

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Petra Šimičić

**MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA I PRIMARNA  
REZISTENCIJA VIRUSA HEPATITISA C NA DIREKTNO  
DJELUJUĆE ANTIVIRUSNE LIJEKOVE U HRVATSKOJ**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

Osijek, 2022.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni  
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

**Znanstveno područje:** Interdisciplinarno područje znanosti  
**Znanstvena polja:** Biologija i Temeljne medicinske znanosti

### MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA I PRIMARNA REZISTENCIJA VIRUSA HEPATITISA C NA DIREKTNO DJELUJUĆE ANTIVIRUSNE LIJEKOVE U HRVATSKOJ

Petra Šimičić

**Disertacija je izrađena u:** Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku, Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. Snježana Židovec Lepej

#### Kratki sažetak doktorske disertacije:

Molekularna epidemiologija virusa hepatitisa C (HCV) izrazito je složena zbog velike raznolikosti genoma HCV-a, a neke virusne varijante nose i mutacije u genima čiji su produkti ciljne strukture lijekova. Rezultati ovog istraživanja pokazali su višu prevalenciju primarne rezistencije na inhibitore proteina NS3 i NS5A u odnosu na nukleozidne inhibitore polimeraze NS5B, posebice u podtipovima 1a i 1b HCV-a. Ispitanici zaraženi HCV-om podtipa 3a, koji je najčešći u intravenskih korisnika droga (IDU), bili su najzastupljeniji u transmisijskim parovima ili klasterima. Filodinamičke analize pokazale su da je krajem 20. stoljeća došlo do eksponencijalnog rasta efektivne populacije sekvencija podtipa 1a i 3a što je razdoblje povezano s velikim porastom broja IDU u Hrvatskoj.

**Broj stranica:** 134

**Broj slika:** 32

**Broj tablica:** 23

**Broj literaturnih navoda:** 156

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** virus hepatitisa C, direktno djelujući antivirusni lijekovi, supstitucije povezane s rezistencijom, NS3, NS5A, NS5B, transmisijski klaster, intravenski korisnici droga, filogenetika, filodinamika

**Datum obrane:** 27. lipnja 2022.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Zorana Grubić
2. izv. prof. dr. sc. Tatjana Vilibić Čavlek
3. izv. prof. dr. sc. Silvija Černi
4. Zamjena: prof. dr. sc. Dijana Škorić

**Disertacija je pohranjena u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruđer Bošković Institute**  
**University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of**  
**Molecular biosciences**

**PhD thesis**

**Scientific Area:** Interdisciplinary Area of Science  
**Scientific Fields:** Biology and Basic Medical Sciences

### **MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND BASELINE RESISTANCE OF HEPATITIS C VIRUS TO DIRECT ACTING ANTIVIRALS IN CROATIA**

Petra Šimičić

**Thesis performed at:** University Hospital for Infectious Diseases „Dr. Fran Mihaljević”, Department of Immunological and Molecular Diagnostics, Zagreb

**Supervisor:** Assist. Prof. Snježana Židovec Lepej, PhD

#### **Short abstract:**

Molecular epidemiology of hepatitis C virus (HCV) is exceptionally complex due to the highly diverse HCV genome. Furthermore, some virus variants bear mutations in drug-targeted genes. The results of this research suggest higher prevalence of baseline resistance to NS3 and NS5A inhibitors compared to nucleoside NS5B inhibitors, especially for HCV subtypes 1a and 1b. The transmission pairs or clusters were predominantly comprised of subtype 3a viruses which are commonly detected among intravenous drug users (IDU). Phylodynamic analyses highlighted an exponential increase in subtype 1a and 3a effective population size in the late 20th century which is a period associated with explosive increase in number of IDU in Croatia.

**Number of pages:** 134

**Number of figures:** 32

**Number of tables:** 23

**Number of references:** 156

**Original in:** Croatian

**Key words:** hepatitis C virus, direct acting antivirals, resistance associated substitutions, NS3, NS5A, NS5B, transmission cluster, intravenous drug users, phylogenetics, phylodynamics

**Date of the thesis defense:** June 27, 2022

#### **Reviewers:**

1. Prof. Zorana Grubić, PhD
2. Assoc. Prof. Tatjana Vilibić Čavlek, PhD
3. Assoc. Prof. Silvija Černi, PhD
4. Substitute: Prof. Dijana Škorić, PhD

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorska disertacija izrađena je u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu na Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku pod mentorstvom doc. dr. sc. Snježane Židovec Lepej. Istraživanje je provedeno u okviru projekta Znanstvenog centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji”, KK.01.1.1.01.0006, sufinanciranog sredstvima Europskog fonda za regionalni razvoj.

## ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem mentorici doc. dr. sc. Snježani Židovec Lepej, voditeljici Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku, na stručnim i znanstvenim savjetima tijekom provedbe istraživanja i izrade doktorske disertacije te posvećenom vremenu i poticanju mog znanstvenog razvoja.

Hvala prof. dr. sc. Adriani Vince, pročelnici Odjela za virusni hepatitis, na pruženom povjerenju i prilici da budem dio istraživačkog tima u sklopu Centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva.

Zahvaljujem svim sadašnjim i bivšim kolegama Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ na prenesenom znanju, podršci i ugodnom radnom okruženju.

Hvala dr. sc. Anamariji Slović na ohrabrenju, savjetima i nesebičnoj pomoći u vezi filogenetske i filodinamičke obrade podataka.

Hvala mojim prijateljima koji su mi uvijek bili potpora i divno društvo, a naročito Ani i Maji na najvećoj podršci kroz sve životne uspone i padove.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji bez koje danas ne bih bila ovdje gdje jesam. Hvala tati koji je prvi potaknuo moju strast za učenjem i istraživanjem. Iako više nije ovdje, u srcu nosim njegovu snagu. Hvala mami na bezuvjetnoj ljubavi koja mi je od malena omogućila da krenem na put ostvarenja svojih želja i ciljeva. Hvala bratu koji je, unatoč udaljenosti, uvijek uz mene i u svakoj mi situaciji zna izmamiti osmijeh na lice. Hvala baki na požrtvornosti, nesebičnosti, brizi i nedvojbenoj vjeri u moj uspjeh.

I za kraj, neizmjereno hvala Kreši što me svakodnevno čini boljom i podupire na mom putu. Hvala na nezaboravnim zajedničkim trenucima, beskrajnom strpljenju i svim proteklim godinama ispunjenim ljubavlju.

“It is not the critic who counts;  
not the man who points out how the strong man stumbles,  
or where the doer of deeds could have done better.  
The credit belongs to the man who is actually in the arena,  
whose face is marred by dust and sweat and blood;  
who strives valiantly, who errs and comes up short again and again,  
because there is no effort without error or shortcoming;  
but who knows the great enthusiasms, the great devotions;  
who spends himself in a worthy cause;  
who at the best knows in the end the triumph of high achievement,  
and who at the worst, if he fails, at least he fails while daring greatly,  
so that his place shall never be with those cold and timid souls  
who neither know victory nor defeat.”

—Theodore Roosevelt

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Virus hepatitisa C (HCV).....	1
1.2. Epidemiologija infekcije HCV-om .....	1
1.2.1. Epidemiologija infekcije HCV-om u svijetu .....	1
1.2.2. Epidemiologija infekcije HCV-om u Hrvatskoj .....	3
1.3. Molekularna epidemiologija infekcije HCV-om.....	5
1.3.1. Molekularna epidemiologija infekcije HCV-om u svijetu.....	5
1.3.2. Molekularna epidemiologija infekcije HCV-om u Hrvatskoj.....	7
1.4. Organizacija genoma i struktura virusne čestice HCV-a .....	8
1.5. Replikacijski ciklus HCV-a.....	11
1.6. Patogeneza infekcije HCV-om.....	13
1.7. Raznolikost genoma HCV-a .....	13
1.8. Liječenje kroničnog hepatitisa C.....	17
1.8.1. Inhibitori proteina NS3 .....	18
1.8.2. Inhibitori proteina NS5A .....	19
1.8.3. Inhibitori proteina NS5B .....	21
1.8.4. Rezistencija na direktno djelujuće antivirusne lijekove (DAA) .....	22
1.8.5. Liječenje kroničnog hepatitisa C u okviru rezistencije.....	22
1.9. Metode analize genske raznolikosti i molekularne evolucije HCV-a .....	24
1.9.1. Metoda Sangerova sekvenciranja .....	25
1.9.2. Metode za rekonstrukciju filogenetskih stabala.....	26
1.9.2.1. Supstitucijski modeli .....	27
1.9.2.2. Demografski modeli i modeli molekularnog sata.....	28
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	31
2.1. Ciljevi istraživanja .....	31
2.2. Hipoteze istraživanja.....	31
3. MATERIJALI I METODE.....	32
3.1. Materijali .....	32
3.1.1. Ispitanici.....	32
3.1.2. Biološki uzorci.....	32
3.1.3. Reagensi i kemikalije.....	33
3.1.4. Računalni programi i alati.....	37
3.1.5. Baze podataka .....	37
3.2. Metode.....	38
3.2.1. Izolacija RNA HCV-a.....	38
3.2.2. Umnažanje regija NS3, NS5A i NS5B virusnog genoma.....	38
3.2.3. Sekvenciranje regija NS3, NS5A i NS5B virusnog genoma .....	39
3.2.4. Bioinformatička analiza sekvencija .....	41

3.2.4.1. Određivanje mutacija koje uzrokuju rezistenciju HCV-a na DAA .....	41
3.2.4.2. Filogenetska analiza sekvencija.....	41
3.2.4.3. Filodinamička analiza sekvencija.....	42
3.2.5. Statistička analiza podataka .....	43
4. REZULTATI.....	44
4.1. Ispitanici.....	44
4.2. Analiza supstitucija povezanih s rezistencijom (RAS) na DAA.....	45
4.2.1. Analiza RAS na inhibitore proteaze NS3 .....	46
4.2.2. Analiza RAS na inhibitore proteina NS5A.....	47
4.2.3. Analiza RAS na nukleozidne inhibitore (NI) polimeraze NS5B .....	48
4.3. Analiza klinički značajne rezistencije na DAA.....	49
4.4. Filogenetska analiza.....	56
4.4.1. Filogenetska analiza sekvencija podtipa 1a (N = 109) .....	61
4.4.1.1. Filogenetska analiza sekvencija regije NS3 podtipa 1a.....	61
4.4.1.2. Filogenetska analiza sekvencija regije NS5A podtipa 1a.....	63
4.4.1.3. Filogenetska analiza sekvencija regije NS5B podtipa 1a.....	64
4.4.2. Filogenetska analiza sekvencija podtipa 1b (N = 80) .....	66
4.4.2.1. Filogenetska analiza sekvencija regije NS3 podtipa 1b .....	66
4.4.2.2. Filogenetska analiza sekvencija regije NS5A podtipa 1b.....	67
4.4.2.3. Filogenetska analiza sekvencija regije NS5B podtipa 1b.....	69
4.4.3. Filogenetska analiza sekvencija podtipa 3a (N = 111) .....	71
4.4.3.1. Filogenetska analiza sekvencija regije NS3 podtipa 3a.....	71
4.4.3.2. Filogenetska analiza sekvencija regije NS5A podtipa 3a.....	73
4.4.3.3. Filogenetska analiza sekvencija regije NS5B podtipa 3a.....	74
4.4.4. Analiza transmisivskih parova i klastera ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a, 1b i 3a .....	76
4.5. Filodinamička analiza sekvencija podtipa 1a, 1b i 3a .....	77
4.6. Statistička analiza karakteristika ispitanika.....	86
5. RASPRAVA.....	91
6. ZAKLJUČCI .....	110
7. LITERATURA.....	111
8. POPIS KRATICA .....	127
9. SAŽETAK.....	130
10. SUMMARY .....	131
11. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA.....	132



## **1. UVOD**

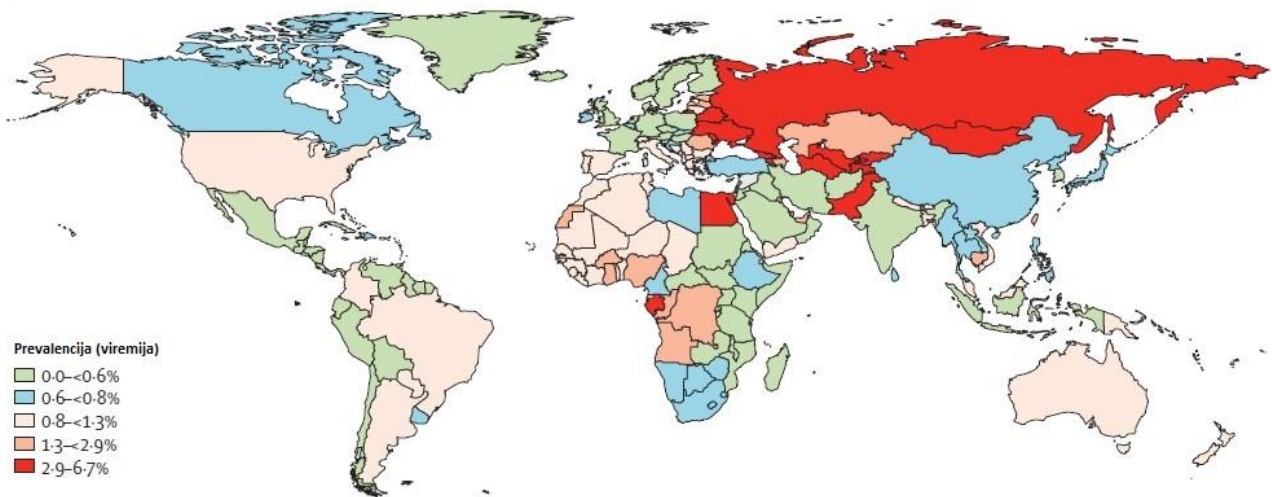
### **1.1. Virus hepatitisa C (HCV)**

Virus hepatitisa C (hepatitis C virus, HCV) je hepatotropni RNA virus koji pripada rodu *Hepacivirus* i porodici *Flaviviridae*. Kronična infekcija HCV-om danas je glavni čimbenik nastanka kronične bolesti jetre, ciroze i hepatocelularnog karcinoma, a virus je identificiran tek 1989. godine kao uzročnik hepatitisa povezanog s transfuzijom koji se nije mogao pripisati infekcijama virusom hepatitisa A niti virusom hepatitisa B (Choo i sur., 1989; Wilkins i sur., 2015; Petruzzello i sur., 2016). Prije ovog otkrića, za koje je 2020. godine dodijeljena Nobelova nagrada za medicinu, HCV je neprepoznat evoluirao i širio se kroz ljudsku populaciju, rezultirajući spektrom endemskih i epidemijskih sojeva koji su sposobni potaknuti kroničnu bolest jetre (Jackoviack i sur., 2014; Laugi, 2020). Predložene su dvije suprotne hipoteze o porijeklu HCV-a u ljudi. Prema prvoj teoriji, HCV se pojavio u ljudi kao rezultat zoonotskog prijenosa s drugih sisavaca, prvenstveno ne-ljudskih primata. Ovu teoriju podupiru zajednički elementi evolucijske povijesti između HCV-a i virusa ljudske imunodeficiencije (human immunodeficiency virus, HIV) čije se porijeklo pripisuje čimpanzama. Međutim, osnovna poteškoća ove pretpostavke jest što zasad u divljim primatima nije pronađena prisutnost HCV-a ili srodnih virusa, ali homolozi HCV-a identificirani su u psima, konjima, šišmišima i glodavcima. Druga predložena teorija pretpostavlja kako je HCV inficirao ljude i njihove pretke tijekom cijele njihove evolucijske povijesti. Ova hipoteza temeljena je na činjenici kako je, unatoč postojanju velikog broja hepacirusa sisavaca, svaki od njih jedinstveno prilagođen jednoj domaćinskoj vrsti (Jackowiak i sur., 2014).

### **1.2. Epidemiologija infekcije HCV-om**

#### **1.2.1. Epidemiologija infekcije HCV-om u svijetu**

Ukupna prevalencija infekcije HCV-om u svijetu procjenjuje se na približno 58 milijuna zaraženih odraslih osoba (WHO, 2021). Unatoč neprekidnom padu incidencije infekcije HCV-om, očekuje se da će mortalitet povezan s infekcijom HCV-om rasti u idućih 20 godina (Petruzzello i sur., 2016). Prevalencija infekcije HCV-om varira u ovisnosti o geografskim regijama u rasponu od 0,5 % do 7 % pri čemu se područja s višom prevalencijom nalaze se u Africi, istočnoj Europi i Aziji, te Bliskom istoku; dok područja s nižom prevalencijom uključuju sjevernu Ameriku, sjevernu i zapadnu Europu i Australiju (Slika 1) (Lee i sur., 2014; Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017).



**Slika 1.** Procjena globalne prevalencije viremičnih infekcija virusom hepatitisa C. Preuzeto i prilagođeno iz: Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017.

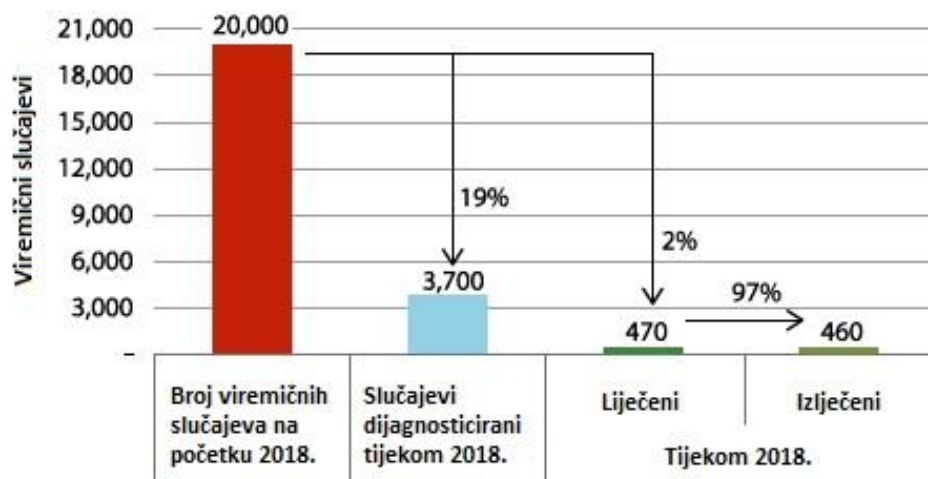
U svibnju 2016. godine Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organisation*, WHO) odobrila je strategiju Globalnog zdravstvenog sektora o virusnim hepatitisima koja predlaže eliminaciju virusnog hepatitisa kao javnozdravstvenog problema do 2030. godine. Eliminacija je definirana kao smanjenje novih slučajeva kroničnog hepatitisa C i B za 90 % i smanjenje smrti uzrokovanih hepatitisom C i B za 65 % u odnosu na 2015. godinu, kada je procijenjeno da je diljem svijeta 71 milijun ljudi odnosno 1 % svjetske populacije živjelo s kroničnim hepatitisom C, a gotovo 400.000 umrlo od ciroze ili hepatocelularnog karcinoma uzrokovanog infekcijom HCV-om. Kako bi se ostvarili navedeni ciljevi, potrebno je dijagnosticirati 90 % zaraženih osoba i započeti liječenje 80 % dijagnosticiranih osoba. U 2015. godini od procijenjenih 71 milijun osoba s kroničnim hepatitisom C samo njih 14 milijuna (20 %) bilo je dijagnosticirano, a od toga je 1,1 milijun (7 %) započelo liječenje (WHO, 2016; Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017; WHO, 2017; WHO, 2018).

Hepatitis C predstavlja važan javnozdravstveni problem i u Europi gdje se pretpostavlja kako je približno 12 – 13 milijuna ljudi, odnosno 1,8 % populacije, kronično zaraženo HCV-om, što uzrokuje više od 60.000 smrti godišnje od hepatocelularnog karcinoma i ciroze (Petruzzello i sur., 2016; WHO 2021). Prosječna stopa viremije iznosi oko 70 % što čini populaciju od gotovo 10 milijuna viremičnih osoba. U središnjoj i jugoistočnoj Europi (koja uključuje države poput Albanije, Bugarske, Bosne i Hercegovine, Češke, Hrvatske, Mađarske, Makedonije, Crne Gore, Poljske, Rumunjske, Srbije, Slovačke i Slovenije) prosječna prevalencija infekcije HCV-om iznosi 1,3 % (Petruzzello, 2016).

Infekcija HCV-om putem transfuzije krvi i krvnih pripravaka bila je jedan od najčešćih načina prijenosa HCV-a prije uvođenja univerzalnog testiranja krvi u razvijenim državama 90-ih godina 20. stoljeća, dok u nerazvijenim dijelovima svijeta ovaj način prijenosa, zajedno s drugim neprikladnim odnosno nesterilnim medicinskim postupcima, i dalje predstavlja problem. U razvijenim državama intravensko korištenje droga danas predstavlja glavni način prijenosa HCV-a, a prevalencija infekcije HCV-om u populaciji intravenskih korisnika droga (eng. *intravenous drug users*, IDU) iznosi 31 – 98 % (Lee i sur., 2014; Webster, Klenerman i Dusheiko, 2015; WHO 2016; Rose i sur., 2018; Clipman i sur., 2021; Minosse i sur., 2021). Drugi načini prijenosa odnose se na aktivnosti koje uključuju potencijalnu perkutanu izloženost krvi ili tjelesnim tekućinama koji sadrže krv kao što su tetoviranje, akupunktura, *piercing*, kozmetički zahvati i slično (Lee i sur., 2014). Spolni prijenos HCV-a među monogamnim heteroseksualnim parovima se događa rijetko, jednako kao i vertikalni, odnosno perinatalni prijenos, HCV-a s majke na dijete. Prevalencija infekcije HCV-om među seksualnim partnerima osoba s kroničnim hepatitisom C je samo 0,6 – 1,2 %, a incidencija prijenosa HCV-a putem seksualnog kontakta iznosi 0,04 – 0,07 % godišnje (Terrault i sur., 2013; Lee i sur., 2014; Webster, Klenerman i Dusheiko, 2015). Za razliku od toga, u skupini HIV-pozitivnih muškaraca koji imaju spolne odnose s muškarcima (eng. *men who have sex with men*, MSM) od 2000. godine incidencija infekcije HCV-om neprekidno raste. Od naročitog interesa u ovoj skupini je stopa reinfekcije nakon uspješnog liječenja ili spontanog izlječenja budući da se 25 % liječenih osoba reinficira unutar dvije godine, što ukazuje na potrebu preventivnih intervencija u ovoj ciljnoj skupini (Webster, Klenerman i Dusheiko, 2015).

### **1.2.2. Epidemiologija infekcije HCV-om u Hrvatskoj**

Hrvatska je zemlja s relativno niskom prevalencijom infekcije HCV-om - procjenjuje se kako je između 35.000 i 45.000 osoba odnosno 0,9 % populacije Hrvatske zaraženo kroničnim hepatitisom C (Vilibic-Cavlek i sur., 2015). Uzevši u obzir stopu viremije od 70 %, prevalencija viremičnih slučajeva procjenjuje se na 0,5 %, odnosno između 20.000 i 34.000 osoba, a do 2014. godine s kroničnim hepatitisom C u Hrvatskoj ukupno je dijagnosticirano oko 4.000 osoba. U 2018. i 2019. godini testirano je između 30.000 i 40.000 osoba godišnje, od kojih je kod 170 dokazana viremija. U proteklih pet godina velike promjene uvedene su u način liječenja HCV-a u Hrvatskoj pri čemu su ukinuta ograničenja za liječenje ovisno o fibrozi i proširena dobna granica liječenih na 18 – 84 godine. Broj liječenih bolesnika utrostručio se u razdoblju od 2015. do 2018. godine te iznosi oko 470 liječenih osoba godišnje (Slika 2) (Vince i sur., 2020).

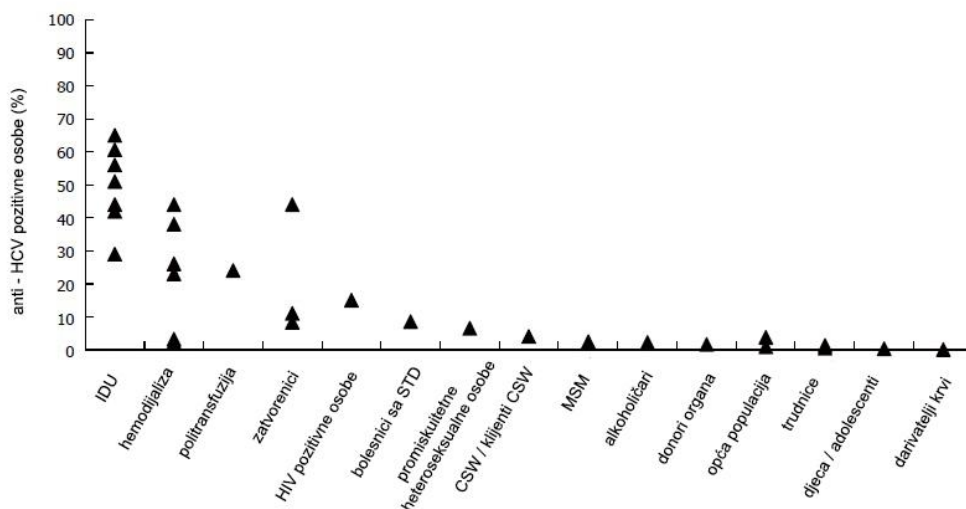


**Slika 2.** Kaskada skrbi za bolesnike zaražene virusom hepatitisa C, uključujući ukupan broj viremičnih osoba, broj dijagnosticiranih bolesnika te broj liječenih i izličenih bolesnika u Hrvatskoj 2018. Preuzeto i prilagođeno iz: Vince i sur., 2020.

Smatra se kako je broj viremičnih osoba u Hrvatskoj dosegao vrhunac 2007. godine te da će se nastaviti smanjivati za 30 % između 2015. i 2030., što će rezultirati s ukupnim brojem zaraženih od 14.100 do kraja 2030. godine. Ukoliko neće biti promjena u procesu dijagnostike i liječenja kroničnog hepatitisa C, u Hrvatskoj se očekuje porast broja smrti povezanih s bolestima jetre, pojave hepatocelularnog karcinoma i dekompenzirane ciroze za 70 %, 80 %, odnosno 90 %. Procjenjuje se kako će se u Hrvatskoj u razdoblju 2018. – 2030. ukupno testirati 460.000 osoba od kojih se kronični hepatitis C očekuje dijagnosticirati kod 2.700 osoba. Postizanje ciljeva WHO-a značilo bi redukciju ukupnog broja viremičnih slučajeva na 4.000 u 2030. godini uz sprječavanje gotovo 1.200 smrtnih ishoda uzrokovanih bolestima jetre, hepatocelularnim karcinomom i dekompenziranom cirozom u razdoblju od 2015. do 2030. godine za koje se procjenjuje da bi nastali uz sadašnju razinu probira i kliničku praksu. Prema upotrijebljenom matematičkom modelu to bi zahtijevalo povećanje broja testiranja na 250.000 osoba godišnje, kako bi se godišnje dijagnosticiralo i liječilo 1.500 bolesnika (Vince i sur., 2020).

Poput ostalih europskih zemalja, u Hrvatskoj su prisutne promjene u epidemiologiji infekcije HCV-om u posljednjih nekoliko desetljeća. U nekim rizičnim skupinama, poput osoba koje su primile transfuziju ili hemodijalizu, vidljiv je značajan pad u prevalenciji infekcije HCV-om nakon uvođenja rutinskog testiranja krvi i krvnih pripravaka 1992. godine. Skupinu s najvećim rizikom za infekciju HCV-om predstavljaju IDU s prevalencijom u rasponu 29 – 65 % (Vilibić-Cavlek i sur., 2015). Procjenjuje se kako u Hrvatskoj oko 15.000 osoba čini populaciju intravenskih korisnika droga (Kolarić i sur., 2010). U usporedbi s prevalencijom infekcije HCV-om u hrvatskoj općoj populaciji (0,9 %) viša stopa prevalencije uočena je u zatvorskoj populaciji (8,3 % – 44 %), naročito među IDU, osobama s infekcijom HIV-om (15 %), osobama s rizičnim seksualnim ponašanjem (4,6 %) i

alkoholičarima (2,4 %). Niska prevalencija uočena je u djece i adolescenata (0,3 %) te darivatelja krvi (0 – 0,009 %) (Slika 3) (Vilibic-Cavlek i sur., 2015).



**Slika 3.** Seroprevalencija infekcije virusom hepatitisa C među različitim rizičnim skupinama u Hrvatskoj (HCV: virus hepatitisa C; IDU: intravenski korisnici droga; STD: spolno prenosive bolesti; CSW: prodavatelji seksualnih usluga; MSM: muškarci koji imaju spolne odnose s muškarcima). Preuzeto i prilagođeno iz: Vilibic-Cavlek i sur., 2015.

