbu dviju nezavisnih skupina korišten je Mann-Whitney U test, s obzirom na neparametrijsku distribuciju većine varijabli. U slučajevima usporedbe više od dvije skupine korišten je Kruskal-Wallis H test (npr. za usporedbu Ct vrijednosti između različitih oblika HSK-a). Za kategorizirane varijable primijenjeni su χ^2 test i Fisherov egzaktni test (npr. za učestalost komplikacija prema PCR statusu).

3.3.2.3. Korelacijska analiza

Za ispitivanje povezanosti među numeričkim varijablama korišten je Spearmanov rang-korelacijski koeficijent (ρ). Analizirana je povezanost između razine virusnog opterećenja (Ct vrijednosti), trajanja liječenja, broja reaktivacija i vidne oštine. Rezultati korelacijske analize prikazani su kroz vrijednosti koeficijenta korelacije (ρ) i pripadajuće p-vrijednosti.

3.3.2.4. Multivarijatna analiza

Provedena je logistička regresijska analiza s ciljem identifikacije neovisnih prediktora PCR pozitivnosti. U model su uključene varijable koje su u univarijatnim analizama pokazale potencijalnu povezanost: oblik HSK-a, dob, spol, broj reaktivacija, broj dana liječenja aciklovirom te vrijeme uzorkovanja. Rezultati su prikazani kao odds ratio (OR) uz 95% intervale pouzdanosti.

3.4. Etički aspekti istraživanja

Svi ispitanici bili su unaprijed upoznati s ciljevima planiranog istraživanja, nakon čega su samostalno i bez prisile donijeli odluku o sudjelovanju te su potpisali informirani pristanak, odobren od strane Etičkog povjerenstva KBC-a Rijeka i Povjerenstva za etička pitanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

U ovom su istraživanju u potpunosti poštovani temeljni etički i bioetički principi: osobni integritet, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost za ispitanika. Tijekom prikupljanja i prikazivanja podataka osigurana je zaštita privatnosti ispitanika i očuvanje njihovog identiteta. Liječnici su se pri provođenju znanstvenog istraživanja pridržavali preporuka Helsinške deklaracije i njezinih revizija, Kodeksa medicinske etike i deontologije, te Pravilnika o kliničkim ispitivanjima i dobroj kliničkoj praksi, koji je usklađen sa Smjernicama Europske medicinske agencije i njezinog tijela *Committee for Proprietary Medicinal Products* (“*Note for Guidance on Good Clinical Practice*” – CPMP/ICH/135/95).

4. REZULTATI

4.1. Demografske karakteristike pacijenata

4.1.1. Dob i spol pacijenata

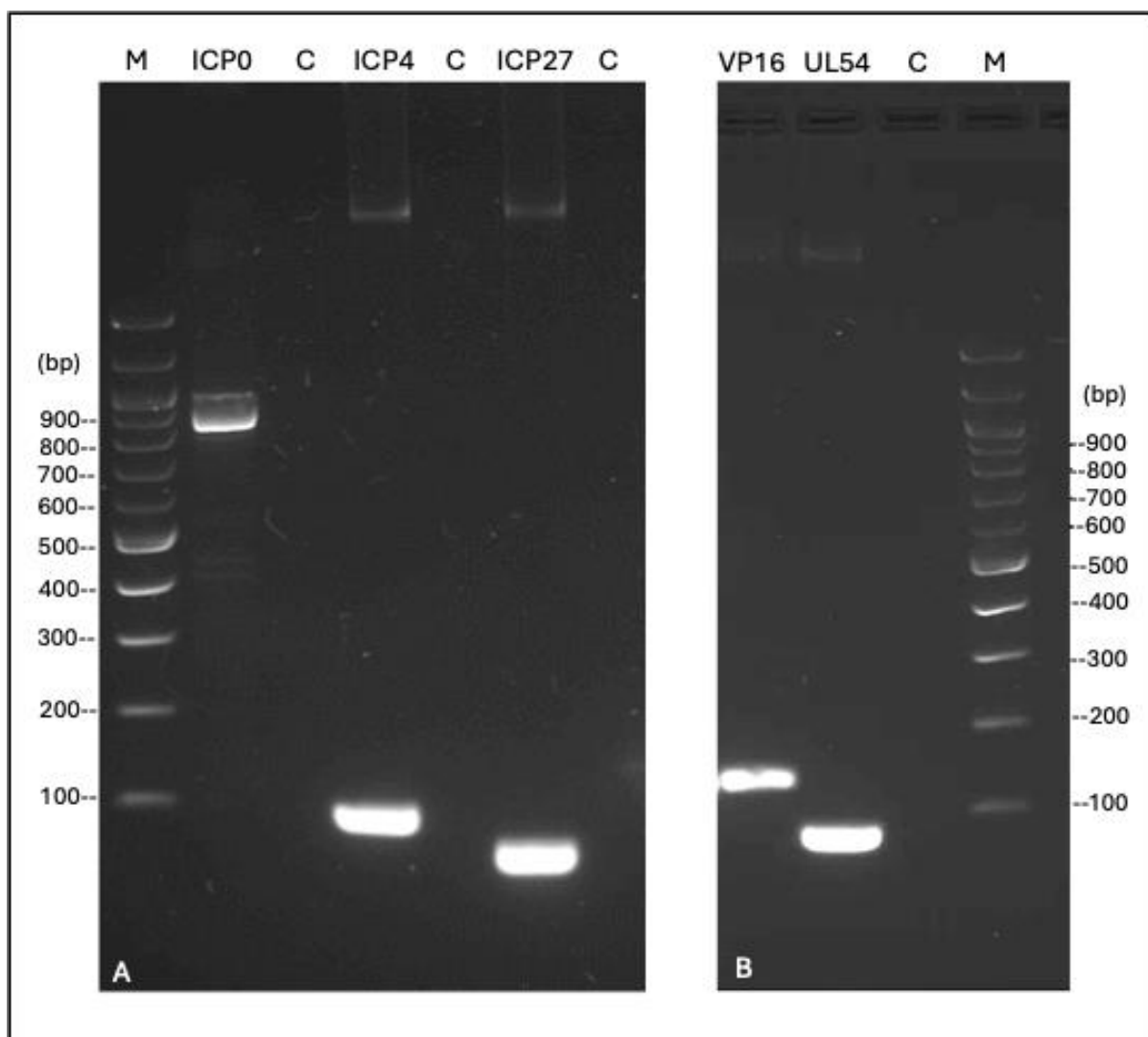
U istraživanje je uključeno ukupno 55 pacijenata s kliničkom dijagnozom HSK-a. Prosječna dob ispitanika iznosila je $68,4 \pm 17,1$ godina (raspon 22 – 91), s medijanom dobi od 71 godine. Većinu uzorka činile su osobe starije životne dobi. Od ukupnog broja pacijenata, 30 (54,5 %) bilo je muškog spola, a 25 (45,5 %) ženskog spola. Omjer spolova nije pokazao statistički značajnu razliku u učestalosti HSK-a (χ^2 -test, $p = 0,49$).

Pacijenti s pozitivnim PCR nalazom bili su prosječno jednake dobi kao i PCR negativni (medijani 73 vs. 71 godina; $p = 0,64$). Ni spol nije pokazao povezanost s rezultatom PCR-a tj. muškarci i žene imali su slične stope pozitivnosti (65,5 % vs. 60,0 %; Fisherov test, $p = 0,78$).

4.2. Validacija i optimizacija PCR protokola

4.2.1. Inicijalna amplifikacija ciljnih HSV-1 gena

U inicijalnoj fazi validacije PCR protokola provedena je amplifikacija pet ciljnih gena HSV-1 (ICP0, ICP4, ICP27, UL54 i VP16) korištenjem referentne DNK (BAC-HSV-1) kao predloška. Cilj ovog koraka bio je potvrditi funkcionalnost dizajniranih početnica te provjeriti očekivane veličine amplifikacijskih produkata. Svi analizirani geni uspješno su amplificirani, pri čemu su dobiveni PCR produkti odgovarali predviđenim veličinama prema dizajnu početnica. Elektroforetska analiza u 2 % agaroznom gelu potvrdila je prisutnost jasnih i diskretnih traka za svaki analizirani gen, bez vidljive degradacije ili potpunog izostanka amplifikacije (Slika 4).

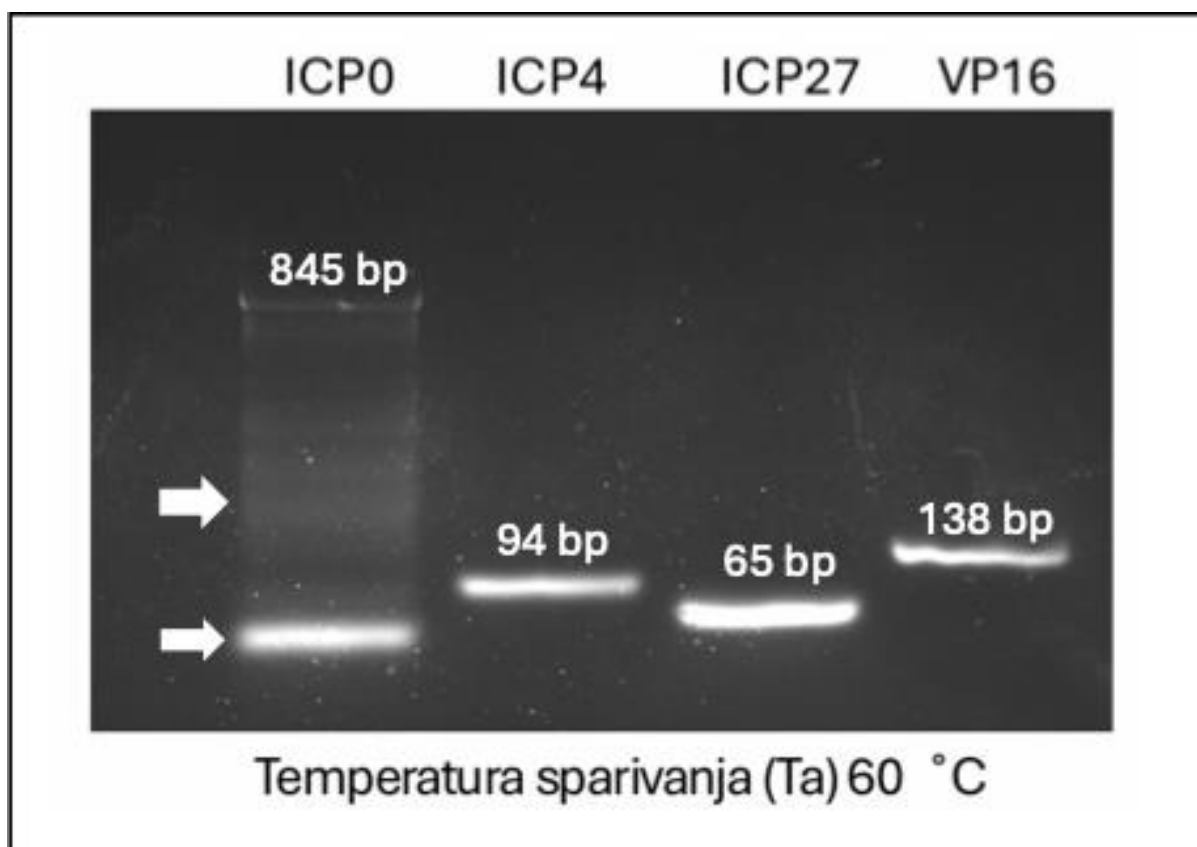


Slika 4. Rezultati PCR amplifikacije ciljanih HSV-1 gena. PCR amplifikacijom uspješno su umnoženi ciljani geni HSV-1 (ICP0, ICP4, ICP27, UL54 i VP16), pri čemu dobiveni PCR produkti odgovaraju očekivanim veličinama, što potvrđuje specifičnost korištenih početnica i učinkovitost primijenjenog PCR protokola. PCR produkti analizirani su elektroforezom u 2 % agaroznom gelu uz molekularni marker (100 bp DNK ljestve). U panelu A prikazani su produkti amplifikacije gena ICP0, ICP4 i ICP27, dok su u panelu B prikazani produkti amplifikacije gena VP16 i UL54. Oznaka M označava molekularni marker, dok C označava negativnu kontrolu PCR reakcije.

Ovi rezultati potvrdili su osnovnu funkcionalnost svih analiziranih PCR eseja te omogućili nastavak optimizacije reakcijskih uvjeta.

4.2.2. Optimizacija temperature sparivanja

Nakon inicijalne potvrde amplifikacije, provedena je optimizacija temperature sparivanja početnica s ciljem povećanja specifičnosti reakcije i smanjenja pojave nespecifičnih produkata. Paralelne PCR reakcije provedene su pri temperaturama sparivanja od 52 °C, 56 °C i 60 °C. Usporednom analizom dobivenih elektroforetskih traka utvrđeno je da reakcije provedene pri 60 °C pokazuju najpovoljniji omjer intenziteta specifičnog amplifikacijskog produkta i smanjenja nespecifičnih traka. Pri nižim temperaturama sparivanja uočena je izraženija pojava dodatnih produkata različitih veličina (Slika 5).

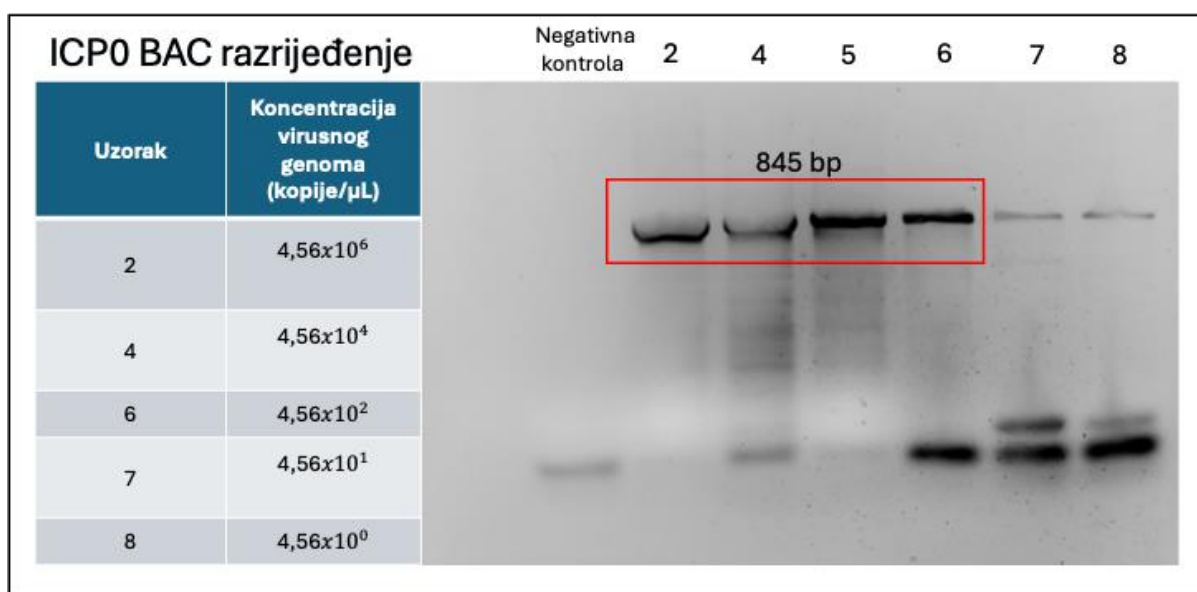


Slika 5. Rezultati PCR amplifikacije ciljanih HSV-1 gena pri temperaturi sparivanja 60 °C. Elektroforeza PCR produkata dobivenih amplifikacijom odabranih gena virusa herpes simplex tip 1 (HSV-1) provedena je u 2 % agaroznom gelu. Dobiveni PCR produkti odgovaraju očekivanim veličinama: ICP0 – 845 bp, ICP4 – 94 bp, ICP27 – 65 bp i VP16 – 138 bp, što potvrđuje specifičnost korištenih početnica i odgovarajuće uvjete PCR reakcije pri temperaturi sparivanja (Ta) od 60 °C. Bijele strelice označavaju artefakt amplifikacije.

Na temelju dobivenih rezultata temperatura sparivanja od 60 °C odabrana je kao optimalna za daljnju primjenu PCR protokola.

4.2.3. Procjena analitičke osjetljivosti i specifičnosti PCR protokola

Analitička osjetljivost PCR protokola procijenjena je korištenjem serijskih desetorostrukih razrjeđenja HSV-1 DNK poznate koncentracije. Elektroforetskom analizom amplifikacijskih produkata utvrđeno je da se granica detekcije razlikuje ovisno o ciljnom genu. Kod amplifikacije gena ICP0 specifični PCR produkt mogao se pouzdano detektirati u rasponu viših koncentracija virusne DNK, dok je pri nižim koncentracijama zabilježen slabiji intenzitet trake te povremena pojava dodatnih produkata (Slika 6).



Slika 6. Procjena analitičke osjetljivosti PCR eseja za gen ICP0.