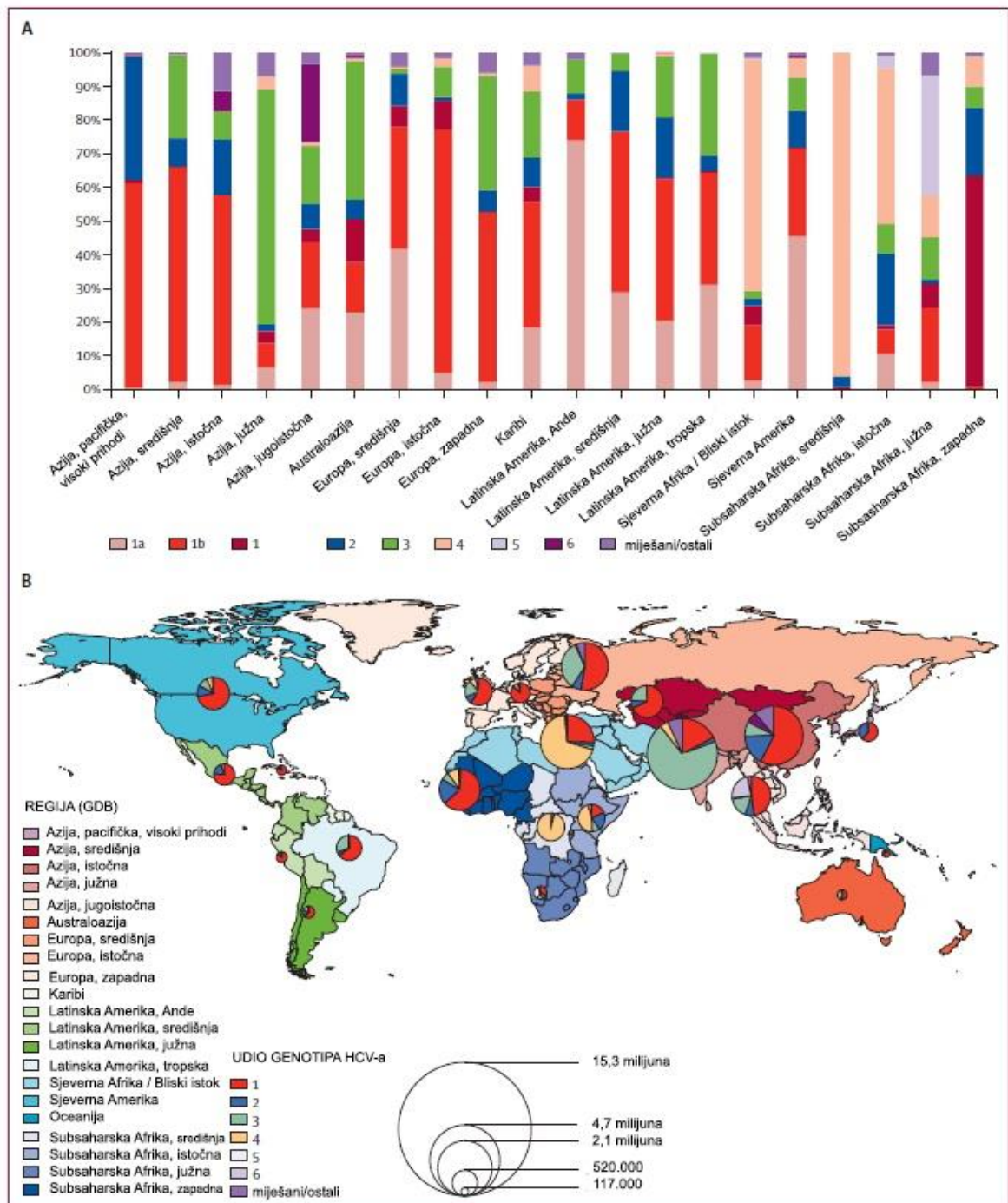
### 1.3. Molekularna epidemiologija infekcije HCV-om

Molekularna epidemiologija infekcije HCV-om složena je zbog velike raznolikosti sekvencija virusnog genoma koje se među genotipovima razlikuju u više od 30 %, a unutar pojedinih podtipova u više od 15 % nukleotidnih mjesta (Jackowiak i sur., 2014; Petruzzello i sur., 2016). Kako bi se izolat HCV-a smatrao novim potvrđenim genotipom ili podtipom, potrebno je dobiti sekvenciju kompletne kodirajuće regije koja: i) formira zasebnu filogenetsku skupinu različitu od prethodno opisanih sekvencija, ii) je predstavljena pomoću najmanje tri epidemiološki nepovezana izolata te iii) nije rezultat rekombinacije između drugih genotipova i podtipova (Jackowiak i sur., 2014; Smith i sur., 2014; ICTV, 2019).

#### 1.3.1. Molekularna epidemiologija infekcije HCV-om u svijetu

Danas se HCV kategorizira u 8 genotipova i 90 podtipova, a prevalencija genotipova varira u ovisnosti o različitim populacijskim skupinama i regijama (ICTV, 2019). Globalna istraživanja molekularne raznolikosti pokazale su kako je genotip 1 najčešći diljem svijeta (46 – 49 %), nakon čega slijede genotipovi 3 (18 – 22 %), 4 (13 – 17 %) i 2 (11 – 13 %), dok su genotipovi 5, 6, 7 i 8 odgovorni za preostalih <5 % infekcija HCV-om. Dok su genotipovi 1 i 3 učestali diljem svijeta, naročito u Europi, Sjevernoj Americi i Australoaziji, najveći udio genotipova 4 i 5 dokazan je u zemljama niskog socioekonomskog statusa, naročito na području Afrike, Azije i Bliskog istoka.

Dominantan genotip u Europi je genotip 1 (64 %), nakon čega slijede genotip 3 (26 %), genotip 2 (6 %) i genotip 4 (4 %) (Slika 4) (Gower i sur., 2014; Petruzzello i sur., 2016).

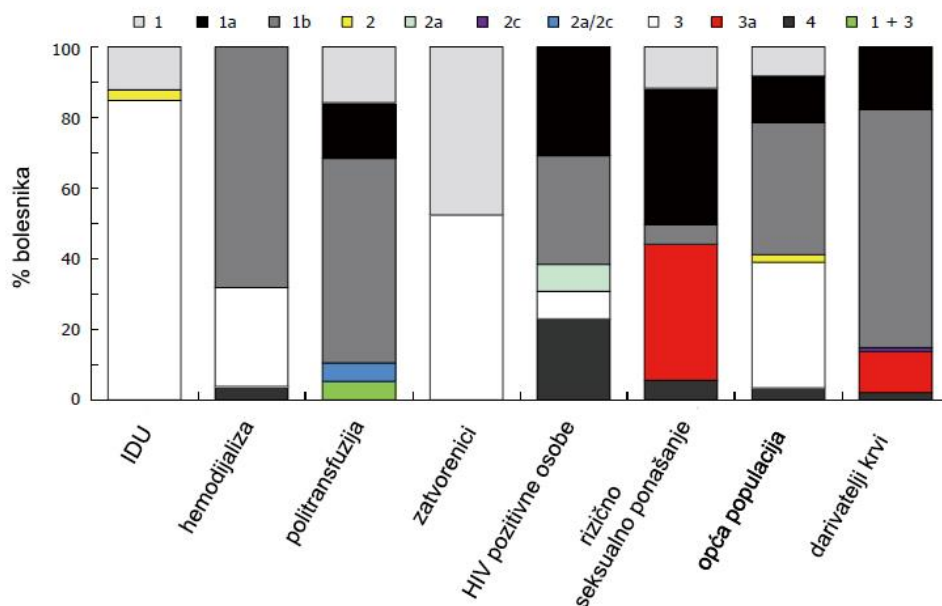


**Slika 4.** Raspodjela genotipova virusa hepatitisa C diljem svijeta. A) prema regiji GBD B) prema genotipu i ukupnom broju zaraženih u regiji GBD (GDB: globalno opterećenje bolešću; HCV: virus hepatitisa C). Preuzeto i prilagođeno iz: Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017.

Suvremena globalna geografska raspodjela genotipova HCV-a je složena. Neki podtipovi (1a, 1b, 2a, 3a) široko su rasprostranjeni diljem svijeta te čine velik broj infekcija HCV-om u razvijenim zemljama. Za ove takozvane epidemijske podtipove smatra se da su se naglo proširili u desetljećima prije otkrića HCV-a putem zaražene krvi, krvnih proizvoda i intravenskog korištenja droga. Ovi podtipovi imaju manju gensku raznolikost, lakše se prenose i smatra se da su se pojavili relativno nedavno. Endemski podtipovi su rjeđi i ograničeni na specifične regije kao što su zapadna i središnja Afrika, južna i jugoistočna Azija te Bliski istok. Oni ujedno imaju i visoku razinu genske raznolikosti što sugerira dugotrajnu evoluciju. Na globalnu raspodjelu genske raznolikosti HCV-a utjecali su povijesni i suvremeni trendovi migracija stanovništva (Jackowiak i sur., 2014; Messina i sur., 2014; Precaido i sur., 2014; Petruzzello i sur., 2016). Raspodjela genotipova i podtipova HCV-a povezana je s načinom prijenosa i pokazuje značajnu geografsku varijaciju na regionalnoj i državnoj razini. U Europi, podtip 1b i genotip 2 najčešće su povezani s transfuzijom krvi i neprikladnim medicinskim postupcima, dok su podtip 1a i 3a najčešće identificirani u intravenskih korisnika droga (Jackowiak i sur., 2014; Vince i sur., 2018).

### **1.3.2. Molekularna epidemiologija infekcije HCV-om u Hrvatskoj**

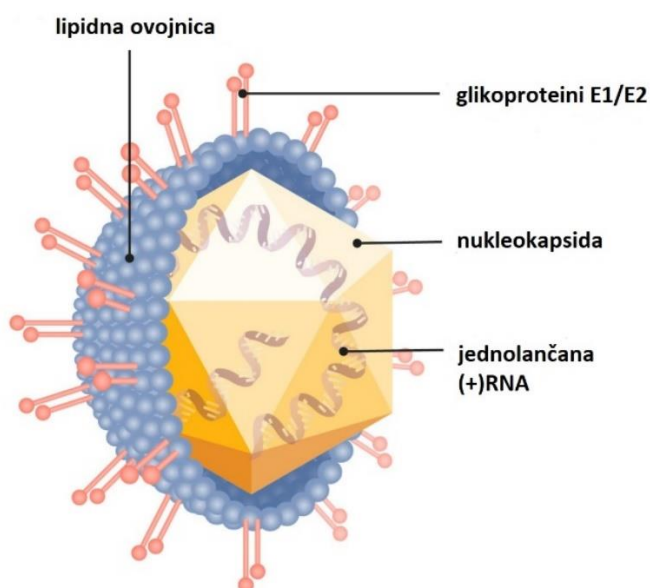
Prevalencija genotipova HCV-a u Hrvatskoj varira u ovisnosti o različitim populacijskim skupinama i regijama. U općoj populaciji, genotip 1 je najzastupljeniji (57 – 80 %) nakon čega slijedi genotip 3 (13 – 48 %). Postotak genotipova 2 (1 – 2 %) i 4 (4 – 7 %) nizak je, a genotipovi 5 i 6 nisu uočeni (Vilibic-Cavlek i sur., 2015; Vince i sur., 2018). Podtipom 1a zaraženo je 46 %, a podtipom 1b 54 % ispitanika genotipa 1 (Vince i sur., 2018). Raspodjela genotipova promijenila se uslijed različitih načina prijenosa. Primanje krvi ili krvnih pripravaka prije 1992. godine povezano je s infekcijom HCV-om uzrokovanom genotipom 1, naročito podtipom 1b koji je uočen u 44 % osoba koje su primile transfuziju i 75 % bolesnika koji su bili na liječenju hemodijalizom. Genotip 3 dominantan je u hrvatskim IDU (60 – 84 %), a najčešći podtipovi u ovoj populaciji su 3a (61 %) i 1a (24 %). U osoba s rizičnim seksualnim ponašanjem najčešći je genotip 1 (56 %), a podtipovi uočeni u ovoj populaciji su 1a (39 %), 3a (39 %) i 1b (6 %) (Slika 5) (Vilibic-Cavlek i sur., 2015).



**Slika 5.** Raspodjela genotipova virusa hepatitisa C u Hrvatskoj unutar različitih rizičnih skupina (IDU: intravenski korisnici droga; HIV: virus ljudske imunodeficijencije). Preuzeto i prilagođeno iz: Vilibic-Cavlek i sur., 2015.

#### 1.4. Organizacija genoma i struktura virusne čestice HCV-a

Čestice HCV-a promjera su 50 – 80 nm i sastoje se od jednolančanog (+) RNA genoma, nukleokapsidnog proteina te glikoproteina ovojnice E1 i E2. Genom HCV-a s nukleokapsidnim proteinom tvori nukleokapsidu ikozaedarskog oblika promjera 30 – 35 nm okruženu lipidnom membranom u koju su usidreni glikoproteini ovojnice (Slika 6) (Kim i Chang, 2013; Dubuisson i Cosset, 2014; Popescu i sur. 2014; Du i Tang, 2015).

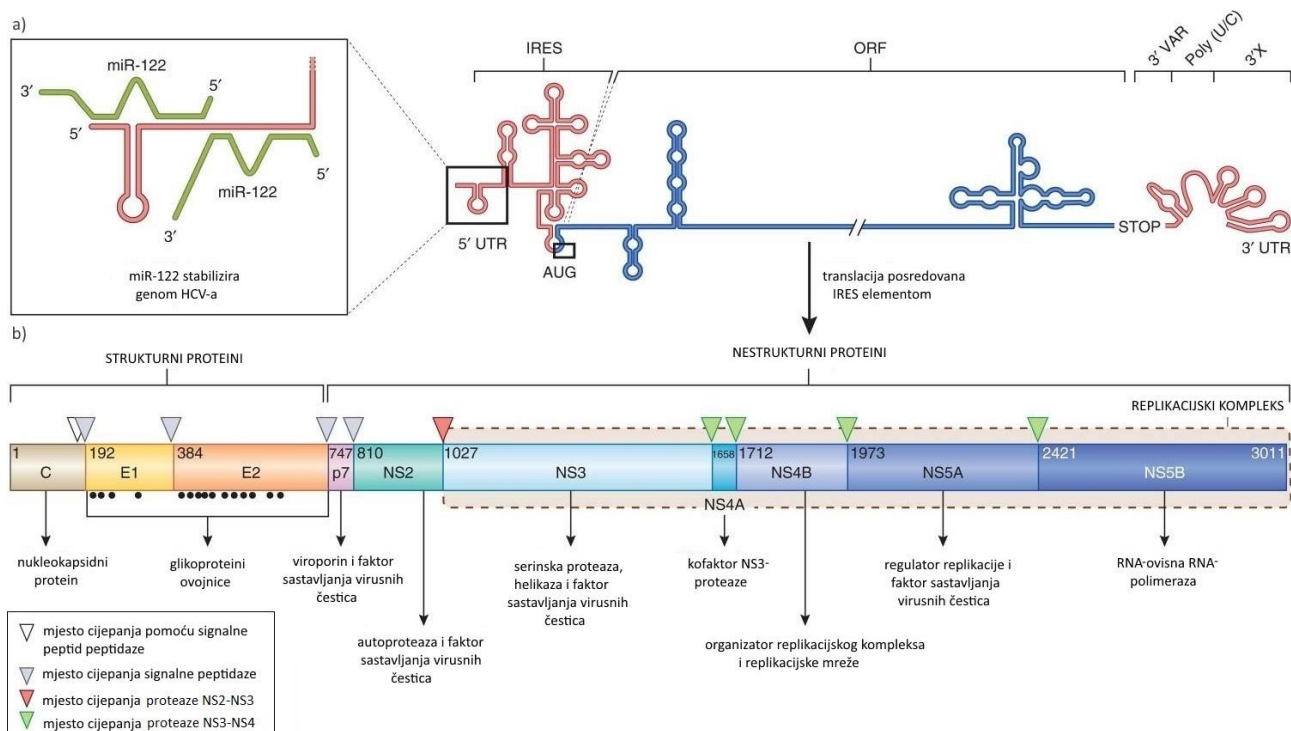


**Slika 6.** Struktura čestice virusa hepatitisa C. Preuzeto i prilagođeno iz: The Lecturio Medical Concept Library, 2021.



Genom HCV-a duljine je 9,7 kilobaza i sadrži jedan otvoreni okvir čitanja (eng. *open reading frame*, ORF) koji se sastoji od 9024 do 9111 nukleotida (ovisno o genotipu) te je okružen terminalnim netranslatirajućim regijama (eng. *untranslated region*, UTR) bogatim sekundarnim strukturama na 5' i 3' krajevima, koje imaju ključne regulacijske funkcije i neophodne su za virusnu replikaciju i translaciju (Kim i Chang, 2013; Li i sur., 2015). Virusna RNA nema 5' metilgvanozinsku kapu umjesto koje se nalazi 5' trifosfat, a 5' UTR sadrži i regulatornu regiju zvanu IRES element koji inicira translaciju genoma HCV-a neovisnim mehanizmom. Blizu 5' kraja RNA genoma HCV-a nalaze se dva konzervirana vezna mjesta za miR-122. Mikro RNA miR-122 specifične su za jetru, a njihovo vezanje za RNA HCV-a potiče translaciju virusnog genoma i pruža zaštitu od imunskog sustava i razgradnje egzonukleazama (Scheel i Rice, 2013). Za razliku od staničnih mRNA, 3' kraj virusnog genoma ne sadrži poli-A rep već završava konzerviranim i stabilnim strukturama s peteljkom i omčom ispred kojih se nalazi poli-U/C slijed (Slika 7) (Piñeiro i Martinez-Salas, 2012; Popescu i sur., 2014; Li i sur., 2015).

Translacija virusnog genoma rezultira sintezom velikog poliproteina od 3010 aminokiselinskih ostataka koji se cijepa pomoću staničnih i virusnih proteaza kako bi nastalo 10 individualnih virusnih proteina s različitim karakteristikama - tri strukturna proteina (nukleokapsidni protein, te proteini E1 i E2) i sedam nestrukturnih proteina (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B) od kojih neki posjeduju enzimske aktivnosti (Slika 7) (Li i sur., 2015). Strukturni proteini ujedno su komponente samih viriona, dok se nestrukturni proteini eksprimiraju u stanicama zaraženima virusom, ali se ne ugrađuju u virusne čestice već služe koordinaciji unutarstaničnih aspekata replikacije HCV-a, uključujući sintezu RNA, modulaciju obrambenih mehanizama domaćina i sastavljanje virusnih čestica (Piñeiro i Martinez-Salas, 2012; Lindenbach i Rice, 2013; Lapa i sur., 2019).



**Slika 7.** Organizacija genoma i poliproteina virusa hepatitisa C. a) Sekundarna struktura jednolančanog RNA genoma virusa hepatitisa C koja prikazuje kratke 5' i 3' netranslatirajuće regije (UTR, crveno) bogatim sekundarnim strukturama koje okružuju dugačak otvoreni okvir čitanja (ORF, plavo). b) Translacijom ORF-a nastaje poliprotein koji se kotranslacijski i posttranslacijski cijepa staničnim (bijeli i sivi trokuti) i virusnim (crveni i zeleni trokuti) proteazama prilikom čega nastaje 10 virusnih proteina. Glikozilacija proteina ovojnice označena je crnim točkama (ORF: otvoreni okvir čitanja; UTR: netranslatirajuća regija). Preuzeto i prilagođeno iz: Scheel i Rice, 2013.

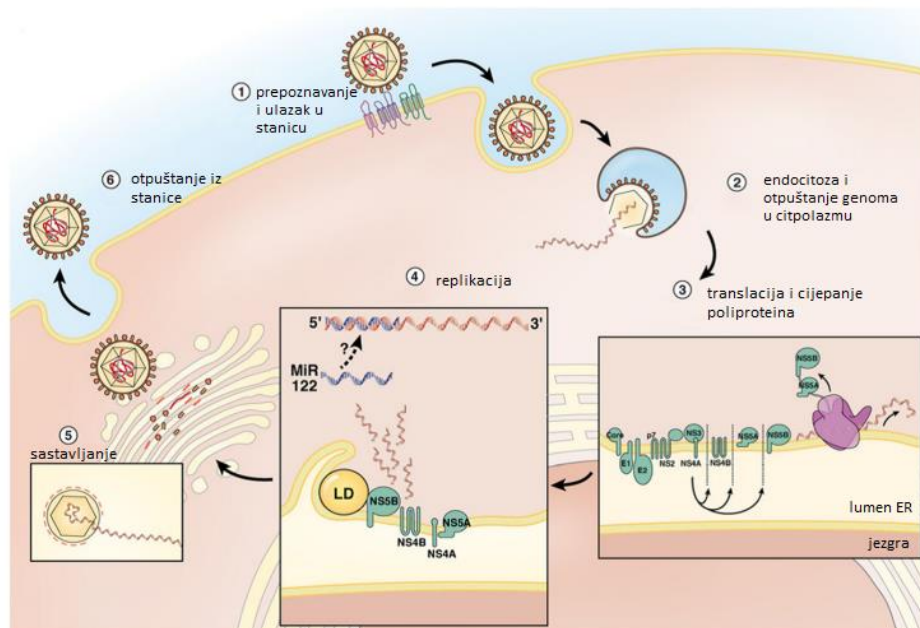
Nukleokapsidni protein je višenamjenski visokokonzervirani protein koji modulira ekspresiju virusnih i staničnih gena te čini dio virusne nukleokapside. Glikoproteini E1 i E2 formiraju heterodimere te čine funkcionalnu jedinicu virusne ovojnice i sudjeluju u receptorom posredovanom ulasku virusa u stanice (Piñeiro i Martinez-Salas, 2012; Kim i Chang, 2013; Popescu i sur., 2014). Glikoproteini ovojnice HCV-a su glavne ciljne strukture selekcijskog pritiska od strane neutralizirajućih protutijela, a hipervarijabilne regije utvrđene u glikoproteinima ovojnice mogu doprinijeti izbjegavanju imunskog sustava i dugom opstanku HCV-a (Kim i Chang, 2013). Mali hidrofobni protein p7 formira ionski kanal uključen u sastavljanje i otpuštanje virusnih čestica (Piñeiro i Martinez-Salas, 2012; Popescu i sur., 2014). Protein NS2 neophodan je za replikaciju i sastavljanje virusnih čestica, a djeluje kao autokatalitička cisteinska proteaza (Popescu i sur., 2014). N-terminalna domena proteina NS3 funkcionira kao serinska proteaza koja je odgovorna za cijepanje virusnog poliproteina i staničnih antivirusnih signalnih proteina, sprečavajući indukciju interferona tipa 1 u zaraženim stanicama. C-terminalna domena NS3 ima helikaznu aktivnost te služi za odmatanje dvolančanih formi virusnog genoma ili odvajanje proteina od genoma tijekom replikacije

RNA (Kim i Chang, 2013; Lindenbach i Rice, 2013; Popescu i sur., 2014). Mali hidrofobni protein NS4A služi kao kofaktor za serinsku proteazu NS3, a protein NS4B potiče preraspodjelu unutarstaničnih membrana potrebnih za virusnu replikaciju (Kim i Chang, 2013; Popescu i sur., 2014). Višenamjenski fosfoprotein NS5A ima ključnu ulogu u virusnoj replikaciji i sastavljanju virusnih čestica (Kohler i sur., 2014). Virusna RNA-ovisna RNA-polimeraza NS5B formira replikacijski kompleks zajedno s NS3, NS4A, NS4B i NS5A (Kim i Chang, 2013; Macarthur i sur., 2013; Popescu i sur., 2014; Du i Tang, 2015).

Jedinstveno svojstvo HCV-a je i njegova povezanost s lipoproteinima domaćina, poput apoE, apoB, apoA1, apoC1, apoC2 i apoC3. Lipidni sastav viriona HCV-a upućuje kako je više od polovice lipida HCV-a sastavljeno od kolesterilnih estera što nalikuje lipidnom sadržaju lipoproteina jako niske gustoće (eng. *very low density lipoprotein*, VLDL) i lipoproteina niske gustoće (eng. *low density lipoprotein*, LDL). Ultracentrifugiranje zaraženih uzoraka krvi u gradijentu saharoze pokazalo je kako čestice HCV-a imaju iznenađujuće nisku gustoću koja varira od 1,03 do 1,20 g/cm<sup>3</sup> te kako su frakcije niske gustoće najinfektivnije. Međudjelovanje između virusnih čestica i serumskih lipoproteina ukazuje kako bi HCV mogao formirati hibridne lipovirusne čestice koje olakšavaju ulazak virusa u hepatocite i mogu štititi virus od neutralizacije protutijelima (Pawlotsky, 2004; Lindenbach i Rice, 2013; Popescu i sur., 2014; Dubuisson i Cosset, 2014; Du i Tang, 2015).

### **1.5. Replikacijski ciklus HCV-a**

Tijekom primarne infekcije, čestice HCV-a transportiraju se krvotokom i dolaze u dodir s bazolateralnom površinom hepatocita nakon prolaska kroz fenestirani epitel jetrenih sinusoida. Ulazak viriona HCV-a u hepatocite započinje niskoafinitetnim međudjelovanjem s LDL receptorom i glikozaminoglikanima prisutnim na heparan sulfat proteoglikanima te brojnim koreceptorima uključujući CD81, klaudin-1, okludin i SRB1. Nakon internalizacije virusnih čestica klatrinom posredovanom endocitozom dolazi do zakiseljavanja endosoma što dovodi do fuzije virusne ovojnice i membrane endosoma te otpuštanja virusnog genoma u citoplazmu (Slika 8) (Kim i Chang, 2013; Lindenbach i Rice, 2013; Dubuisson i Cosset, 2014; Du i Tang, 2015; Gogela i sur., 2015).



**Slika 8.** Replikacijski ciklus virusa hepatitisa C (ER: endoplazmatski retikulum; LD: lipidne kapljice. Preuzeto i prilagođeno iz: Gogela i sur., 2015).

Budući da je replikacija virusne RNA vođena replikacijskim kompleksom vezanim uz membrane, potrebna je prethodna translacija virusnog genoma i ekspresija nestrukturnih proteina. Replikacija genoma HCV-a odvija se u strukturama porijeklom od endoplazmatskog retikuluma gdje se proteini NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B povezivanjem dvomembranskim vezikulima sastavljaju u replikacijski kompleks zvan membranska mreža (Slika 8) (Dubuisson i Cosset, 2014; Li i sur., 2015). Novosintetizirana molekula RNA može služiti kao kalup za daljnju replikaciju virusne RNA, biti usmjerena u translaciju radi sinteze virusnih proteina ili pakiranje u nove virusne čestice (Kim i Chang, 2013; Popescu i sur., 2014; Li i sur., 2015). Dugi opstanak HCV-a zahtijeva ravnotežu između sinteze i razgradnje virusne RNA. Izrazito velika proizvodnja novih virusnih genoma i virusnih proteina dovela bi do stanične smrti, dok bi premalo učinkovita replikacija mogla dovesti do uklanjanja virusa pomoću imunskog sustava domaćina. Ova ravnoteža postiže se negativnom povratnom spregom između virusom potaknutog oksidacijskog oštećenja membrana i replikaznog kompleksa te stabilizacijom virusnog genoma pomoću miR-122 (Li i sur., 2015).

Sastavljanje virusnih čestica odvija se u unutarstaničnim lipidnim kapljicama, a zahtijeva vremenski i prostorno usklađeno međudjelovanje strukturalnih proteina i replikacijskog kompleksa (Du i Tang, 2015). Nakon pakiranja virusne RNA u nukleokapsidu virusna čestica pupanjem iz endoplazmatskog retikuluma dobiva ovojnica, a prolaskom kroz sekretorni put sazrijeva pri čemu dolazi do posttranslacijskih modifikacija glikoproteina i međudjelovanja sa serumskim lipoproteinima te otpuštanja viriona iz stanica (Slika 8) (Lindenbach i Rice, 2013; Popescu i sur., 2014).

## 1.6. Patogeneza infekcije HCV-om

Patogeneza infekcije HCV-om neraskidivo je povezana sa sposobnošću dugog opstanka virusa desetljećima u većini zaraženih osoba. Mehanizmi dugog opstanka HCV-a nisu u potpunosti karakterizirani, ali uključuju višestruku virusom izazvanu stimulaciju imunskog sustava domaćina pri čemu se virus u jetri zadržava godinama s minimalnom patologijom i relativno stalnom razinom viremije (Li i sur., 2015). U većini slučajeva (50 – 80 %) akutna infekcija HCV-om prelazi u kroničnu (definirana kao prisutnost mjerljivog virusa u organizmu dulje od šest mjeseci nakon zaraze) što dovodi do nastanka ciroze u 10 – 20 % bolesnika u razdoblju od 10 – 30 godina i hepatocelularnog karcinoma u 1 – 4 % bolesnika s cirozom (Pawlotsky, 2004; El-Shamy i Hotta, 2014; Jackowiak i sur., 2014; Lee i sur., 2014; Wilkins i sur., 2015).

Dugotrajnost infekcije djelomično je uzrokovana slabim imunskim odgovorom tijekom akutne infekcije koji ne uspijeva ograničiti virusnu replikaciju. Pretpostavlja se kako jednom kada dođe do uspostavljanja kronične infekcije, virus nema izravan citolitički učinak. Mehanizam oštećenja hepatocita uzrokovan infekcijom HCV-om nije u potpunosti razjašnjen, ali mogao bi uključivati lokalne mehanizme posredovane imunskim sustavom koji uzrokuju kronično upalno stanje (Du i Tang, 2015; Wilkins i sur., 2015). Lokalna upala potiče fibrogenezu, a fibroza predstavlja glavnu komplikaciju kroničnog hepatitisa C. Definira se kao odlaganje komponenti izvanstaničnog matriksa u parenhim jetre, a karakterizira je značajno povećanje kolagena i drugih komponenti izvanstaničnog matriksa kao što su laminin, fibronektin i proteoglikani. Uloga virusnih faktora u progresiji fibroze nejasna je. S druge strane, egzogeni faktori, poput dugotrajne konzumacije alkohola i infekcije drugim hepatotropnim virusima, imaju značajnu ulogu u progresiji fibroze prema cirozi i drugim patološkim oštećenjima jetre (Pawlotsky, 2004). Procjenjuje se kako je trećina slučajeva hepatocelularnog karcinoma godišnje uzrokovana HCV-om što predstavlja značajan javnozdravstveni problem (Lee i sur., 2014).

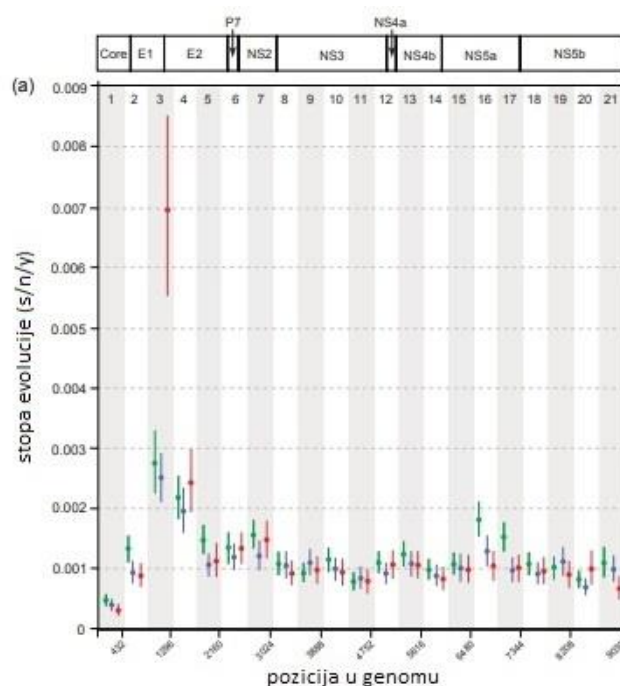
## 1.7. Raznolikost genoma HCV-a

Analiza genske raznolikosti HCV-a važna je za ispitivanje složenosti virusne populacije, rezistencije na lijekove, molekularne evolucije i epidemiološka istraživanja (Precaido i sur., 2014; Lapa i sur., 2019). HCV postoji u svakoj zaraženoj osobi kao velika populacija genski različitih varijanti koja čini kvazivrstu. Pojam kvazivrste može se definirati kao skupina blisko povezanih, ali genski različitih varijanti virusne populacije koje su prisutne u jednom domaćinu i podvrgnute neprekidnom procesu genske varijacije, kompeticije i selekcije (Domingo, Sheldon i Perales, 2012; Jackowiak i sur., 2014; Lim i Gallay, 2014; Li i Chung, 2019). Neke varijante nose mutacije u genima koji su ciljne strukture lijekova. Tada govorimo o supstitucijama povezanim s rezistencijom (eng. *resistance associated substitution*, RAS), a varijantama povezanim s rezistencijom (eng. *resistance*

*associated variant*, RAV) smatraju se one virusne varijante koje sadrže RAS. Prisutnost rijetkih RAV na početku liječenja može utjecati na ishod antivirusnog liječenja, budući da te varijante mogu postati dominantne uslijed selekcijskog pritiska lijekova što može dovesti do neuspjeha liječenja ili relapsa. Smisao kvazivrste je značajna adaptacijska prednost budući da prisutnost mnogih varijanti genoma dozvoljava neprekidnu evolucijsku selekciju mutacija s najboljim *fitnessom* u svim danim uvjetima. Neke RAV iskazuju velik *fitness* te mogu biti postojane kao dominantne varijante mjesecima i godinama nakon završetka liječenja (Fourati i Pawlotsky, 2015; Ahmed i Felmlee, 2015).

Konsenzusna sekvencija uključuje sve nukleotide koji se najčešće uočavaju u virusnoj populaciji te se koristi za analizu promjena globalne virusne populacije. Promjenjivost u konsenzusnoj sekvenciji koristi se za opisivanje virusne evolucije, ali ne daje informacije o strukturi kvazivrste te ne mora biti nužno prisutna u populaciji kao stvarna sekvencija (Lapa i sur., 2019). Dominantna sekvencija predstavlja najčešću sekvenciju uočenu u virusnoj populaciji u specifičnom vremenskom razdoblju te ne mora biti u skladu s konsenzusnom sekvencijom. Dominantna varijanta često se smatra varijantom s najvećim *fitnessom* u određenim okolišnim uvjetima. Koncept kvazivrste podrazumijeva da je populacija u cjelini, a ne pojedina varijanta, podložna selekciji (Jackowiak i sur., 2014; Lapa i sur., 2019).

Evolucija HCV-a može se analizirati na dvije biološke razine: na individualnoj razini (unutar jednog domaćina) i na epidemiološkoj razini (između različitih domaćina). Obje razine karakterizirane su različitim selekcijskim pritiscima što virusnu populaciju može usmjeriti u različitom smjeru (Jackowiak i sur., 2014). Sposobnost evolucije virusa određena je s pet međusobno povezanih čimbenika. Kao prvo, nastanak RAS ovisi o prosječnoj stopi (frekvenciji) mutacija tijekom replikacije genoma. RNA-polimeraza HCV-a iznimno je sklona greškama, odnosno nema 3'-5' egzozukleaznu aktivnost te posljedično ne može ispraviti pogrešno ugrađene nukleotide što dovodi do stope mutacija od  $10^{-3} - 10^{-4}$  supstitucija po kopiranom nukleotidu. Stopom evolucije smatra se broj mutacija koje se akumuliraju u virusnom genomu kao funkcija vremena, odnosno broj supstitucija po nukleotidnom mjestu po godini (eng. *substitutions per site per year*, s/n/y), te ona u većem dijelu genoma HCV-a iznosi  $10^{-3} - 10^{-4}$  s/n/y. Povišena stopa evolucije uočena je u regijama E1 i E2, naročito u hipervarijabilnoj regiji (Slika 9) (Sarrazin i Zeuzem, 2010; Gray i sur., 2011; Domingo, Sheldon i Perales, 2012; Jackowiak i sur., 2014; Ahmed i Felmlee, 2015; Li i Chung, 2019; Lapa i sur., 2019).

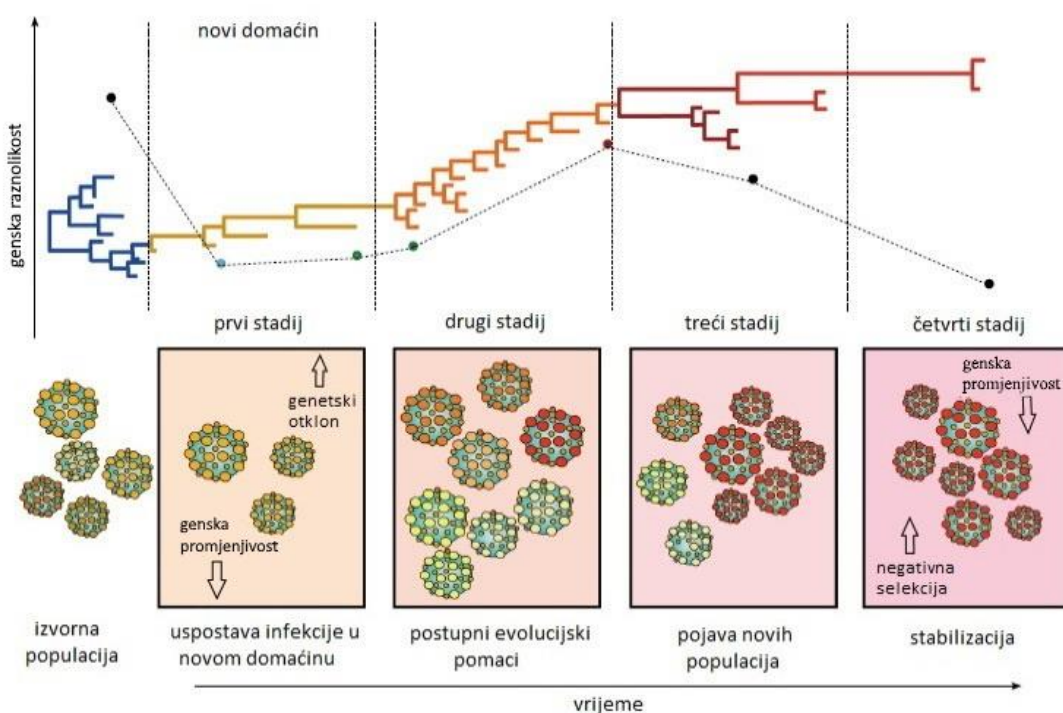


**Slika 9.** Procijenjena stopa evolucije u različitim dijelovima kodirajuće regije genoma virusa hepatitisa C podijeljene na 21 dio (podtip 1a među različitim domaćinima – zeleno; podtip 1b među različitim domaćinima – plavo; podtip 1b među istim domaćinima – crveno; s/n/y: broj supstitucija po nukleotidnom mjestu po godini). Preuzeto i prilagođeno iz: Gray i sur., 2011.

Nadalje, razvoj rezistentnih varijanti ovisi i o replikacijskoj stopi virusa koja za HCV iznosi  $10^{10}$  do  $10^{12}$  viriona dnevno, a poluživot HCV-a procjenjuje se na samo 2 – 5 sati (Sarrazin i Zeuzem, 2010; Jackowiak i sur., 2014; Ahmed i Felmlee, 2015; Li i Chung, 2019). Treći čimbenik koji doprinosi razvoju rezistentnih varijanti je genska barijera za rezistenciju na lijekove koja se definira kao broj i tip mutacija potreban za razvoj RAS, odnosno prag iznad kojeg virusna populacija dobiva odgovarajući broj mutacija koji dovodi do nastanka rezistencije (Eltahla i sur., 2016; Li i Chung, 2019). Na taj prag utječe mnoštvo faktora kao što su mutacijska pristranost RNA-polimeraze HCV-a koja favorizira tranzicije u odnosu na transverzije. Stoga niska barijera za rezistenciju znači kako su tranzicije ili manji broj mutacija potrebni za smanjenje učinkovitosti određenih lijekova, dok visoka barijera za rezistenciju zahtijeva nastanak više mutacija, odnosno transverzijske supstitucije (Lim i Gallay, 2014). Nadalje, replikativni *fitness* populacije rezistentne varijante, odnosno selekcijska prednost koju ta varijanta ima u odnosu na ostatak virusne populacije, ključan je i određuje vjerojatnost opstanka bilo koje rezistentne varijante unutar veće virusne populacije. Većina novonastalih varijanti biva uklonjena pomoću imunskog sustava, odnosno ne rezultira nastankom viriona zbog gubitaka funkcije mutiranih proteina (Sarrazin i Zeuzem, 2010; Precaido i sur., 2014; Ahmed i Felmlee, 2015; Fourati i Pawlotsky, 2015; Eltahla i sur., 2016; Li i Chung, 2019). U konačnici, pojava virusne rezistencije određena je i količinom izloženosti lijekovima budući da suboptimalne koncentracije lijekova mogu rezultirati selekcijom pojedinih RAS omogućavanjem

održavanja virusne populacije u prisutnosti manjeg selekcijskog pritiska (Lim i Gally, 2014; Precaido i sur., 2014; Fourati i Pawlotsky, 2015; Li i Chung, 2019).

Brza divergencija HCV-a predstavlja važan izazov za istraživanja genetske povezanosti budući da epidemiološka povezanost može biti izgubljena između povezanih slučajeva tijekom relativno kratkog vremenskog perioda. Molekularna evolucija HCV-a uključuje seriju složenih procesa karakteriziranih varijacijama koje neprekidno mijenjaju arhitekturu virusne populacije. U prvom stadiju dolazi do uspostavljanja infekcije HCV-om u novom domaćinu, a drugi stadij karakteriziraju mali evolucijski pomaci uzrokovani imunskim odgovorom domaćina. Treći stadij karakterizira genska diversifikacija koja vodi do pojave novih subpopulacija te se naposljetku pod snažnom negativnom selekcijom genska promjenjivost HCV-a smanjuje i ustaljuje (Slika 10). Ove varijacije tijekom vremena mogu utjecati na prijenos HCV-a i ishod liječenja budući da su različite virusne varijante dostupne u različitim vremenskim točkama nakon infekcije (Gray i sur., 2012; Precaido i sur., 2014).



**Slika 10.** Molekularna evolucija virusa hepatitisa C s ilustriranim stadijima evolucije unutar domaćina zajedno s glavnim molekularnim procesima koji ih obilježavaju i filogenetskom povezanošću između različitih populacija tijekom vremena. Preuzeto i prilagođeno iz: Precaido i sur., 2014.

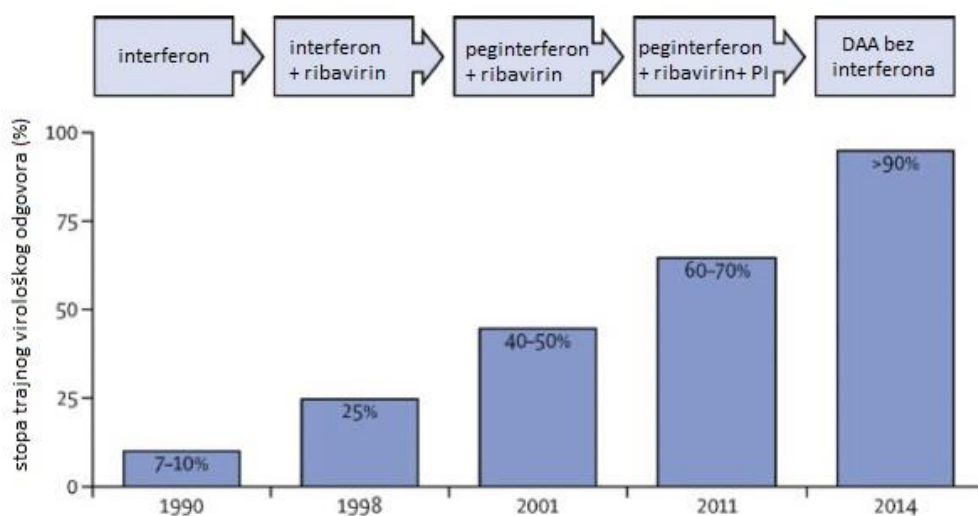
Iako jetra predstavlja glavno mjesto replikacije HCV-a, različite populacije HCV-a pronađene su u drugim tkivima i staničnim tipovima, što upućuje na postojanje izvanhepatalnih rezervoara, a raspodjela virusnih varijanti varira između tkiva uz specifičnu stopu evolucije (Precaido i sur., 2014). Posljedično, sastav i genska raznolikost virusnih kvazivrsta uzorkovanih iz različitih mjesta, odnosno organa, značajno se razlikuju. Kvazivrsta u krvi predstavlja dio virusne populacije koji može inicirati



infekciju u drugom domaćinu. Ova populacija raznolikija je od populacije u jetri, a najveći broj najraznolikijih virusnih varijanti pronađen je upravo u serumu (Gray i sur., 2012, Jackowiak i sur., 2014).

### 1.8. Liječenje kroničnog hepatitisa C

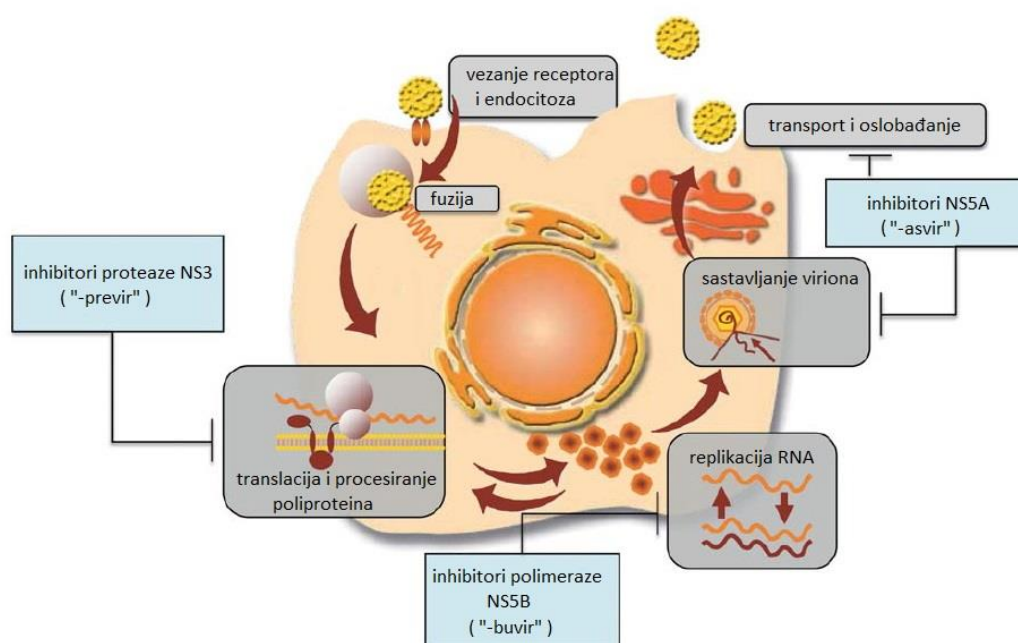
Primarni cilj liječenja kroničnog hepatitisa C jest postizanje trajnog virološkog odgovora (eng. *sustained virological response*, SVR) koji se definira kao odsutnost virusne RNA 12 – 24 tjedana nakon završetka antivirusne terapije (Webster, Klenerman i Dusheiko, 2015). Monoterapija interferonom, proteinom koji pobuđuje antivirusno stanje u stanicama, predstavljala je okosnicu antivirusne terapije HCV-a tijekom 90-ih godina 20. stoljeća, no bila je povezana sa značajnim nuspojavama i lošim ishodima liječenja (Scheel i Rice, 2013; Ahmed i Felmler, 2015; Gogela i sur., 2015; Li i Chung, 2019). Antivirusna terapija neznatno je poboljšana dodatkom ribavirina, gvanozinskog analoga čiji mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, ali uključuje poticanje virusne mutageneze, inhibiciju virusne replikacije te imunomodulatorne učinke (Gogela i sur., 2015). Uvođenje pegiliranog interferona 2001. godine, koji ima duže vrijeme poluraspada te povoljniju farmakokinetiku u kombinaciji s ribavirinom, dovelo je do poboljšanja stope SVR-a na približno 50 % (Slika 11) (Scheel i Rice, 2013; Li i Chung, 2019).



**Slika 11.** Razvoj antivirusne terapije za liječenje kroničnog hepatitisa C i stopa trajnog virološkog odgovora (DAA: direktno djelujući antivirusni lijekovi; PI: inhibitori proteaza). Preuzeto i prilagođeno iz: Webster, Klenerman i Dusheiko, 2015.

Značajno poboljšanje razumijevanja molekularne i strukturne virologije, replikacijskog ciklusa i patogeneze HCV-a dovelo je do razvoja prvih direktno djelujućih antivirusnih lijekova (eng. *direct acting antivirals*, DAA) 2011. godine (Precaido i sur., 2014; Li i Chung 2019). Svih 10 proteina HCV-a proučavani su kao potencijalne ciljne strukture antivirusnih lijekova, a trenutno dostupni

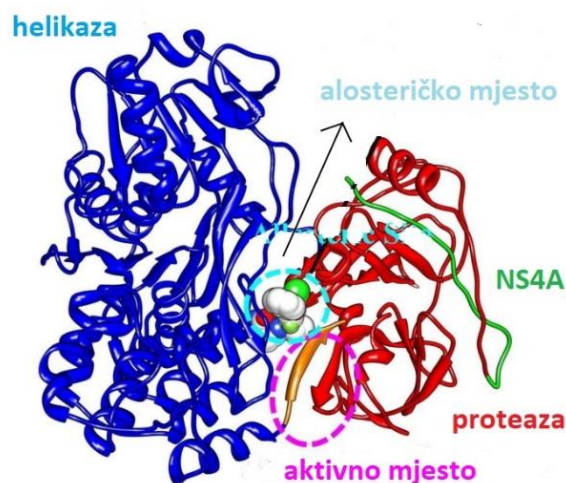
DAA svrstavaju se u četiri kategorije ovisno o ciljnom nestrukturinom proteinu na koji su usmjereni i mehanizmu djelovanja: inhibitori proteaze NS3, inhibitori proteina NS5A te nukleozidni (NI) i nenukleozidni inhibitori (NNI) RNA-ovisne RNA-polimeraze NS5B (Slika 12) (Macarthur i sur., 2013; Fourati i Pawlotsky, 2015; Gao i Ju, 2018). Terapija DAA iznimno je efikasna, učinkovita i gotovo bez nuspojava. Ovi DAA unaprijedili su liječenje bolesnika zaraženih HCV-om pokazujući stopu SVR-a koja danas doseže 90 – 95 %. Najnovije smjernice predlažu primjenu DAA u svim zaraženim osobama neovisno o stupnju fibroze, a neprekidan pad cijene DAA omogućuje njihovu veću dostupnost i u državama srednjeg i niskog socioekonomskog statusa (Vince i sur., 2020, WHO, 2018). Primjena DAA jedno je od najvećih novijih postignuća u području hepatologije i bolesti jetre budući da je njihovom primjenom hepatitis C postao izlječiva bolest (Sharafi i Alavian, 2018).



**Slika 12.** Ciljne točke djelovanja direktno djelujućih antivirusnih lijekova unutar replikacijskog ciklusa virusa hepatitisa C. Preuzeto i prilagođeno iz: Zeuzem, 2017.

### 1.8.1. Inhibitori proteina NS3

Ciljna struktura inhibitora proteaza (eng. *protease inhibitor*, PI) je virusna proteaza NS3, esencijalna za cijepanje poliproteina HCV-a na individualne virusne proteine. Virusna proteaza, odnosno helikaza, NS3 je heterodimerni kompleks u kojem protein NS3 sadrži mjesto proteolitičkog cijepanja, a NS4A funkcionira kao kofaktor. Inhibitori proteina NS3 blokiraju katalitičko mjesto NS3 ili međudjelovanje NS3 i NS4A te potrebne konformacijske promjene sprečavajući tako cijepanje poliproteina HCV-a (Slika 13) (Xue i sur., 2014; Li i Chung, 2019).



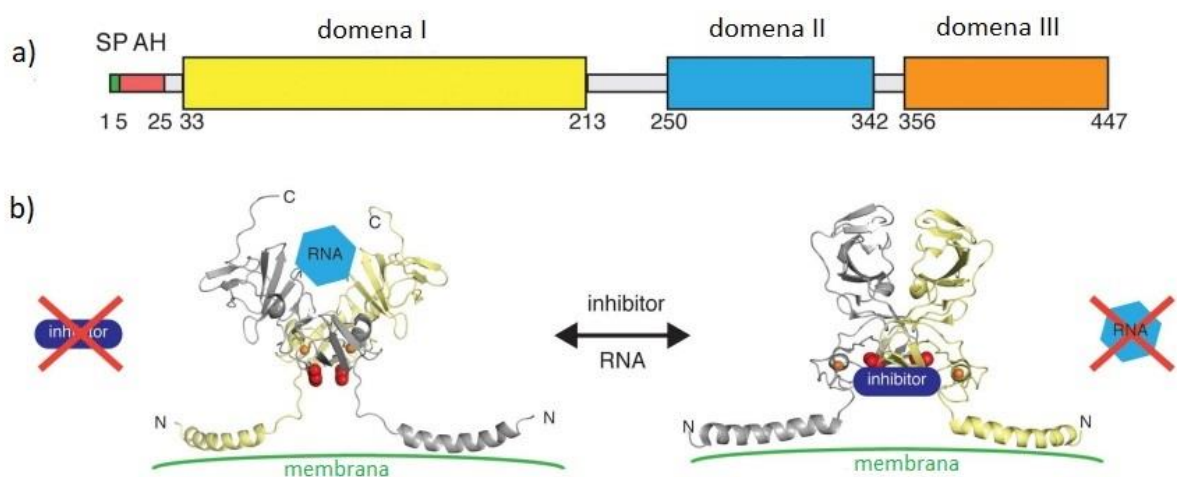
**Slika 13.** Strukturni model proteina NS3/4A virusa hepatitisa C s različito obojanim domenama helikaze (plavo), proteaze (crveno) i kofaktora NS4A (zeleno). Preuzeto i prilagođeno iz: Xue i sur., 2014.

Katalitičko mjesto proteaze NS3 locirano je u plitkom utoru koji čini strukturu malih inhibitorskih molekula izazovnom budući da ne omogućava čvrsto vezanje inhibitora. Nadalje, zahvaljujući malom broju dostupnih veznih mjesta za male molekule u katalitičkom mjestu, genska barijera za rezistenciju na inhibitore proteina NS3/4A je relativno niska (Li i Chung, 2019). Aktivnost inhibitora ovisi o nekolicini međudjelovanja s enzimom, a svega nekoliko ključnih mutacija u enzimu dovoljno je za uzrokovanje značajne rezistencije na ove lijekove (Ahmed i Felmlee, 2015). Uz iznimku katalitičke trijade, svega 47 % aminokiselinskih ostataka proteina NS3 u potpunosti je konzervirano među genotipovima što otežava razvoj pangenetipskih inhibitora. Generička imena svih inhibitora proteaze NS3 završavaju na “-previr” (Zeuzem, 2017). Generacije PI razlikuju se na temelju veznih svojstava unutar katalitičke trijade proteaze NS3, barijere za rezistenciju i učinkovitosti protiv različitih genotipova. Prva generacija PI, kao što su boceprevir (BOC) i telaprevir (TPV), kovalentno vežu enzim te imaju usku genotipsku specifičnost i nisku gensku barijeru za rezistenciju. Druga generacija PI, kao što su paritaprevir (PTV) i simeprevir (SMV), nekovalentno vežu katalitičku trijadu te imaju nešto širi spektar antivirusne aktivnosti. Najnovija generacija PI, kao što su grazoprevir (GZR), glecaprevir (GLE) i voxilaprevir (VOX), imaju veću gensku barijeru za rezistenciju te poboljšanu antivirusnu aktivnost protiv različitih genotipova (Thompson, 2014; Sorbo i sur., 2018; Cuypers i sur., 2017a).

### 1.8.2. Inhibitori proteina NS5A

Ciljno mjesto inhibitora proteina NS5A je nestrukturni proteina 5A koji nema poznatu enzimsku aktivnost u replikacijskom ciklusu HCV-a, ali je povezan s drugim virusnim proteinima i brojnim staničnim faktorima (Kwoon i sur., 2015). Riječ je o višenamjenskom proteinu koji se eksprimira u hipofosforiliranom (p56) i hiperfosforiliranom (p58) obliku (Gogela i sur., 2015). Oba

fosfoproteina, p56 i p58, fosforiliraju se na serinskim ostacima nakon otpuštanja zrelog proteina iz poliproteina (Macarthur i sur., 2013; Khalaghadgi i sur., 2016). Funkcija NS5A i dalje nije u potpunosti razjašnjena, no poznato je kako djeluje kao modulator ključnih virusnih funkcija uključujući virusnu replikaciju, sastavljanje virusnih čestica i njihov izlazak iz stanica te regulaciju protuvirusnog interferenskog odgovora i međudjelovanje sa stanicama domaćina (El-Shamy i Hotta, 2014; Khalaghadgi i sur., 2016; Li i Chung, 2019). Protein NS5A sastoji se od N-terminalnog alfa heliksa pomoću kojeg se usidruje u stanične membrane i tri strukturne domene (Kohler i sur., 2014). Domena 1 sadrži RNA- i cink- vezujuće motive te postoji u različitim alternativnim dimeriziranim stanjima, dok su domene 2 i 3 fleksibilne domene uključene u replikaciju RNA, sastavljanje virusnih čestica i međudjelovanje s virusnim faktorima i faktorima domaćina (Slika 14) (Issur i Götte, 2014; Lim i Gally, 2014; Ahmad & Feemle i sur., 2015; Li i Chung, 2019).



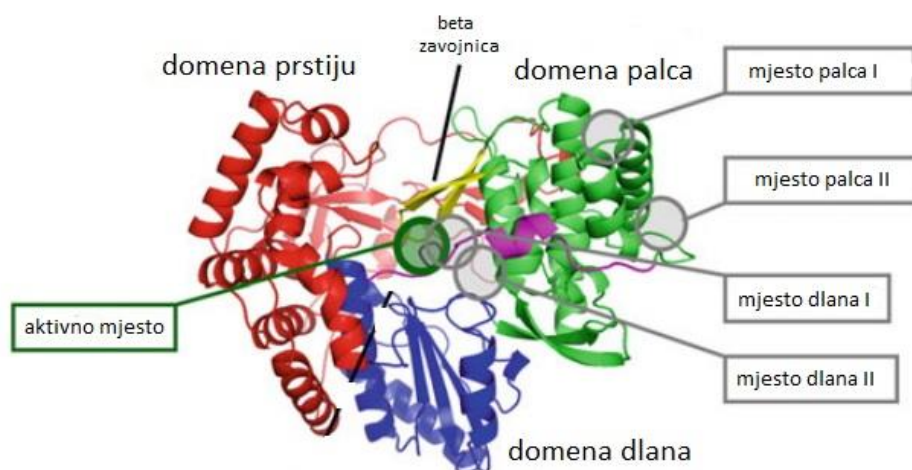
**Slika 14.** a) Struktura proteina NS5A koji se sastoji od N-terminalnog alfa heliksa (AH) pomoću kojeg se usidruje u stanične membrane i tri strukturne domene (SP: signalni peptid) b) Jedan od predloženih mehanizama djelovanja inhibitora NS5A. Vezanje inhibitora za domenu 1 sprečava vezanje RNA što onemogućava uspješnu replikaciju virusnog genoma. Preuzeto i prilagođeno iz: Ascher i sur., 2014.

Svi inhibitori NS5A imaju generička imena koji završavaju na “-asvir” (Zeuzem, 2017). Trenutno odobreni inhibitori NS5A za liječenje HCV-a uključuju daclatasvir (DCV), ledipasvir (LDV), ombitasvir (OBV), elbasvir (EBR), velpatasvir (VEL) i pibrentasvir (PIB). Unatoč naglom razvoju ove skupine DAA, točan mehanizam djelovanja DAA na protein NS5A nije u potpunosti razjašnjen. Brojna biokemijska istraživanja pokazuju kako inhibitori proteina NS5A vežu dimeriziranu domenu 1 i stabiliziraju je fiksirajući je u danu poziciju te sprečavajući daljnje strukturne promjene neophodne za brojne funkcije ovog proteina, uključujući formiranje replikacijskog kompleksa (Slika 14) (Ascher i sur., 2014; Ahmed i Felmler, 2015; Sorbo i sur., 2018; Li i Chung, 2019). Ostali predloženi mehanizmi uključuju inhibiciju hiperfosforilacije i promjenu unutarstanične lokalizacije proteina NS5A što rezultira pogrešnim sastavljanjem virusnih čestica (Gogela i sur.,

2015). Točan mehanizam na koji inhibitori onesposobljavaju protein NS5A i dalje je aktivno područje istraživanja (Li i Chung, 2019).

### 1.8.3. Inhibitori proteina NS5B

Ciljna struktura polimeraznih inhibitora je RNA-ovisna RNA-polimeraza NS5B organizirana u konformaciju desne ruke koja sadrži domenu prstiju i palca koje okružuju domenu dlana unutar koje se nalazi aktivno mjesto. Polimeraza mijenja konformaciju između otvorene i zatvorene koje su ključne u različitim koracima *de novo* sinteze genoma HCV-a. Sadrži dva mjesta: katalitičko mjesto za vezanje nukleotida i četiri mjesta za alosteričko međudjelovanje gdje se mogu vezati i nenukleotidne komponente (Slika 15). Jednako tako, razlikujemo dvije skupine inhibitora NS5B: nukleozidne inhibitore (eng. *nucleoside inhibitor*, NI) i nenukleozidne inhibitore (eng. *non-nucleoside inhibitor*, NNI) (Ahmed i Felmlee, 2015; Li i Chung, 2019; Watkins, 2019). Generička imena svih inhibitora polimeraze NS5B završavaju na “-buvir”, a danas se za liječenje kroničnog hepatitisa C koriste NI sofosbuvir (SOF) i NNI dasabuvir (DSV) (Zeuzem, 2017).