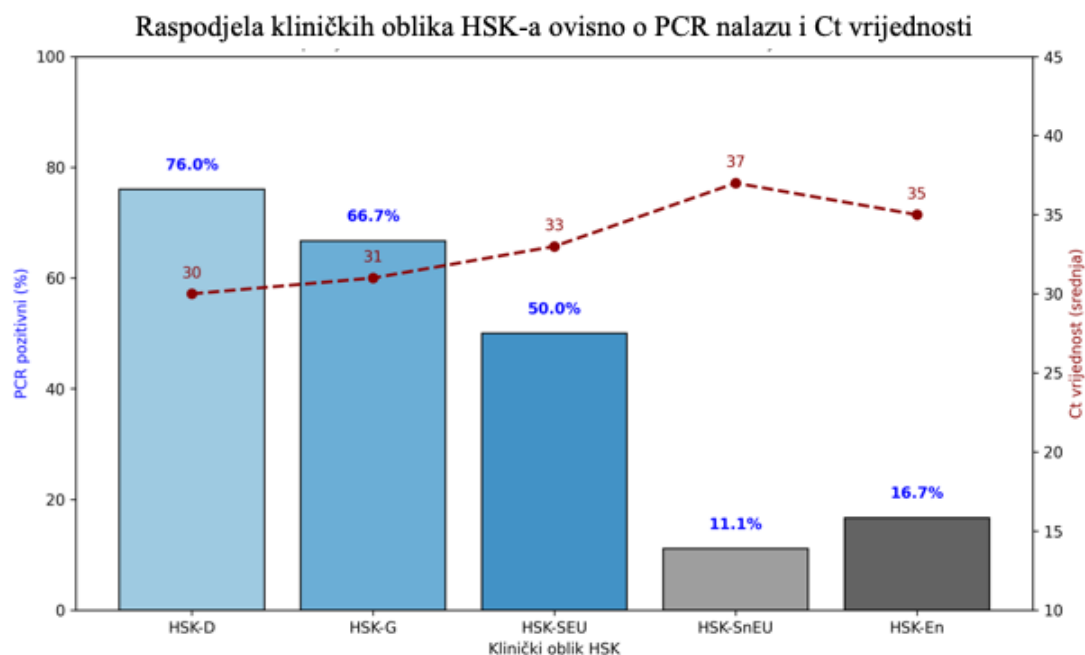
Prikaz elektroforetske analize PCR produkata (845 bp) dobivenih amplifikacijom gena ICP0 iz serijskih desetorostrukih razrjeđenja HSV-1 DNK ($4,56 \times 10^6$ do $4,56 \times 10^0$ kopija/ μ L). PCR reakcije provedene su prema optimiziranom protokolu, uz uključenu negativnu kontrolu. Produkti su analizirani elektroforezom u 2 % agaroznom gelu i vizualizirani pod UV svjetlom. Na slici su prikazane trake dobivene pri različitim koncentracijama virusnog genoma.

Dobiveni rezultati ukazali su na razlike u osjetljivosti pojedinih PCR eseja, što je uzeto u obzir pri daljnjoj selekciji metoda za analizu kliničkih uzoraka. Uz procjenu osjetljivosti analizirana je i specifičnost pojedinih PCR eseja. U reakcijama s nižim koncentracijama predložka, osobito kod amplifikacije gena ICP0, povremeno je uočena pojava dodatnih nespecifičnih PCR produkata različite veličine, uključujući i produkte kraće od očekivanog PCR produkta. Pojava nespecifičnih produkata ukazivala je na potrebu pažljive optimizacije reakcijskih uvjeta te

selekcije PCR eseja koji su pokazali najvišu specifičnost i reproducibilnost za daljnju primjenu na kliničkim uzorcima.

4.3. Raspodjela kliničkih oblika HSK-a

HSK-E zabilježen je u 28 od ukupno 55 pacijenata (50,9 %), pri čemu je 25 pacijenata imalo HSK-D, a 3 HSK-G. HSK-S dijagnosticiran je u 21 pacijenta (38,2 %), pri čemu je HSK-SEU potvrđen u 12, a HSK-SnEU u 9 slučajeva. HSK-En zabilježen je u 6 pacijenata (10,9 %). Najčešći pojedinačni klinički oblik bio je HSK-D, prisutan u 45,5 % svih slučajeva ($p < 0,01$). Rezultati PCR testiranja pokazali su značajne razlike u ovisnosti o kliničkom obliku bolesti. PCR test bio je pozitivan u 76,0 % pacijenata s HSK-D, u 66,7 % pacijenata s HSK-G, u 50,0 % pacijenata s HSK-SEU, u 11,1 % pacijenata s HSK-SnEU te u 16,7 % pacijenata s HSK-En, u odnosu na ukupan broj pacijenata unutar svake pojedine kliničke skupine. Osobito nisku stopu detekcije pokazao je HSK-SnEU, dok je HSK-D bio najčešći oblik s dokazanim pozitivnim PCR-om. Kada su oblici bolesti grupirani prema dubini i karakteru zahvaćanja rožnice, površinski oblici HSK-a (HSK-D, HSK-G i HSK-SEU) pokazali su PCR pozitivnost u 63,3 % slučajeva, dok su dublji oblici HSK-a (HSK-SnEU i HSK-En) bili pozitivni u svega 13,3 % slučajeva. Ova razlika u učestalosti PCR pozitivnosti između površinskih HSK-E i dubljih HSK-S i HSK-En bila je statistički značajna ($\chi^2 = 9,17$; $p = 0,0025$). Čak i kada su oblici grupirani u tri glavne kategorije (HSK-E, HSK-S, HSK-En), razlika je ostala statistički značajna ($p < 0,01$), s najvećim udjelom pozitivnih PCR nalaza kod epitelnog oblika HSK-a (Slika 7).



Slika 7. Raspodjela kliničkih oblika HSK-a. *Stupci prikazuju udio PCR pozitivnih pacijenata (%) za svaki klinički oblik HSK, dok isprekidana crvena linija označava srednje vrijednosti Ct - vrijednost praga u qPCR analizi (od engl. cycle threshold) kod PCR pozitivnih uzoraka. Najviša učestalost PCR pozitivnih nalaza zabilježen je kod površinskih oblika bolesti uz niže Ct vrijednosti, što upućuje na višu razinu virusa. Nasuprot tome, HSK oblici bez epitelnog defekta pokazali su najnižu stopu PCR pozitivnosti te više Ct vrijednosti, što ukazuje na slabiju ili odsutnu aktivnu replikaciju virusa u tim oblicima.*

Analiza Ct vrijednosti pokazala je da HSK-E i HSK-S imaju niže medijane Ct vrijednosti (oko 30 – 33 ciklusa), što upućuje na višu razinu virusa u tim skupinama. Suprotno tome, u HSK-En oblicima Ct vrijednosti su uglavnom visoke (često > 35), što ukazuje na nisku ili odsutnu detekciju virusne DNK. Drugim riječima, HSV DNK češće je i u većoj količini prisutna na rožnici u HSK-E i HSK-S, dok u HSK-En ostaje gotovo ne otkrivena PCR metodom. Iako zbog ograničenog broja pozitivnih uzoraka u HSK-En skupini razlike u razini virusa nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$), deskriptivna analiza jasno potvrđuje da je prisutnost virusa najmanje izražena upravo u ovom obliku.

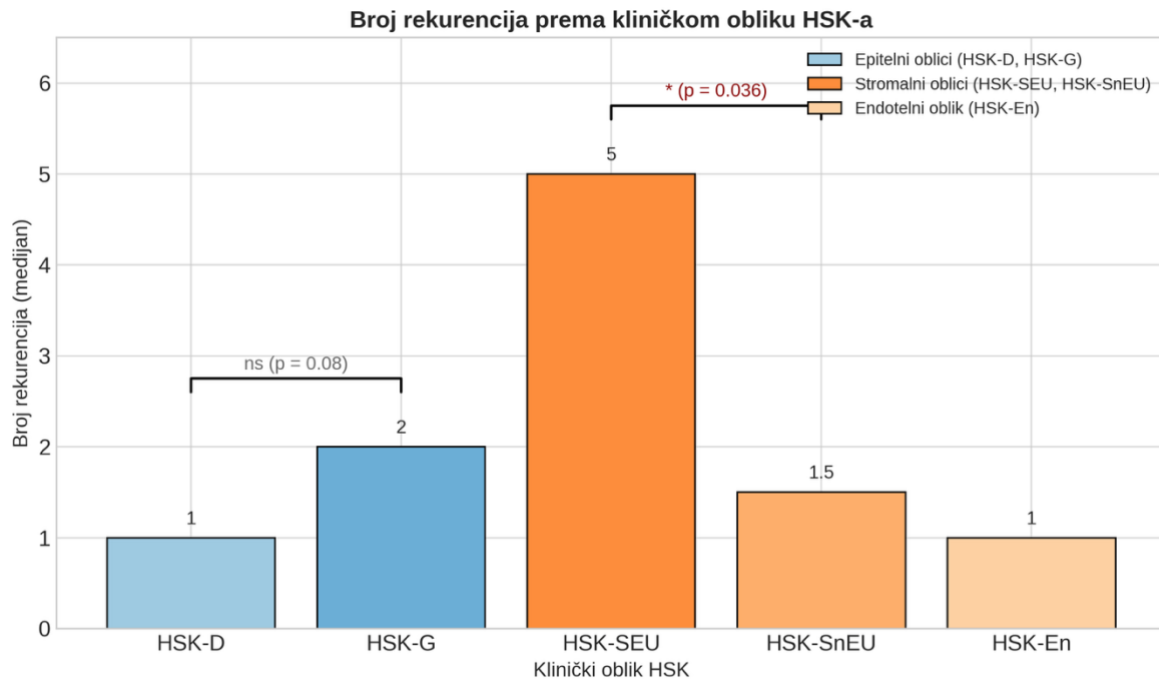
Multivarijatna logistička regresija potvrdila je da klinički oblik lezije predstavlja neovisan prediktor PCR ishoda. Istodobno, prethodno liječenje ACV-om pokazalo se dodatnim neovisnim čimbenikom povezanim sa smanjenom vjerojatnošću PCR pozitivnosti ($p < 0,01$),

bez obzira na oblik HSK-a. Drugim riječima, primjena ACV prije uzorkovanja smanjuje vjerojatnost za detekciju virusne DNK PCR metodom, neovisno o kliničkoj prezentaciji.

Zaključno, rezultati pokazuju da su klinički oblik bolesti i prethodna ACV terapija dva neovisna čimbenika koji značajno utječu na ishod PCR testiranja, pri čemu HSK-E oblik pokazuje najveću, a HSK-En oblik najmanju detekciju virusne DNK.

4.4. Učestalost reaktivacija HSK-a

Većina pacijenata imala je povijest ponavljajućih epizoda rHSK. Broj prethodnih reaktivacija varirao je od 1 do 10, s medijanom od 2 epizode. Najveći udio pacijenata (36 / 55; 65,5 %) imao je dvije ili više epizoda rHSK, dok je 19 od 55 pacijenata (34,5 %) imalo prvu epizodu HSK-a. Više od polovice pacijenata (28 / 55, 50,9 %) imalo je tri ili više reaktivacije, a najveći zabilježeni broj recidiva bio je 10, zabilježen kod dva pacijenta. Prosječan broj reaktivacija iznosio je $3,1 \pm 2,4$. Nije uočena statistički značajna korelacija između dobi pacijenta i broja reaktivacija (Spearman $\rho = -0,03$; $p = 0,85$), niti je zabilježena razlika između muškaraca i žena (Mann–Whitney $U = 352$; $p = 0,65$) (Slika 8).



Slika 8. Broj rekurencija prema kliničkom obliku herpetičnog keratitisa (HSK).

Stupci prikazuju medijan broja prethodnih epizoda herpetičnog keratitisa za pojedine kliničke podtipove bolesti (HSK-D, HSK-G, HSK-SEU, HSK-SnEU i HSK-En). Veći broj reaktivacija zabilježen je u stromalnim oblicima bolesti, osobito u HSK-SEU. Horizontalne linije iznad stupaca označavaju rezultate parnih usporedbi između skupina (Mann–Whitney test), uz pripadajuće p-vrijednosti.

Broj reaktivacija razlikovao se među kliničkim oblicima HSK-a. HSK-E imali su medijan od 1 (IQR 0 – 1), HSK-S medijan 2 (IQR 1 – 4), a HSK-En medijan 1 (IQR 0 – 2). Razlike među grupama bile su statistički značajne (Kruskal – Wallis $H = 6,84$; $p = 0,03$). Post-hoc analiza (Mann – Whitney) pokazala je da HSK-S ima značajno veći broj reaktivacija u odnosu na HSK-E ($U = 163$; $p = 0,01$). Razlike između HSK-S i HSK-En te između HSK-E i HSK-En nisu bile statistički značajne ($p > 0,20$).

Unutar epitelnih oblika HSK-a nije uočena značajna razlika u broju recidiva. HSK-G je pokazivao tendenciju češćih reaktivacija (medijan 2) u odnosu na HSK-D (medijan 1), no razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,08$). Nasuprot tome, unutar stromalnih oblika (HSK-SEU + HSK-SnEU) primijećen je jasan trend: HSK-SEU bio je povezan s višim brojem recidiva (procijenjeni medijan 5) u odnosu na HSK-SnEU (medijan 1 – 2), a razlika je bila statistički značajna ($p = 0,036$). Ispitana je povezanost učestalosti prethodnih epizoda s PCR nalazom te razinom virusne DNK. Nije nađena statistički značajna razlika u prosječnom broju

recidiva između PCR pozitivnih i PCR negativnih pacijenata (medijani 2 vs. 3 epizode; $U = 250,5$; $p = 0,65$). Također, korelacija između broja reaktivacija i Ct vrijednosti bila je vrlo slaba i nije značajna (Spearman $\rho = + 0,09$; $p = 0,51$).

4.5. Utjecaj vremena uzorkovanja na PCR detekciju HSV-a

Vrijeme proteklo od početka aktualne kliničke epizode HSK-a do uzimanja uzorka za PCR analizu bilo je izrazito varijabilno. Medijan vremena uzorkovanja iznosio je 7 dana (raspon 1 – 136 dana), pri čemu je 75 % uzoraka prikupljeno unutar prvih 14 dana od pojave simptoma. U dva slučaja uzorak je uzet istoga dana kada je postavljena dijagnoza (1. dan bolesti), dok je kod pet pacijenata uzorkovanje provedeno nakon više od 50 dana trajanja bolesti. Prosječno vrijeme uzorkovanja iznosilo je $16,9 \pm 26,2$ dana. Nije utvrđena statistički značajna razlika u vremenu uzorkovanja između različitih kliničkih oblika HSK-a (Kruskal–Wallis $H = 3,13$; $p = 0,21$). Prosječno vrijeme uzorkovanja u skupini HSK-E iznosilo je 12,3 dana, u HSK-S 22,7 dana, a u HSK-En 17,2 dana, uz značajno preklapanje raspona vrijednosti između skupina. Također nije utvrđena značajna povezanost između duljine trajanja simptoma prije uzorkovanja i rezultata PCR analize. Medijan vremena do uzorkovanja u skupini s pozitivnim PCR nalazom iznosio je 6,5 dana, u usporedbi sa 7 dana u skupini s negativnim nalazom (Mann–Whitney $U = 261$; $p = 0,82$). Analiza korelacije nije pokazala značajnu povezanost između broja dana od početka simptoma i količine virusne DNK (Spearman $\rho = - 0,15$; $p = 0,29$). Sveukupno, vrijeme uzorkovanja nije imalo statistički značajan utjecaj na ishod PCR detekcije HSV-a.

4.6. Vidna oštrina (VO) prije i poslije liječenja HSK-a

Na početku liječenja pacijenti su imali značajno sniženu VO zahvaćenog oka. Srednja početna VO iznosila je $0,36 \pm 0,35$, s medijanom 0,30 (IQR 0,09 – 0,60). Nakon provedenog liječenja, VO značajno se popravila na prosječno $0,48 \pm 0,37$, s medijanom 0,50 (IQR 0,20 – 0,70). Razlika VO prije i poslije terapije bila je statistički značajna (Wilcoxonov test, $z = - 4,16$; $p < 0,001$). Pojedinačno gledano, poboljšanje VO zabilježeno je u 31 / 55 pacijenata (56,4 %), kod 21 pacijenta (38,2 %) VO ostala je nepromijenjena, dok je u samo 3 pacijenta (5,5 %) došlo do pogoršanja VO unatoč terapiji. Prije terapije medijan početne VO zahvaćenog oka iznosio je 0,30 (raspon 0,001 – 1,0), a nakon terapije 0,50 to poboljšanje bilo je statistički značajno ($p < 0,001$). Pacijenti s HSK-E imali su relativno dobru početnu VO (medijan 0,6 za HSK-D, 0,5 za HSK-G). Nasuprot tome, HSK-S imali su značajno slabiji vid u početku (medijan 0,2), a HSK-En a najslabiji (medijan 0,05). Ove razlike u početnom vidu među skupinama bile su statistički

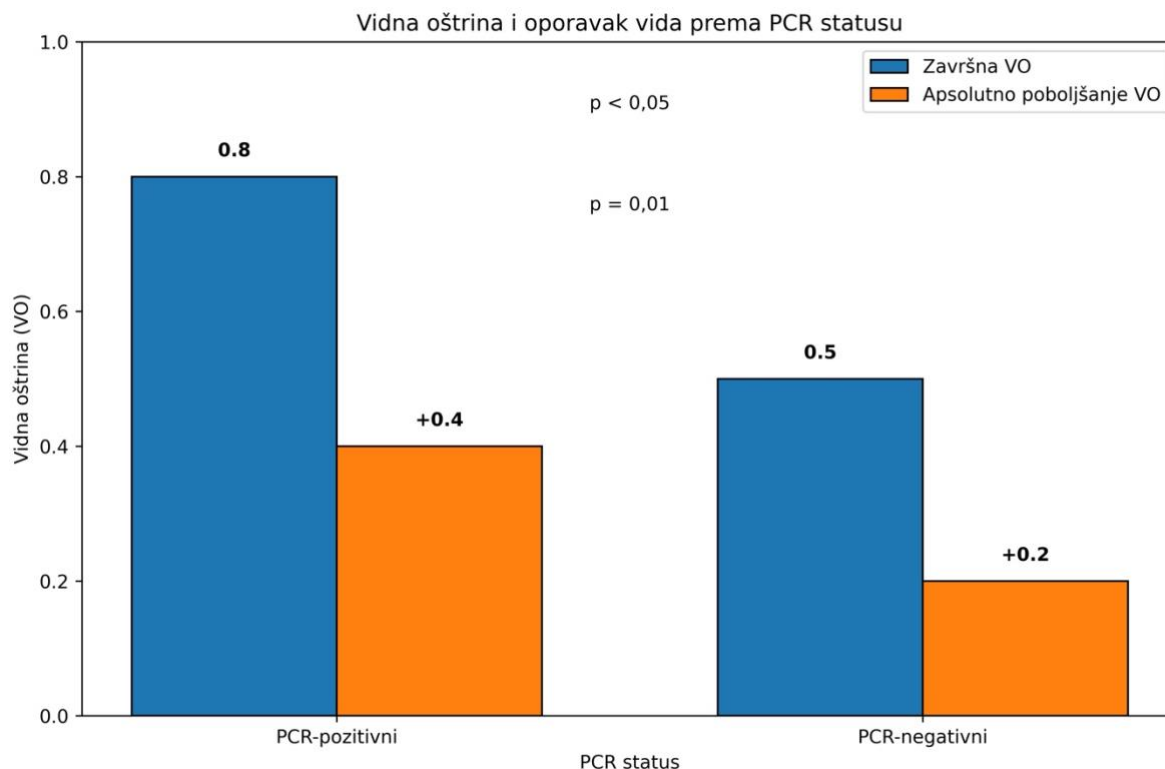
značajne (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 13,07$; $p = 0,0015$). Sličan obrazac zabilježen je i za završnu VO: HSK-E postigli su bolji konačni vid (medijan 0,7) od HSK-S (0,3) i HSK-En (0,065) ($\chi^2 = 14,78$; $p = 0,0006$). Unatoč tome, relativno poboljšanje VO nije se značajno razlikovalo između kliničkih skupina ($p = 0,72$). Drugim riječima, iako su HSK-E imali bolji apsolutni vid i HSK-S slabiji, prosječni porast VO uslijed terapije bio je podjednak u svim skupinama. Detaljni prikaz početne i završne VO te relativnog poboljšanja prema kliničkom obliku HSK-a prikazan je u Tablici 5.