**Slika 15.** Kristalna struktura proteina NS5B s različito obojanim domenama palca (zeleno), dlana (plavo) i prstiju (crveno) te označenim aktivnim mjestom i glavnim alosteričkim inhibitornim mjestima. Preuzeto i prilagođeno iz: Watkins, 2019.

Nukleozidni inhibitori fosforiliraju se u stanicama pomoću staničnih kinaza te vežu kao trifosfati za aktivno mjesto polimeraze NS5B oponašajući prirodne supstrate, što rezultira terminacijom lanca tijekom replikacije virusnog genoma. Prednosti NI su snažna antivirusna aktivnost, sposobnost inhibicije replikacije RNA različitih genotipova HCV-a, odnosno pangentipska aktivnost zahvaljujući visokoj konzerviranosti aktivnog mjesta, i izrazito visoka barijera za pojavu rezistencije budući da je aktivno, tj. katalitičko mjesto, relativno netolerantno na aminokiselinske supstitucije. Nedostatak NI je potencijalan utjecaj na polimeraze domaćina budući

da aktivno mjesto za koje se vežu ima slična svojstva među različitim tipovima polimeraza (Ahmed i Felmlee, 2015; Sesmero i Thorpe, 2015; Sorbo i sur., 2018; Scheel i Rice, 2013; Precaido i sur., 2014; Thompson, 2014; Zeuzem, 2017).

Inhibicija NS5B nekompetitivnim vezanjem za jedno od četiri alosterička vezna mjesta karakteristična je za NNI koji time inhibiraju formiranje elongacijskog kompleksa, odnosno sprečavaju konformacijske promjene enzima neophodne za njegovo funkcioniranje. Ovi inhibitori su povezani s vjerojatnijim razvojem rezistencije, odnosno jednom od najnižih barijera za rezistenciju među svim DAA te nižom aktivnošću među različitim genotipovima budući da ne postoji tako snažan evolucijski pritisak za očuvanje aminokiselinskog slijeda NNI veznih mjesta. (Scheel i Rice, 2013; Di Maio i sur., 2014; Precaido i sur., 2014; Thompson, 2014; Ahmed i Felmlee, 2015; Sesmero i Thorpe, 2015; Sorbo i sur., 2018).

#### **1.8.4. Rezistencija na direktno djelujuće antivirusne lijekove (DAA)**

Rezistencija se javlja kao posljedica nastanka mutacija, odnosno RAS, u genima čiji su produkti ciljne strukture lijekova. Primarna rezistencija posljedica je egzistencije virusa u obliku kvazivirsa, odnosno prijenosa rezistentnog soja kod prethodno neliječenih bolesnika, dok se sekundarna rezistencija javlja uslijed nepotpune supresije virusne replikacije nakon liječenja DAA (Wyles i Luetkemeyer, 2017). Iako kombinacija DAA osigurava postizanje SVR-a u većine bolesnika neovisno o genotipu HCV-a, pojava rezistencije na DAA i dalje onemogućuje njihov potpuni uspjeh. Stoga je prisutna potreba za identifikacijom učestalih mutacija povezanih s rezistencijom, razumijevanju biokemijskih mehanizama koji su u pozadini rezistencije i razvoja novih terapijskih strategija za liječenje osoba kod kojih inicijalna terapija ne polučiti uspjeh (Li i Chung, 2019). Osim toga, rezistencijske mutacije u regiji NS3 mogu biti postojane mjesecima, a u regiji NS5A godinama nakon završetka liječenja smanjujući mogućnost uspješnog ponovljenog liječenja te povećavajući rizik širenja novih infekcija s varijantama HCV-a rezistentnima na DAA. Karakterizacija ovih varijanti i njihov utjecaj na strategije liječenja i dalje predstavlja izazov (Khalaghadgi i sur., 2016; Sorbo i sur., 2018).

#### **1.8.5. Liječenje kroničnog hepatitisa C u okviru rezistencije**

Vjerojatnost pojave rezistencije može se smanjiti korištenjem komponenti koje imaju visoku barijeru za rezistenciju, kao što je nukleozidni polimerazni inhibitor, ili kombinacijom nekoliko skupina DAA čiji se rezistencijski profili ne preklapaju (Scheel i Rice, 2013). Tri pangenotipska režima (SOF/VEL, SOF/DCV te GLE/PIB) učinkovita su u liječenju svih genotipova HCV-a neovisno o prisutnosti ciroze. Ovi pangenotipski DAA pojednostavili su pristup liječenju kroničnog hepatitisa C diljem svijeta (WHO, 2018; Baumert, 2018). Sposobnost nekih RAS da

uzrokuju rezistenciju na različite DAA čini ispitivanje rezistencije HCV-a potencijalnom dijagnostičkim metodom za prilagodbu terapije i poboljšanje vjerojatnosti virološkog uspjeha sekundarne terapije, naročito ako se istovremeno provodi na regiji NS3, NS5A i NS5B (Sorbo i sur., 2018). U Hrvatskoj je tijekom 2019. godine 468 osoba liječeno DAA, od toga 52 % GLE/PIB, 29 % SOF/VEL, 10 % GZR/EBR, 7 % SOF/LDV te 2 % SOF/VEL/VOX (Tablica 1) (Flisiak i sur., 2021).

**Tablica 1.** Najčešće korišteni direktno djelujući antivirusni lijekovi za liječenje kroničnog hepatitisa C u Hrvatskoj u 2019. godini. Preuzeto i prilagođeno iz Flisiak i sur., 2021.

Tip terapije	Kategorija DAA	Udio u primijenjenoj terapiji (n = 468)	Ciljni genotip
GLE/PIB	inhibitor NS3 + inhibitor NS5A	52,00 %	pangenotipski
SOF/VEL	inhibitor NS5A + inhibitor NS5B	29,00 %	pangenotipski
GZR/EBR	inhibitor NS3 + inhibitor NS5A	10,00 %	1
SOF/LDV	inhibitor NS5A + inhibitor NS5B	7,00 %	1, 4, 5, 6
SOF/VEL/VOX	inhibitor NS3 + inhibitor NS5A + inhibitor NS5B	2,00 %	pangenotipski

Kazalo - n: broj bolesnika; DAA: direktno djelujući antivirusni lijekovi; GLE: glecaprevir; PIB: pibrentasvir; SOF: sofosbuvir; VEL: velpatasvir; GZR: grazoprevir; EBR: elbasvir; LDV: ledipasvir; VOX: voxilaprevir

Terapijske smjernice za bolesnike zaražene genotipom 3 HCV-a s prisutnom cirozom jetre koji prethodno nisu primili DAA ukazuju kako je prije početka liječenja SOF/VEL neophodno potrebno provesti testiranje prisutnosti RAS na inhibitore NS5A te kako je liječenje ovom kombinacijom lijekova moguće provesti samo u onih bolesnika bez mutacije Y93H (HCV Guidance, 2020). Infekcija genotipom 3 povezana je s povećanim rizikom za razvoj jetrene steatoze, ciroze i hepatocelularnog karcinoma, a prisutnost ciroze u kombinaciji s mutacijom Y93H smanjuje uspješnost postizanja SVR-a u ovih bolesnika na 84 – 88 % (Kanwal i sur., 2014, Bartolini i sur., 2017, HCV Guidance, 2020). Nadalje, testiranje prisutnosti RAS na inhibitore NS5A potrebno je provesti i ukoliko se za liječenje bolesnika zaraženih HCV-om podtipa 1a razmatra primjena kombinacije GZR/EBR te se u slučaju prisutnosti aminokiselinskih supstitucija na položajima 28, 30, 31 ili 93 regije genoma NS5A ne preporuča uporaba ovih lijekova. Naime, prisutnost NS5A RAS povezana je s velikim smanjenjem osjetljivosti na elbasvir u bolesnika zaraženih HCV-om podtipa 1a pri čemu je uočeno kako svega 22 – 58 % ovih bolesnika ostvaruje SVR (Zeuzem i sur., 2017; HCV Guidance, 2020).

## 1.9. Metode analize genske raznolikosti i molekularne evolucije HCV-a

Tijekom posljednja dva desetljeća raste interes za proučavanje filogenije i molekularne evolucije HCV-a koje mogu pružiti važne informacije o virusnoj klasifikaciji i epidemiologiji bolesti, uključujući nadziranje i praćenje prijenosa ovog patogena. Nadalje, ove metode mogu biti korisne u dijagnostici, izboru optimalnog načina liječenja i praćenju bolesnika (Jackowiak i sur., 2014). Genska raznolikost virusne populacije može se analizirati pomoću tri metode: Sangerovim sekvenciranjem, klonalnim sekvenciranjem ili sekvenciranjem nove generacije. Glavna razlika između ovih tehnologija je granica uočavanja virusnih varijanti u odnosu na njihov udio u ukupnoj virusnoj populaciji.

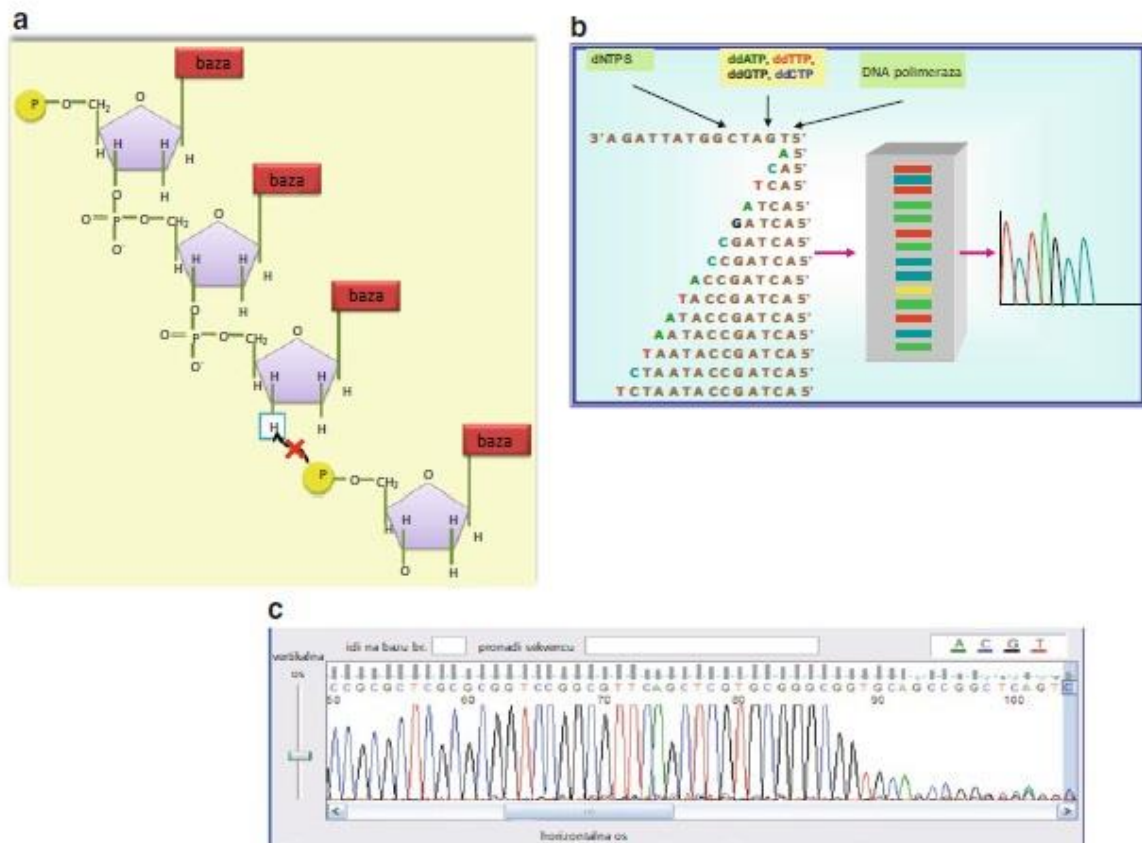
Sangerovo sekvenciranje produkata umnoženih lančanom reakcijom polimeraze omogućuje određivanje RAV prisutnih u 15 – 20 % ukupne virusne populacije (Calleja i sur., 2016; Sharafi i Alavian, 2018). Ova metoda može se jednostavno provesti na kliničkim uzorcima kako bi se dobila konsenzusna sekvencija, koja pokazuje dominantne varijante prisutne u virusnoj populaciji. Zbog velike različitosti virusnih podtipova i genotipova za uspješno umnažanje ciljanih nestrukturnih gena potrebno je korištenje početnica specifičnih za genotip. Klonalno sekvenciranje odnosi se na Sangerovo sekvenciranje individualnih klonova izoliranih iz kliničkog uzorka nakon kloniranja virusnih varijanti u plazmidni vektor i transformacije bakterijskog domaćina. Svaka klonalna sekvencija predstavlja jedinstvenu varijantu populacije prisutne u uzorku, a moguće je odrediti varijante prisutne u 1 – 5 % ukupne virusne populacije, ovisno o broju analiziranih klonova. Međutim, broj klonova koji se na ovaj način može analizirati ograničen je, a metoda je skupa i zahtjevna (Fourati i Pawlotsky, 2015; Calleja i sur., 2016). Razvoj tehnologije sekvenciranja nove generacije naglo je omogućio određivanje virusnih populacija koje čine samo 0,1 – 1 % ukupne virusne populacije. Međutim, pokazalo se kako prisutnost RAS u manjem dijelu virusne populacije (<15 – 20 %) ne utječe značajno na ishod liječenja te se stoga Sangerovo sekvenciranje može smatrati metodom izbora za analizu genomske raznolikosti virusne populacije (Sharafi i Alavian, 2018; Li i Chung, 2019).

Različiti elementi infekcije HCV-om mogu se uspješno pratiti pomoću sekvencijskih informacija dobivenih iz različitih subgenomskih regija. Regija 5' UTR često se koristi za dokazivanje HCV-a zahvaljujući visokoj konzerviranosti među genotipovima, dok se regija NS5B pokazala naročito pouzdanom za genotipizaciju virusa (Murphy i sur., 2007). Međutim, ove dvije regije ne sadrže dovoljno informacija za dokazivanje genetske povezanosti kliničkih izolata. Istraživanja genetske povezanosti često se temelje na informacijama dobivenima iz hipervarijabilne regije, međutim brza divergencija u ovoj regiji može predstavljati izazov za istraživanja molekularne epidemiologije. Sekvenciranje više dužih subgenomskih regija predloženo je kao alternativa kako bi se premostila ograničenja uzrokovana brzom evolucijom HCV-a (Precaido, 2014).



### 1.9.1. Metoda Sangerova sekvenciranja

Tehnologija Sangerova sekvenciranja danas se smatra tehnologijom sekvenciranja prve generacije, a poznata je i kao sekvenciranje pomoću enzimske terminacije lanca odnosno „dideoksi sekvenciranje”. Razvio ju je Frederick Sanger 1975. godine, a komercijalizirana je 1977. godine te se unatoč uvođenju novih tehnologija danas velika količina sekvencijskih informacija dobiva upravo ovom metodom. Temelji se na korištenju dideoksinukleotid trifosfata (ddNTP) kojima nedostaje 3' hidroksilna skupina na trećem ugljikovom atomu riboze što onemogućuje formiranje fosfodieterske veze s petim ugljikovim atomom riboze sljedećeg deoksinukleotid trifosfata (dNTP) i dovodi do blokiranja polimerizacije DNA. Reakcijska smjesa sadrži mješavinu dNTP-a i ddNTP-a koje DNA-polimeraza nasumično ugrađuje u rastući lanac DNA. Dideoksinukleotidi su označeni različitim molekulama fluorofora, a prilikom njihove ugradnje reakcija polimerizacije DNA staje, a nastala molekula emitira signal koji upućuje na posljednji inkorporirani nukleotid (A, T, C ili G). Nakon odgovarajućeg broja ciklusa umnažanja ukupan broj različitih molekula jednak je broju nukleotida koje sadrži dani isječak DNA, a u dužini se razlikuju za jedan nukleotid. Kapilarnom elektroforezom ovih molekula dani isječci bivaju poredani po rastućoj molekularnoj masi, a svaki se može identificirati prema fluoroforu karakterističnom za odgovarajući ddNTP (Slika 16). Automatizacija ove metode dovela je do povećanja duljine mogućeg očitavanja, a time i povećanja brzine sekvenciranja što zajedno s izrazitom točnošću čini ovu metodu primjenjivom u brojnim područjima, uključujući karakterizaciju virusnih kvazivirata (Verma, Kulshrestha i Puri, 2016; Garrido-Cardenas i sur., 2017).



**Slika 16.** Metoda Sangerova sekvenciranja. a) Prekid sinteze DNA prilikom ugradnje dideoksinukleoetida (ddNTP) zbog nedostatka 3' OH skupine za formiranje fosfodiesterske veze sa sljedećim deoksinukleotidom (dNTP) b) Nastanak fragmenata koji se razlikuju u dužini za jedan nukleotid i njihovo razdvajanje kapilarnom elektroforezom c) Elektroferogram sekvencije DNA. Preuzeto i prilagođeno iz: Verma, Kulshrestha i Puri, 2016.

### 1.9.2. Metode za rekonstrukciju filogenetskih stabala

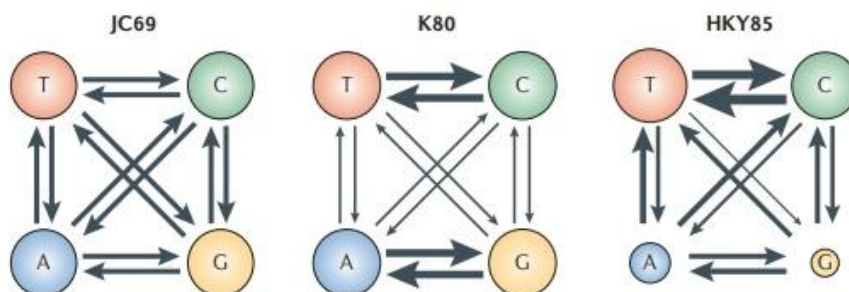
Metode za rekonstrukciju filogenetskih stabala dijelimo prema tome temelje li se na analizi stanja karaktera sekvenci tj. njezinih sastavnih komponenti ili matrici udaljenosti te koriste li metodu iscrpnog pretraživanja ili postupnog klasteriranja (Yang i Rannala, 2012). Metode koje se temelje na matrici udaljenosti poput susjednog sparivanja (eng. *neighbor-joining*) računaju udaljenosti između parova sekvencija i postepeno grupiraju one koje su međusobno najsličnije. Ova metoda je računalno jednostavna i relativno brza, no ne dozvoljava analizu doprinosa određenog karaktera pojedinom grupiranju te usporedbu različitih potencijalnih topologija stabala (Harrison i Langdale, 2006; Yang i Rannala, 2012; Ajawatanawong, 2016). Iz tog razloga češće su u uporabi metode temeljene na analizi stanja karaktera sekvenci tj. njezinih sastavnih komponenti kao što su metoda najveće štedljivosti (eng. *maximum parsimony*), metoda najveće vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood, ML*) te Bayesova metoda.

Metoda najveće štedljivosti temelji se na traženju filogenetskog stabla za čiju je izradu potreban najmanji broj koraka. Ova metoda je jednostavna, ali ne dozvoljava unošenje bilo kakvih pretpostavki ili poznatih informacija o evoluciji sekvencija dane skupine podataka. Metoda ML zasniva se na procjeni duljine grana i topologije stabla na temelju nukleotidnog sravnjenja i odabranog supstitucijskog modela, pri čemu se topologija stabla s najvećom vrijednosti maksimalne vjerojatnosti smatra najizglednijom (Felsenstein, 2004; Yang i Rannala, 2012; Ajawatanawong, 2016). Ova metoda je veoma precizna, no zahtijeva značajne računalne resurse te je nepraktična za velike skupine podataka. Statistička podrška filogenetskih stabala, odnosno njihova reproducibilnost i stabilnost topologije, može se ispitati pomoći tzv. *bootstrapping* metode pri čemu se u izvorne podatke uvode nasumične varijacije tj. provodi se ponovno uzorkovanje putem stvaranja pseudo-uzoraka zadani broj ponavljanja. Zadovoljavajuće pouzdanom filogenetskom vezom smatra se onom u kojoj podrška grananja iznosi najmanje 70 % (Holmes, 2003; Felsenstein i sur., 2004; Harrison i Langdale, 2006; Yang i Rannala, 2012). Za velike količine podataka često se koristi sofisticiranija Bayesova metoda temeljena na Bayesovoj statistici i algoritmu Markovljeva lanca Monte Carlo (eng. *Markov Chain Monte Carlo*, MCMC) koja nastoji pronaći stablo s najvećom posteriornom vjerojatnošću za danu skupinu podataka (Yang i Rannala, 2012; Ajawatanawong, 2016). Za razliku od metode ML, koja čimbenike u modelu smatra nepoznatim fiksnim konstantama, Bayesova metoda ih smatra nasumičnim varijablama sa statističkom raspodjelom. Prije analize podataka čimbenicima se dodjeljuje prethodna raspodjela, koja u kombinaciji s vrijednostima samih podataka daje posteriornu raspodjelu. MCMC je simulacijski algoritam bioloških procesa koji nasumičnim posjećivanjem čimbenika modela frekvencijom proporcionalnom s njihovom posteriornom vjerojatnošću generira uzorak iz ciljane raspodjele (Yang i Rannala, 2012).

### 1.9.2.1. Supstitucijski modeli

Različiti modeli evolucije sekvencija DNA razlikuju se u čimbenicima koje koriste kako bi opisali brzinu kojom jedan nukleotid zamjenjuje drugog tijekom vremena. Model JC69 (Jukes i Cantor, 1969) najjednostavniji je model nukleotidne supstitucije koji pretpostavlja da se sve supstitucije odvijaju jednakom brzinom te da su sve nukleotidne baze zastupljene s jednakom učestalošću (Jukes i Cantor, 1969). Model K80 (Kimura, 1980) pretpostavlja kako brzina tranzicija  $A \leftrightarrow G$  i  $C \leftrightarrow T$  ne mora biti jednaka brzini transverzija  $A \leftrightarrow C$  i  $G \leftrightarrow T$ , ali frekvenciju svih nukleotidnih baza i dalje smatra jednakom (Kimura, 1980). Model HKY85 (Hasegawa, Kishino i Yano, 1985) osim različite brzine tranzicija  $A \leftrightarrow G$  i  $C \leftrightarrow T$  u odnosu na transverzije  $A \leftrightarrow C$  i  $G \leftrightarrow T$  dozvoljava i različitu frekvenciju svih nukleotidnih baza (Hasegawa, Kishino i Yano, 1985). Model TN93 (Tamura i Nei, 1993) osim različite brzine tranzicija u odnosu na transverzije dozvoljava i različite brzine tranzicija  $A \leftrightarrow G$  u odnosu na tranzicije  $C \leftrightarrow T$  te različitu učestalost pojave

nukleotidnih baza (Tamura i Nei, 1993). Naposljetku, opći vremenski reverzibilni (eng. *general time reversible*, GTR) model dozvoljava različite brzine supstitucije između svakog para nukleotida jednako kao i različite frekvencije svih nukleotidnih baza (Slika 17) (Tavare, 1986; Yang i Rannala, 2012, Abadi i sur., 2019).



**Slika 17.** Markovljevi modeli nukleotidne supstitucije. Debljina strelica upućuje na stopu supstitucije četiri nukleotida: timin (T), citozin (C), adenin (A), gvanin (G), dok veličine krugova predstavljaju frekvencije nukleotida kada je supstitucijski proces u ravnoteži (JC69: Jukes i Cantor, 1969; K80: Kimura, 1980; HKY85: Hasegawa, Kishino i Yano, 1985). Preuzeto i prilagođeno iz: Yang i Rannala, 2012.

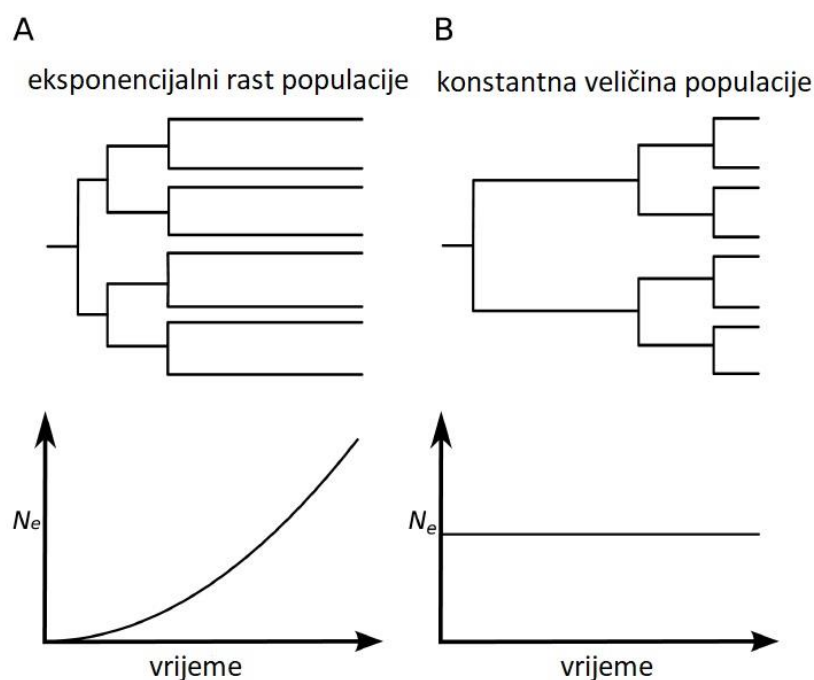
Prvi supstitucijski modeli pretpostavljali su kako sva mjesta određene skupine sekvencija evoluiraju uniformnom brzinom. Danas se u filogenetskim analizama često primjenjuje gama raspodjela (eng. *gamma distribution*, G) kako bi se modelirao stupanj raznolikosti stope supstitucije na različitim mjestima nukleotidnog sravnjenja, odnosno mogućnost brže ili sporije evolucije pojedinih mjesta u odnosu na druge. Jednako tako, neka mjesta nukleotidnog sravnjenja moguće je smatrati nevarijabilnima (eng. *invariable*, I) (Sullivan i Joyce, 2005, Scornavacca, Delsuc i Galtier, 2020). Korištenje suviše jednostavnih modela s nedostatnom parametrizacijom može dovesti do naizgled manjih genskih udaljenosti, podcjenjivanja broja stvarnih supstitucija i netočnih filogenetskih odnosa. Korištenje složenijih modela poboljšava odnos podataka i modela, ali pretjeranom parametrizacijom može doći do gubitka snage razlučivanja, snažne korelacije među čimbenicima i ekstremne osjetljivosti na pretpostavke unesene korištenjem odabranog modela (Nascimento, Reis i Yang, 2017; Sullivan i Joyce, 2005). Stoga je odabir adekvatnog supstitucijskog modela preduvjet za uspješne filogenetske analize.

### 1.9.2.2. Demografski modeli i modeli molekularnog sata

Vrijeme divergencije taksona može se odrediti pomoću molekularnog sata prema kojemu molekule DNA nakupljaju promjene stalnom brzinom tijekom vremena (Zuckerandl i Pauling, 1962). Molekularni sat potrebno je kalibrirati kako bi dobivene vrijednosti bile izražene na apsolutnoj, a ne relativnoj vremenskoj skali. Jedan od načina kalibracije molekularnog sata jest pomoću heterokronih sekvencija ukoliko je vremenski raspon uzorkovanja dovoljno dugačak za akumulaciju

genskih promjena (Ho i Duchêne, 2014). Model strogog molekularnog sata pretpostavlja da se evolucija svake grane filogenetskog stabla odvija jednakom brzinom, dok model nekoreliranog relaksiranog sata dozvoljava nezavisnu brzinu evolucije svake pojedine grane koja ne ovisi o brzini evolucije susjednih grana (Drummond i sur., 2006).

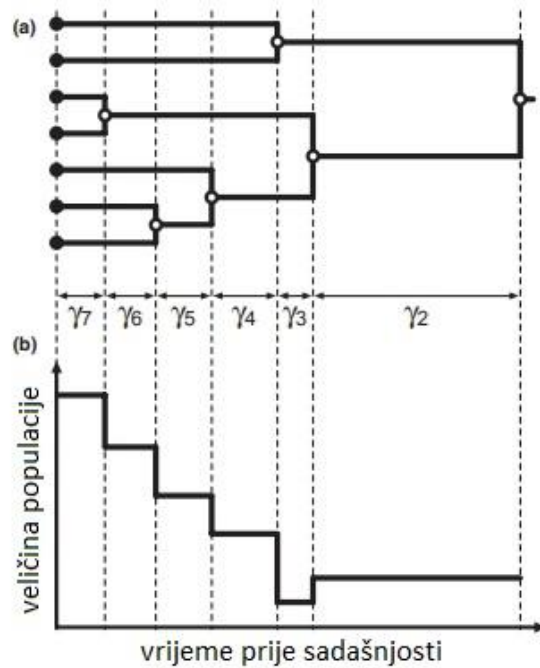
Koalescentne metode zahtijevaju i odabir odgovarajućeg demografskog modela, odnosno matematičke funkcije koja se koristi za opis promjena u efektivnoj veličini populacije tijekom vremena. Demografski modeli mogu biti parametrijski, kao što su model konstantne ili eksponencijalne populacije, ili neparametrijski kao što je fleksibilni model Bayesova horizonta. Model konstantne populacije najprikladniji je za primjenu na populaciji za koju se pretpostavlja da je stabilne veličine od vremena zadnjeg zajedničkog pretka uzoraka, dok je model eksponencijalne populacije prikladan za analizu uzoraka iz ranih stadija epidemije budući da je inicijalni epidemijski rast često približno eksponencijalan (Slika 18) (Drummond i sur., 2005; Volz, Koelle i Bedford, 2013).



**Slika 18.** Pojednostavljeni modeli virusnih filogenetskih odnosa koji prikazuju učinak promjene u veličini virusne populacije. A) eksponencijalni rast populacije B) konstantna veličina populacije ( $N_e$ : veličina virusne populacije). Preuzeto i prilagođeno iz Volz, Koelle i Bedford, 2013.