Tablica 5. Prikaz početne i završne vidne oštine (VO) prema kliničkom obliku herpetičnog keratitisa (HSK). *Prikazane su medijanske vrijednosti VO prije i nakon liječenja te relativno poboljšanje vidne funkcije. Završna VO značajno se razlikovala među kliničkim oblicima HSK-a, s boljim konačnim vidom u epitelnom HSK-u u odnosu na stromalne i endotelne oblike HSK-a dok razlike u relativnom poboljšanju VO nisu bile statistički značajne.*

Klinički oblik HSK-a	Početna VO (medijan)	Završna VO (medijan)	Relativno poboljšanje VO	Statistička značajnost među skupinama
HSK-E (HSK-D + HSK-G)	0,5–0,6	0,7	+0,1 do +0,2	$\chi^2 = 14,78$; $p = 0,0006$
HSK-S (HSK-SEU + HSK-SnEU)	0,2	0,3	+0,1 do +0,2	$p = 0,72$ (ns)
HSK-En	0,05	0,065	+0,1	$p = 0,72$ (ns)

Analizirano je poboljšanje VO tijekom liječenja u dvije skupine pacijenata, podijeljene prema PCR nalazu na PCR pozitivne i PCR negativne. Obje skupine pokazale su statistički značajno poboljšanje VO nakon terapije, no uočen je različit stupanj oporavka vida između PCR pozitivnih i PCR negativnih pacijenata. Kod PCR pozitivnih pacijenata prosječna najbolje korigirana VO prije liječenja iznosila je oko 0,4, a nakon liječenja porasla je na 0,8. Ovo poboljšanje vidne funkcije kod PCR pozitivnih pacijenata bilo je statistički značajno ($p < 0,001$). Kod PCR negativnih pacijenata prosječna VO prije liječenja bila je oko 0,3, a nakon terapije poboljšala se na 0,5 ($p < 0,001$). Iako je terapijom postignut značajan porast VO u obje skupine, pacijenti s pozitivnim PCR nalazom imali su na kraju liječenja bolju konačnu VO nego PCR negativni. U prosjeku, završna VO u PCR pozitivnoj skupini bila je oko 0,8 naspram 0,5 u PCR negativnoj skupini, što predstavlja statistički značajnu razliku ($p < 0,05$). Također, prosječno apsolutno poboljšanje VO bilo je veće u PCR pozitivnih (oko + 0,4) u usporedbi s PCR-negativnima (oko + 0,2). Razlika u stupnju poboljšanja između te dvije skupine bila je statistički značajna ($p = 0,01$), što upućuje da je pozitivan PCR nalaz (indikativan za aktivnu

virusnu infekciju) povezan s većim funkcionalnim oporavkom vida nakon odgovarajuće terapije (Slika 9).



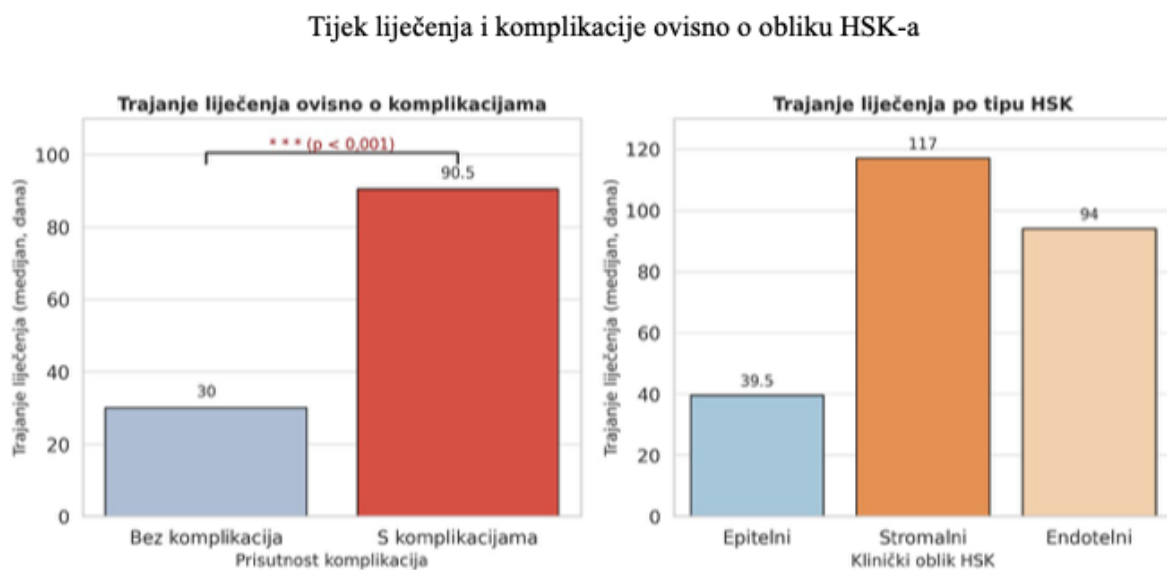
Slika 9. Usporedba završne vidne oštrine (VO) i apsolutnog poboljšanja vidne funkcije prema PCR statusu pacijenata s herpetičnim keratitisom. PCR pozitivni pacijenti postigli su bolju završnu vidnu oštrinu u odnosu na PCR negativne (0,8 naspram 0,5; $p < 0,05$). Također, apsolutno poboljšanje vidne oštrine bilo je značajno veće u PCR pozitivnoj skupini u usporedbi s PCR negativnima (+ 0,4 naspram + 0,2; $p = 0,01$).

4.7. Trajanje antivirusnog liječenja ACV-om

Trajanje aktivnog liječenja HSK-a značajno je variralo među pacijentima. Medijan ukupnog trajanja terapije bio je 60 dana (raspon 10 – 242 dana), a srednje trajanje liječenja iznosilo je 85 ± 73 dana. Očekivano, duljina terapije razlikovala se ovisno o kliničkom obliku HSK-a. HSK-E liječio se najkraće, medijan trajanja terapije kod epitelnih oblika HSK-a iznosio je 39,5 dana (oko 5 – 6 tjedana). HSK-S zahtijevali su znatno dulje liječenje sa medijanom od 117 dana (16 – 17 tjedana, oko 4 mjeseca). HSK-En imao je medijan trajanja liječenja od 94 dana (3 mjeseca). Razlike u trajanju terapije između ovih skupina bile su statistički značajne (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 12,32$; $p = 0,002$). HSK-S zahtijevali su značajno dulju terapiju nego HSK-E (post-hoc Mann-Whitney, $p < 0,001$), dok između HSK-S i HSK-En nije bilo značajne razlike ($p = 0,73$). Unutar stromalnih oblika HSK-a uočen je trend duljeg liječenja kod težeg

oblika, HSK-SEU imao je tendenciju duljeg trajanja liječenja (medijan 126 dana) u odnosu na HSK-SnEU (medijan 90 dana), no zbog malog uzorka ta razlika nije bila statistički pouzdana ($p = 0,89$).

Uočeno je da su pacijenti s duljim trajanjem liječenja ujedno imali i teži klinički tijek bolesti s više komplikacija. Naime, pacijenti kod kojih su nastale komplikacije liječeni su značajno dulje medijan 90,5 dana u usporedbi s pacijentima bez komplikacija (medijan 30 dana; Mann-Whitney = 576; $p < 0,001$). Također, u skupini s najduljom terapijom češće su bili zastupljeni HSK-S i HSK-En (Slika 10).



Slika 10. Tijek liječenja i komplikacije ovisno o obliku HSK. Lijevi panel prikazuje usporedbu trajanja liječenja u pacijenata sa i bez komplikacija. Pacijenti kod kojih su se razvile komplikacije liječeni su značajno dulje (medijan 90,5 dana) u usporedbi s onima bez komplikacija (medijan 30 dana; Mann–Whitney = 576; $p < 0,001$).

Desni panel prikazuje trajanje liječenja prema kliničkom obliku HSK. Najdulje liječenje zabilježeno je kod stromalnih oblika i endotelnih oblika HSK-a, dok su epitelni oblici HSK-a zahtijevali kraću terapiju. Horizontalne oznake iznad stupaca označavaju razine statističke značajnosti.

Kada se uspoređi nalaz PCR-a i visine Ct vrijednosti pacijenti s negativnim PCR nalazom imali su medijan trajanja liječenja od 65 dana, usporediv s 57 dana u PCR pozitivnih (razlika nije

značajna). Nije nađena ni korelacija između visine Ct vrijednosti i duljine liječenja (Spearman $\rho = + 0,007$; $p = 0,96$).

4.8. Komplikacije HSK-a

Tijekom praćenja pacijenata zabilježene su četiri glavne komplikacije HSK-a (prema planu istraživanja): ožiljak rožnice, NV rožnice, sekundarni glaukom i PED. Od 55 pacijenata, 36 (65,5 %) razvilo je barem jednu od navedenih komplikacija. Najčešća komplikacija bio je ožiljak rožnice, prisutan kod 33 pacijenata (60,0 %). NV rožnice pojavila se u 10 slučajeva (18,2 %), sekundarni glaukom u 3 slučaja (5,5 %), a PED u 2 slučaja (3,6 %). Više različitih komplikacija istovremeno zabilježeno je kod 12 pacijenata (npr. stromalni ožiljak uz istodobnu NV rožnice).

Učestalost komplikacija razlikovala se među kliničkim oblicima HSK-a. HSK-E imali su značajno manju pojavnost komplikacija zabilježenu u 42,9 % pacijenata (12 / 28) u usporedbi sa HSK-S i HSK-En (90,5 % i 83,3 %), što je bilo statistički vrlo značajno ($\chi^2 = 14,03$; $p < 0,001$). Nasuprot tome, kod HSK-S čak 90,5 % pacijenata (19 / 21) razvilo je barem jednu komplikaciju, a kod HSK-En 83,3 % (5 / 6) pacijenata. Osobito se ističe razlika u učestalosti ožiljaka rožnice, koja je zabilježena u 85,7 % pacijenata s HSK-S i u 83,3 % pacijenata s HSK-En, dok je u skupini s HSK-E ožiljak zaostao u svega 36,0 % slučajeva ($\chi^2 = 14,03$; $p < 0,001$). Drugim riječima, HSK-S oblici statistički su značajno skloniji stvaranju ožiljaka nego HSK-E oblici. Također, NV rožnice zabilježena je češće kod HSK-S (33,3 % slučajeva) u usporedbi s HSK-E (11,1 % slučajeva), no razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,08$). Sekundarni glaukom javio se kod 2 pacijenta s HSK-D te kod 1 pacijenta s HSK-En; zbog malog broja ovih slučajeva nije rađena statistička analiza. PED je nastupio rijetko i sporadično (1 HSK-E, 1 HSK-S).

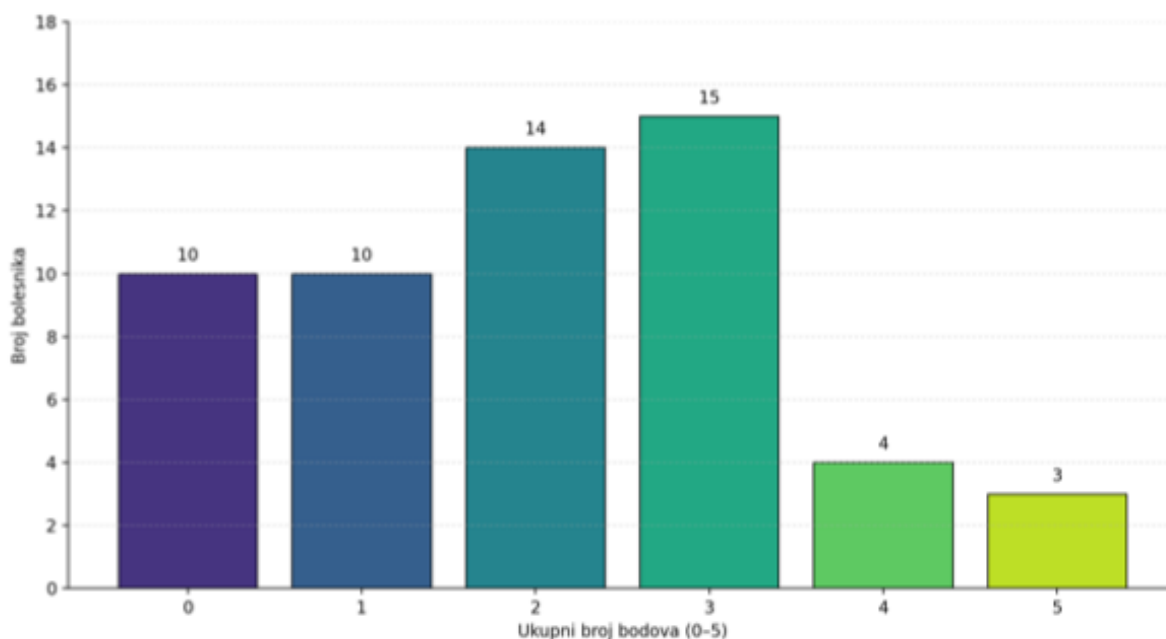
Nadalje, pacijenti s većim brojem recidiva imali su i veći kumulativni rizik od komplikacija. U skupini pacijenata s ≥ 5 epizoda HSK-a gotovo svi su razvili ožiljak ili drugu komplikaciju (92,3 %), dok je u skupini s jednom jedinom epizodom HSK-a komplikacija zabilježena u 47,4 % pacijenata. Premda korelacija broja recidiva s incidencijom komplikacija nije dosegla statističku značajnost ($\chi^2 = 3,11$; $p = 0,08$), dijelom zbog ograničenog broja pacijenata, opisno se vidi trend: svaka ponovna reaktivacija virusa doprinosi daljnjem oštećenju rožnice i povećava rizik trajnih posljedica. Najteže kombinirane komplikacije (npr. NV + ožiljak + sekundarni glaukom) zabilježene su ponajviše kod pacijenata s dugom poviješću rekurentnih stromalnih HSK-a.

Ispitana je pojavnost komplikacija HSK-a u odnosu na PCR nalaz. Uočena je određena razlika između PCR pozitivnih i PCR negativnih pacijenata, premda nije dosegla statističku značajnost. Komplikacije su zabilježene kod PCR pozitivnih pacijenata u približno 15 – 20 % slučajeva, dok su kod PCR negativnih pacijenata komplikacije nastupile u većem udjelu otprilike 30 – 40 % slučajeva. Stoga su pacijenti s negativnim PCR nalazom imali gotovo dvostruko veću učestalost komplikacija u usporedbi s PCR pozitivnim pacijentima, no ta razlika nije dosegla statističku značajnost ($p > 0,05$). Budući da su PCR negativni slučajevi češće bili povezani s težim kliničkim oblicima HSK-a, osobito HSK-S, provedena je logistička regresijska analiza kako bi se ispitalo je li PCR nalaz neovisno povezan s rizikom od razvoja komplikacija, uz prilagodbu za klinički oblik HSK. Multivarijatna analiza koja je istovremeno uključila PCR status i oblik HSK pokazala je da PCR status nije bio neovisni prediktor razvoja komplikacija ($p > 0,05$) nakon prilagodbe na klinički oblik bolesti. Nasuprot tome, upravo je klinički oblik HSK-a (npr. HSK-S naspram HSK-E) pokazao očekivani značajan utjecaj na pojavnost komplikacija. To sugerira da veća učestalost komplikacija viđena u PCR negativnoj skupini primarno proizlazi iz činjenice da PCR negativni slučajevi češće pripadaju skupini HSK-S i HSK-En koji nose viši rizik komplikacija, a ne iz samog PCR statusa.

4.9. Primjena sustava prediktivnog modela za procjenu rezistencije na ACV

Primjenom prediktivnog modela za prepoznavanje pacijenata s mogućom rezistencijom HSV-a na ACV analizirano je svih 55 pacijenata uključenih u istraživanje. Model se temeljio na kombinaciji kliničkih i laboratorijskih varijabli: broju prethodnih reaktivacija HSK-a, PCR nalazu tijekom terapije ACV-om, kliničkom obliku bolesti te prisutnosti komplikacija rožnice. U ukupnoj populaciji, većina pacijenata (60,8 %) ostvarila je 0 – 2 boda te je svrstana u skupinu niskog rizika. Srednji rizik (3 – 4 boda), utvrđen je u 26,8 % pacijenata, dok je visoki rizik (5 bodova) zabilježen u 12,5 % pacijenata.

Unutar srednje rizične skupine identificirano je 15 pacijenata s ukupno 3 boda. Svi su imali stromalni oblik HSK-a, ≥ 5 recidiva bolesti te su bili PCR pozitivni unatoč kontinuiranoj profilaktičkoj terapiji ACV-om (Slika 11).



Slika 11. Distribucija prediktivnog skora za procjenu rizika rezistencije HSV-a na aciklovir (ACV) u ispitanoj populaciji. *Stupčasti graf prikazuje raspodjelu ukupnog broja bodova (0 – 5) prema kriterijima prediktivnog modela. Većina pacijenata ostvarila je 0 – 2 boda i svrstana je u nisku skupinu rizika, dok je manji broj pacijenata imao 3 – 4 boda (srednji rizik). Mali broj pacijenata ostvario je maksimalnih 5 bodova, što predstavlja visoku razinu rizika za moguću rezistenciju na ACV.*

Pacijenti iz srednje i visoke rizične skupine, osobito oni s ukupno 3 boda, predstavljaju potencijalne kandidate za ciljanu molekularnu analizu rezistencije (npr. sekvenciranje HSV gena UL23 i UL30). Većina pacijenata u niskorizičnoj skupini imala su kraće trajanje liječenja, negativan PCR nalaz nakon terapije i odsutnost komplikacija, što dodatno potvrđuje pouzdanost modela u razlikovanju pacijenata prema kliničkom riziku za ACV rezistenciju.

4.10. Usporedba PCR i qPCR metode u dijagnostici HSK

U cilju usporedbe učinkovitosti standardnog PCR testa i qPCR, provedena je analiza amplifikacije dvaju virusnih gena (ICP4 i VP16), koji su u ranijim validacijama pokazali najvišu specifičnost i osjetljivost za detekciju HSV-1. Obje metode testirane su na serijskim desetorostrukim razrjeđenjima rekombinantne HSV-1 DNK poznate koncentracije (izmjerena koncentracija pročišćene BAC DNA 98,5 ng / mL).

Rezultati eksperimentalne usporedbe pokazali su da se kod standardnog PCR-a detekcija specifičnih amplifikacijskih produkata provodi naknadno, post-PCR analizom agaroznom

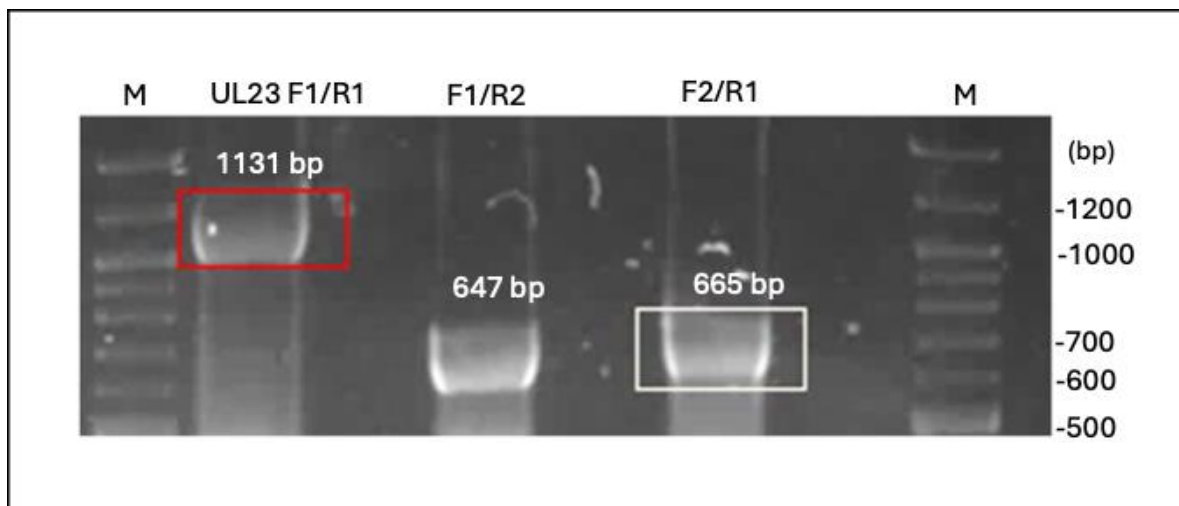
elektroforezom, dok kvantitativni qPCR omogućuje istodobnu amplifikaciju i detekciju ciljne DNK unutar iste reakcije, uz značajno kraće ukupno trajanje postupka. U qPCR testu za gen ICP4, vrijednosti Ct-a kretale su se od približno 22 ciklusa pri najvećoj koncentraciji virusne DNK ($4,56 \times 10^6$ genoma/ μL) do 35 ciklusa pri najnižoj testiranoj koncentraciji ($4,56$ genoma / μL). Međutim, u negativnoj kontroli (reakcija bez dodane DNK) zabilježena je prosječna Ct vrijednost oko 30, koja se smatrala nespecifičnim amplifikacijskim signalom, usporedivim s Ct vrijednostima dobivenima pri koncentraciji od približno $4,56 \times 10^4$ genoma u standardnoj krivulji. Taj nalaz ukazivao je na moguću nespecifičnu fluorescenciju ili kontaminaciju reagensa (odnosno prisutnost sekundarnih struktura početnica), stoga je bilo potrebno dodatno optimizirati reakcijske uvjete. Analiza krivulje taljenja (od engl. *melt-curve analysis*) pokazala je da je u negativnoj kontroli zabilježen zaseban fluorescencijski vrh krivulje taljenja (pik) s maksimumom na $78\text{ }^\circ\text{C}$, dok su pozitivni uzorci pokazivali stabilan vrh krivulje taljenja na $88\text{ }^\circ\text{C}$, što odgovara očekivanoj temperaturi taljenja specifičnog amplifikacijskog produkta. Time je potvrđeno da se nespecifični signal može razlikovati od specifične amplifikacije na temelju temperature taljenja produkta.

Za gen VP16, qPCR analiza pokazala je vrlo malu razliku u Ct vrijednostima između negativne kontrole i uzoraka s najnižom koncentracijom virusne DNK. Negativna kontrola imala je Ct vrijednost oko 33, dok su pozitivni uzorci s najnižom koncentracijom (45 genoma/ μL) imali Ct vrijednosti oko 32. Takva mala razlika Ct vrijednosti upućuje na mogućnost nespecifične amplifikacije ili nastanka primer – dimer produkata, što je poznato ograničenje qPCR metoda, osobito pri vrlo niskim koncentracijama predloška. Sukladno preporukama MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) smjernica [93], interpretacija rezultata nije se temeljila isključivo na Ct vrijednostima, već je dodatno potvrđena analizom PCR produkata. Elektroforetska analiza u agaroznom gelu pokazala je da produkt dobiven u negativnoj kontroli ima manju molekularnu veličinu od očekivanog VP16 produkta, što upućuje na nespecifičnu amplifikaciju, dok je u pozitivnim uzorcima detektiran produkt očekivane veličine. Ipak, tijekom analize krivulje taljenja uočeno je djelomično preklapanje krivulja negativnih i pozitivnih uzoraka za gen VP16, što je otežavalo interpretaciju graničnih rezultata. Dodatna analiza PCR produkata na agaroznom gelu pokazala je da je produkt dobiven u negativnoj kontroli bio manje molekularne veličine u odnosu na očekivani specifični amplifikacijski produkt (od engl. *amplicon*) gena VP16. Sangerovim sekvenciranjem utvrđeno je da produkt iz negativne kontrole predstavlja nespecifični artefakt, dok su PCR produkti pozitivnih uzoraka odgovarali ciljanoj sekvenci gena VP16.

4.11. Rezultati analize gena UL23 i UL30

Uspješno je provedena amplifikacija i sekvenciranje gena UL23 iz HSV-1 pozitivnih uzoraka dobivenih iz staničnih kultura inficiranih virusom herpes simplex tipa 1 (HSV-1). PCR amplifikacija provedena je koristeći tri para početnica (F1/R1, F1/R2 i F2/R1) koji omogućuju umnažanje većeg fragmenta gena te dva međusobno preklapajuća fragmenta pogodna za sekvenciranje.

Elektroforetskom analizom PCR produkata u 1 % agaroznom gelu potvrđena je uspješna amplifikacija fragmenata očekivane veličine. Dobiveni su amplikoni veličine 1131 bp (veći fragment koji obuhvaća gotovo cijeli gen) te 647 bp i 665 bp, koji predstavljaju dva preklapajuća fragmenta korištena za sekvencijsku analizu (Slika 12).



Slika 12. Amplifikacija gena UL23. Analiza PCR produkata dobivenih pomoću početnica F1/R1, F1/R2 i F2/R1 na temelju DNK izolirane iz stanica u kulturi inficiranih HSV-1 virusom (24 sata nakon infekcije). Elektroforeza je provedena u 1 % agaroznom gelu. Dobiveni su PCR produkti veličine 1131 bp, 647 bp i 665 bp. Crvenim pravokutnikom označen je PCR produkt veličine 1131 bp dobiven pomoću početnica F1/R1, dok je bijelim pravokutnikom označen PCR produkti veličine 665 bp dobiven pomoću početnica F2/R1. M – molekularni marker.

Pročišćeni PCR produkti zatim su sekvencirani Sangerovom metodom sekvenciranja. Kvaliteta dobivenih kromatograma provjerena je vizualnim pregledom, a sekvence su poravnate s referentnom sekvencom HSV-1 koristeći standardne bioinformatičke alate. Dobivene sekvence pokazale su gotovo 100 % podudarnost s referentnim genomom HSV-1, bez prisutnosti mutacija koje bi upućivale na promjene u kodirajućoj regiji gena. Sekvenciranje gena UL23 provedeno je na dva klinička uzorka dobivena od pacijenata koji su prethodno bili na terapiji

ACV-om. Pokrivenost ciljne sekvence iznosila je više od 90 % (S4: 40–1125 nt; S5: 45–1131 nt od ukupno 1285 nt). Nepokriveni dijelovi odnose se na terminalne regije sekvence koje zbog tehničkih ograničenja metode često ostaju nedovoljno pouzdano očitane. U oba analizirana uzorka sekvenca gena UL23 bila je identična referentnoj sekvenci, što ukazuje na odsutnost mutacija koje bi mogle uzrokovati rezistenciju na ACV. Ovaj nalaz upućuje da u analiziranim uzorcima nije prisutna genetska osnova za rezistenciju na ACV na razini gena TK. Analiza terminalnih regija dodatno je provedena u laboratoriju prof. Igora Juraka (Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova, Sveučilište u Rijeci), gdje su rezultati potvrđeni metodom kloniranja i ponovnog sekvenciranja.

S obzirom na znatno veću veličinu gena UL30 (3660 bp), koji kodira virusnu DNK polimerazu, njegova amplifikacija provedena je u sedam preklapajućih fragmenata pomoću sedam parova specifičnih početnica. Sekvence korištenih početnica te očekivane veličine PCR produkata prikazane su u Tablici 6.

Tablica 6. Sekvence PCR početnica korištenih za amplifikaciju fragmenata gena UL30.

Tablica prikazuje sekvence uzvodnih (forward) i nizvodnih (reverse) početnica korištenih za PCR amplifikaciju sedam preklapajućih fragmenata gena UL30 herpes simplex virusa tipa 1 (HSV-1) te očekivane veličine dobivenih PCR produkata izražene u parovima baza (bp).

Fragment	Uzvodna (forward) početnica	Nizvodna (reverse) početnica	Veličina PCR produkta (bp)
UL30_01	GATGTTTTCCGGTGGCGG	TTCATGTAAAAGTACTGCCGCG	623
UL30_02	CCTGGAGAACGTGGAGCA	GCTAGCGTGTGTTCCGG	524
UL30_03	TCAAGAAGTACGAGGGTGGG	CACCATGCCGTTACCTTTAT	694
UL30_04	GCCAGAGCCACTTCCAGAA	AGGGAGAGCGTGCTGAAG	699
UL30_05	CATCATCCAGGCCACAAC	CGGTATCGTCGTA AACAGCA	775
UL30_06	CGTTTATCAACCGCACCTCC	CCATGAGCTTGTAAATACCCGT	287
UL30_07	TTTGTCTCACCGCCGAA	CTCTATGCAACATTCGACGAGT	597

Dizajn fragmenata omogućio je međusobno preklapanje amplificiranih regija, čime je osigurana pouzdana analiza cijele sekvence gena. Umnažanje i sekvenciranje svih fragmenata omogućilo je gotovo potpuno pokrivanje ciljne sekvence (> 95 %). Dobivene sekvence poravnate su s referentnim genomom HSV-1 korištenjem standardnih bioinformatičkih alata za analizu sekvenci, pri čemu nisu uočene značajne devijacije u odnosu na referentnu sekvencu.

5. RASPRAVA

HSK i dalje predstavlja značajan klinički problem unatoč desetljećima istraživanja i razvoju učinkovitih antivirusnih lijekova. U našoj studiji analizirali smo skupinu od 55 pacijenata s HSK-om liječenih i praćenih na Klinici za oftalmologiju KBC Rijeka tijekom trogodišnjeg razdoblja. U uzorku je bilo 30 muškaraca (54,5 %) i 25 žena (45,5 %). Naši rezultati pokazuju da nema značajne razlike u pojavnosti HSK-a između spolova. Sličan zaključak navode Gyu-Nam i sur. te Yousuf i sur. koji su pronašli tek blagu prevagu muškaraca [1]. S druge strane, pojedina istraživanja zabilježila su veću incidenciju u žena, uključujući i primarne te rekurentne infekcije HSV-om [2]. Naše opažanje stoga se uklapa u raspon prethodnih nalaza i sugerira da spol sam po sebi nije glavni čimbenik rizika za HSK.

Prosječna dob naših pacijenata iznosila je 68,4 godine, pri čemu je 71,4 % ($n = 39 / 55$) bilo starije od 60 godina. Time se naša kohorta razlikuje od većine ranijih studija koje navode da se većina HSK-a javlja u srednjoj životnoj dobi (≤ 60 god.), a tek oko 25 % slučajeva u starijih od 60 godina [4]. Ova razlika vjerojatno odražava specifičnosti našeg uzorka, budući da je naš centar terciarna ustanova u kojoj se liječe i prate pacijenti s težim oblicima rHSK-a, dok se blaži slučajevi, osobito kod mlađih i imunokompetentnih osoba, najčešće zbrinjavaju u primarnim i sekundarnim ustanovama [5]. Slično tome, terciarne oftalmološke ustanove u literaturi također izvještavaju o višoj prosječnoj dobi oboljelih, primjerice 62 godine u studiji Alfaro i sur [6]. Poznato je da pacijenti > 65 godina i oni s produženim trajanjem bolesti (> 7 mjeseci) imaju lošiju prognozu zbog slabljenja imunološke funkcije i prisutnosti komorbiditeta [7]. Jedno od mogućih objašnjenja jest da s porastom dobi dolazi do postupnog slabljenja fizioloških funkcija, uključujući imunološki odgovor, čime se smanjuje otpornost organizma na reaktivaciju latentne virusne infekcije. U skladu s tim, naši stariji pacijenti češće su imali teže oblike HSK-a i sporiji oporavak, što potvrđuje važnost dobi kao značajnog prognostičkog čimbenika u tijeku bolesti. Ističemo da nije uočen utjecaj dobi na samu detekciju virusa PCR-om tj. udio PCR pozitivnih bio je sličan u mlađih i starijih, što sugerira da dob ne utječe bitno na razinu virusne replikacije u trenutku prezentacije bolesti.

U provedenom istraživanju potvrdili smo hipotezu da učestalost PCR pozitivnosti značajno varira s kliničkim oblikom HSK-a. Aktivna replikacija virusa prisutnija u epitelnim oblicima HSK-a, dok je u HSK-S i HSK-En virusna DNK često ispod praga detekcije. Drugim riječima, epitelne lezije (koje odražavaju akutnu virusnu infekciju) češće daju PCR pozitivan nalaz nego imunološki posredovani oblici dubljih slojeva rožnice [27, 94]. Naši podaci u skladu su s recentnim svjetskim izvješćima. Primjerice, Hoarau i sur. opisali su da je osjetljivost PCR

detekcije HSV-1 u suzama bila 97 % za epitelni oblik HSK, dok je za HSK-SEU iznosila 49 %, a za HSK-SnEU i HSK-En tj. oblike bez epitelne lezije tek 8 – 14 % [45]. Istodobno, količina virusne DNK bila je višestruko veća u epitelnim oblicima (HSK-D + HSK-G) i HSK-SEU, dok je u oblicima bez zahvaćenosti epitela (HSK-SnEU + HSK-SnEU) prosječno bilo čak 196 puta niže [45, 95]. U našem uzorku, prosječna relativna količina virusne DNK bila je 3,5 puta više u skupini pacijenata s epitelnom lezijom (HSK-D, HSK-G, HSK-SEU) u odnosu na skupinu bez epitelne lezije (HSK-SnEU, HSK-En) (odnos 0,29 : 1).

S druge strane, dokazano je da se HSV DNK može detektirati u epitelu rožnice i u slučajevima kada su primarno zahvaćeni dublji slojevi rožnice, što potvrđuju i rezultati drugih autora. Slično tome, studija Hoarau i sur. izvještava da se HSV DNK može povremeno detektirati u površinskim uzorcima (suze ili epitel) čak i kada je primarno zahvaćen dublji, endotelni sloj rožnice. Takvi nalazi, međutim, ne moraju nužno ukazivati na aktivnu replikaciju virusa u epitelu, već mogu odražavati sekundarni prijenos virusnog materijala iz dubljih slojeva [45]. Nadalje, Todokoro i sur. pomoću qPCR metode detektirali su HSV DNK u tri slučaja HSK-En, iako je prema kliničkim karakteristikama diferencijalna dijagnoza uključivala i mogućnost gljivične infekcije [96].