Neparametrijski model Bayesova horizonta koji dozvoljava složeniju demografiju populacije temelji se na principu procjene promjene efektivne veličine populacije tijekom koalescentnih događaja. Ovaj model dozvoljava promjenu efektivne veličine populacije arbitran broj puta pri čemu se pretpostavlja kako je veličina efektivne populacije stalna između točaka promjene, ali se tijekom koalescentnih događaja može naglo promijeniti (Drummond i sur., 2005; Villanea, Kitchen i

Kemp, 2020). Vrijeme između sadašnjosti i vremena najstarijeg zajedničkog pretka (eng. *time to most recent common ancestor*, tMRCA) podijeljeno je u segmente, a točke promjene segmenata određene su grupiranjem susjednih koalescentnih događaja (Slika 19). Navedeni model je koristan ukoliko su analizirani podaci izrazito informativni o prošlosti populacije ili kada demografska povijest populacije nije primarni objekt interesa te je poželjan fleksibilan model s minimalnim pretpostavkama (Drummond i Rambaut, 2007).



**Slika 19.** Procjena demografske povijesti iz genealogije filogenetskog stabla. a) procijenjena genealogija s duljinama grana proporcionalnih vremenu uz označene koalescentne intervale ( $\gamma_i$ ) b) procjena veličine populacije za svaki koalescentni interval. Preuzeto i prilagođeno iz: Ho i Shapiro, 2011.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. Ciljevi istraživanja**

- 1) Odrediti prevalenciju primarne rezistencije bolesnika zaraženih HCV-om podtipa 1a, 1b i 3a uključenih u kliničku skrb u razdoblju 2016. – 2019. godine na direktno djelujuće antivirusne lijekove iz skupine inhibitora proteina NS3, inhibitora proteina NS5A i inhibitora proteina NS5B te učestalost i kliničku značajnost pojedinih supstitucija povezanih s rezistencijom.
- 2) Filogenetskom i filodinamičkom analizom karakterizirati gensku raznolikost, dinamiku rasprostranjivanja i epidemiološku povijest pojedinih podtipova HCV-a uključujući stopu evolucije te vrijeme zadnjeg zajedničkog pretka

### **2.2. Hipoteze istraživanja**

- 1) Prevalencija primarne rezistencije svih podtipova HCV-a bit će viša na inhibitore proteina NS3 i NS5A koji inhibiraju virusnu proteazu NS3 odnosno nestrukturani protein 5A, u odnosu na nukleozidne inhibitore proteina NS5B koji inhibiraju virusnu polimerazu.
- 2) Prevalencija primarne rezistencije bit će viša u bolesnika zaraženih podtipom 1a i 1b u odnosu na ispitanike zaražene podtipom 3a HCV-a.
- 3) Transmisijski klasteri bit će češći u bolesnika zaraženih HCV-om podtipa 3a koji je dominantan u intravenskih korisnika opojnih droga.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Znanstvenog centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji” (MIS kod: KK.01.1.1.01.0006) financiranog od strane Europskog fonda za regionalni razvoj. Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević” (KZIB) odobrilo je istraživanja u sklopu navedenog projekta za Element projekta 6 (Karakterizacija stečene imunosti na virus hepatitisa C) na sjednici 10. svibnja 2021. godine.

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Ispitanici**

U istraživanje je uključeno 300 osoba s kroničnim hepatitisom C koje prethodno nisu bile liječene direktno djelujućim antivirusnim lijekovima, a bile su uključene u skrb KZIB i Referentnog centra za virusni hepatitis Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske u sklopu preterapijske obrade u razdoblju od siječnja 2016. do prosinca 2019. godine. Kriteriji za uključivanje bili su: (1) dob  $\geq 18$  godina, (2) viremija  $>1000$  internacionalnih jedinica (eng. *international units*, IU) RNA HCV-a po ml seruma te (3) podtip HCV-a 1a, 1b ili 3a. Odabrani demografski, klinički i laboratorijski čimbenici (spol, dob, rizičan čimbenik za infekciju, stadij fibroze, viremija HCV-a i podtip HCV-a) prikupljeni su iz baze podataka Referentnog centra za dijagnostiku i liječenje virusnih hepatitisa Republike Hrvatske u KZIB. Istraživanje je provedeno na Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku KZIB, u Ambulanti za virusni hepatitis i Referentnom centru za virusni hepatitis Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske.

##### **3.1.2. Biološki uzorci**

Biološke uzorke za određivanje rezistencije HCV-a na direktno djelujuće antivirusne lijekove te filogenetsku i filodinamičku karakterizaciju virusne populacije prikupila sam u Ambulanti za virusni hepatitis tijekom redovitih kontrola bolesnika u KZIB. U istraživanju sam koristila serume dobivene centrifugiranjem periferne krvi uzete venepunkcijom u sterilnu epruvetu bez antikoagulansa pri  $959 \times g$  10 minuta pri sobnoj temperaturi. Odvojene serume pohranila sam pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize. Tijekom istraživanja koristila sam isključivo ostatne dijelove seruma prikupljene u svrhu dijagnostičkih postupaka tijekom redovitih kontrola bolesnika u KZIB.



### 3.1.3. Reagensi i kemikalije

#### 3.1.3.1. Set reagensa za izolaciju virusne RNA

- *QIAamp Viral RNA Mini kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka)
  - nosač RNA (*carrier RNA*)
  - pufer za lizu koji sadrži soli i deterdžente (*AVL*)
  - pufer za ispiranje 1 (*AW1*)
  - pufer za ispiranje 2 (*AW2*)
  - elucijski pufer koji sadrži vodu bez RNaza s 0,04 % natrijevog azida (*AVE*)
- etanol (T.T.T.d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

#### 3.1.3.2. Set reagensa za umnažanje gena NS3, NS5A i NS5B lančanom reakcijom polimerazom s reverznom transkripcijom

- *Superscript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase Kit* (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
  - 2x koncentrirana reakcijska smjesa *2x Reaction Mix* koja sadrži 0,4 mM svakog dNTP-a i 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>
  - smjesa enzima *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* i *Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase* koja uključuje *Taq* DNA-polimerazu, *Pyrococcus sp. GB-D*-polimerazu s 3'-5'-egzonukleaznom aktivnošću i *Platinum® Taq* antitijela koja blokiraju polimeraznu aktivnost na sobnoj temperaturi
- specifične početnice, 50 μM (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, SAD) (Tablica 2)
- voda, *PCR-grade* (Roche, Basel, Švicarska)

#### 3.1.3.3. Set reagensa za umnažanje gena NS3, NS5A i NS5B ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom

- *FastStart High Fidelity PCR System kit* (Roche, Basel, Švicarska)
  - 10x koncentriran reakcijski pufer koji sadrži 18 mM MgCl<sub>2</sub>
  - smjesa koja sadrži 10 mM svakog dNTP-a
  - smjesa *FastStart High Fidelity Enzyme Blend 5U/μl* koja uključuje enzim *FastStart Taq DNA-polimerase* i termostabilni protein s 3'-5'-egzonukleaznom aktivnošću koji se aktiviraju zagrijavanjem na 95°C
- specifične početnice, 50 μM (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, SAD) (Tablica 3)

- voda, *PCR-grade* (Roche, Basel, Švicarska)

#### 3.1.3.4. Set reagensa za određivanje koncentracije amplikona

- *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
  - *Qubit® dsDNA BR Reagent*
  - *Qubit® dsDNA BR Buffer*
  - *Qubit® dsDNA BR Standard 1 i Standard 2*

#### 3.1.3.5. Set reagensa za reakciju sekvenciranja

- *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD)
  - *BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix* koji sadrži enzim *AmpliTag® DNA-polimerase*, svaki od dNTP i ddNTP označen fluorokromima (ddGTP označen dR110, ddATP označen dR6G, ddTTP označen dTAMRA i ddCTP označen dROX)
  - 5x koncentriran pufer za sekvenciranje *5X Sequencing Buffer* koji sadrži 175 mM Tris HCl i 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>
- specifične početnice, 2,5 μM (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, SAD) (Tablica 3)
- voda bez RNaza i Dnaza, *DEPC-Treated Water* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD)

#### 3.1.3.6. Reagensi za pročišćavanje produkata reakcije sekvenciranja

- otopina natrijeva acetata, 3M, pH 5,2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- etanol (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- visoko deionizirani formamid (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD)

#### 3.1.3.7. Reagensi za sekvenciranje

- anodni pufer (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD)
- katodni pufer (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD)
- polimer za sekvenciranje *POP-7* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD)

**Tablica 2.** Početnice za umnažanje gena NS3, NS5A i NS5B podtipova 1a, 1b i 3a virusa hepatitisa C.

REGIJA	PODTIP	TIP POČETNICE	SLIJED NUKLEOTIDA (5'-3')	POLOŽAJ U GENOMU*	AUTORI
NS3	1a	uzvodna	ATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGG	3276 – 3300	Dietz i sur., 2015
		nizvodna	ACCCGCCGTCGGCAAGGAAGTTGCCGTA	4227 – 4254	Dietz i sur., 2015
	1b	uzvodna	TGGAGACYAAGMTCATYACSTGGG	3277 – 3300	Gozlan i sur., 2017
		nizvodna	CCARGACYGTGCCRATGCCCA	4321 – 4339	Zhou i sur., 2017
	3a	uzvodna	TACGACCACCTAGCGCCAATG	3276 – 3297	vlastite početnice (Ye i sur., 2012)
		nizvodna	GGGACCTTTGTGCTCTTAC	4045 – 4063	vlastite početnice (Ye i sur., 2012)
NS5A	1a	uzvodna	ACATCCTTGCAGGGTATGG	5890 – 5908	Dietz i sur., 2017
		nizvodna	GACCACAGGTGGTTCGTAG	7256 – 7274	Dietz i sur., 2017
	1b	uzvodna	TGGATGAACCGGCTGATAG	6084 – 6102	McCormick i sur., 2015
		nizvodna	CCACAGGAGRTTGGCCTC	7023 – 7040	McCormick i sur., 2015
	3a	uzvodna	TGGATGAACAGGCTCATYGC	6084 – 6103	McCormick i sur., 2015
		nizvodna	ATGTTRCTGCCCATCTCTTG	7044 – 7063	McCormick i sur., 2015
NS5B	1a	uzvodna	CTYAGCGACGGRTCRT	7539 – 7554	Peres-da-Silva, de Almeida i Lampe, 2017
		nizvodna	TCACGGGTRAGGTARTAGAC	8742 – 8761	Peres-da-Silva, de Almeida i Lampe, 2017
	1b	uzvodna	TCYTGGTCTACYGTRAG	7551 – 7568	Peres-da-Silva, de Almeida i Lampe, 2017
		nizvodna	AGGARCATGATGTTATCARCTC	8682 – 8703	Peres-da-Silva, de Almeida i Lampe, 2017
	3a	uzvodna	GCTCGTCTATGCCTCCTCTC	7497 – 7517	vlastite početnice (Ye i sur., 2012)
		nizvodna	AAGGTCGTAAGTGGCCTGTG	8673 – 8693	vlastite početnice (Ye i sur., 2012)
	1a/1b/3a	uzvodna	TATGAYACCCGCTGYTTYGA	8256 – 8275	Akaberi i sur., 2018
		nizvodna	GGGCAYGHGACABGCTGTGA	9284 – 9303	Akaberi i sur., 2018

Kazalo - \*: prema referentnoj sekvenciji H77 (*GenBank* pristupni broj: AF009606)

**Tablica 3.** Početnice za ugniježđeno umnažanje gena NS3, NS5A i NS5B podtipova 1a, 1b i 3a virusa hepatitisa C.

REGIJA	PODTIP	TIP POČETNICE	SLIJED NUKLEOTIDA (5'-3')	POLOŽAJ U GENOMU*	AUTORI
NS3	1a	uzvodna	CGAYGGAATGGTCTCCAAG	3386 – 3404	Nejabat i sur., 2019
		nizvodna	CRGCAACRGAGGGGTTGAG	4101 – 4119	Nejabat i sur., 2019
	1b	uzvodna	ACSGCRGCRGTGYGGGGAC	3309 – 3326	Vallet i sur., 2011
		nizvodna	GTGCTCTTRCCGCTRCCRGT	4035 – 4054	Vallet i sur., 2011
	3a	uzvodna	ATACAGCGGCTTGCGGAG	3307 – 3325	vlastite početnice (Ye i sur., 2012)
		nizvodna	GCAGGAGGAGTTGAATTGTC	3975 – 3995	vlastite početnice (Ye i sur., 2012)
NS5A	1a	uzvodna	TGGATGAACCGGCTGATAG	6084 – 6102	Dietz i sur., 2017
		nizvodna	ATGTTGCCGCCCATCTC	7047 – 7063	Dietz i sur., 2017
	1b	uzvodna	TCCCCACGCACTAYGTG	6129 – 6146	McCormick i sur., 2015
		nizvodna	CTRCYGARGAGCTGGCC	6935 – 6952	McCormick i sur., 2015
	3a	uzvodna	GCTCATCGGTTCCGCATCC	6095 – 6114	vlastite početnice (Ye i sur., 2012)
		nizvodna	CCTATGCGTCTGGCAAGTGG	7005 – 7025	vlastite početnice (Ye i sur., 2012)
NS5B	1a	uzvodna	TCGTGTGYTGCTCRATG	7591 – 7607	Peres-da-Silva, de Almeida i Lampe, 2017
		nizvodna	TACCTGGTCATAGCCTCC	8621 – 8638	Peres-da-Silva, de Almeida i Lampe, 2017
	1b	uzvodna	TCYTGGTCTACYGTRAG	7551 – 7568	Peres-da-Silva, de Almeida i Lampe, 2017
		nizvodna	CCTAGTCATAGCCTCCGT	8619 – 8636	Peres-da-Silva, de Almeida i Lampe, 2017
	3a	uzvodna	CGACTCTTGGTCCACCGTTAG	7590 – 7611	vlastite početnice (Ye i sur., 2012)
		nizvodna	GCTCTCAGGGCTGCTCTATC	8595 – 8615	vlastite početnice (Ye i sur., 2012)
	1a/1b/3a	uzvodna	ACCCGCTGYTTYGACTCVAC	8262 – 8281	Akaberi, 2018
		nizvodna	GACASGCTGWGATADATGTC	9276 – 9295	Akaberi, 2018

Kazalo - \*: prema referentnoj sekvenciji H77 (*GenBank* pristupni broj: AF009606)

### 3.1.4. Računalni programi i alati

- *Vector NTI* verzija 11.5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- *geno2pheno [hcv]* algoritam (Kalaghatgi i sur., 2016)
- *Basic local alignment search tool (BLAST)* (Altschul i sur., 1990)
- *ClustalX* verzija 2.1 (Larkin i sur., 2007)
- *AliView* verzija 1.27 (Larsson, 2014)
- *Molecular Evolutionary Genetics Analyses (MEGA)* verzija 10.2.6 (Kumar i sur., 2018)
- *jModelTest* verzija 2.1.4 (Darriba i sur., 2012)
- *iTol* verzija 6.4.2. (Letunic i Bork, 2021)
- *ClusterPickerGUI* verzija 1.2.1 (Ragonnet-Cronin i sur. 2013)
- *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees (BEAST)* verzija 2.2.6 i pripadajući programi (Bouckaert i sur., 2012)
- *jModelTest* verzija 2.1.5. (Posada, 2008)
- *Tracer* verzija 1.7.1 (Rambaut, 2018)
- *Statistica* verzija 13.5. (TIBCO, 2018)

### 3.1.5. Baze podataka

- *GenBank Nucleotide Sequence Database* (Benson i sur., 2012)
- *The Los Alamos HCV Sequence Database* (Kuiken, 2005)
- *HCV Classification Database (ICTV, 2019)*

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija RNA HCV-a

Za izolaciju virusne RNA koristila sam standardizirani set reagensa *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača. Ukupnu virusnu RNA izolirala sam iz 140  $\mu$ l seruma pomoću sustava *QIAamp Mini Spin* kolona s membranom od silikagela (Qiagen, Njemačka). Svakom uzorku sam dodala 560  $\mu$ l pufera za lizu (AVL) i 6  $\mu$ l nosača RNA, promiješala te inkubirala pri sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon inkubacije dodala sam 560  $\mu$ l 96 %-tnog etanola, promiješala te u dva navrata volumen od 630  $\mu$ l prenijela na kolonu postavljenu u epruvetu za sakupljanje i centrifugirala 1 min pri 6.000 x g pri sobnoj temperaturi uz mijenjanje epruvete za sakupljanje. Potom sam provela dva ispiranja s po 500  $\mu$ l pufera AW1, odnosno AW2, i centrifugiranje 1 min pri 6.000 x g, odnosno 3 min pri 20.000 x g pri sobnoj temperaturi uz mijenjanje epruvete za sakupljanje. Kako bi se osiguralo potpuno uklanjanje pufera, kolonu sam prebacila u čistu epruvetu za sakupljanje i centrifugirala 1 min pri 20.000 x g. Kako bih virusnu RNA isprala s kolone dodala sam 60  $\mu$ l pufera AVE, inkubirala 1 min pri sobnoj temperaturi te centrifugirala 1 min pri 6.000 x g. Na ovaj način uspješno sam eluirala najmanje 90 % virusne RNA koju sam odmah koristila u daljnjem procesu umnažanja regija NS3, NS5A i NS5B virusnog genoma. Ostatak izolata pohranila sam pri -20 °C.

### 3.2.2. Umnažanje regija NS3, NS5A i NS5B virusnog genoma

Umnažanje regija proteaze NS3, domene I regije NS5A te parcijalne regije NS5B virusnog genoma provela sam metodom lančane reakcije polimerazom s reverznom transkripcijom. Za prepisivanje molekule RNA u komplementarnu cDNA i umnažanje ciljnih regija virusnog genoma koristila sam set reagensa *Superscript<sup>TM</sup> III One-Step RT-PCR System with Platinum<sup>®</sup> Taq High Fidelity Polymerase Kit* (Invitrogen, SAD) uz odgovarajuće početnice specifične za pojedini podtip (1a, 1b, 3a) virusa i regiju (NS3, NS5A, NS5B) virusnog genoma (Tablica 2). Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25  $\mu$ l sadržavala je: 12,5  $\mu$ l reakcijske smjese *2X Reaction Mix*, 0,5  $\mu$ l odgovarajuće uzvodne početnice (50  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ l odgovarajuće nizvodne početnice (50  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ l smjese enzima *SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase* i *Platinum<sup>®</sup> Taq High Fidelity DNA Polymerase*, 6,5  $\mu$ l vode te 5  $\mu$ l izolirane RNA HCV-a. Reakcijsku smjesu pripremila sam u epruvetama od 0,2 mL (Applied Biosystems, SAD) te stavila na umnažanje u termociklički amplifikator *ProFlex<sup>TM</sup> 3 x 32-well PCR System* (Applied Biosystems, SAD) prema uvjetima navedenima u Tablici 4.

**Tablica 4.** Uvjeti lančane reakcije polimerazom s reverznom transkripcijom za umnažanje regija NS3, NS5A i NS5B genoma virusa hepatitisa C.

KORAK/ UVJETI	reverzna transkripcija	početna denaturacija	45 ciklusa			završno produljenje lanca	hlađenje
			denaturacija	vezanje početnica	produljenje lanca		
temperatura	50 °C	94 °C	94 °C	55 °C	68 °C	68 °C	4 °C
vrijeme	30 min	2 min	20 s	30 s	90 s	5 min	∞

Kako bi se povećala osjetljivost, odnosno smanjila količina nespecifičnih produkata, produkte dobivene lančanom reakcijom polimerazom s reverznom transkripcijom koristila sam kao kalup za drugo umnažanje pomoću metode ugniježdene lančane reakcije polimerazom. Pritom sam koristila set reagensa *FastStart High Fidelity PCR System Kit* (Roche, Švicarska) uz odgovarajuće početnice specifične za pojedini podtip (1a, 1b, 3a) virusa i regiju (NS3, NS5A, NS5B) virusnog genoma (Tablica 3). Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µl sadržavala je: 2,5 µl reakcijskog pufera *10X High Fidelity Reaction Buffer*, 0,5 µL smjese nukleotida *dNTP mix*, 0,2 µl odgovarajuće uzvodne početnice (50 µM), 0,2 µl odgovarajuće nizvodne početnice (50 µM), 0,25 µl smjese enzima *FastStart High Fidelity* (5U/µl), 20,35 µl vode te 1 µl DNA HCV-a dobivene u prethodnom koraku umnažanja. Reakcijsku smjesu pripremila sam u epruветama od 0,2 mL (Applied Biosystems, SAD) te stavila na umnažanje u termociklički amplifikator *ProFlex™ 3 x 32-well PCR System* (Applied Biosystems, SAD) prema uvjetima navedenima u Tablici 5.

**Tablica 5.** Uvjeti ugniježdene lančane reakcije polimerazom za umnažanje regija NS3, NS5A i NS5B genoma virusa hepatitisa C.

KORAK/ UVJETI	početna denaturacija	45 ciklusa			završno produljenje lanca	hlađenje
		denaturacija	vezanje početnica	produljenje lanca		
temperatura	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C
vrijeme	2 min	30 s	30 s	60 s	7 min	∞

Koncentraciju DNA HCV-a u dobivenim amplikonima izmjerila sam pomoću seta reagensa *Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit* (Invitrogen, SAD) korištenjem uređaja *Qubit Fluorometer* (Invitrogen, SAD). Amplikone sam pohranila pri -20 °C ili koristila odmah u sljedećem koraku sekvenciranja odgovarajuće regije virusnog genoma.

### 3.2.3. Sekvenciranje regija NS3, NS5A i NS5B virusnog genoma

Slijed nukleotida amplikona dobivenih ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom koji obuhvaćaju regiju NS3, NS5A i NS5B virusnog genoma odredila sam metodom Sangerova

sekvenciranja. Pritom sam koristila set reagensa *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, SAD) uz odgovarajuće početnice specifične za pojedini podtip (1a, 1b, 3a) virusa i regiju (NS3, NS5A, NS5B) virusnog genoma (Tablica 3). Ovisno o izmjerenoj koncentraciji ampikone DNA sam razrijedila kako bi ukupna količina DNA korištena u reakciji sekvenciranja bila 5 – 20 ng. Za svaki uzorak pripremila sam dvije reakcijske smjese s uzvodnom odnosno nizvodnom početnicom. Svaka reakcijska smjesa ukupnog volumena 10 µl sadržavala je: 2 µl reakcijskog pufera *5X Sequencing Buffer*, 0,6 µl odgovarajuće uzvodne ili nizvodne početnice (2,5 µM), 0,5 µl smjese *BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix*, 5,9 µl vode te 1 µl razrijeđene DNA HCV-a. Reakcijsku smjesu pripremila sam u epruветama u nizu od 0,2 mL s poklopcima (Applied Biosystems, SAD) te stavila na umnažanje u termociklički amplifikator *GeneAmp™ PCR System 9700* (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uvjetima navedenim u Tablici 6.

**Tablica 6.** Uvjeti reakcije sekvenciranja regija NS3, NS5A i NS5B genoma virusa hepatitisa C.

KORAK/ UVJETI	početna denaturacija	25 ciklusa			hlađenje
		denaturacija	vezanje početnica	produljenje lanca	
temperatura	96 °C	96 °C	50 °C	60 °C	4 °C
vrijeme	1 min	10 s	5 s	4 min	∞

Kako bih uklonila neugrađene dideoksinukleotide, početnice i soli, pročistila sam produkte reakcije sekvenciranja. Najprije sam u svaki uzorak dodala 2 µL natrijeva acetata (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) i 50 µL 96 %-tnog etanola (T.T.T. d.o.o., Hrvatska) te ih centrifugirala pri 2000 x g 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja supernatanta u svaki sam uzorak dodala 150 µL hladnog 70 %-tnog etanola (T.T.T. d.o.o., Hrvatska) i centrifugirala pri 2000 x g 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja supernatanta uzorke sam otopila u 20 µL visoko deioniziranog formamida (Applied Biosystems, SAD) te ih stavila u termociklički amplifikator *GeneAmp™ PCR System 9700* (Thermo Fisher Scientific, SAD) pri 95 °C u trajanju od 2 minute nakon čega su ohlađeni pri 4 °C. Uzorke sam prenijela u pločicu s 96 jažica sa septom, stalkom i poklopcem (Applied Biosystems, SAD) te ih stavila u uređaj *ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, SAD) gdje su kapilarnom elektroforezom razdvojeni isječci DNA sintetizirani u sekvencijskoj reakciji. Pri tom je korišten osmokapilarni set *3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array, 50 cm* (Applied Biosystems, SAD), polimer *POP-7* (Applied Biosystems, SAD) te modul *Standard sequencing* u trajanju od 125 minuta.



### 3.2.4. Bioinformatička analiza sekvencija

Nukleotidne sljedove ispitivanih sekvencija pregledala sam u programu *Vector NTI* v.11.5 (Thermo Fisher Scientific, SAD) u kojem sam ujedno poravnala sekvencije dobivene pomoću nizvodne i uzvodne početnice za svaki uzorak te ispravila pogrešno očitane signale. Uređene sekvencije pohranila sam u formatu FASTA i koristila za određivanje rezistencije HCV-a na direktno djelujuće antivirusne lijekove te filogenetske i filodinamičke analize.

#### 3.2.4.1. Određivanje mutacija koje uzrokuju rezistenciju HCV-a na DAA

Pomoću algoritma *geno2pheno [hcv]* dobivene sekvencije usporedila sam s referentnim sekvencijama za podtip 1a (pristupni brojevi baze podataka *GenBank*: AF009606, M62321, M67463, HQ850279, EF407457), podtip 1b (pristupni brojevi baze podataka *GenBank*: D90208, M58335, EU781827, EU781828) i podtip 3a (pristupni brojevi baze podataka *GenBank*: D17763, D28917, X76918, JN714194) te provjerila postojeću genotipsku klasifikaciju ispitivanih sekvencija. Algoritam *geno2pheno [hcv]* koristila sam i za određivanje prisutnosti mutacija koje uzrokuju rezistenciju na direktno djelujuće antivirusne lijekove. Analizirala sam primarnu rezistenciju na sve inhibitore proteaze NS3 (BOC, GLE, GZV, PTV, SMV, TPV, VOX), sve inhibitore proteina NS5A (DCV, EBR, LDV, OBV, PIB, VEL) te NI polimeraze NS5B SOF. Primarnu rezistenciju definirala sam kao prisutnost jedne ili više mutacija iz skupine klinički značajnih rezistencijskih mutacija ili mutacija koje uzrokuju smanjenu osjetljivost na najmanje jedan direktno djelujući antivirusni lijek iz pojedine skupine. Podložnost lijekovima definirala sam kao odsutnost mutacija ili prisutnost mutacija koji nemaju dokazani učinak na smanjenje učinkovitosti pojedinog direktno djelujućeg antivirusnog lijeka.

#### 3.2.4.2. Filogenetska analiza sekvencija

Sekvencije dobivene Sangerovim sekvenciranjem nadopunila sam referentnim sekvencijama za odgovarajući genotip HCV-a navedenim u poglavlju 3.2.4.1 te kontrolnim sekvencijama. Za svaku dobivenu sekvenciju pretraživanjem *GenBank* baze podataka pomoću algoritma BLAST odabrala sam 10 najslabijih kontrolnih sekvencija koje zadovoljavaju sljedeće kriterije: (1) nisu klonalne niti nastale rekombinacijom; (2) poznatog su genotipa; (3) poznate su države porijekla; (4) poznatog su datuma uzorkovanja te (5) imaju najmanje 90 % podudarnosti s ciljnom sekvencijom. Dvostruke, odnosno ponavljajuće kontrolne sekvencije, nisam uključila u daljnje analize. Na ovaj način dobiveno je devet skupina podataka, za 3 različite regije genoma i 3 različita genotipa. U svrhu potvrde genotipizacije dobivenih uzoraka kreirala sam i 3 dodatne skupine podataka za svaku regiju u koje sam dodala nukleotidne sekvencije referentnih izolata HCV-a svih poznatih genotipova i podtipova iz baza podataka *HCV Los Alamos Database* te *HCV Classification Database*. Višestruka sravnjenja

sekvencija napravila sam u programu *ClustalX* v.2.1, a korekciju krajeva varijabilnih duljina u programu *AliView* v.1.27.

Na temelju višestrukog sravnjenja sekvencija ispitala sam najvjerojatniji supstitucijski model koji uključuje pretpostavke o sastavu nukleotidnih baza te frekvenciji i tipu nukleotidnih supstitucija svake skupine podataka u programu *Mega* v.10.2.6. Ukupno su testirana 24 supstitucijska modela. Za model s najmanjom dobivenom vrijednosti Bayesova informacijskog kriterija (eng. *Bayesian information criteria*, BIC) smatrala sam kako najvjerojatnije opisuje nukleotidne supstitucije određene skupine podataka. Filogenetska stabla izradila sam pomoću metode ML u programu *Mega* v.10.2.6. Pouzdanost filogenije odnosno podršku grananja testirala sam pomoću *bootstrap* metode uz 1000 pseudoreplikacija. Konačan pregled i uređenje dobivenih filogenetskih stabala napravila sam u programu *iTOL* v.6.4. Filogenetska stabla podtipa 1a ukorijenila sam pomoću referentnih sekvencija podtipa 1b, a filogenetska stabla podtipa 1b pomoću referentnih sekvencija podtipa 1a navedenih u poglavlju 3.2.4.1., dok sam filogenetska stabla podtipa 3a ukorijenila pomoću referentnih sekvencija podtipa 3b (pristupni brojevi baze podataka *GenBank*: D49374, JQ065709). Transmisijske parove i klastere identificirala sam na filogenetskim stablima pomoću programa *ClusterPickerGUI* v.1.2.3 s gornjom granicom za podršku grananja i genetsku udaljenost podešenima na 70 %, odnosno 4,5 %.