Valja naglasiti da negativan PCR nalaz ne isključuje HSV etiologiju, osobito u situacijama HSK-S ili HSK-En. Važno je interpretirati PCR rezultat u kliničkom kontekstu. Pozitivan PCR test ne mora nužno značiti aktivnu replikaciju u epitelu, već može odražavati prisutnost virusne DNK iz dubljih slojeva ili ranijih epizoda infekcije. Literatura podupire takav pristup, primjerice, Dandachli i sur. ističu da se terapija HSK-a ne smije odgađati radi čekanja na PCR potvrdu, jer se na nju ne možemo potpuno osloniti kod imunoloških oblika tj. u njihovoj studiji PCR je bio pozitivan tek u 18,6 % klinički suspektnih HSK slučajeva [97].

Utvdili smo da prethodna sistemska terapija ACV značajno smanjuje vjerojatnost PCR pozitivnosti. Ovaj nalaz ima važnu praktičnu implikaciju, jer upućuje na to da je uzorak za PCR analizu optimalno uzeti prije ili vrlo rano nakon uvođenja antivirusne terapije, budući da kasnije započinjanje terapije može dovesti do smanjenja količine detektibilne virusne DNK u uzorku [45]. Ipak, čak i u našem uzorku, nekoliko pacijenata ostalo je PCR pozitivno unatoč prethodnoj ACV terapiji. PCR test može ostati pozitivan i nakon započetog liječenja ACV, što odražava složenu interakciju između virusne dinamike, farmakokinetike lijeka i osjetljivosti virusa. U kontekstu mogućeg razvoja antivirusne rezistencije, u ovom radu razvijen je i jednostavan prediktivni bodovni sustav za procjenu kliničke sumnje na rezistenciju HSV-a na ACV. Model kombinira kliničke i laboratorijske parametre povezane s težim tijekom bolesti, uključujući broj prethodnih reaktivacija HSK-a, PCR nalaz tijekom terapije ACV-om, klinički

oblik bolesti te prisutnost komplikacija rožnice. Većina pacijenata u našoj kohorti ostvarila je nizak ukupni skor, dok je manji dio pacijenata pripadao skupini srednjeg ili visokog rizika. Iako u analiziranim uzorcima nisu identificirane mutacije u genima UL23 i UL30, ovakav model može imati praktičnu kliničku vrijednost u identifikaciji pacijenata kod kojih postoji povećana sumnja na razvoj rezistencije te kod kojih bi bilo opravdano provesti dodatnu molekularnu analizu virusnog genoma.

Jedno od objašnjenja jest da PCR, zbog svoje visoke osjetljivosti, može detektirati rezidualnu virusnu DNK i nakon što je aktivna replikacija već inhibirana. Takva DNK može potjecati od neinfektivnih virusnih čestica ili degradiranih genoma te ne mora označavati prisutnost aktivnog virusa [98]. U težim kliničkim oblicima, poput HSK-S ili HSK-En, moguće je da unatoč terapiji postoji perzistentna niska razina replikacije virusa, što je posljedica ograničene penetracije ACV-a u dublje slojeve rožnice ili pojave djelomične rezistencije virusa [85]. Pozitivan PCR nalaz može se javiti i ako je uzorak uzet u ranoj fazi terapije, kada lijek još nije u potpunosti suzbio replikaciju virusa [99]. U manjem broju slučajeva, pozitivan PCR unatoč liječenju može ukazivati na stvarnu rezistenciju virusa na ACV [90].

Rožnica predstavlja imunološki privilegirano mjesto, što znači da posjeduje mehanizme koji ograničavaju imunološke i upalne reakcije kako bi se očuvala njezina prozirnost i funkcionalnost. Budući da rožnici nedostaje limfna drenaža, a rezidentne stanice poput keratocita i epitelnih stanica aktivno inhibiraju lokalne upalne procese, upalni odgovor na infekciju ostaje prigušen. Takvo mikrookruženje može stvoriti pogodne uvjete za perzistenciju i selekciju HSV-1 varijanti rezistentnih na ACV. Do odabira rezistentnih sojeva može doći vrlo brzo, unutar nekoliko dana nakon početka terapije ACV osobito u slučajevima dugotrajne ili ponavljane primjene antivirusnih lijekova [100, 101].

HSK poznat je po sklonosti rekuriranju, a naše ga je istraživanje detaljno kvantificiralo i povezalo s kliničkim oblicima bolesti. Pacijenti čiji je HSK zahvaćao stromu imali su statistički znatno veći broj prethodnih recidiva u odnosu na pacijente s epitelnim oblikom HSK-a. Osobito se istaknuo HSK-SEU tj. ti su pacijenti imali medijan oko 5 epizoda rHSK-a značajno više nego pacijenti sa HSK-SnEU (medijan 1 – 2 epizode; $p = 0,036$). Drugim riječima, teži oblici bolesti javljali su se pretežno u pacijenata s anamnestičkim podatkom o učestalim prethodnim reaktivacijama, što implicira da kumulativno oštećenje rožnice uslijed više recidiva može promijeniti imunološki odgovor oka i predisponirati razvoju komplikacija. Ovi nalazi upućuju kliničare da pacijenti s dugogodišnjom poviješću HSK-a spadaju u skupinu visokog rizika za opetovane, teške rekurencije te ih treba pomno pratiti [32, 46, 102, 103]. Naši rezultati u pogledu učestalosti recidiva usporedivi su s literaturnim podacima. Ova “samonapredujuća”

priroda bolesti slaže se i s podacima HEDS studije tj. povijest prethodnog HSK-S dramatično povećava vjerojatnost budućih stromalnih recidiva. Štoviše, rizik je rastao s brojem proteklih epizoda, više prijašnjih recidiva značilo je i veću vjerojatnost novih [6, 61, 63]. Ovi nalazi sugeriraju da imunopatološki mehanizmi HSK-S imaju tendenciju perzistirati ili se reaktivirati, dok izolirana epitelna infekcija može ostati jednokratna pojava. U kontekstu našeg istraživanja to znači da pacijenti koji jednom razviju stromalni oblik HSK-a, posebice HSK-SEU, predstavljaju populaciju koju treba dugoročno profilaktički liječiti i pratiti kako bi se spriječili novi recidivi i akumulacija oštećenja rožnice.

Epidemiološke studije pokazuju da nakon inicijalne epizode HSK-a rizik ponovne pojave iznosi otprilike 10 – 27 % unutar 1 godine, oko 36 % kroz 5 godina, te preko 60 % tijekom dvadesetogodišnjeg razdoblja [63, 104]. Liesegang i suradnici pokazali su da pacijenti koji nisu imali recidiv tijekom prve godine nakon početne epizode HSK-a imaju približno 27 % vjerojatnosti za barem jedan recidiv unutar sljedećih pet godina. Nasuprot tome, kod pacijenata koji su već imali jednu reaktivaciju rizik ponovne epizode značajno je veći i iznosi oko 38 % tijekom sljedeće godine te približno 67 % unutar pet godina. Ovi podaci u skladu su s našim rezultatima, u kojima je većina pacijenata imala povijest ponavljajućih epizoda bolesti. U našoj kohorti čak 65,5 % pacijenata imalo je dvije ili više reaktivacija HSK-a, dok je više od polovice pacijenata (50,9 %) imalo tri ili više epizoda bolesti, što potvrđuje sklonost HSK-a ponavljajućem tijeku [63].

Vrijeme proteklo između početne infekcije i trenutka uzorkovanja nije imalo značajan utjecaj na rezultate PCR analize što je potvrđeno i u našoj studiji. U ovoj studiji nije utvrđena statistički značajna povezanost između trajanja simptoma i PCR ishoda. Slični rezultati zabilježeni su i u ranijim istraživanjima, koja su pokazala da se HSV DNK može zadržati u rožnici i do 90 dana nakon akutne infekcije, a ponekad i tijekom latentne faze bolesti [2, 63]. Ovi nalazi upućuju na to da vrijeme uzorkovanja ne predstavlja ključni čimbenik u mogućnosti detekcije virusne DNK, budući da HSV može perzistirati u svim slojevima rožnice znatno nakon završetka aktivne faze infekcije.

Analiza našeg uzorka pokazala je da broj prethodnih epizoda nije bio pouzdan prediktor PCR ishoda trenutne epizode. PCR nalaz mogao je biti pozitivan i u prvom i u desetom recidivu, kao i negativan već pri drugom. Ova spoznaja podupire važeću kliničku praksu prema kojoj svaku epizodu klinički sumnjivog HSK-a treba dijagnostički obraditi, uključujući PCR analizu, te terapijski tretirati kao potencijalno aktivnu infekciju, neovisno o broju prethodnih epizoda. Nadalje, potvrđuje da odsutnost detektabilne virusne DNK u kroničnih pacijenata ne isključuje rizik od ponovne reaktivacije i razvoja novih infektivnih epizoda. Naprotiv, virus se može

povremeno ponovno aktivirati i iznenada pojaviti čak i nakon dugog perioda imunološke dominacije [2, 27].

Trajanje liječenja HSK-a u našem uzorku variralo je ovisno o kliničkoj težini bolesti, pri čemu su teži oblici zahtijevali znatno produljenu terapiju. Očekivano, HSK-E liječili su se najkraće, dok su HSK-S i HSK-En zahtijevali višemjesečnu terapiju. Ovi rezultati u skladu su s prirodom bolesti. Epitelne lezije HSK-a ograničene su na površinski sloj rožnice i u većini slučajeva uspješno zacijele unutar nekoliko tjedana antivirusne terapije. Međutim, u kliničkoj praksi opaža se znatna varijabilnost u vremenu epitelizacije. Naši podaci pokazuju da je prosječno trajanje liječenja HSK-E bilo dulje nego što se uobičajeno navodi u literaturi (medijan 6 tjedana u odnosu na 2 – 3 tjedna u većini izvještaja) [7]. Takva razlika vjerojatno odražava kompleksnost kliničkih slučajeva koji se liječe u tercijarnim ustanovama, gdje su pacijenti često s višestrukim recidivima, ožiljnim promjenama ili kroničnim epitelnim defektima. HSK-E može sporo cijeliti iz više razloga. Jedan od glavnih čimbenika je herpetička neurotrofija, tj. smanjena osjetljivost rožnice uslijed oštećenja senzornih vlakana trigeminalnog živca [6]. Smanjena inervacija rožnice dovodi do poremećene regulacije metabolizma epitela, smanjene mitotske aktivnosti i slabijeg cijeljenja rana. Uz to, često se javlja smanjeno lučenje suza i promijenjen sastav suznog filma, što dodatno kompromitira proces epitelizacije i povećava rizik od PED-a. U literaturi se navodi da kod takvih pacijenata često dolazi do epitelne toksičnosti, keratopatije i suhog oka koje produžuju tijek bolesti [105]. Zbog toga je u našoj praksi primijenjen pristup postupnog titriranja antivirusne terapije i produžene profilakse, osobito kod pacijenata sa sporijim cijeljenjem ili ponavljajućim defektima. Takav pristup omogućuje smanjenje rizika od recidiva u ranoj fazi rekonvalescencije, kada je epitel još fragilan. Uz farmakološku terapiju, kod sporog cijeljenja korisne su i adjuvantne metode liječenja, poput umjetnih suza bez konzervansa, privremenog zatvaranja suznih kanalića, primjene autologne serumske kapi, ili terapije amnijskom membranom kod refraktornog epitelnog defekta [106]. Sve navedeno potvrđuje da HSK-E, iako se naizgled čini blažim oblikom bolesti, može imati produžen i složen tijek, osobito kod pacijenata s oštećenom rožničnom inervacijom, kroničnim suhim okom ili čestim recidivima.

Nasuprot tome, kod HSK-S i HSK-En značajnu ulogu u patogenezi bolesti ima autoimuna komponenta na virusne antigene pristune u stromi. Autoimuni proces može se održavati i nakon eliminacije virusa, s obzirom na to da imunološki sustav reagira na virusne antigene kojima je prethodno bio izložen, kao i na unutarstanične strukture oštećenog tkiva, što dovodi do samoodržavajuće upalne reakcije. Ukratko, HSK-S i HSK-En često kombiniraju elemente direktne virusne infekcije i autoimune reakcije, što opravdava potrebu za produženom

antivirusnom i protuupalnom terapijom [27, 107]. U našem radu, nakon smirivanja aktivne upale, pacijenti sa HSK-S i HSK-En nastavili su uzimati ACV profilaktički tijekom cijelog perioda postupnog ukidanja kortikosteroida (obično do 6 mjeseci). Time smo nastojali spriječiti tzv. rebound efekt, pogoršanje upale po brzom ukidanju terapije. Važno je istaknuti da je trajanje terapije u našem istraživanju prvenstveno bilo vođeno kliničkim stanjem pacijenta, a ne rezultatima PCR testa. Analiza je pokazala da nema značajne razlike u duljini liječenja između PCR pozitivnih i PCR negativnih pacijenata (medijan 57 vs. 65 dana; $p = 0,96$). Ovakav pristup podržan je i literaturom tj. ne preporuča se prekidati ili mijenjati terapiju isključivo na temelju PCR nalaza, već odluku temeljiti na tijeku kliničkog poboljšanja [2, 27, 62]. U našem radu to je vidljivo i kroz činjenicu da su komplikacije bolesti značajno produljile liječenje, tj. pacijenti kod kojih su se razvile komplikacije liječeni su medijan 90 dana, nasuprot 30 dana kod onih bez komplikacija ($p < 0,001$). To potvrđuje da smo u takvim slučajevima terapiju nastavili dulje kako bismo pokušali sanirati komplikacije ili spriječiti njihovo napredovanje [6, 62].

Jedan od zanimljivijih nalaza našeg istraživanja odnosi se na povezanost PCR nalaza i funkcionalnog ishoda vida. Naši rezultati pokazuju naizgled paradoksalan obrazac: PCR pozitivni pacijenti imali su u prosjeku bolju završnu VO te veći stupanj poboljšanja vida nakon terapije u usporedbi s PCR negativnim pacijentima. S druge strane, pokazalo se da početna VO nije bila lošija u PCR pozitivnih dapače, bila je nešto bolja nego u PCR negativnih, što sugerira da PCR negativne (imunološke) forme često predstavljaju teže, već prethodno ožiljkom opterećene slučajeve. Iako je terapijom došlo do poboljšanja vida u obje skupine, PCR pozitivni pacijenti postigli su značajno bolju VO u prosjeku oko 0,8 naspram 0,5 kod PCR negativnih. Ovi nalazi sugeriraju povezanost između prisutnosti detektibilne virusne DNK, kao pokazatelja aktivne infekcije, i većeg poboljšanja vidne funkcije nakon terapije. Analiza kovarijance (ANCOVA), uz kontrolu početne VO, pokazala je statistički značajnu povezanost PCR statusa s konačnom VO ($p < 0,05$). To bi upućivalo da slučajevi aktivne virusne infekcije bolje reagiraju na antivirusnu terapiju, dok imunološki posredovani oblici (PCR negativni) imaju ograničeniji oporavak [2, 108]. Međutim, treba oprezno interpretirati ove rezultate. Daljnjom analizom utvrdili smo da se razlika u konačnom vidu između skupina smanjuje kada se u obzir uzmu sve druge varijable, posebno stupanj početnog oštećenja rožnice. PCR negativna skupina uključivala je nesrazmjerno više pacijenata s uznapredovalim ožiljcima, NV i drugim komplikacijama od ranije što objašnjava njihovu lošiju početnu VO. Nasuprot tome, PCR pozitivni su uglavnom bili HSK-E oblici stoga su imali relativno očuvanu početnu prozirnost rožnice i veći potencijal za oporavak vida. Nakon provedene terapije, funkcionalni

ishod vida ovisio je prvenstveno o stupnju trajnog oštećenja rožnice a manje o samom PCR statusu tijekom akutne epizode. Ovi rezultati imaju važne implikacije. Pokazuju da prisutnost virusa na početku epizode nije sama po sebi određujući faktor konačnog ishoda vida. Ključni prognostički faktor je zapravo ukupna težina i slojevitost bolesti. To je u skladu s podacima iz literature, jer je HSK-S prepoznat kao glavni uzrok jednostrane sljepoće rožnice u razvijenim zemljama, upravo zbog trajnih posljedica na transparentnost rožnice [6, 27]. Također, komorbiditeti poput prethodnih operacija oka, katarakte, glaukoma ili sistemskih bolesti mogu utjecati na konačni vid. Dandachli i sur. navode da su povijest kirurških zahvata na oku, kao i prisutni glaukom ili dijabetes, značajno povezani s lošijim ishodom kod HSK pacijenata. Ti faktori koji nemaju veze s PCR statusom, ali itekako utječu na oporavak [109]. U našem uzorku broj takvih komorbiditeta bio je malen, no svakako ih treba imati na umu u širem kontekstu. Zanimljiv je podatak da su komplikacije HSK-a u našoj kohorti bile vrlo česte, što odražava težinu i kroničnost bolesti. Od 55 pacijenata, 65 % pacijenata imalo je barem jednu pridruženu komplikaciju tijekom praćenja, što je očekivano za populaciju tercijarnog centra i u skladu s literaturom [17]. U različitim studijama, učestalost ožiljka rožnice varira između 60 % i 90 % slučajeva, ovisno o težini upale, trajanju bolesti i ranijim epizodama reaktivacije. Rodriguez-Garcia i sur. navode da je 62,5 % očiju s aktivnim HSK-S-om imalo znakove ožiljavanja, dok je u inaktivnim slučajevima ta učestalost porasla na 89,6 %. Slično, epidemiološki podaci pokazuju da čak tri četvrtine pacijenata s HSK-om tijekom života razvije neki oblik ožiljka rožnice [110, 111].

Prema ranijim studijama, NV je tipična za ponavljane i kronične stromalne upale koje u stromi potiču lučenje angiogenih čimbenika poput VEGF-a i IL-6, što dovodi do rasta novih krvnih žila iz limbalnog područja prema središtu rožnice. U našem istraživanju 11% pacijenata sa HSK-En je razvilo NV rožnice vjerojatno nastale sekundarno nakon ponavljanih epizoda stromalnih upala jer se prema literaturi NV u HSK-En javljaju sporadično [9, 105].