### **3.2.4.3. Filodinamička analiza sekvencija**

Za filodinamičke analize koristila sam sve sakupljene dobivene višestruko sravnjene sekvencije te zabilježen točan datum njihova uzorkovanja. Kako bih povećala broj informativnih nukleotidnih mjesta, spojila sam dobivene sekvencije regija NS3, NS5A i NS5B svakog ispitanika, a gensku raznolikost populacije podtipa 1a, 1b odnosno 3a tijekom vremena ispitala sam pomoću metode Bayesovog zaključivanja u programu *BEAST* v.2.6.6. Najpovoljniji model nukleotidne supstitucije svake skupine podataka odabrala sam u programu *jModelTest* v.2.1.5. prema Akaikeovom i Bayesovom informacijskom kriteriju. Analizu sam provela metodom Markovljevog lanca Monte Carlo pri čemu je ujedno izračunata stopa evolucije (broj nukleotidnih supstitucija po mjestu po godini) i vrijeme zadnjeg zajedničkog pretka (eng. *time of the most recent ancestor*, tMRCA) sekvencija podtipa 1a, 1b, odnosno 3a. Za svaku skupinu sekvencija testirala sam 3 modela molekularnog sata (strogi molekularni sat, nekorelirani relaksirani molekularni sat uz lognormalnu raspodjelu, nekorelirani relaksirani molekularni sat uz eksponencijalnu raspodjelu) i 3 demografska modela (model konstantne populacije, model eksponencijalne populacije, model Bayesova horizonta) pomoću analize *Path Sampling* dostupne u programu *BEAST* v.2.6.6. Najvjerojatniji demografski model i model molekularnog sata odredila sam pomoću Bayesova faktora (eng. *Bayes factor*, BF) na temelju razlike logaritma procijenjenih marginalnih vjerojatnosti (eng. *marginal likelihood estimate*, MLE) dva uspoređivana modela. Vrijednosti  $\log(\text{BF}) > 2$  smatrala sam potvrdom preferencije prvog

od dva uspoređivana modela prema vrijednostima navedenima u Tablici 7.

**Tablica 7.** Raspon Bayesova faktora i stupanj podrške u korist prvog od dva uspoređivana modela Preuzeto i prilagođeno iz Kass i Raftery, 1995.

Raspon BF	Raspon ln(BF)	Raspon log(BF)	Interpretacija
1 – 3	0 – 1,1	0 – 0,5	neznačajna podrška
3 – 20	1,1 – 3	0,5 – 1,3	pozitivna podrška
20 – 150	3 – 5	1,3 – 2,2	snažna podrška
>150	>5	>2,2	izrazita podrška

Kazalo - BF: Bayesov faktor; ln: prirodni logaritam uz bazu e; log: prirodni logaritam uz bazu 10

Za svaku skupinu podataka, demografski model i model molekularnog sata provodila sam analizu sve dok nije uočena konvergencija lanaca MCMC. Stopa uzorkovanja bila je 0,001, a konvergenciju sam ispitala pomoću čimbenika efektivne veličine uzorka (engl. *effective sample size*, ESS) u programu *Tracer* v.1.7.2. Prvih 10 % rezultata automatski je odbačeno kao tzv. *burn-in* vrijednost, a vrijednosti EES >200 posteriorne raspodjele svih čimbenika smatrala sam mjerom dobre konvergencije lanaca MCMC. Modele koji nisu konvergirali tijekom 200 milijuna generacija isključila sam iz daljnjih analiza. Pouzdanost procjena tMRCA i stope evolucije izrazila sam kao 95 %-tni interval najveće posteriorne gustoće (engl. *highest posterior density*, HPD).

### 3.2.5. Statistička analiza podataka

Statističku analizu dobivenih podataka provela sam pomoću programa *Statistica* v.13.5. Vrijednosti kvalitativnih (kategoričkih) varijabli prikazala sam tablicama frekvencije, a vrijednosti kvantitativnih (numeričkih) varijabli medijanom kao mjerom središnje vrijednosti i interkvartilnim rasponom kao mjerom varijabilnosti podataka. Povezanost između kvantitativnih varijabli odabranih neovisnih skupina podataka usporedila sam pomoću Mann-Whitney-evog testa, a povezanost između kvalitativnih varijabli pomoću hi-kvadrat testa odnosno Fisherovog egzaktnog testa. Statistički značajnim razlikama smatrala sam vrijednosti  $P < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Ispitanici

U razdoblju od siječnja 2016. do prosinca 2019. godine u skrb KZIB i Referentnog centra za virusni hepatitis Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske u sklopu predterapijske obrade bilo je uključeno 300 osoba koje su zadovoljile kriterije uključivanja navedene u poglavlju 3.1.1. Od ukupnog broja ispitanika uključeno je bilo 187 (62,3 %) muškaraca i 113 (37,7 %) žena. Nulti (F0) odnosno prvi (F1) stadij fibroze jetre imala su 103 (34,3 %) uključena ispitanika, drugi (F2) stadij 72 (24,0 %) ispitanika, treći (F3) stadij 44 (14,7 %) ispitanika, četvrti (F4) stadij odnosno cirozu jetre 74 (24,7 %) ispitanika dok je za 7 (2,3 %) ispitanika stadij fibroze jetre bio nepoznat. Medijan viremije, odnosno broja kopija virusne RNA u serumu, iznosio je 6,0 log<sub>10</sub> IU/ml (5,5 – 6,3 log<sub>10</sub> IU/ml). Od 300 uključenih ispitanika njih 109 (36,3 %) bilo je zaraženo podtipom 1a, 80 (26,7 %) podtipom 1b, a 111 (37,0 %) podtipom 3a HCV-a. Medijan dobi ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a iznosio je 44,0 (40,0 – 50,5) godine, ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b 61,0 (52,0 – 65,8) godinu, a ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a 43,0 (39,0 – 49,0) godine. Pretpostavljeni način zaraze, odnosno rizični čimbenik, bio je intravensko korištenje droga kod 95 (31,7 %) ispitanika, jatrogeni prijenos odnosno neprikladni medicinski postupci kod 48 (16,0 %) ispitanika, spolni ili perinatalni prijenos kod 11 (3,7 %) ispitanika, dok za 146 (48,7 %) ispitanika način zaraze nije bio poznat. Najčešći prijavljeni put prijenosa kod ispitanika zaraženih podtipom 1a (44,0 %) i 3a (41,4 %) HCV-a bio je intravensko korištenje droga, a kod ispitanika zaraženih podtipom 1b HCV-a neprikladni medicinski postupci (31,3 %) (Tablica 8).

**Tablica 8.** Demografske, kliničke i laboratorijske karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje.

	Ukupno	Podtip 1a	Podtip 1b	Podtip 3a
Ispitanici	N = 300	N = 109	N = 80	N = 111
Spol	n (%)			
M	187 (62,3)	73 (67,0)	36 (45,0)	78 (70,3)
Ž	113 (37,7)	36 (33,0)	44 (55,0)	33 (29,7)
Dob, godine	n (%)			
18 – 35	32 (10,7)	11 (10,1)	5 (6,3)	16 (14,4)
36 – 47	140 (46,7)	66 (60,6)	11 (13,8)	63 (56,8)
48 – 59	72 (24,0)	27 (24,8)	21 (26,3)	24 (21,6)
>60	56 (18,7)	5 (4,6)	43 (53,8)	8 (7,2)
Dob, medijan godina (Q1 – Q3)	45,0 (40,0 – 57,0)	44,0 (40,0 – 50,5)	61,0 (52,0 – 65,8)	43,0 (39,0 – 49,0)
Stadij fibroze	n (%)			
F0/F1	103 (34,3)	48 (44,0)	22 (27,5)	33 (29,7)
F2	72 (24,0)	27 (24,8)	21 (26,3)	24 (21,6)
F3	44 (14,7)	15 (13,8)	12 (15,0)	17 (15,3)
F4	74 (24,7)	17 (15,6)	24 (30,0)	33 (29,7)
Nepoznato	7 (2,3)	2 (1,8)	1 (1,3)	4 (3,6)
Pretpostavljeni način zaraze	n (%)			
IDU	95 (31,7)	48 (44,0)	1 (1,3)	46 (41,4)
Jatrogeno	48 (16,0)	14 (12,8)	25 (31,3)	9 (8,1)
Perinatalno/spolno	11 (3,7)	2 (1,8)	1 (1,3)	8 (7,2)
Nepoznato	146 (48,7)	45 (41,3)	53 (66,3)	48 (43,2)
Viremija, medijan (Q1 – Q3), log IU/ml	6,0 (5,5 – 6,3)	6,0 (5,5 – 6,5)	5,9 (5,5 – 6,3)	6,0 (5,5 – 6,3)

Kazalo - N: ukupan broj ispitanika; n: broj ispitanika u određenoj kategoriji; %: postotak ispitanika; Q1: prva kvartila; Q3: treća kvartila; IDU: intravensko korištenje droga; log: prirodni logaritam s bazom 10; IU: internacionalna jedinica

#### 4.2. Analiza supstitucija povezanih s rezistencijom (RAS) na DAA

Analizirala sam ukupno 900 sekvencija dobivenih sekvenciranjem regija NS3, NS5A odnosno NS5B 300 ispitanika. Prisutnost jedne ili više RAS na najmanje jedan DAA iz skupine inhibitora proteina NS3, NS5A ili NS5B utvrđena je u 137 (45,7 %) ispitanika, od toga 80 (73,4 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a, 48 (60,0 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b te 9 (8,1 %)

ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a. Prisutnost RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju na najmanje jedan DAA iz skupine inhibitora proteina NS3, NS5A ili NS5B utvrđena je u 83 (27,7 %) ispitanika, od toga 60 (55,0 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a, 19 (23,8 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b te 4 (3,6 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a. Istovremena pojava RAS u različitim nestrukturnim regijama utvrđena je u 25 (8,3 %) ispitanika, pri čemu je 23 (7,6 %) ispitanika imalo RAS na dvije skupine DAA, a dva ispitanika RAS na sve tri skupine DAA (0,7 %). Najčešća je bila istovremena prisutnost RAS u regijama NS3 i NS5A (5,0 %), dok su NS3 i NI NS5B RAS (1,7 %) te NS5A i NI NS5B RAS (1,0 %) uočene rijetko.

#### **4.2.1. Analiza RAS na inhibitore proteaze NS3**

Prisutnost jedne ili više RAS na najmanje jedan DAA iz skupine inhibitora proteaze NS3 utvrđena je u 99 (33,0 %) ispitanika, od toga 75 (68,8 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a, 22 (27,5 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b te dva (1,8 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a. Jedna ili više RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju na najmanje jedan DAA iz skupine inhibitora proteaze NS3 utvrđena je u 62 (20,7 %) ispitanika, od toga u 57 (52,3 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a, četiri (5,0 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b te jednog (0,9 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a. Većina klinički značajnih mutacija u podtipu 1a HCV-a nalazila se na poziciji 80 unutar regije NS3 pri čemu je glutamin zamijenjen lizinom (Q80K) u 51 (46,8 %) ispitanika. Ova supstitucija uočena je kao zasebna mutacija u 24 (22,0 %) ispitanika dok je kod ostalih ispitanika bila popraćena mutacijama koje uzrokuju smanjenu osjetljivost na inhibitore proteaze NS3 (N174S (17,4 %), R117H (0,9 %)), drugim rezistencijskim mutacijama (V55A (0,9 %), T54S (0,9 %)), odnosno kombinacijom oba tipa mutacija (N174S + V55A (4,6 %)). Od ostalih klinički značajnih NS3 RAS, T54S i V55A utvrđene su ukupno u četiri (3,7 %), odnosno osam (7,3 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a. Od mutacija koje uzrokuju smanjenu osjetljivost na inhibitore proteaze NS3, najzastupljenija je bila N174S nastala zamjenom asparagina serinom na poziciji 174 utvrđena u 43 (39,5 %) ispitanika. U ispitanika zaraženih podtipom 1b HCV-a utvrđeno je svega nekoliko klinički značajnih NS3 RAS: T54S (2,5 %), V55A (1,3 %) te N174F u kombinaciji s Y56F (1,3 %). Od mutacija koje uzrokuju smanjenu osjetljivost na inhibitore proteaze NS3 najzastupljenija je bila upravo Y56F nastala zamjenom tirozina fenilalaninom na poziciji 56 utvrđena u 18 (22,5 %) ispitanika. Jedine RAS utvrđene u ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a bile su Q168R (0,9 %) te Q168K (0,9 %). U svih ispitanika podtipa 3a NS3 RAS utvrđene su pojedinačno. Pregled svih utvrđenih mutacija u regiji NS3 ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a, 1b i 3a prikazan je u Tablici 9, a rezistencijski profili ispitanika s utvrđenim klinički značajnim RAS na najmanje jedan DAA u Tablici 13.

**Tablica 9.** Otkrivene supstitucije povezane s rezistencijom na inhibitore proteaze NS3.

Položaj kodona unutar regije NS3	Divlji tip aminokiseline	Promijenjena aminokiselina povezana s rezistencijom	Prevalencija RAS <sup>†</sup> u podtipovima HCV-a		
			1a (N = 109) n (%)	1b (N = 80) n (%)	3a (N = 111) n (%)
54	T	S	<b>4 (3,7)</b>	<b>2 (2,5)</b>	/
55	V	A	<b>8 (7,3)</b>	<b>1 (1,3)</b>	/
56	Y	F	/	18 (22,5)	/
80	Q	K	<b>51 (46,8)</b>	/	/
117	R	H	2 (1,8)	4 (5,0)	/
168	D/Q*	E	1 (0,9)	/	/
		K	/	/	1 (0,9)
		R	/	/	<b>1 (0,9)</b>
174	N/S/T*	F	/	<b>1 (1,3)</b>	/
		S	43 (39,5)	/	/
Ispitanici s bar jednom NS3 RAS		sve RAS	75 (68,8)	22 (27,5)	2 (1,8)
		klinički značajne RAS	57 (52,3)	4 (5,0)	1 (0,9)
Ispitanici bez NS3 RAS			34 (31,2)	58 (72,5)	109 (98,2)

Kazalo - HCV: virus hepatitisa C; RAS: supstitucije povezane s rezistencijom; N: ukupan broj ispitanika; n: broj ispitanika u određenoj kategoriji; %: postotak ispitanika; †: RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju otisnute su podebljano; \*: D168 i N174 su divlji tipovi aminokiseline u podtipu 1a; D168 i S174 su divlji tipovi aminokiseline u podtipu 1b; Q168 i T174 su divlji tipovi aminokiseline u podtipu 3a

#### 4.2.2. Analiza RAS na inhibitore proteina NS5A

Prisutnost jedne ili više RAS na najmanje jedan DAA iz skupine inhibitora proteina NS5A utvrđena je u 41 (13,7 %) ispitanika, od toga u 17 (15,6 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a, 17 (21,3 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b te sedam (6,3 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a. Jedna ili više RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju na najmanje jedan DAA iz skupine inhibitora proteina NS5A utvrđena je u 24 (8,0 %) ispitanika, od toga pet (4,6 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a, 16 (20,0 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b te tri (2,7 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a. Najučestalija NS5A RAS u podtipu 1a bila je M28V koju karakterizira zamjena metionina valinom na poziciji 28 u 11 (10,1 %) ispitanika, a uzrokuje smanjenu osjetljivost na inhibitore proteina NS5A. Klinički značajne NS5A RAS bile su Q30R u tri (2,8 %) ispitanika te M28T i L31M utvrđene svaka u jednog (0,9 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a. U svih ispitanika podtipa 1a NS5A RAS utvrđene su pojedinačno. Većina klinički značajnih mutacija u podtipu 1b HCV-a nalazila se na poziciji 93 unutar regije NS5A pri čemu je tirozin zamijenjen histidinom (Y93H) u 9 (11,3 %) ispitanika. Ova supstitucija bila je prisutna kao zasebna mutacija u šest (7,5 %) ispitanika, dok je u po jednog (1,3 %) ispitanika popraćena supstitucijom R30Q, L31I odnosno R30Q + L31I. Druge uočene klinički značajne NS5A RAS bile

su R30Q i L31M koje su utvrđene u pet (6,3 %) odnosno četiri (5,0 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b. U ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a utvrđene klinički značajne mutacije bile su A30K (0,9 %) te Y93H (1,8 %), dok je u četiri (3,6 %) ispitanika uočena mutacija A62L koje uzrokuje smanjenu osjetljivost na inhibitore proteina NS5A. U svih ispitanika podtipa 3a NS5A RAS utvrđene su pojedinačno. Pregled svih utvrđenih mutacija u regiji NS5A ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a, 1b i 3a prikazan je u Tablici 10, a rezistencijski profili ispitanika s utvrđenim klinički značajnim RAS na najmanje jedan DAA u Tablici 13.

**Tablica 10.** Otkrivene supstitucije povezane s rezistencijom na inhibitore proteina NS5A.

Položaj kodona unutar regije NS5A	Divlji tip aminokiseline	Promijenjena aminokiselina povezana s rezistencijom	Prevalencija RAS <sup>†</sup> u podtipovima HCV-a		
			1a (N = 109) n (%)	1b (N = 80) n (%)	3a (N = 111) n (%)
24	K/Q/S*	R	1 (0,9)	/	/
28	M/L*	V	11 (10,1)	/	/
		T	<b>1 (0,9)</b>	/	/
30	Q/R/A*	R	<b>3 (2,8)</b>	/	/
		Q	/	<b>5 (6,3)</b>	/
		K	/	/	<b>1 (0,9)</b>
31	L	M	<b>1 (0,9)</b>	<b>4 (5,0)</b>	/
		I	/	3 (3,8)	/
62	E/Q/A*	L	/	/	4 (3,6)
93	Y	H	/	<b>9 (11,3)</b>	<b>2 (1,8)</b>
Ispitanici s bar jednom NS5A RAS	sve RAS		17 (15,6)	17 (21,3)	7 (6,3)
	klinički značajne RAS		5 (4,6)	16 (20,0)	3 (2,7)
Ispitanici bez NS5A RAS			92 (84,4)	63 (78,8)	104 (93,7)

Kazalo - HCV: virus hepatitisa C; RAS: supstitucije povezane s rezistencijom; N: ukupan broj ispitanika; n: broj ispitanika u određenoj kategoriji; %: postotak ispitanika; †: RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju otisnute su podebljano; \*: K24, M28, Q30 i E62 su divlji tipovi aminokiseline u podtipu 1a; Q24, L28, R30 i Q62 su divlji tipovi aminokiseline u podtipu 1b; S24, M28, A30 i A62 su divlji tipovi aminokiseline u podtipu 3a

#### 4.2.3. Analiza RAS na nukleozidne inhibitore (NI) polimeraze NS5B

Prisutnost jedne ili više RAS na NI polimeraze NS5B utvrđena je u ukupno 25 (8,3 %) ispitanika. Svih 25 ispitanika bilo je zaraženo HCV-om podtipa 1b (31,3 %). U svih ispitanika riječ je o supstituciji leucina u fenilalanin na poziciji 159 (L159F) u genu na polimerazu NS5B koja uzrokuje smanjenu osjetljivost na sofosbuvir. U ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a i 3a nije utvrđena prisutnost mutacija povezanih s rezistencijom na ovaj direktno djelujući antivirusni lijek.



### 4.3. Analiza klinički značajne rezistencije na DAA

Kliničku značajnost utvrđenih RAS na DAA iz skupine inhibitora proteaze NS3, inhibitora proteina NS5A i nukleozidnog inhibitora polimeraze NS5B analizirala sam pomoću algoritma *geno2pheno [hcv]*. Pomoću ovog algoritma sve dobivene sekvencije grupirala sam u tri skupine ovisno o prisutnim mutacijama: rezistentnu skupinu (eng. *resistant*, R) koja sadrži dobro karakterizirane mutacije koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju, skupinu sa smanjenom osjetljivošću na neki od DAA (eng. *reduced susceptibility*, RS) koja sadrži mutacije povezane s rezistencijom, ali s nedovoljno ispitanim kliničkim ishodom te skupinu osjetljivu na DAA (eng. *susceptible*, S) koja sadrži supstitucije odnosno mutacije koje nisu povezane s ishodom liječenja. Odredila sam očekivani rezistencijski profil za sve kombinacije utvrđenih RAS i DAA iz skupine inhibitora proteaze NS3 (Tablica 11) i inhibitora proteina NS5A (Tablica 12).

Rezistencijski profili 83 ispitanika s RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju na najmanje jedan DAA iz skupine inhibitora proteina NS3, NS5A ili NS5B prikazani su u Tablici 13. U 61 (73,5 %) ispitanika s klinički značajnom rezistencijom utvrđene su RAS na jednu skupinu DAA, u 20 ispitanika (24,1 %) RAS na dvije skupine DAA, a u dva ispitanika (2,4 %) RAS na sve tri skupine DAA. U oba ispitanika s rezistencijskim mutacijama na sve tri skupine DAA utvrđene su NS5A RAS L31M te NS5B RAS L159F, dok je utvrđena NS3 RAS u jednog ispitanika bila R117H, a u drugog T54S. U ispitanika s rezistencijskim mutacijama na dvije skupine DAA najčešće je uočena istovremena prisutnost NS3 i NS5A RAS (18,1 %), potom NS5A i NS5B RAS (3,6 %) te naposljetku NS3 i NS5B RAS (2,4 %). U 10 (12,0 %) ispitanika s rezistencijskim mutacijama na dvije skupine DAA uočena je istovremena prisutnost NS3 RAS Q80K te NS5B RAS M28V. U ispitanika s klinički značajnim rezistencijskim mutacijama na jednu skupinu RAS mutacije su utvrđene u regiji NS3 (56,6 %) ili regiji NS5A (16,9 %). Mutacije u regiji NS5A nalazile su pretežno na poziciji 93 (Y93H) kod sedam ispitanika (8,4 % ispitanika), odnosno na poziciji 30 (Q30R, R30Q, A30K) kod šest ispitanika (7,2 %) s klinički značajnim RAS na jednu skupinu DAA. Mutacije u regiji NS3 nalazile su se pretežno na poziciji 80 (Q80K) kod 39 ispitanika (47,0 %) s klinički značajnim RAS na jednu skupinu DAA.

**Tablica 11.** Interpretacija klinički značajnog obrasca mutacija povezanih s rezistencijom direktno djelujuće antivirusne lijekove iz skupine inhibitora proteaze NS3.

OBRAZAC MUTACIJA INHIBITOR NS3	T54S	V55A	Y56F	Q80K	R117H	D/Q*168E	D/Q*168K	D/Q*168R	N/T*174F	N/T*174S	
podtip 1a											REZISTENCIJSKI PROFIL
BOC	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	
GLE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
GZR	S	S	RS	S	S	R	S	S	S	S	
PTV	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	
SMV	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	
TPV	RS	RS	S	S	RS	S	S	S	RS	RS	
VOX	S	S	S	RS	S	S	RS	RS	S	S	
podtip 1b											
BOC	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	
GLE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
GZR	S	S	RS	S	S	RS	R	S	S	S	
PTV	S	S	S	S	S	RS	R	S	S	S	
SMV	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	
TPV	RS	RS	S	S	RS	S	S	S	RS	S	
VOX	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
podtip 3a											
BOC	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
GLE	S	S	S	S	S	S	RS	R	S	S	
GZR	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
PTV	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
SMV	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
TPV	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
VOX	S	S	S	RS	S	S	S	S	S	S	

Kazalo - S: osjetljivost; RS: smanjena osjetljivost; R: rezistencija; n/a: nije primjenjivo; BOC: boceprevir; GLE: glecaprevir; GZR: grazoprevir; PTV: paritaprevir; SMV: simeprevir; TPV: telaprevir; VOX: voxilaprevir; \*: D168 i N174 su divlji tipovi aminokiselina u podtipovima 1a i 1b; Q168 i T174 su divlji tipovi aminokiselina u podtipu 3a

**Tablica 12.** Interpretacija klinički značajnog obrasca mutacija povezanih s rezistencijom na direktno djelujuće antivirusne lijekove iz skupine inhibitora proteina NS5A.

OBRAZAC MUTACIJA INHIBITOR NS5A	K/Q/S*24R	M/L*28V	M/L*28T	Q/R/A*30R	Q/R/A*30Q	Q/R/A*30K	L31M	L31I	E/Q/A*62L	Y93H	
podtip 1a											REZISTENCIJSKI PROFIL
DCV	RS	S	S	R	S	R	R	S	S	R	
EBR	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	
LDV	RS	S	R	R	S	R	R	R	S	R	
OBV	S	RS	R	R	S	S	S	S	S	R	
PIB	RS	S	S	RS	S	RS	RS	S	S	RS	
VEL	S	S	S	RS	S	S	S	S	S	R	
podtip 1b											
DCV	S	S	S	S	R	S	RS	RS	S	R	
EBR	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	
LDV	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	
OBV	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	
PIB	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
VEL	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
podtip 3a											
DCV	S	S	S	S	S	R	R	R	RS	R	
EBR	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	
LDV	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	
OBV	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
PIB	S	S	S	S	S	RS	S	S	S	S	
VEL	S	S	S	S	S	RS	RS	S	S	R	

Kazalo - S: osjetljivost; RS: smanjena osjetljivost; R: rezistencija; n/a: nije primjenjivo; DCV: daclatasvir; EBR: elbasvir; LDV: ledipasvir; OBV: ombitasvir; PIB: pibrentasvir; VEL: velpatasvir; \*: K24, M28, Q30 I E62 su divlji tipovi aminokiselina u podtipu 1a; Q24, L28, R30, Q62 su divlji tipovi aminokiselina u podtipu 1b; S24, M28, A30, A62 su divlji tipovi aminokiselina u podtipu 3a

**Tablica 13.** Rezistencijski profili svih ispitanika s utvrđenim klinički značajnim supstitucijama na najmanje jedan direktno djelujući antivirusni lijek iz skupine inhibitora proteina NS3, NS5A ili NS5B.

Broj ispitanika	Podtip HCV-a	NS3 RAS <sup>†</sup>	NS5A RAS <sup>†</sup>	NS5B RAS <sup>†</sup>	Rezistencija na inhibitore proteaze NS3	Rezistencija na inhibitore proteina NS5A	Rezistencija na nukleozidne inhibitore polimeraze NS5B
1	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
2	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
3	1a	<b>Q80K, N174S</b>	<b>L31M</b>	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	R (DCV, EBR, LDV) + RS (PIB)	S
4	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
5	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
6	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
7	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
8	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
9	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
10	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
11	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
12	1a	<b>Q80K, N174S</b>	M28V	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	RS (OBV)	S
13	1a	<b>Q80K, V55A, N174S</b>	/	/	R (BOC,SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
14	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
15	1a	<b>Q80K, V55A, N174S</b>	/	/	R (BOC,SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
16	1a	/	<b>Q30R</b>	/	S	R (DCV, EBR, LDV, OBV) + RS (PIB,VEL)	S
17	1a	<b>Q80K</b>	M28V	/	R (SMV) + RS (VOX)	RS (OBV)	S
18	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
19	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S

20	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
21	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
22	1a	<b>T54S</b>	/	/	R (BOC) + RS (TPV)	S	S
23	1a	<b>T54S</b>	/	/	R (BOC) + RS (TPV)	S	S
24	1a	<b>Q80K, R117H</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
25	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
26	1a	<b>Q80K</b>	M28V	/	R (SMV) + RS (VOX)	RS (OBV)	S
27	1a	<b>Q80K, T54S</b>	/	/	R (BOC, SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
28	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
29	1a	<b>Q80K</b>	M28V	/	R (SMV) + RS (VOX)	RS (OBV)	S
30	1a	D186E	/	/	R (GZR, PTV, SMV)	S	S
31	1a	<b>Q80K, N174S</b>	M28V	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	RS (OBV)	S
32	1a	<b>Q80K</b>	M28V	/	R (SMV) + RS (VOX)	RS (OBV)	S
33	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
34	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
35	1a	/	<b>Q30R</b>	/	S	R (DCV, EBR, LDV, OBV) + RS (PIB, VEL)	S
36	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
37	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
38	1a	/	<b>Q30R</b>	/	S	R (DCV, EBR, LDV, OBV) + RS (PIB, VEL)	S
39	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
40	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
41	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S

42	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
43	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
44	1a	<b>Q80K</b>	M28V	/	R (SMV) + RS (VOX)	RS (OBV)	S
45	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
46	1a	<b>V55A</b>	/	/	R (BOC) + RS (TPV)	S	S
47	1a	<b>Q80K, 174S, R117H</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
48	1a	<b>Q80K</b>	<b>M28T</b>	/	R (SMV) + RS (VOX)	R (EBR, LDV, OBV)	S
49	1a	<b>Q80K, N174S</b>	M28V	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	RS (OBV)	S
50	1a	<b>V55A, Q80K, N174S</b>	/	/	R (BOC, SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
51	1a	<b>Q80K, N174S</b>	M28V	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	RS (OBV)	S
52	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
53	1a	<b>V55A, Q80K, N174S</b>	/	/	R (BOC, SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
54	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
55	1a	<b>V55A, Q80K, N174S</b>	/	/	R (BOC, SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
56	1a	<b>V55A</b>	/	/	R (BOC) + RS (TPV)	S	S
57	1a	<b>T54S, N174S</b>	/	/	R (BOC) + RS (TPV)	S	S
58	1a	<b>Q80K, N174S</b>	/	/	R (SMV) + RS (TPV, VOX)	S	S
59	1a	<b>V55A, Q80K, N174S</b>	M28V	/	R (BOC, SMV) + RS (TPV, VOX)	RS (OBV)	S
60	1a	<b>Q80K</b>	/	/	R (SMV) + RS (VOX)	S	S
61	1b	R117H	<b>L31M</b>	L159F	RS (TPV)	R (EBR, LDV) + RS (DCV)	RS (SOF)
62	1b	<b>T54S</b>	<b>L31M</b>	L159F	R (BOC) + RS (TPV)	R (EBR, LDV) + RS (DCV)	RS (SOF)
63	1b	<b>T54S</b>	/	/	R (BOC) + RS (TPV)	S	S
64	1b	/	<b>Y93H</b>	L159F	S	R (DCV, EBR, LDV, OBV, VEL)	RS (SOF)

65	1b	<b>N174F</b>	/	L159F	R (BOC) + RS (TPV)	S	RS (SOF)
66	1b	Y56F	<b>Y93H</b>	/	RS (GZR)	R (DCV, EBR, LDV, OBV, VEL)	S
67	1b	Y56F	<b>L31M</b>	/	RS (GZR)	R (EBR, LDV) + RS (DCV)	S
68	1b	Y56F	<b>L31M</b>	/	RS (GZR)	R (EBR, LDV) + RS (DCV)	S
69	1b	/	<b>Y93H</b>	/	S	R (DCV, EBR, LDV, OBV, VEL)	S
70	1b	/	<b>Y93H</b>	/	S	R (DCV, EBR, LDV, OBV, VEL)	S
71	1b	/	<b>Y93H</b>	/	S	R (DCV, EBR, LDV, OBV, VEL)	S
72	1b	/	<b>Y93H, L31I</b>	/	S	R (DCV, EBR, LDV, OBV, VEL)	S
73	1b	/	<b>R30Q</b>	/	S	R (DCV, OBV)	S
74	1b	/	<b>R30Q</b>	/	S	R (DCV, OBV)	S
75	1b	/	<b>Y93H, R30Q</b>	L159F	S	R (DCV, EBR, LDV, OBV, VEL)	RS (SOF)
76	1b	/	<b>Y93H, R30Q, L31I</b>	/	S	R (DCV, EBR, LDV, OBV, VEL)	S
77	1b	<b>V55A</b>	/	L159F	R (BOC) + RS (TPV)	S	RS (SOF)
78	1b	/	<b>Y93H</b>	/	S	R (DCV, EBR, LDV, OBV, VEL)	S
79	1b	/	<b>R30Q</b>	L159F	S	R (DCV, OBV)	RS (SOF)
80	3a	<b>Q186R</b>	/	/	R (GLE)	S	S
81	3a	/	<b>Y93H</b>	/	S	R (DCV, EBR, LDV, VEL)	S
82	3a	/	<b>A30K</b>	/	S	R (DCV, EBR, LDV) + RS (PIB, VEL)	S
83	3a	/	<b>Y93H</b>	/	S	R (DCV, EBR, LDV, VEL)	S

Kazalo - RAS: supstitucije povezane s rezistencijom; S: osjetljivost; RS: smanjena osjetljivost; R: rezistencija; BOC: bocaprevir; GLE: glecaprevir; GZR: grazoprevir; PTV: paritaprevir; SMV: simeprevir; TPV: telaprevir; VOX: voxilaprevir; DCV: daclatasvir; EBR: elbasvir; LDV: ledipasvir; OBV: ombitasvir; PIB: pibrentasvir; VEL: velpatasvir; SOF: sofosbuvir; †: RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju otisnute su podebljano

#### 4.4. Filogenetska analiza

Nakon obrade sekvencija dobivenih Sangerovim sekvenciranjem za filogenetske i filodinamičke analize konačna duljina sekvencija regije NS3 bila je 543 nukleotida (kodoni 1 – 181) koja odgovara nukleotidnim položajima od 3420 do 3962 referentnog genoma H77 (*GenBank* pristupni broj: AF009606). Konačna duljina sekvencija regije NS5A bila je 639 nukleotida (kodoni 1 – 213) koja odgovara nukleotidnim položajima od 6258 do 6896 referentnog genoma H77 (*GenBank* pristupni broj: AF009606). Konačna duljina sekvencija regije NS5B bila je 1455 nukleotida (kodoni 38 – 522) koja odgovara nukleotidnim položajima od 7713 do 9167 referentnog genoma H77 (*GenBank* pristupni broj: AF009606). Sve dobivene sekvencije pohranila sam u bazu podataka *GenBank* pod pristupnim brojevima OM312065 – OM312964. Konačan broj sekvenci za odgovarajući podtip HCV-a i analiziranu regiju virusnog genoma nakon dodavanja referentnih sekvencija navedenih u poglavlju 3.2.4.1. te kontrolnih sekvencija i sekvencija za ukorjenjivanje filogenetskih stabala odabranih na način opisan u poglavlju 3.2.4.2. prikazan je u Tablici 14.