Iako se u našem istraživanju PED pojavio rijetko i sporadično, moramo biti svjesni rizika oštećenja živčanih stanica rožnice. Hamrah i sur. su in vivo konfokalnom mikroskopijom pokazali ograničenu sposobnost regeneracije živaca u rožnicama nakon preboljelog HSK-a čak i tri godine nakon infekcije, mreža živčanih vlakana ostaje prorijeđena [23].

Kod izoliranog HSK-a, sekundarni glaukom je rijedak i obično prolazan, dok je znatno češći u sklopu herpetičnog uveitisa. Povišeni IOP u tim slučajevima najčešće je posljedica kortikosteroidne terapije ili blage upalne reakcije u prednjoj sobici, a samo iznimno zahtijeva trajno antiglaukomsko liječenje. Patofiziološki, riječ je o virusnom trabekulitisu što dovodi do smanjenog otjecanja očne vodice i trajno povišenog IOT-a. Ovi nalazi su u skladu s našim

rezultatima, gdje je sekundarni glaukom zabilježen u 3 pacijenta, potvrđujući da je riječ o relativno rijetkoj, ali klinički značajnoj komplikaciji HSK-a [71, 112].

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je analizirati utjecaj profilaktičke terapije na tijek bolesti. U našem uzorku, dio pacijenata već je na početku studije uzimao profilaktički ACV. Očekivano, ti pacijenti imali su manju vjerojatnost aktivne virusne replikacije pri dolasku (što se očitovalo nižom PCR pozitivnošću, kako je ranije spomenuto). Međutim, činjenica da su bili na profilaksi ukazuje da su i dalje imali recidive (profilaksa ne eliminira rizik u potpunosti) ili da su terapiju možda nedovoljno dugo uzimali. Poznato je da prekid profilakse može rezultirati ponovnim izbijanjem bolesti, osobito unutar prve 2 godine nakon prestanka. To je uočeno i u velikoj HEDS studiji tj. tijekom 6 mjeseci nakon prekida jednogodišnje profilakse, stope recidiva u prethodno liječenoj i placebo skupini izjednačile su se. Dakle, protektivni učinak ACV traje samo dok se lijek uzima redovito; nakon prestanka, rizik se vraća na onaj uobičajeni za danog pacijenta [61, 62, 104].

Najznačajniji dokaz djelotvornosti profilakse dolazi upravo iz HEDS *Acyclovir Prevention Trial* studije gdje je jednogodišnje profilaktičko uzimanje ACV dovelo je do upola manjeg rizika recidiva u usporedbi s placebom. Taj je učinak bio najizraženiji kod pacijenata s češćim prethodnim recidivima, osobito stromalnim oblikom HSK-a [30, 61]. Drugim riječima, pacijenti s većom težinom bolesti imali su i najveću korist od profilaktičke terapije, što je u skladu s činjenicom da su upravo oni skloniji učestalijim rekurencijama koje se profilaksom može spriječiti. Naša analiza podupire ovu strategiju jer smo utvrdili da su pacijenti mlađe životne dobi, s višim brojem prethodnih epizoda te oni koji su već primali profilaksu (što implicira teži oblik bolesti), u najvećem riziku od daljnjih recidiva. Stoga je upravo ova skupina primarni cilj profilaktičkog liječenja [63, 104]. U našem uzorku bilo je pacijenata koji su unatoč profilaksi (400 mg 2 x dnevno) ipak doživjeli ponovne epizode HSK-a. To otvara pitanje poboljšanja profilaktičkog režima. Jedan smjer istraživanja je povećanje doze ili promjena lijeka: primjerice, VACV 500 mg dnevno mogao bi teoretski biti djelotvorniji (zbog više koncentracije aktivnog metabolita), no studije nisu pokazale značajnu prednost VACV ili FCV nad ACV-om u standardnoj dozi, uz veću cijenu tih lijekova [61, 108, 113]. Drugi smjer je dodavanje adjuvantnih terapija. Zanimljivo je istraživanje Gyu Nam Kima i sur. gdje su rezultati pokazali da su recidivi bili znatno rjeđi u skupini koja je uz standardnu antivirusnu profilaksu uzimala i visokodozni vitamin C (2g dnevno). Ovi rezultati upućuju da optimizacija imunološkog statusa pacijenta (npr. antioksidativna zaštita vitaminom C) može pomoći u prevenciji recidiva uz standardnu profilaksu. Ipak, to zahtijeva dodatne studije prije uvođenja u rutinsku praksu [94].

Važno je napomenuti da u jednoj ranijoj studiji profilaktička primjena oralnog ACV nije pokazala značajan učinak na smanjenje recidiva [114]. U toj retrospektivnoj analizi, pacijenti koji su uzimali ACV imali su sličnu stopu jednogodišnjih recidiva kao i oni koji ga nisu uzimali (oko 43 %), što je autore navelo na zaključak da ACV “ne sprječava recidiv”. Međutim, danas je konsenzus, na temelju randomiziranih dokaza, da profilaksa ACV ipak značajno smanjuje rizik ponovne pojave i da je preporučljiva kod pacijenata s visokim rizikom [30]. Smjernice (npr. AAO) navode da minimalno 12 mjeseci profilakse donosi korist, a da se u težim slučajevima terapija može nastaviti i 18 – 24 mjeseca, pa i duže, uz evaluaciju rizika i koristi [6]. Našim pacijentima sa stromalnim oblicima HSK-a savjetovali smo dugotrajnu profilaksu, što su mnogi i prihvatili. Kod nekoliko pacijenata profilaksa je prekinuta nakon 1 godine bez recidiva, uz pomno praćenje idućih 6 – 12 mjeseci; dvojica su nakon prestanka profilakse unutar godinu dana doživjeli novi recidiv, što se uklapa u ranije opisani obrazac (povrat rizika nakon prekida). To upućuje na to da odluka o prekidu profilakse treba biti individualna te uključivati procjenu suradljivosti pacijenta, broja prethodnih rekurencija HSK-a i tolerancije lijeka. Srećom, ACV dugoročno ima povoljan sigurnosni profil (rijetko uzrokuje nuspojave osim mogućih probavnih smetnji i blagog porasta kreatinina), pa je dugotrajna primjena u većine pacijenata sigurna i dobro podnošljiva [6].

Molekularne metode značajno su unaprijedile dijagnostiku HSK-a, pri čemu se konvencionalni PCR i qPCR koriste s različitim ciljevima i prednostima. Konvencionalni PCR, iako tehnički manje zahtjevan i šire dostupan, u pravilu omogućuje isključivo kvalitativnu detekciju prisutnosti ili odsutnosti virusne DNK, zbog čega je prikladan za osnovni dijagnostički probir, osobito u laboratorijima s ograničenim resursima [37]. Međutim, njegova osjetljivost može biti ograničena, a interpretacija rezultata zahtijeva dodatnu obradu (npr. elektroforezu na gelu), što produljuje proces i povećava rizik kontaminacije [38].

S druge strane, qPCR se sve više nameće kao metoda izbora zbog svoje visoke osjetljivosti, specifičnosti i mogućnosti kvantifikacije razine virusa. Brojne studije pokazale su da qPCR značajno povećava dijagnostičku vrijednost u usporedbi s konvencionalnim PCR-om. Primjerice, Guda i sur. istaknuli su da multiplex real-time PCR omogućuje istovremenu detekciju HSV-1, HSV-2 i VZV u uzorcima rožnice s većom točnošću, dok Hoarau i sur. pokazuju da analiza suza qPCR metodom može potvrditi dijagnozu i u atipičnim slučajevima bez jasnih epitelnih lezija [35, 45]. Također, qPCR u zatvorenom sustavu smanjuje rizik unakrsne kontaminacije i omogućuje bržu dostupnost rezultata [95]. Ovi nalazi potvrđuju da qPCR nije samo osjetljiviji u detekciji virusa, već pruža i klinički relevantne informacije o količini virusnog genoma, što je osobito važno za razlikovanje aktivne replikacije od

imunološki posredovanih recidiva te za praćenje učinka antivirusne terapije [115]. Sveukupno, PCR i qPCR predstavljaju metodološki različite, ali međusobno komplementarne dijagnostičke pristupe: konvencionalni PCR zadržava svoju ulogu u inicijalnom dokazivanju infekcije, dok qPCR pruža dodatnu vrijednost u kvantitativnoj procjeni virusne DNK te u praćenju tijeka bolesti i potpori donošenju terapijskih odluka. U našem istraživanju, uspoređujući dvije metode, qPCR metoda omogućila je precizniju kvantifikaciju virusne DNK i bržu obradu uzoraka, ali su uočeni problemi s nespecifičnim signalima te ograničenjem osjetljivosti kod vrlo niskih razina virusa. Na temelju provedenih analiza, osjetljivost qPCR eseja procijenjena je na približno 100 virusnih genoma po reakciji za gen ICP4 i 45 genoma/ μL za VP16, što je usporedivo s pragovima detekcije postignutima standardnim PCR-om. Drugim riječima, qPCR u našim uvjetima nije bitno nadmašio standardni PCR po osjetljivosti, ali je pružio kvantitativne podatke i bržu detekciju. U praksi, primjena qPCR-a mogla bi biti korisna za brzu potvrdu i kvantifikaciju HSV DNK u kliničkim uzorcima HSK-a, uz napomenu da je nužna dobra kontrola nespecifičnih reakcija i validacija graničnih rezultata (npr. analizom krivulje taljenja ili sekvenciranjem sumnjivih amplifikacijskih produkata).

Zaključno, temelji za uspostavu PCR i qPCR dijagnostike u sklopu ovog istraživanja uspješno su provedeni. Dizajnirali smo i optimizirali vlastite PCR protokole za detekciju HSV-1, uključujući qPCR, čime smo ostvarili tehnološki cilj projekta. Komparativna analiza koju smo proveli pokazala je da naša qPCR metoda ima visoku osjetljivost i specifičnost za detekciju HSV-1 DNK. To potvrđuje činjenica da smo uspjeli detektirati virusnu DNK i u uzorcima s niskom razinom virusa (visoke Ct vrijednosti). Usporedba s klasičnim PCR-om (od engl. *endpoint* elektroforeza) pokazala je prednosti real-time pristupa u brzini i kvantifikaciji, što je u skladu s literaturom [38, 43]. Treba naglasiti da je u ovom istraživanju molekularna dijagnostika provedena u suradnji s prof. dr. sc. I. Jurakom u Laboratoriju za molekularnu virologiju pri Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, budući da navedena dijagnostika u trenutku provođenja istraživanja nije bila dostupna u KBC-u Rijeka. Međutim, Klinički zavod za kliničku mikrobiologiju KBC-a Rijeka u narednim mjesecima započinje s implementacijom PCR i qPCR metoda za dijagnosticiranje HSV-a u rutinsku praksu, čime se osigurava trajna primjena molekularne dijagnostike HSK-a u kliničkom radu Klinike za oftalmologiju KBC-a Rijeka.

Naši rezultati pokazuju da u dva klinička uzorka koja su bila visoko suspektna na razvoj rezistencije na ACV na temelju našeg predloženog modela za izračun rizika, nije nađena nijedna mutacija u genu UL23. Ovaj nalaz je u skladu s činjenicom da su rezistentni sojevi rijetki u imunokompetentnih pacijenata [85]. Analizirane sekvence bile su identične

referentnom genomu, a dodatna provjera kloniranjem i sekvenciranjem potvrdila je valjanost nalaza. To potvrđuje da je UL23, koji kodira TK HSV-a, u većini slučajeva stabilan te da rezistencija, kada se pojavi, proizlazi iz relativno ograničenog skupa mutacija koje su već dobro poznate [116]. S druge strane, gen UL30, koji kodira virusnu DNK polimerazu, rjeđe je mjesto mutacija, no promjene u njemu mogu imati osobito teške kliničke posljedice. Mutacije u UL30 ne samo da mogu smanjiti učinkovitost ACV, već i uzrokovati križnu rezistenciju na druge nukleozidne analoge i inhibitore DNK polimeraze [85, 117]. Zbog svoje veličine i složenosti, UL30 predstavlja tehnički zahtjevniji cilj za analizu. U našoj metodološkoj postavci koristili smo pristup amplifikacije u sedam preklapajućih fragmenata, što se pokazalo izvedivim i pouzdanim načinom za postizanje visoke pokrivenosti i kvalitetne sekvencijske analize. Ovaj modularni pristup već je u literaturi potvrđen kao učinkovit za gene veće duljine, jer *long-range* PCR može biti ograničen pojavom sekundarnih struktura i smanjenom pouzdanosću amplifikacije [117, 118].

Dosadašnja istraživanja pokazala su da genotipska analiza UL23 i UL30 ima komplementarnu vrijednost. Većina klinički značajnih slučajeva rezistencije može se otkriti analizom UL23, no potpuna dijagnostička sigurnost zahtijeva uključivanje UL30, osobito kod pacijenata s neuobičajeno teškim ili refraktornim tijekom bolesti [116, 119]. U istraživanju Burrell i sur. analizirana je prirodna varijabilnost gena UL23 i UL30 u 94 klinička soja HSV-1 i HSV-2. Autori su otkrili da su oba gena izrazito konzervirana, no s ograničenim brojem novih polimorfizama, 15 u UL23 i 51 u UL30 [119]. Time se naglašava važnost razlikovanja klinički značajnih mutacija od prirodne varijabilnosti, jer mnoge varijante mogu biti polimorfizmi bez funkcionalnih posljedica [117].

U našem istraživanju, iako smo uspjeli provesti sekvenciranje gena na kliničkim uzorcima, zbog financijskih i tehničkih ograničenja nismo bili u mogućnosti analizirati veći broj uzoraka. Ipak, postignut je važan metodološki korak jer smo uspješno izolirali i amplificirali oba ciljana gena (UL23 i UL30), što samo po sebi predstavlja zahtjevan laboratorijski postupak. Naš rad potvrđuje da je metodološki okvir s preklapajućim fragmentima primjenjiv u rutinskoj praksi i pruža stabilnu osnovu za buduće sekvencijske analize. Time smo postavili stabilne temelje za buduća istraživanja, u kojima planiramo proširiti analizu na veći broj kliničkih uzoraka i sustavno istražiti prisutnost mutacija povezanih s rezistencijom na ACV.

Za buduće korake preporučujemo primjenu *next generation sequencing* (NGS), proširenje uzorka na pacijente sa sumnjom na rezistenciju te kombinaciju genotipske i fenotipske analize. Na taj način može se unaprijediti dijagnostički algoritam i poboljšati terapijsko odlučivanje kod pacijenata s HSK-om kod kojih postoji rizik razvoja rezistencije.

Unatoč značajnim nalazima, ovo istraživanje ima nekoliko ograničenja. U studiju je uključeno relativno malo ispitanika ($N = 55$) s aktivnim HSK-om, što smanjuje statističku snagu, osobito za analize manjih podskupina. Neki klinički oblici (npr. HSK-G, En-HSK) bili su zastupljeni s vrlo malo slučajeva, pa rezultate vezane uz njih treba tumačiti oprezno. Uzorak je prikupljen na tercijarnom centru (KBC Rijeka), što znači da su možda disproporcionalno zastupljeni teži slučajevi u odnosu na opću populaciju (blaže epitelne oblike HSK često zbrinjavaju i sekundarne ustanove). Stoga naši postoci i medijani vjerojatno odražavaju teži kraj kliničkog spektra bolesti. Istraživanje je prospektivno opservacijsko, bez kontrolne skupine za intervencije. Nismo, primjerice, imali randomiziranu kontrolu za ispitivanje učinka profilakse tj. naše zaključke o profilaksi izvukli smo indirektno i oslanjajući se na literaturu. To znači da postoji mogućnost pristranosti (bias) u odabiru terapija: liječnici su selektivno davali profilaksu onima za koje su smatrali da su visokorizični, pa se kasnije ti isti faktori rizika javljaju i kao prediktori ishoda. U multivarijatnim analizama nastojali smo kontrolirati poznate čimbenike, ali uvijek postoji mogućnost nepoznatih konfuznih varijabli. Iako je PCR vrlo osjetljiv, u našem istraživanju postoje okolnosti koje su mogle dovesti do lažno negativnih rezultata. Prvo, vrijeme uzorkovanja je variralo tj. neki su uzorci uzeti već prvog dana bolesti, a neki tek nakon nekoliko tjedana. Unatoč tome što nismo našli statistički značajnu razliku u ishodu PCR-a s obzirom na vrijeme uzorkovanja, logično je pretpostaviti da vrlo kasno uzeti uzorci nose veći rizik da je virus već eliminiran. Također PCR može detektirati i neinfektivnu virusnu DNK. To znači da pozitivan nalaz ne razlikuje aktivnu replikaciju od zaostale virusne DNK. U PCR pozitivnim slučajevima klinička slika jasno je upućivala na aktivnu infekciju; međutim, teorijski je moguće da dio PCR pozitivnih nalaza, osobito onih s višim Ct vrijednostima, odražava perzistenciju virusne DNK nakon prethodne infekcije. Naše praćenje pacijenata bilo je fokusirano na akutnu epizodu. Nadalje, nismo imali jedinstveni protokol praćenja nakon završetka terapije unutar okvira. Izvedba PCR i sekvenciranja zahtijevala je znatna sredstva i vrijeme. Zbog ograničenih resursa, nismo mogli izvršiti sekvenciranje virusnog genoma za sve izolirane viruse, već samo ciljano za gene rezistencije i tipizaciju. Također, nije učinjena genotipizacija virusa (npr. razlikovanje HSV-1 od HSV-2 putem PCR-a) jer smo pretpostavili da je riječ o HSV-1 budući da je 95 % očnih infekcija HSV-om uzrokovana HSV-1. Teoretski, da smo sekvencirali cijeli genom virusa iz svakog uzorka, mogli smo dobiti uvid i u eventualne različite sojeve, no to je bilo izvan okvira ovog rada. Iako smo uspješno amplificirali i sekvencirali oba gena ključna za razvoj rezistencije na ACV, zbog ograničenih resursa nije bilo moguće provesti analizu na svim kliničkim uzorcima koji su pokazivali sumnju na rezistenciju. Unatoč tome, ovim istraživanjem uspješno je uspostavljen i validiran metodološki postupak

koji omogućuje buduću rutinsku detekciju mutacija povezanih s rezistencijom na ACV u HSV genomu. Nadalje, broj kontrolnih ispitanika (PCR negativnih bez povijesti HSK-a) koje smo uključili za potrebe metodologije mogao je biti veći iako uključili smo 45 zdravih rožnica za provjeru specifičnosti testa, što smatramo dostatnim, no veća kontrolna skupina uvijek daje veću sigurnost u rezultate. Srećom, niti jedan kontrolni uzorak nije bio lažno pozitivan, tako da je specifičnost testa praktički 100 % na našem uzorku.