**Tablica 14.** Broj sekvencija korišten za filogenetske analize pojedinih regija virusnog genoma.

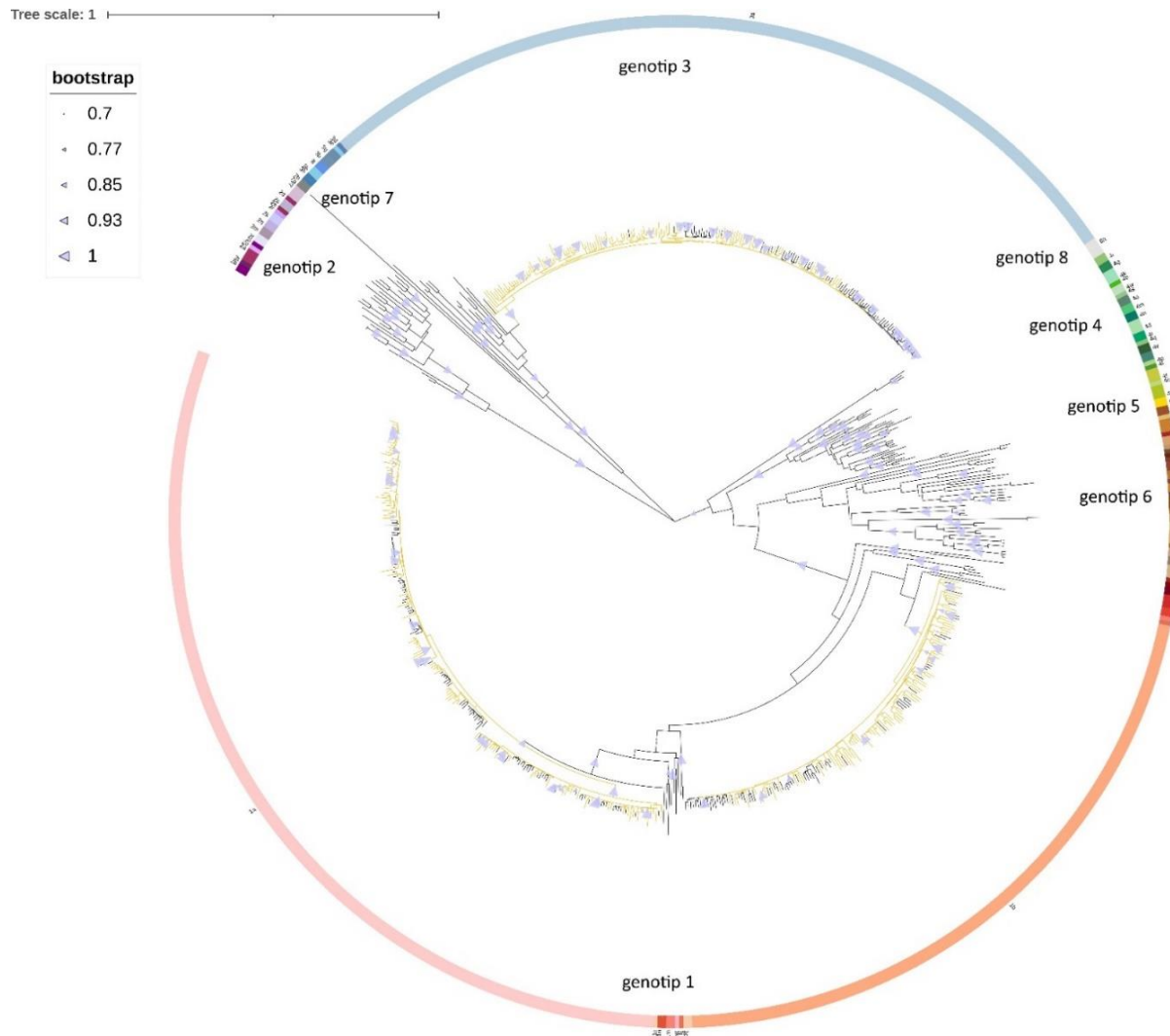
Regija genoma	NS3 (n)	NS5A (n)	NS5B (n)
Podtip HCV-a			
1a	221	358	250
1b	159	201	172
3a	199	299	166

Kazalo - HCV: virus hepatitisa C; n: broj sekvencija

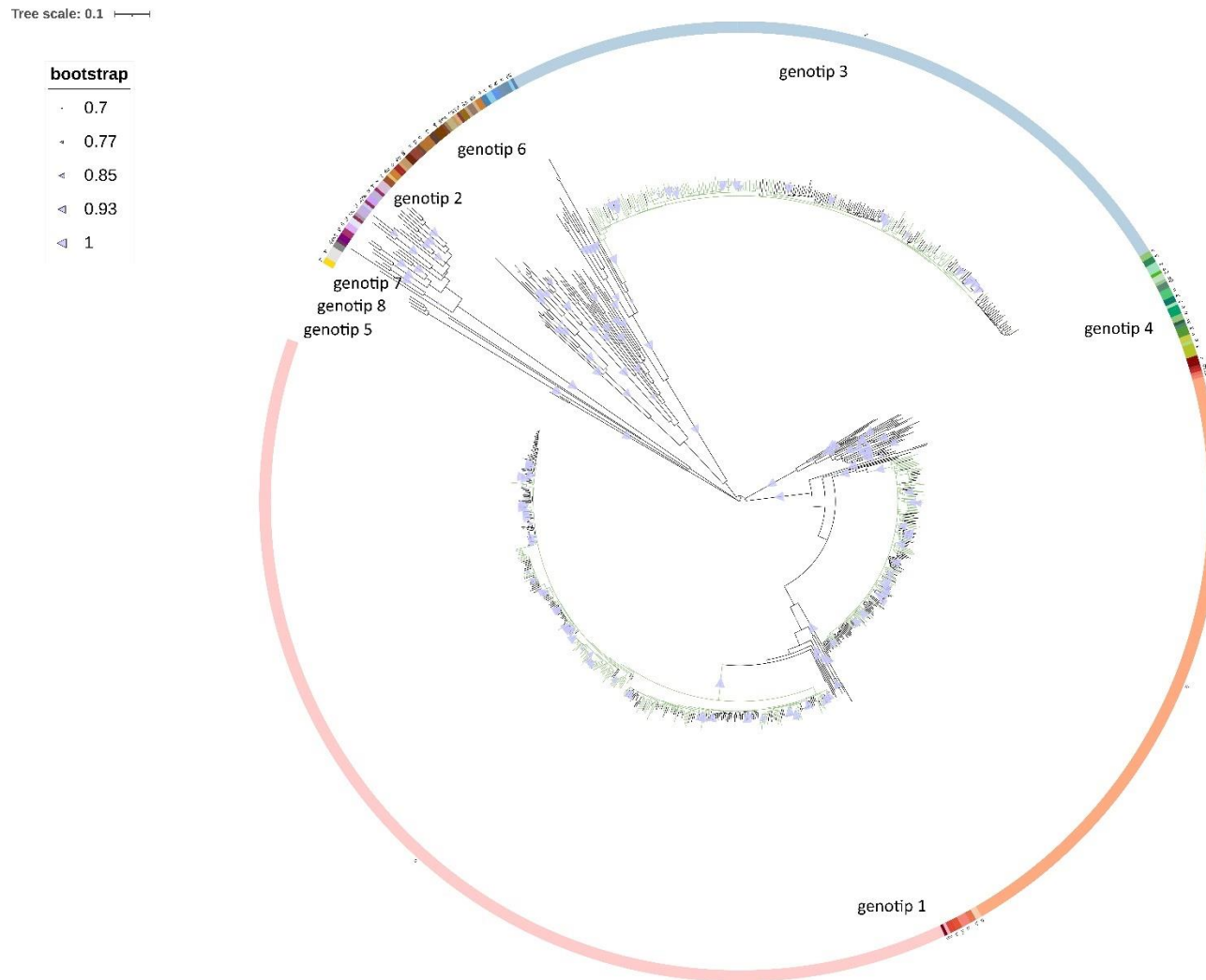
Tri dodatne skupine podataka za svaku regiju kreirane u svrhu potvrđne genotipizacije dobivenih sekvencija s dodane 153 referentne sekvencije svih poznatih genotipova i podtipova HCV-a sadržavale su ukupno 708 sekvencija regije NS3, 917 sekvencija regije NS5A te 715 sekvencija regije NS5B. Kao najvjerojatniji supstitucijski model objedinjene skupine podataka NS3, NS5A i NS5B pokazao se model GTR + G + I. U izradi ovih filogenetskih stabala koristila sam filogramski prikaz koji prikazuje stvarnu duljinu grana, odnosno broj genskih promjena (supstitucija po nukleotidnom mjestu) između sekvencija. Iz topologije filogenetskih stabala objedinjene skupine podataka NS3 (Slika 20), NS5A (Slika 21) i NS5B (Slika 22) jasno je vidljivo kako se 109 dobivenih sekvencija grupira isključivo uz referentne sekvencije podtipa 1a, 80 dobivenih sekvencija uz referentne sekvencije podtipa 1b, a 111 dobivenih sekvencija uz referentne sekvencije podtipa 3a uz



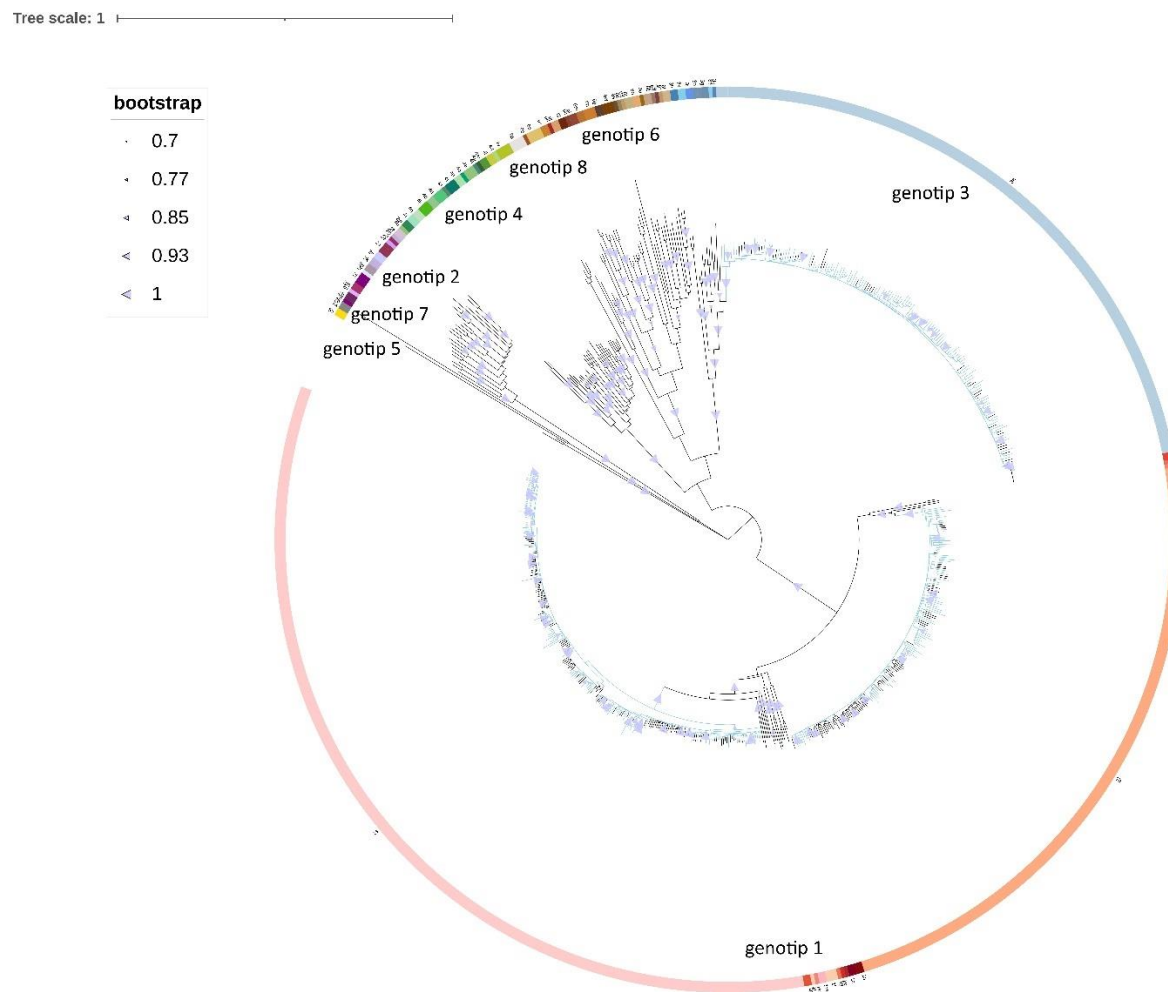
podršku grananja veću od 70 %. Uočljivo je kako se dobivene i kontrolne sekvencije podtipa 1a na filogenetskim stablima svih regija smještaju na dvije različite grane filogenetskog stabla unutar podtipa 1a. Dobivene i referentne sekvencije svih podtipova istog genotipa smještaju se na blisko povezane grane stabla što upućuje da su međusobno srodne. Kako bih ispitala filogenetsku povezanost dobivenih sekvencija u okviru rezistencije na DAA pojedinih skupina te epidemiološku povezanost ispitanika napravila sam zasebna filogenetska stabla za svaki podtip i regiju virusnog genoma. U izradi ovih filogenetskih stabala koristila sam kladogramski prikaz kako bi topologija stabala bila jasnije razlučiva.



**Slika 20.** Filogenetsko stablo gena NS3 virusa hepatitisa C izrađeno metodom najveće vjerojatnosti pomoću supstitucijskog modela GTR + G + I uz 1000 pseudoreplikacija. Skala predstavlja 1 nukleotidnu supstituciju po mjestu. *Bootstrap* vrijednosti između 70 % i 100 % prikazane su na čvorovima kao ljubičasti trokuti s veličinom proporcionalnom jačini podrške grananja. Grane referentnih i kontrolnih sekvencija obojane su crno, a grane dobivenih sekvencija žuto. Genotipovi i podtipovi HCV-a označeni su različitim bojama odnosno nijansama iste boje.



**Slike 21.** Filogenetsko stablo gena NS5A virusa hepatitisa C izrađeno metodom najveće vjerojatnosti pomoću supstitucijskog modela GTR + G + I uz 1000 pseudoreplikacija. Skala predstavlja 0,1 nukleotidnu supstituciju po mjestu. *Bootstrap* vrijednosti između 70 % i 100 % prikazane su na čvorovima kao ljubičasti trokuti s veličinom proporcionalnom jačini podrške grananja. Grane referentnih i kontrolnih sekvencija obojane su crno, a grane dobivenih sekvencija zeleno. Genotipovi i podtipovi HCV-a označeni su različitim bojama odnosno nijansama iste boje.

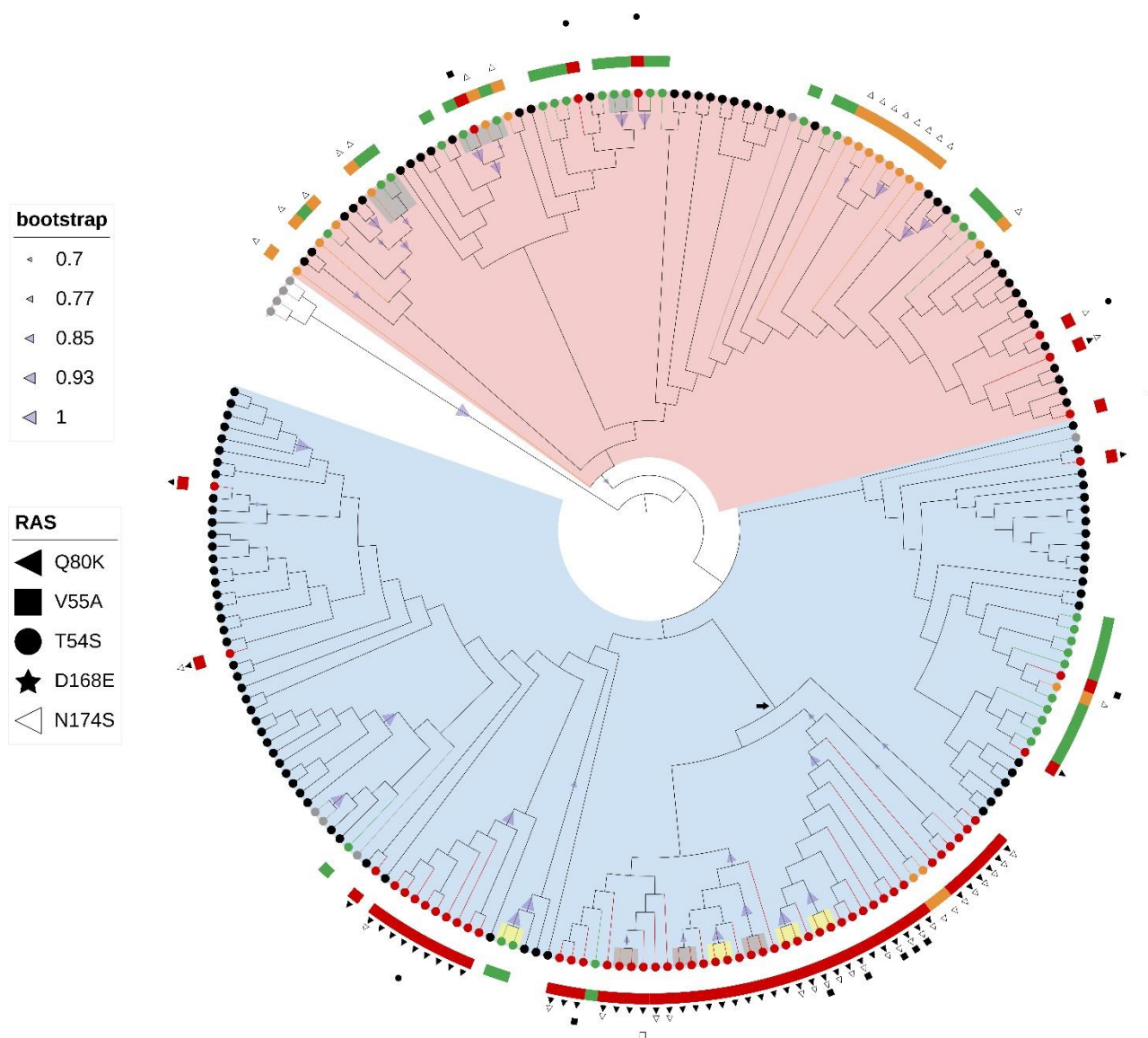


**Slike 22.** Filogenetsko stablo gena NS5B virusa hepatitisa C izrađeno metodom najveće vjerojatnosti pomoću supstitucijskog modela GTR + G + I uz 1000 pseudoreplikacija. Skala predstavlja 1 nukleotidnu supstituciju po mjestu. *Bootstrap* vrijednosti između 70 % i 100 % prikazane su na čvorovima kao ljubičasti trokuti s veličinom proporcionalnom jačini podrške grananja. Grane referentnih i kontrolnih sekvencija obojane su crno, a grane dobivenih sekvencija plavo. Genotipovi i podtipovi HCV-a označeni su različitim bojama odnosno nijansama iste boje.

#### **4.4.1. Filogenetska analiza sekvencija podtipa 1a (N = 109)**

##### **4.4.1.1. Filogenetska analiza sekvencija regije NS3 podtipa 1a**

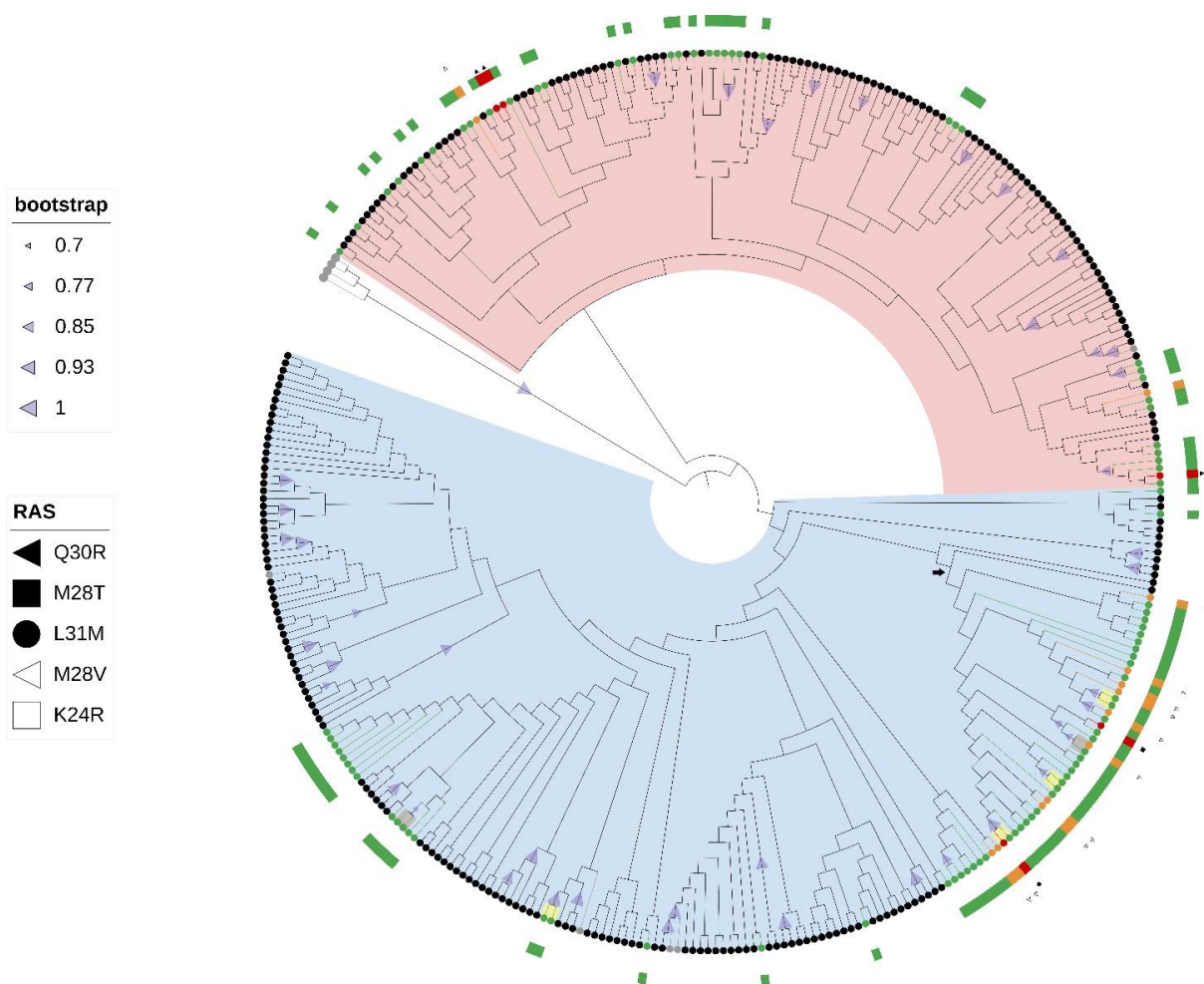
Kao najvjerojatniji supstitucijski model skupine podataka koja sadrži sekvencije regije NS3 kod 109 ispitanika zaraženih podtipom 1a pokazao se model GTR + G + I. Filogenetsko stablo sekvencija gena NS3 podtipa 1a pokazuje kako se sve sekvencije grupiraju u dva kladija – kladij I u koji se svrstavaju sekvencije 68 ispitanika (62,4 %) i kladij II u koji se svrstavaju sekvencije 41 ispitanika (37,6 %). U 54 (79,4 %) sekvencije koje pripadaju kladiju I i 21 (51,2 %) sekvenciji koje pripadaju kladiju II podtipa 1a uočene su rezistencijske mutacije. Prisutnost klinički značajnih rezistencijskih mutacija otkrivena je u 51 (75,0 %) sekvenciji kladija I te šest (14,6%) sekvencija kladija II. Nadalje, supstitucija Q80K koja je dominantna mutacija u regiji NS3 uočena je u 73,5 % ispitanika zaraženih kladijem I podtipa 1a HCV-a i samo 2,4 % ispitanika zaraženih kladijem II podtipa 1a HCV-a. Kladij I karakterizira grupiranje sekvencija 39 istih ispitanika na sestrinskim granama filogenetskih stabala svih analiziranih gena podtipa 1a, kod kojih su uočene rezistencijske mutacije u regiji NS3 većine ispitanika (97,4 %). Na filogenetskom stablu dobivenom pomoću sekvencija regije NS3 uočeno je 11 transmisijskih parova, odnosno klastera među ispitanicima, od čega je postojanje četiri transmisijska para s ukupno osam ispitanika (7,3 %) podržano na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 1a (Slika 23).



**Slika 23.** Filogenetsko stablo sekvencija gena NS3 virusa hepatitisa C podtipa 1a izrađeno metodom najveće vjerojatnosti pomoću supstitucijskog modela GTR + G + I uz 1000 pseudoreplikacija. *Bootstrap* vrijednosti između 70 % i 100 % prikazane su na čvorovima kao ljubičasti trokuti s veličinom proporcionalnom stupnju podrške grananja. Grane referentnih sekvencija obojane su sivo, grane kontrolnih sekvencija crno, a grane dobivenih sekvencija različitim bojama ovisno o prisutnosti mutacija povezanih s rezistencijom (RAS) na najmanje jedan inhibitor proteaze NS3 (crveno - rezistencija, narančasto - smanjena osjetljivost, zeleno - osjetljivost). Kladij I osjenčan je plavo, a kladij II ružičasto. Uočeni transmisijski parovi, odnosno klasteri, među ispitanicima osjenčani su sivo ukoliko je njihovo postojanje podržano samo na danom stablu, odnosno žuto ukoliko se javljaju na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 1a. Skupina 39 ispitanika na sestrinskim granama filogenetskog stabla označena je strelicom. Uz pripadajuće sekvencije punim simbolom označene su utvrđene RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju, a praznim simbolom utvrđene RAS koje uzrokuju smanjenu osjetljivost na najmanje jedan inhibitor proteaze NS3.