Svako ograničenje zapravo otvara i nova istraživačka pitanja primjerice, valjalo bi na većem uzorku i multicentrično potvrditi naše nalaze o vizualnim ishodima i profilaksi, ili ciljano pratiti skupinu pacijenata kroz više godina da se preciznije odredi dugoročni učinak različitih terapijskih pristupa. Nadalje, rapidni razvoj molekularnih metoda (poput NGS-a) u budućnosti bi nam mogao omogućiti da s više aspekata sagledamo virusne i genske faktore rizika.

6. ZAKLJUČCI

1. Pozitivnost PCR testa značajno ovisi o kliničkom obliku HSK-a te je znatno češća u oblicima s epitelnim defektom nego u stromalnim i endotelnim oblicima bolesti.
2. Prethodna terapija ACV-om značajno smanjuje vjerojatnost PCR detekcije HSV DNK u uzorcima rožnice, što naglašava važnost uzorkovanja prije ili neposredno nakon početka antivirusne terapije.
3. Stromalni oblici HSK-a, osobito HSK-SEU, povezani su s većim brojem prethodnih reaktivacija u usporedbi s epitelnim oblicima bolesti.
4. Broj prethodnih reaktivacija nije pokazao značajnu povezanost s PCR nalazom ni s razinom detektirane virusne DNK u aktualnoj epizodi bolesti.
5. Iako su epitelni oblici HSK-a imali bolju početnu i završnu VO, terapija je dovela do značajnog poboljšanja vida u svim kliničkim skupinama.
6. Pacijenti s PCR potvrđenom HSV infekcijom imali su veće poboljšanje VO tijekom liječenja u usporedbi s PCR negativnim pacijentima.
7. Trajanje liječenja značajno je dulje kod stromalnih i endotelnih oblika HSK-a te u pacijenata s razvijenim komplikacijama.
8. Uspostavljena konvencionalna PCR metoda pokazala je visoku osjetljivost i specifičnost za detekciju HSV-1 DNK te je prikladna za rutinsku laboratorijsku dijagnostiku HSK-a.
9. Kvantitativna PCR metoda u realnom vremenu omogućuje bržu detekciju i kvantifikaciju virusnog opterećenja te predstavlja učinkovito poboljšanje molekularne dijagnostike HSK-a.
10. Analiza gena UL23 i UL30 nije pokazala mutacije povezane s rezistencijom na ACV, što upućuje na rijetku pojavu ACV-rezistentnih HSV-1 sojeva u ispitanjima.

7. LITERATURA

1. Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, i sur. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA*. 2006;296(8):964–73.
2. Kaye S, Choudhary A. Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res*. 2006;25(4):355–80.
3. Al-Dujaili LJ, Clerkin PP, Clement C, i sur. Ocular herpes simplex virus: how are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated? *Future Microbiol*. 2011;6(8):877–907.
4. Labib BA, Chigbu DI. Clinical Management of Herpes Simplex Virus Keratitis. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(10).
5. Nardella M, Yu AC, Busin M, Rizzo R, Zauli G. Outcomes of Corneal Transplantation for Herpetic Keratitis: A Narrative Review. *Viruses*. 2024;16(9).
6. White ML CJ. Herpes Simplex Virus Keratitis: A Treatment Guideline. . American Academy of Ophthalmology;. 2014
7. Arshad S, Petsoglou C, Lee T, Al-Tamimi A, Carnt NA. 20 years since the Herpetic Eye Disease Study: Lessons, developments and applications to clinical practice. *Clin Exp Optom*. 2021;104(3):396–405.
8. Azher TN, Yin XT, Tajfirouz D, Huang AJ, Stuart PM. Herpes simplex keratitis: challenges in diagnosis and clinical management. *Clin Ophthalmol*. 2017;11:185–91.
9. Wang J, Rabiee B, Patel C, i sur. Herpesvirus Infections of the Corneal Endothelium. *Microorganisms*. 2025;13(4).
10. Bai L, Xu J, Zeng L, Zhang L, Zhou F. A review of HSV pathogenesis, vaccine development, and advanced applications. *Mol Biomed*. 2024;5(1):35.
11. Kim HC, Lee HK. Vaccines against Genital Herpes: Where Are We? *Vaccines (Basel)*. 2020;8(3).
12. Schiffer JT, Gottlieb SL. Biologic interactions between HSV-2 and HIV-1 and possible implications for HSV vaccine development. *Vaccine*. 2019;37(50):7363–71.
13. Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J*. 2009;276(24):7228–36.
14. Sharthiya H, Seng C, Van Kuppevelt TH, Tiwari V, Fornaro M. HSV-1 interaction to 3-O-sulfated heparan sulfate in mouse-derived DRG explant and profiles of inflammatory markers during virus infection. *J Neurovirol*. 2017;23(3):483–91.
15. Toma HS, Murina AT, Areaux RG, Jr., i sur. Ocular HSV-1 latency, reactivation and recurrent disease. *Semin Ophthalmol*. 2008;23(4):249–73.
16. Bloom DC. HSV LAT and neuronal survival. *Int Rev Immunol*. 2004;23(1-2):187–98.
17. Antony F KD, Nowińska A, Rouse BT, Suryawanshi A. The immunobiology of corneal HSV-1 infection and herpetic stromal keratitis. *Clin Microbiol Rev* 2024;37.
18. Divito S, Cherpes TL, Hendricks RL. A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency. *Immunol Res*. 2006;36(1-3):119–26.
19. Kosz-Vnenchak M, Coen DM, Knipe DM. Restricted expression of herpes simplex virus lytic genes during establishment of latent infection by thymidine kinase-negative mutant viruses. *J Virol*. 1990;64(11):5396–402.
20. Zhang Q, Hsia SC, Martin-Caraballo M. Regulation of voltage-gated sodium channels by TNF-alpha during herpes simplex virus latency establishment. *J Neurovirol*. 2024;30(5-6):513–23.
21. Sawtell NM. The probability of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 increases with the number of latently infected neurons in the ganglia. *J Virol*. 1998;72(8):6888–92.

22. Yin XT, Hartman A, Sirajuddin N, i sur. UVB induced reactivation leads to HSV1 in the corneas of virtually all latently infected mice and requires STING to develop corneal disease. *Sci Rep.* 2024;14(1):6859.
23. Kaufman HE, Azcuy AM, Varnell ED, i sur. HSV-1 DNA in tears and saliva of normal adults. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(1):241–7.
24. Margolis TP, Elfman FL, Leib D, i sur. Spontaneous reactivation of herpes simplex virus type 1 in latently infected murine sensory ganglia. *J Virol.* 2007;81(20):11069–74.
25. Feldman LT, Ellison AR, Voytek CC, i sur. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(2):978–83.
26. Spear PG, Roizman B. Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion. *J Virol.* 1972;9(1):143–59.
27. Farooq AV, Shukla D. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update. *Surv Ophthalmol.* 2012;57(5):448–62.
28. McCormick I, James C, Welton NJ, i sur. Incidence of Herpes Simplex Virus Keratitis and Other Ocular Disease: Global Review and Estimates. *Ophthalmic Epidemiol.* 2022;29(4):353–62.
29. Chaloulis SK, Moustakis G, Tsaousis KT. Incidence and Risk Factors of Bilateral Herpetic Keratitis: 2022 Update. *Trop Med Infect Dis.* 2022;7(6).
30. Young RC, Hodge DO, Liesegang TJ, Baratz KH. Incidence, recurrence, and outcomes of herpes simplex virus eye disease in Olmsted County, Minnesota, 1976-2007: the effect of oral antiviral prophylaxis. *Arch Ophthalmol.* 2010;128(9):1178–83.
31. Stuart PM, Keadle TL. Recurrent herpetic stromal keratitis in mice: a model for studying human HSK. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:728480.
32. Sibley D, Larkin DFP. Update on Herpes simplex keratitis management. *Eye (Lond).* 2020;34(12):2219–26.
33. Acharya M, Dave A, Farooqui JH. Commentary: Herpes keratitis: A diagnostic challenge. *Indian J Ophthalmol.* 2019;67(7):1046–7.
34. Taber LH, Brasier F, Couch RB, i sur. Diagnosis of herpes simplex virus infection by immunofluorescence. *J Clin Microbiol.* 1976;3(3):309–12.
35. Ting DSJ, Gopal BP, Deshmukh R, i sur. Diagnostic armamentarium of infectious keratitis: A comprehensive review. *Ocul Surf.* 2022;23:27–39.
36. Shoji J, Sakimoto T, Inada N, i sur. A diagnostic method for herpes simplex keratitis by simultaneous measurement of viral DNA and virus-specific secretory IgA in tears: an evaluation. *Jpn J Ophthalmol.* 2016;60(4):294–301.
37. Lee SY, Kim MJ, Kim MK, Wee WR. Comparative analysis of polymerase chain reaction assay for herpes simplex virus 1 detection in tear. *Korean J Ophthalmol.* 2013;27(5):316–21.
38. Milligan AL, Hoffman JJ, Neo YN, Koay SY. Improving polymerase chain reaction diagnostic rates for herpes simplex keratitis: results of a pilot study. *Digit J Ophthalmol.* 2024;30(1):1–4.
39. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp.* 2012(63):e3998.
40. Islam KU, Iqbal J. An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:560616.
41. Liu HY, Hopping GC, Vaidyanathan U, i sur. Polymerase Chain Reaction and Its Application in the Diagnosis of Infectious Keratitis. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol.* 2019;8(3):152–5.
42. Taravati P, Lam D, Van Gelder RN. Role of molecular diagnostics in ocular microbiology. *Curr Ophthalmol Rep.* 2013;1(4).

43. Pramod NP, Thyagarajan SP, Mohan KV, Anandakannan K. Polymerase chain reaction in the diagnosis of herpetic keratitis: experience in a developing country. *Can J Ophthalmol.* 2000;35(3):134–40.
44. Chen Z, Halford NG, Liu C. Real-Time Quantitative PCR: Primer Design, Reference Gene Selection, Calculations and Statistics. *Metabolites.* 2023;13(7).
45. Hoarau G, Haigh O, Vauloup-Fellous C, i sur. Diagnostic performance of real-time quantitative PCR in tear samples in various subtypes of herpes simplex keratitis. *J Clin Microbiol.* 2023;61(12):e0088523.
46. Chodosh J, Ung L. Adoption of Innovation in Herpes Simplex Virus Keratitis. *Cornea.* 2020;39 Suppl 1(1):S7–S18.
47. van Velzen M, van de Vijver DA, van Loenen FB, i sur. Acyclovir prophylaxis predisposes to antiviral-resistant recurrent herpetic keratitis. *J Infect Dis.* 2013;208(9):1359–65.
48. Koganti R, Yadavalli T, Shukla D. Current and Emerging Therapies for Ocular Herpes Simplex Virus Type-1 Infections. *Microorganisms.* 2019;7(10).
49. Pan D, Kaye SB, Hopkins M, i sur. Common and new acyclovir resistant herpes simplex virus-1 mutants causing bilateral recurrent herpetic keratitis in an immunocompetent patient. *J Infect Dis.* 2014;209(3):345–9.
50. Rao SN. Treatment of herpes simplex virus stromal keratitis unresponsive to topical prednisolone 1% with topical cyclosporine 0.05%. *Am J Ophthalmol.* 2006;141(4):771–2.
51. Vyvey M. Steroids as pain relief adjuvants. *Can Fam Physician.* 2010;56(12):1295–7, e415.
52. Kim Y, Doo JG, Chon J, i sur. Steroids plus antiviral agents are more effective than steroids alone in the treatment of severe Bell's palsy patients over 40 years of age. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2021;35:20587384211042124.
53. Fung AT, Tran T, Lim LL, i sur. Local delivery of corticosteroids in clinical ophthalmology: A review. *Clin Exp Ophthalmol.* 2020;48(3):366–401.
54. Brijacak N, Dekaris I, Gagro A, Gabric N. Therapeutic effect of amniotic membrane in persistent epithelial defects and corneal ulcers in herpetic keratitis. *Coll Antropol.* 2008;32 Suppl 2:21–5.
55. Kim JG, Jun JH. Therapeutic and tectonic keratoplasty with simple cryopreserved remnants of donor corneas: an 11 year retrospective case series. *Sci Rep.* 2022;12(1):7331.
56. Zinser E, Krawczyk A, Muhl-Zurbes P, i sur. A new promising candidate to overcome drug resistant herpes simplex virus infections. *Antiviral Res.* 2018;149:202–10.
57. Crumacker CS, Schaffer PA. New anti-HSV therapeutics target the helicase-primase complex. *Nat Med.* 2002;8(4):327–8.
58. Zhu LA, Weller SK. The UL5 gene of herpes simplex virus type 1: isolation of a lacZ insertion mutant and association of the UL5 gene product with other members of the helicase-primase complex. *J Virol.* 1992;66(1):458–68.
59. Jaishankar D, Yakoub AM, Yadavalli T, i sur. An off-target effect of BX795 blocks herpes simplex virus type 1 infection of the eye. *Sci Transl Med.* 2018;10(428).
60. Poirier RH, Kingham JD, de Miranda P, Annel M. Intraocular antiviral penetration. *Arch Ophthalmol.* 1982;100(12):1964–7.
61. Oral acyclovir for herpes simplex virus eye disease: effect on prevention of epithelial keratitis and stromal keratitis. Herpetic Eye Disease Study Group. *Arch Ophthalmol.* 2000;118(8):1030–6.
62. Wilhelmus KR, Gee L, Hauck WW, i sur. Herpetic Eye Disease Study: A Controlled Trial of Topical Corticosteroids for Herpes Simplex Stromal Keratitis. *Ophthalmology.* 2020;127(4S):S5–S18.

63. Liesegang TJ, Melton LJ, 3rd, Daly PJ, Ilstrup DM. Epidemiology of ocular herpes simplex. Incidence in Rochester, Minn, 1950 through 1982. *Arch Ophthalmol.* 1989;107(8):1155–9.
64. Ahmad B, Gurnani B, Patel BC. Herpes Simplex Keratitis. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2025.
65. Amano S, Oshika T, Kaji Y, i sur. Herpes simplex virus in the trabeculum of an eye with corneal endotheliitis. *Am J Ophthalmol.* 1999;127(6):721–2.
66. Ohashi Y, Yamamoto S, Nishida K, i sur. Demonstration of herpes simplex virus DNA in idiopathic corneal endotheliopathy. *Am J Ophthalmol.* 1991;112(4):419–23.
67. Tambasco FP, Cohen EJ, Nguyen LH, Rapuano CJ, Laibson PR. Oral acyclovir after penetrating keratoplasty for herpes simplex keratitis. *Arch Ophthalmol.* 1999;117(4):445–9.
68. Miserocchi E, Modorati G, Galli L, Rama P. Efficacy of valacyclovir vs acyclovir for the prevention of recurrent herpes simplex virus eye disease: a pilot study. *Am J Ophthalmol.* 2007;144(4):547–51.
69. Lobo AM, Agelidis AM, Shukla D. Pathogenesis of herpes simplex keratitis: The host cell response and ocular surface sequelae to infection and inflammation. *Ocul Surf.* 2019;17(1):40–9.
70. Chirapapaisan C, Muller RT, Sahin A, i sur. Effect of herpes simplex keratitis scar location on bilateral corneal nerve alterations: an in vivo confocal microscopy study. *Br J Ophthalmol.* 2022;106(3):319–25.
71. Kwon JE, Kang C, Moghtader A, i sur. Emerging Treatments for Persistent Corneal Epithelial Defects. *Vision (Basel).* 2025;9(2).
72. Heba Al Saad WW. Management of Neovascularization in Recurrent Herpetic Keratitis. *J Bahrain Med Soc.* 2020.
73. Gimenez F, Suryawanshi A, Rouse BT. Pathogenesis of herpes stromal keratitis--a focus on corneal neovascularization. *Prog Retin Eye Res.* 2013;33:1–9.
74. Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA, i sur. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(3):208–48.
75. Shtein RM, Elnor VM. Herpes simplex virus keratitis: histopathology and corneal allograft outcomes. *Expert Rev Ophthalmol.* 2010;5(2):129–34.
76. Zheng M, Schwarz MA, Lee S, Kumaraguru U, Rouse BT. Control of stromal keratitis by inhibition of neovascularization. *Am J Pathol.* 2001;159(3):1021–9.
77. Hoeksema L, Jansonius NM, Los LI. Risk Factors for Secondary Glaucoma in Herpetic Anterior Uveitis. *Am J Ophthalmol.* 2017;181:55–60.
78. Sudhakar P, Menon M, Ck M, Balasubramaniam A. Glaucoma in Viral Keratouveitis: A Retrospective Review at a Tertiary Eye Hospital. *J Curr Glaucoma Pract.* 2022;16(1):65–70.
79. Vaidyanathan U, Hopping GC, Liu HY, i sur. Persistent Corneal Epithelial Defects: A Review Article. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol.* 2019;8(3):163–76.
80. Sacchetti M, Komaiha C, Bruscolini A, i sur. Long-term clinical outcome and satisfaction survey in patients with neurotrophic keratopathy after treatment with cenegermin eye drops or amniotic membrane transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2022;260(3):917–25.
81. Bonini S, Lambiase A, Rama P, i sur. Phase II Randomized, Double-Masked, Vehicle-Controlled Trial of Recombinant Human Nerve Growth Factor for Neurotrophic Keratitis. *Ophthalmology.* 2018;125(9):1332–43.
82. Koay SY, Larkin DFP. New Pharmacological Approaches for the Treatment of Neurotrophic Keratitis. *Front Pharmacol.* 2022;13:796854.
83. Menage MJ, de Clercq E, van Lierde A, i sur. Antiviral drug sensitivity in ocular herpes simplex virus infection. *Br J Ophthalmol.* 1990;74(9):532–5.

84. Frobert E, Burrel S, Ducastelle-Lepretre S, i sur. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. *Antiviral Res.* 2014;111:36–41.
85. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):459–72.
86. Duan R, de Vries RD, van Dun JM, i sur. Acyclovir susceptibility and genetic characteristics of sequential herpes simplex virus type 1 corneal isolates from patients with recurrent herpetic keratitis. *J Infect Dis.* 2009;200(9):1402–14.
87. Shin YK, Cai GY, Weinberg A, Leary JJ, Levin MJ. Frequency of acyclovir-resistant herpes simplex virus in clinical specimens and laboratory isolates. *J Clin Microbiol.* 2001;39(3):913–7.
88. Jiang YC, Feng H, Lin YC, Guo XR. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *Int J Oral Sci.* 2016;8(1):1–6.
89. Fife KH, Crumacker CS, Mertz GJ, Hill EL, Boone GS. Recurrence and resistance patterns of herpes simplex virus following cessation of > or = 6 years of chronic suppression with acyclovir. Acyclovir Study Group. *J Infect Dis.* 1994;169(6):1338–41.
90. Morfin F, Thouvenot D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol.* 2003;26(1):29–37.
91. Turner LD, Beckingsale P. Acyclovir-resistant herpetic keratitis in a solid-organ transplant recipient on systemic immunosuppression. *Clin Ophthalmol.* 2013;7:229–32.
92. Rousseau A, Boutolleau D, Titier K, i sur. Recurrent herpetic keratitis despite antiviral prophylaxis: A virological and pharmacological study. *Antiviral Res.* 2017;146:205–12.
93. Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, i sur. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends Biotechnol.* 2019;37(7):761–74.
94. Kim GN, Yoo WS, Park MH, i sur. Clinical Features of Herpes Simplex Keratitis in a Korean Tertiary Referral Center: Efficacy of Oral Antiviral and Ascorbic Acid on Recurrence. *Korean J Ophthalmol.* 2018;32(5):353–60.
95. Hirota A, Shoji J, Inada N, i sur. Rapid detection and diagnosis of herpetic keratitis using quantitative microfluidic polymerase chain reaction system for herpes simplex and varicella-zoster virus DNA: a case series. *BMC Ophthalmol.* 2023;23(1):177.
96. Todokoro D, Hosogai M, Nakano S, Akiyama H. Effective diagnosis by real-time PCR of herpes simplex diffuse endotheliitis that is similar in appearance to fungal keratitis: case series. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2021;11(1):20.
97. Brunner M, Somerville T, Corless CE, i sur. Use of a corneal impression membrane and PCR for the detection of herpes simplex virus type-1. *J Med Microbiol.* 2019;68(9):1324–9.
98. Nagasato D, Araki-Sasaki K, Kojima T, Ideta R, Dogru M. Morphological changes of corneal subepithelial nerve plexus in different types of herpetic keratitis. *Jpn J Ophthalmol.* 2011;55(5):444–50.
99. Knickelbein JE, Hendricks RL, Charukamnoetkanok P. Management of herpes simplex virus stromal keratitis: an evidence-based review. *Surv Ophthalmol.* 2009;54(2):226–34.
100. Remeijer L, Doornenbal P, Geerards AJ, Rijneveld WA, Beekhuis WH. Newly acquired herpes simplex virus keratitis after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology.* 1997;104(4):648–52.
101. Lepisto AJ, Frank GM, Hendricks RL. How herpes simplex virus type 1 rescinds corneal privilege. *Chem Immunol Allergy.* 2007;92:203–12.
102. Predictors of recurrent herpes simplex virus keratitis. Herpetic Eye Disease Study Group. *Cornea.* 2001;20(2):123–8.

103. Wang L, Wang R, Xu C, Zhou H. Pathogenesis of Herpes Stromal Keratitis: Immune Inflammatory Response Mediated by Inflammatory Regulators. *Front Immunol.* 2020;11:766.
104. Barron BA, Gee L, Hauck WW, i sur. Herpetic Eye Disease Study. A controlled trial of oral acyclovir for herpes simplex stromal keratitis. *Ophthalmology.* 1994;101(12):1871–82.
105. Kaye SB. *BMJ Open Ophthalmology.* *BMJ Open Ophthalmol.* 2020;5(1):e000530.
106. Vilares Morgado R, Moura R, Moreira R, Falcao-Reis F, Pinheiro-Costa J. New Promising Therapeutic Approach for Refractory Corneal Epithelial Defects. *Cureus.* 2023;15(5):e39324.
107. Musa M, Enaholo E, Aluyi-Osa G, i sur. Herpes simplex keratitis: A brief clinical overview. *World J Virol.* 2024;13(1):89934.
108. Wilhelmus KR. Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;1(1):CD002898.
109. Dandachli MH, Maier AB, Hofmann J, Dietrich-Ntoukas T. Comorbidities, clinical outcome and rate of herpes simplex positive PCR in patients with keratitis, corneal erosions and ulcers. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2025;15(1):59.
110. Rodriguez-Garcia A, Alfaro-Rangel R, Bustamante-Arias A, Hernandez-Camarena JC. In Vivo Corneal Microstructural Changes in Herpetic Stromal Keratitis: A Spectral Domain Optical Coherence Tomography Analysis. *J Ophthalmic Vis Res.* 2020;15(3):279–88.
111. Liesegang TJ. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea.* 2001;20(1):1–13.
112. Hamrah P, Cruzat A, Dastjerdi MH, i sur. Corneal sensation and subbasal nerve alterations in patients with herpes simplex keratitis: an in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology.* 2010;117(10):1930–6.
113. Wald A, Selke S, Warren T, i sur. Comparative efficacy of famciclovir and valacyclovir for suppression of recurrent genital herpes and viral shedding. *Sex Transm Dis.* 2006;33(9):529–33.
114. Akova YA, Onat M, Duman S. Efficacy of low-dose and long-term oral acyclovir therapy after penetrating keratoplasty for herpes simplex heratitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 1999;7(1):51–60.
115. Hlinomazova Z, Loukotova V, Horackova M, Sery O. The treatment of HSV1 ocular infections using quantitative real-time PCR results. *Acta Ophthalmol.* 2012;90(5):456–60.
116. Kolokotronis A, Doumas S. Herpes simplex virus infection, with particular reference to the progression and complications of primary herpetic gingivostomatitis. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(3):202–11.
117. Burrell S, Boutolleau D, Azar G, i sur. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant corneal HSV-1 isolates from immunocompetent patients with recurrent herpetic keratitis. *J Clin Virol.* 2013;58(1):321–4.
118. Burrell S, Aime C, Hermet L, i sur. Surveillance of herpes simplex virus resistance to antivirals: a 4-year survey. *Antiviral Res.* 2013;100(2):365–72.
119. Burrell S, Deback C, Agut H, Boutolleau D. Genotypic characterization of UL23 thymidine kinase and UL30 DNA polymerase of clinical isolates of herpes simplex virus: natural polymorphism and mutations associated with resistance to antivirals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):4833–42.

POPIS TABLICA

Tablica 1. *Klasifikacija HSK-a prema smjernicama AAO*

Tablica 2. *Setovi početnica korišteni u PCR protokolu za detekciju HSV-1*

Tablica 3. *GC sadržaj početnica i optimalna temperatura sparivanja (od engl. annealing) za amplifikaciju HSV-1 gena PCR metodom*

Tablica 4. *Početnice za amplifikaciju gena UL30*

Tablica 5. *Prikaz početne i završne vidne oštine (VO) prema kliničkom obliku herpetičnog keratitisa (HSK)*

Tablica 6. *Sekvence PCR početnica korištenih za amplifikaciju fragmenata gena UL30*

POPIS SLIKA

Slika 1. *Prikaz HSK-E pod biomikroskopom nakon bojanja fluoresceinskom bojom (HSK-D i HSK-G)*

Slika 2. *Prikaz HSK-S (HSK-SEU i HSK-SnEU) pod biomikroskopom*

Slika 3. *Prikaz HSK-En pod biomikroskopom*

Slika 4. *Rezultati PCR amplifikacije ciljanih HSV-1 gena*

Slika 5. *Rezultati PCR amplifikacije ciljanih HSV-1 gena pri temperaturi sparivanja 60 °C*

Slika 6. *Procjena analitičke osjetljivosti PCR eseja za gen ICP0*

Slika 7. *Raspodjela kliničkih oblika HSK-a*

Slika 8. *Broj rekurencija prema kliničkom obliku herpetičnog keratitisa (HSK)*

Slika 9. *Usporedba završne vidne oštine (VO) i apsolutnog poboljšanja vidne funkcije prema PCR statusu pacijenata s herpetičnim keratitisom (HSK)*

Slika 10. *Tijek liječenja i komplikacije ovisno o obliku HSK-a*

Slika 11. *Distribucija prediktivnog skora za procjenu rizika rezistencije HSV-a na aciklovir (ACV) u ispitanoj populaciji*

Slika 12. *Amplifikacija gena UL23*

POPIS POKRATA

AAO – American Academy of Ophthalmology (Američka akademija za oftalmologiju)

ACV – aciklovir

ACVR – aciklovir rezistentni

ACVS – aciklovir osjetljivi (od engl. acyclovir susceptible)

ANCOVA – analiza kovarijance (od engl. analysis of covariance)

BAC – bakterijski umjetni kromosom (od engl. bacterial artificial chromosome)

bp – parovi baza (od engl. base pairs)

CPE – citopatski efekt (od engl. cytopathic effect)

CRISPR-Cas9 – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated protein 9

Ct – vrijednost praga u qPCR analizi (od engl. cycle threshold)

DFA – direktna (izravna) metoda imunofluorescencije

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

ELISA – imunoenzimski test (od engl. enzyme-linked immunosorbent assay)

FCV – famciklovir

FDA – Agencija za hranu i lijekove (od engl. Food and Drug Administration)

FITC – fluorescein izotiocijanat (od engl. fluorescein isothiocyanate)

GCV – ganciklovir

HLA – sustav humanog leukocitnog antigena (od engl. human leukocyte antigen)

HSK – herpetični keratitis

HSK-D – dendritički oblik herpetičnog keratitisa

HSK-E – epitelni herpetični keratitis

HSK-En – endotelni herpetični keratitis

HSK-G – geografski oblik herpetičnog keratitisa

HSK-S – stromalni herpetični keratitis

HSK-SEU – stromalni HSK s epitelnom ulceracijom

HSK-SnEU – stromalni HSK bez epitelne ulceracije

HSV – herpes simpleks virus (od engl. herpes simplex virus)

HSV-1 – herpes simpleks virus tip 1

HSV-2 – herpes simpleks virus tip 2

HVEM – posrednik ulaska herpes virusa (od engl. herpesvirus entry mediator)

IF – imunofluorescencija
IFA – indirektna metoda imunofluorescencije
IgA – imunoglobulin A
IgG – imunoglobulin G
IgM – imunoglobulin M
IOT – intraokularni tlak
IQR – interkvartilni raspon (od engl. interquartile range)
kb – kilobaza (od engl. kilobase pair)
KBC – Klinički bolnički centar
LAT – latentno pridruženi transkript (od engl. latency associated transcript)
lncRNK – duga nekodirajuća ribonukleinska kiselina (od engl. long non-coding RNA)
MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti (od engl. major histocompatibility complex)
MIQE – smjernice za objavljivanje qPCR eksperimenata (od engl. Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments)
miRNK – mikroRNK (od engl. microRNA)
NGS – sekvenciranje sljedeće generacije (od engl. next generation sequencing)
NK – stanice prirodne ubojice (od engl. natural killer cells)
NV – neovaskularizacija
PCR – lančana reakcija polimerazom (od engl. polymerase chain reaction)
PED – perzistentni epitelni defekt
qPCR – kvantitativni PCR u realnom vremenu (od engl. quantitative PCR)
rHSK – rekurentni herpetični keratitis
RNK – ribonukleinska kiselina
SAD – Sjedinjene Američke Države
SPSS – Statistical Package for the Social Sciences
TK – timidin kinaza
UTM – univerzalni transportni medij (od engl. universal transport medium)
VACV – valaciklovir
VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (od engl. vascular endothelial growth factor)
VO – vidna oštrina
VZV – virus varicella zoster

8. ŽIVOTOPIS

Životopis

Osobni podaci

Prezime / Ime Grubešić Petra
Adresa(e) Zagrebačka 10, 51000 Rijeka; Hrvatska
Telefonski broj(evi) +385 98 600 729
E-mail grubesic.petra@gmail.com
Državljanstvo Hrvatsko
Datum rođenja 27. srpnja 1986.
Spol Ž



Obrazovanje i licence

Vrijeme Naziv dodijeljene kvalifikacije Ime i vrsta organizacije pružatelja obrazovanja i sposobljavanja	2013- danas Doktorand Medicinski fakultet u Rijeci, Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina
Vrijeme Naziv dodijeljene kvalifikacije Ime i vrsta organizacije pružatelja obrazovanja i sposobljavanja	2012. ALS (Advanced life support) CRC, Croatian resuscitation council
Vrijeme Naziv dodijeljene kvalifikacije Ime i vrsta organizacije pružatelja obrazovanja i sposobljavanja	2012. Odobrenje za samostalan rad Hrvatska liječnička komora, Republika Hrvatska
Vrijeme Naziv dodijeljene kvalifikacije Ime i vrsta organizacije pružatelja obrazovanja i osposobljavanja	2005. – 2011. Doktor medicine, VSS Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet Rijeka
Vrijeme Naziv dodijeljene kvalifikacije Ime i vrsta organizacije pružatelja obrazovanja i osposobljavanja	2005. Maturant, SSS Prva Riječka Hrvatska Gimnazija u Rijeci

Radno iskustvo	
Vrijeme:	2024-danas
Poslodavac / naziv radnog mjesta:	Klinički bolnički centar Rijeka, subspecijalist prednjeg segmenta oka
Vrijeme:	09/2018 – danas
Poslodavac / naziv radnog mjesta:	Klinički bolnički centar Rijeka, specijalist oftalmologije i optometrije
Vrijeme:	02/2013 – 09/2018
Poslodavac / naziv radnog mjesta:	Klinički bolnički centar Rijeka, specijalizant oftalmologije i optometrije
Vrijeme:	09/2016 – 10/2016
Poslodavac / naziv radnog mjesta:	University Hospitals Birmingham, Queen Elizabeth hospital, Department of Ophthalmology, UK.
Vrijeme:	5/2018 – 6/2018
Poslodavac / naziv radnog mjesta:	Specijalna bolnica "Svjetlost"
Vrijeme:	10/2011 – 10/2012 (staž)
Poslodavac / naziv radnog mjesta:	KBC Rijeka

Osobne vještine i kompetencije

Materinski jezik(ci)	hrvatski
Drugi jezik(ci)	
engleski	CEFR C1

Publikacije, pozvana predavanja i projekti	<p>Publikacije:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1: Castleman's disease—case report J Roganović, P Čoza (Grubešić), N Jonjić. <i>Pediatrics Today</i> 8 (2), 165-171 2: Progression of macular oedema following cataract surgery in a diabetic patient. P Grubešić, M Merlak, R Gržetić, M Bilen Babić, V Markušić, T Paravić. <i>Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis</i> 55 (2), 148-151 3: Nonsteroidal antiinflammatory drugs and treatment of cystoid macular edema. M Bilen Babić, M Merlak, R Gržetić-Lenac, I Valković Antić, P Grubešić. <i>Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis</i> 55 (2), 142-147 4: Cystoid macular edema after cataract surgery. M Merlak, R Gržetić-Lenac, MB Babić, IV Antić, P Grubešić, T Paravić. <i>Medicina Fluminensis</i> 55 (2), 152-158 5: The comparison of early and late percutaneous dilatational tracheostomy in the onset of complications in mechanically ventilated patients in the intensive care unit. M Iljanić, P Čoza (Grubešić), J Kuharić, T Rukavina, N Sučić, Ž Župan. <i>Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis</i> 48 (1), 72-78 6. Grubešić, P.; Jurak, I.; Čaljkušić-Mance, T.; Belančić, A.; Grubešić, A. Clinical and Demographic Characteristics of Herpetic Keratitis Patients—Tertiary Centre Experience. <i>Medicina</i> 2024, 60, 577. 7. Šoša, I.; Perković, M.; Baniček Šoša, I.; Grubešić, P.; Linšak, D.T.; Strenja, I. Absorption of Toxicants from the Ocular Surface: Potential Applications in Toxicology. <i>Biomedicines</i> 2025, 13, 645. <p>Pozvana predavanja:</p> <p>2024. ESCRS Congress (European Society of Cataract & Refractive Surgeons), Barcelona, Španjolska Pozvano predavanje: Resolution of Severe Keratitis with the Use of Intravenous Immunoglobulins</p> <p>2022. ESCRS Congress (European Society of Cataract & Refractive Surgeons), Milano, Italija Pozvano predavanje: Analysis of the HSV-1 Genome in Corneal Scrapings of Patients with Different Forms of HSV Keratitis in Croatia</p> <p>Projekti:</p> <p>UNIRI projekt 2018 (uniri-prirod-18-178 7239): <i>Ekspresija i funkcija miR-H1 herpes simpleks virusa 1. Suradnik/doktorand.</i></p>
--	---