#### 4.4.1.2. Filogenetska analiza sekvencija regije NS5A podtipa 1a

Najvjerojatnijim supstitucijskim modelom skupine podataka koja sadrži sekvencije regije NS5A kod 109 ispitanika zaraženih podtipom 1a pokazao se model T92 + G + I. Filogenetsko stablo sekvencija gena NS5A podtipa 1a pokazuje kako se sve sekvencije grupiraju u dva kladija – kladij I u koji se svrstavaju sekvencije 68 ispitanika (62,4 %) i kladij II u koji se svrstavaju sekvencije 41 ispitanika (37,6 %). U 12 (17,6 %) sekvencija koje pripadaju kladiju I i pet (12,2 %) sekvencija koje pripadaju kladiju II uočene su rezistencijske mutacije. Prisutnost klinički značajnih rezistencijskih mutacija otkrivena je u dvije (2,9 %) sekvencije kladija I te tri (7,3 %) sekvencije kladija II. Kladij I karakterizira grupiranje sekvencija 39 istih ispitanika na filogenetskim stablima svih analiziranih gena, kod kojih je uočena većina NS5A RAS utvrđenih u kladiju I (25,6 %). Na filogenetskom stablu dobivenom pomoću sekvencija regije NS5A uočeno je šest transmisijskih parova među ispitanicima, od čega je postojanje četiri transmisijska para s ukupno osam ispitanika (7,3 %) podržano na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 1a (Slika 24).



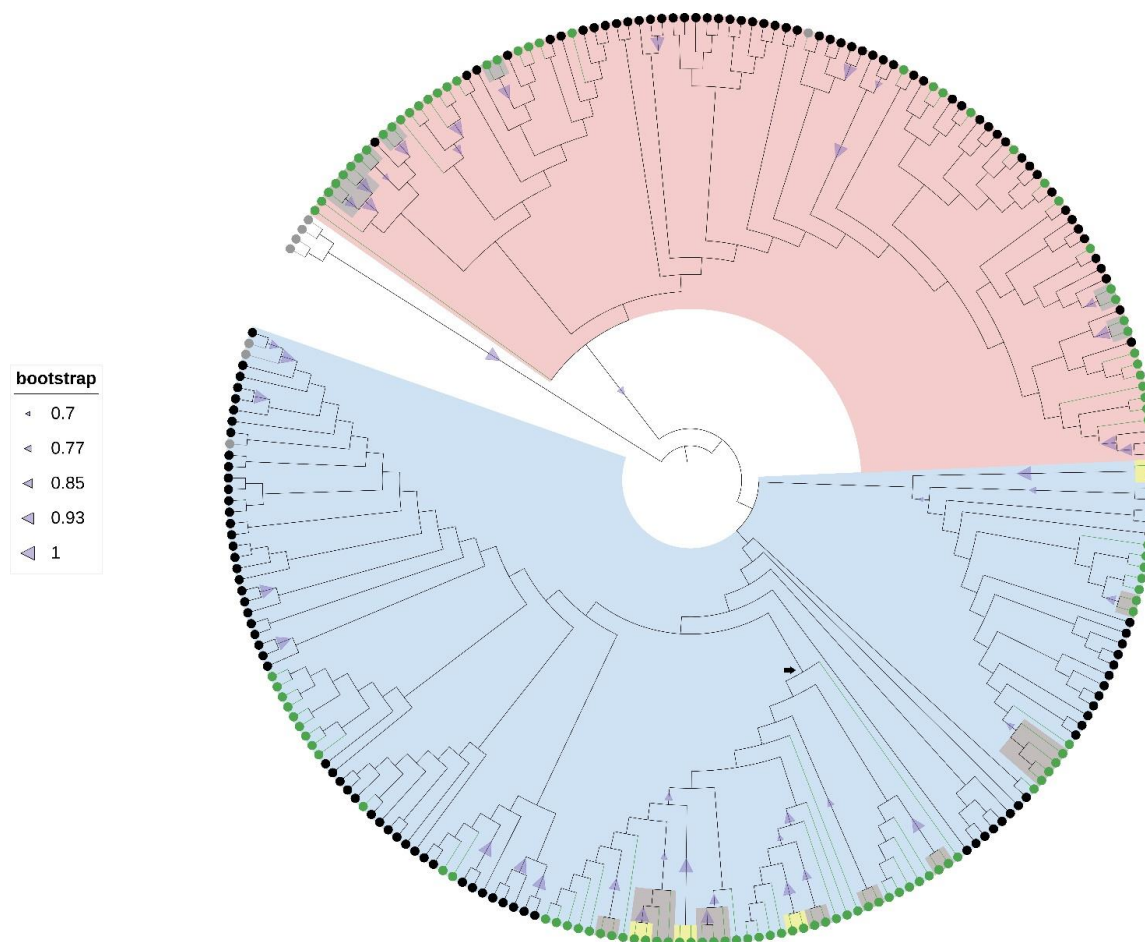
**Slika 24.** Filogenetsko stablo sekvencija gena NS5A virusa hepatitisa C podtipa 1a izrađeno metodom najveće vjerojatnosti pomoću supstitucijskog modela T92 + G + I uz 1000 pseudoreplikacija. *Bootstrap* vrijednosti između 70 % i 100 % prikazane su na čvorovima kao ljubičasti trokuti s veličinom proporcionalnom stupnju podrške grananja. Grane referentnih sekvencija obojane su sivo, grane kontrolnih sekvencija crno, a grane dobivenih sekvencija različitim bojama ovisno o prisutnosti mutacija povezanih s rezistencijom (RAS) na najmanje jedan inhibitor proteina NS5A (crveno - rezistencija, narančasto - smanjena osjetljivost, zeleno - osjetljivost). Kladij I osjenčan je plavo, a kladij II ružičasto. Uočeni transmisivski parovi među ispitanicima osjenčani su sivo ukoliko je njihovo postojanje podržano samo na danom stablu, odnosno žuto ukoliko se javljaju na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 1a. Skupina 39 ispitanika na sestrinskim granama filogenetskog stabla označena je strelicom. Uz pripadajuće sekvencije punim simbolom označene su utvrđene RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju, a praznim simbolom utvrđene RAS koje uzrokuju smanjenu osjetljivost na najmanje jedan inhibitor proteina NS5A.

#### 4.4.1.3. Filogenetska analiza sekvencija regije NS5B podtipa 1a

Supstitucijski model GTR + G + I pokazao se najvjernijim za opisivanje skupine podataka koja sadrži sekvencije regije NS5B kod 109 ispitanika zaraženih podtipom 1a. Filogenetsko stablo sekvencija gena NS5B podtipa 1a pokazuje kako se sve sekvencije grupiraju u dva kladija – kladij I u koji se svrstavaju sekvencije 68 ispitanika (62,4 %) i kladij II u koji se svrstavaju sekvencije 41



ispitanika (37,6 %). Kladij I karakterizira grupiranje sekvencija 39 istih ispitanika na filogenetskim stablima svih analiziranih gena, a niti u jednom kladiju nisu uočene NS5B RAS. Na filogenetskom stablu dobivenom pomoću sekvencija regije NS5B uočeno je 17 transmisivskih parova, odnosno klastera među ispitanicima, od čega je postojanje četiri transmisivska para s ukupno osam ispitanika (7,3 %) podržano na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 1a (Slika 25).

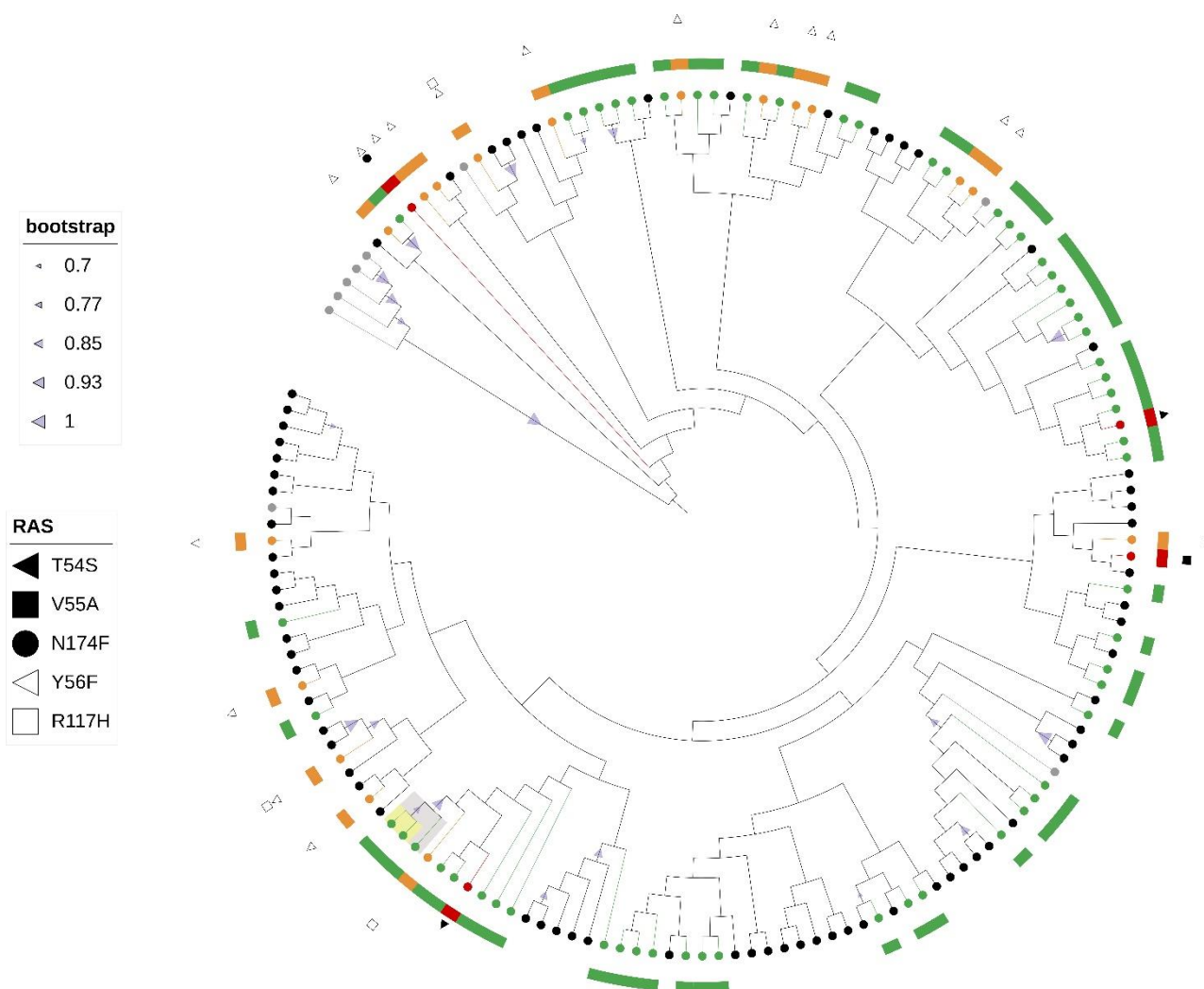


**Slika 25.** Filogenetsko stablo sekvencija gena NS5B virusa hepatitisa C podtipa 1a izrađeno metodom najveće vjerojatnosti pomoću supstitucijskog modela GTR + G + I uz 1000 pseudoreplikacija. *Bootstrap* vrijednosti između 70 % i 100 % prikazane su na čvorovima kao ljubičasti trokuti s veličinom proporcionalnom stupnju podrške grananja. Grane referentnih sekvencija obojane su sivo, grane kontrolnih sekvencija crno, a grane dobivenih sekvencija različitim bojama ovisno o prisutnosti mutacija povezanih s rezistencijom (RAS) na najmanje jedan inhibitor polimeraze NS5B (crveno - rezistencija, narančasto - smanjena osjetljivost, zeleno - osjetljivost). Kladij I osjenčan je plavo, a kladij II ružičasto. Uočeni transmisivski parovi, odnosno klasteri, među ispitanicima osjenčani su sivo ukoliko je njihovo postojanje podržano samo na danom stablu, odnosno žuto ukoliko se javljaju na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 1a. Skupina 39 ispitanika na sestrinskim granama filogenetskog stabla označena je strelicom.

#### **4.4.2. Filogenetska analiza sekvencija podtipa 1b (N = 80)**

##### **4.4.2.1. Filogenetska analiza sekvencija regije NS3 podtipa 1b**

Za skupinu podataka koja sadrži sekvencije regije NS3 kod 80 ispitanika zaraženih podtipom 1b najvjerojatnijim supstitucijskim modelom pokazao GTR + G + I. Topologija filogenetskog stabla sekvencija gena NS3 podtipa 1b pokazuje njihovu jednoliku zastupljenost na različitim granama bez izraženog grupiranja ili formiranja kladija. Jednako tako, dobivene sekvencije raspodijeljene su jednoliko na filogenetskom stablu neovisno o prisutnosti rezistencijskih mutacija. Na filogenetskom stablu dobivenom pomoću sekvencija regije NS3 uočen je jedan transmisijski par, odnosno klaster među ispitanicima s ukupno dva ispitanika (2,5 %) čije je postojanje podržano na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 1b (Slika 26).

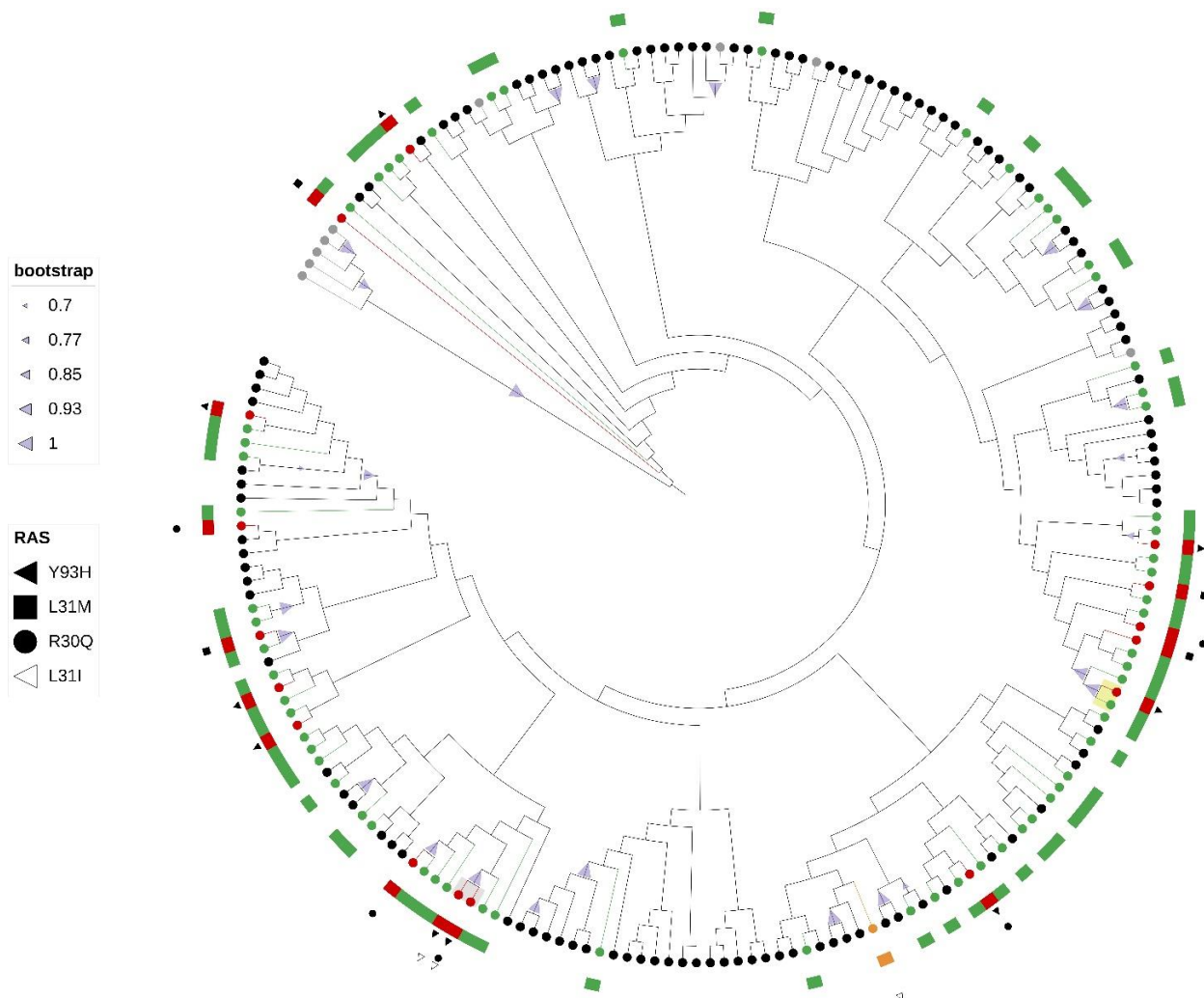


**Slika 26.** Filogenetsko stablo sekvencija gena NS3 virusa hepatitisa C podtipa 1b izrađeno metodom najveće vjerojatnosti pomoću supstitucijskog modela GTR + G + I uz 1000 pseudoreplikacija. *Bootstrap* vrijednosti između 70 % i 100 % prikazane su na čvorovima kao ljubičasti trokuti s veličinom proporcionalnom stupnju podrške grananja. Grane referentnih sekvencija obojane su sivo, grane kontrolnih sekvencija crno, a grane dobivenih sekvencija različitim bojama ovisno o prisutnosti mutacija povezanih s rezistencijom (RAS) na najmanje jedan inhibitor proteaze NS3 (crveno - rezistencija, narančasto - smanjena osjetljivost, zeleno - osjetljivost). Uočeni transmisivski parovi, odnosno klasteri, među ispitanicima osjenčani su sivo ukoliko je njihovo postojanje podržano samo na danom stablu, odnosno žuto ukoliko se javljaju na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 1b. Uz pripadajuće sekvencije punim simbolom označene su utvrđene RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju, a praznim simbolom utvrđene RAS koje uzrokuju smanjenu osjetljivost na najmanje jedan inhibitor proteaze NS3.

#### 4.4.2.2. Filogenetska analiza sekvencija regije NS5A podtipa 1b

Najvjerojatnijim supstitucijski modelom skupine podataka koja sadrži sekvencije regije NS5A kod 80 ispitanika zaraženih podtipom 1b pokazao se model T92 + G + I. Topologija filogenetskog stabla sekvencija gena NS5A podtipa 1b pokazuje njihovu jednoliku zastupljenost na različitim granama bez izraženog grupiranja ili formiranja kladija. Jednako tako, dobivene sekvencije

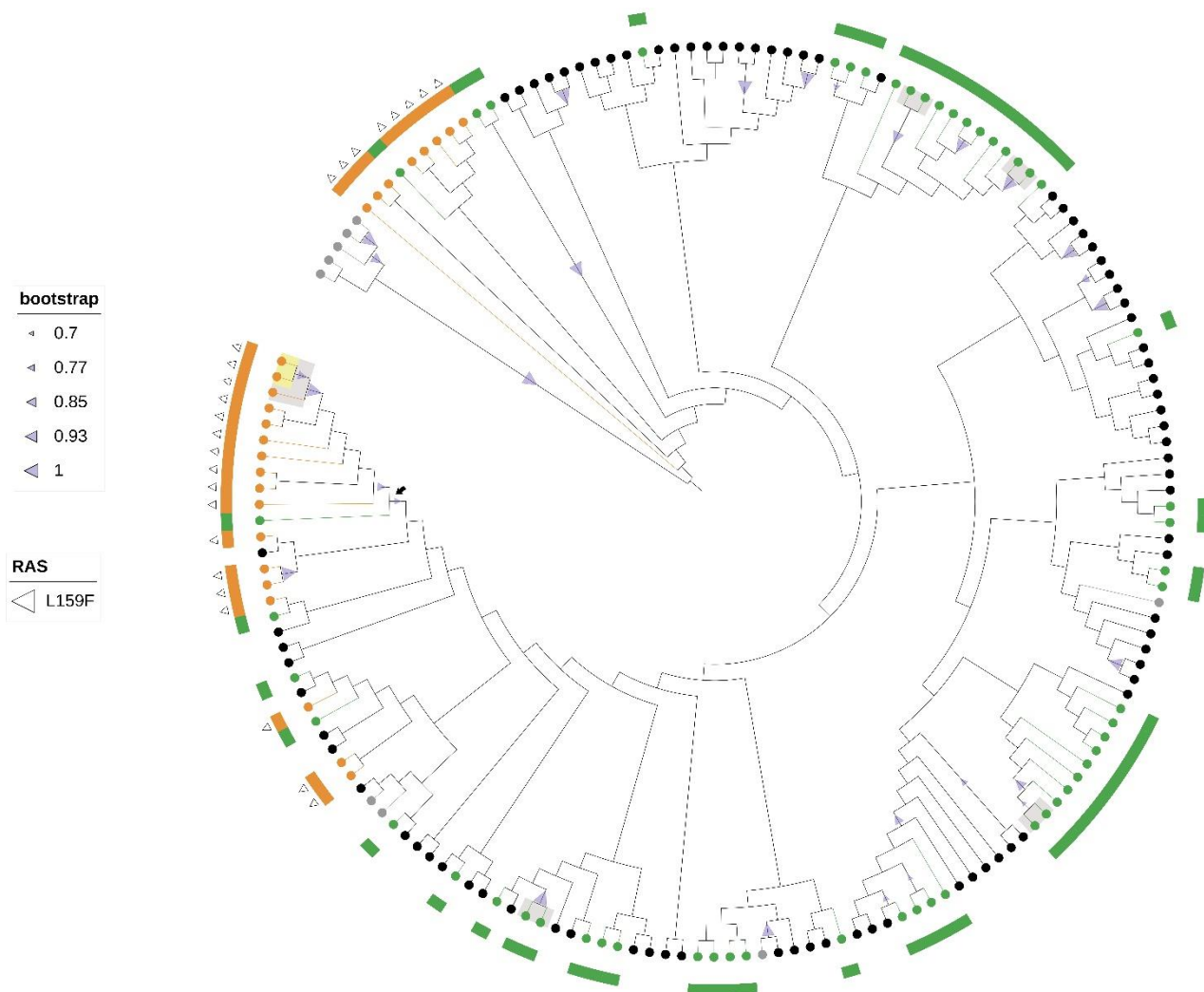
raspodijeljene su jednoliko na filogenetskom stablu neovisno o prisutnosti rezistencijskih mutacija. Na filogenetskom stablu dobivenom pomoću sekvencija regije NS5A uočena su dva transmisijska para među ispitanicima, od čega je postojanje jednog transmisijskog para s ukupno dva ispitanika (2,5 %) podržano na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 1b (Slika 27).



**Slika 27.** Filogenetsko stablo sekvencija gena NS5A virusa hepatitisa C podtipa 1b izrađeno metodom najveće vjerojatnosti pomoću supstitucijskog modela T92 + G + I uz 1000 pseudoreplikacija. *Bootstrap* vrijednosti između 70 % i 100 % prikazane su na čvorovima kao ljubičasti trokuti s veličinom proporcionalnom stupnju podrške grananja. Grane referentnih sekvencija obojane su sivo, grane kontrolnih sekvencija crno, a grane dobivenih sekvencija različitim bojama ovisno o prisutnosti mutacija povezanih s rezistencijom (RAS) na najmanje jedan inhibitor proteina NS5A (crveno - rezistencija, narančasto - smanjena osjetljivost, zeleno - osjetljivost). Uočeni transmisijski parovi među ispitanicima osjenčani su sivo ukoliko je njihovo postojanje podržano samo na danom stablu, odnosno žuto ukoliko se javljaju na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 1b. Uz pripadajuće sekvencije punim simbolom označene su utvrđene RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju, a praznim simbolom utvrđene RAS koje uzrokuju smanjenu osjetljivost na najmanje jedan inhibitor proteina NS5A.

#### **4.4.2.3. Filogenetska analiza sekvencija regije NS5B podtipa 1b**

Supstitucijski model K2 + G + I pokazao se najvjernijim za opisivanje skupine podataka koja sadrži sekvencije regije NS5B kod 80 ispitanika zaraženih podtipom 1b. Topologija filogenetskog stabla sekvencija gena NS5B podtipa 1b pokazuje njihovu jednoliku zastupljenost na različitim granama bez izraženog grupiranja odnosno formiranja kladija. Jednako tako, dobivene sekvencije raspodijeljene su jednoliko na filogenetskom stablu u odnosu na kontrolne sekvencije, pri čemu se 11 sekvencija (10 sekvencija s mutacijom L156F te jedna bez NS5B RAS) grupira na sestrinskim granama filogenetskog stabla s podrškom većom od 70 %. Na filogenetskom stablu dobivenom pomoću sekvencija NS5B uočeno je pet transmisijska parova, odnosno klastera među ispitanicima, od čega je postojanje jednog transmisijskog para s ukupno dva ispitanika (2,5 %) podržano na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 1b (Slika 28).

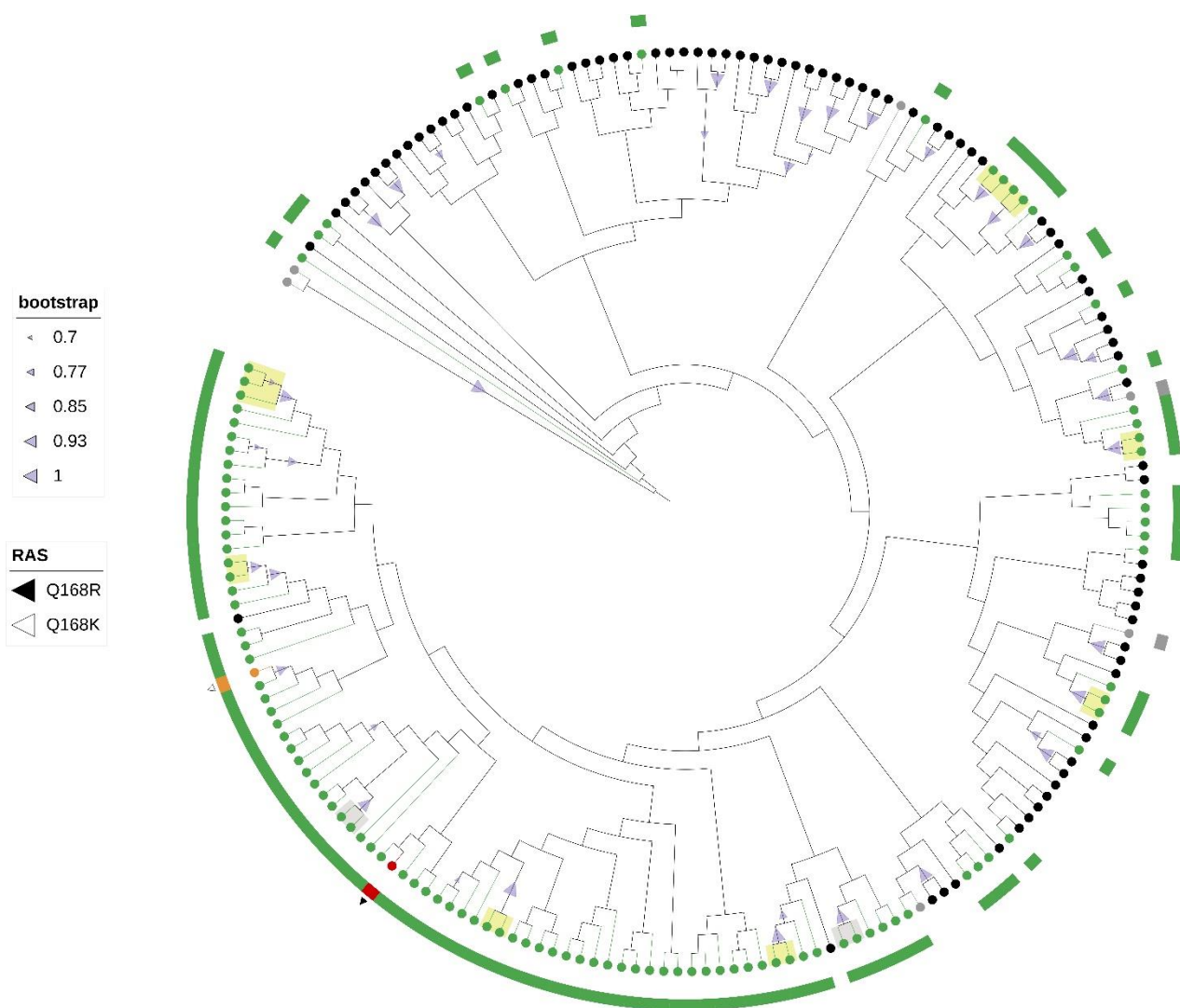


**Slika 28.** Filogenetsko stablo sekvencija gena NS5B virusa hepatitisa C podtipa 1b izrađeno metodom najveće vjerojatnosti pomoću supstitucijskog modela K2 + G + I uz 1000 pseudoreplikacija. *Bootstrap* vrijednosti između 70 % i 100 % prikazane su na čvorovima kao ljubičasti trokuti s veličinom proporcionalnom stupnju podrške grananja. Grane referentnih sekvencija obojane su sivo, grane kontrolnih sekvencija crno, a grane dobivenih sekvencija različitim bojama ovisno o prisutnosti mutacija povezanih s rezistencijom (RAS) na najmanje jedan inhibitor polimeraze NS5B (crveno - rezistencija, narančasto - smanjena osjetljivost, zeleno - osjetljivost). Uočeni transmisivski parovi, odnosno klasteri među ispitanicima osjenčani su sivo ukoliko je njihovo postojanje podržano samo na danom stablu, odnosno žuto ukoliko se javljaju na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 1b. Skupina 11 ispitanika na sestrinskim granama filogenetskog stabla označena je strelicom. Uz pripadajuće sekvencije praznim simbolom označene su utvrđene RAS koje uzrokuju smanjenu osjetljivost na najmanje jedan inhibitor polimeraze NS5B.

### **4.4.3. Filogenetska analiza sekvencija podtipa 3a (N = 111)**

#### **4.4.3.1. Filogenetska analiza sekvencija regije NS3 podtipa 3a**

Najvjerojatnijim supstitucijskim modelom skupine podataka koja sadrži sekvencije regije NS3 kod 111 ispitanika zaraženih podtipom 3a pokazao se model K2 + G + I. Topologija filogenetskog stabla sekvencija gena NS3 podtipa 3a pokazuje njihovu jednoliku zastupljenost na različitim granama bez izraženog grupiranja ili formiranja kladija. Dobivene sekvencije nisu raspodijeljene jednoliko na filogenetskom stablu u odnosu na kontrolne sekvencije, odnosno svrstavaju se pretežno na sestrinske grane. Na filogenetskom stablu dobivenom pomoću sekvencija regije NS3 uočeno je 10 transmisijskih parova, odnosno klastera među ispitanicima, od čega je postojanje osam transmisijskih parova, odnosno klastera s ukupno 17 ispitanika (15,3 %) podržano na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 3a (Slika 29).

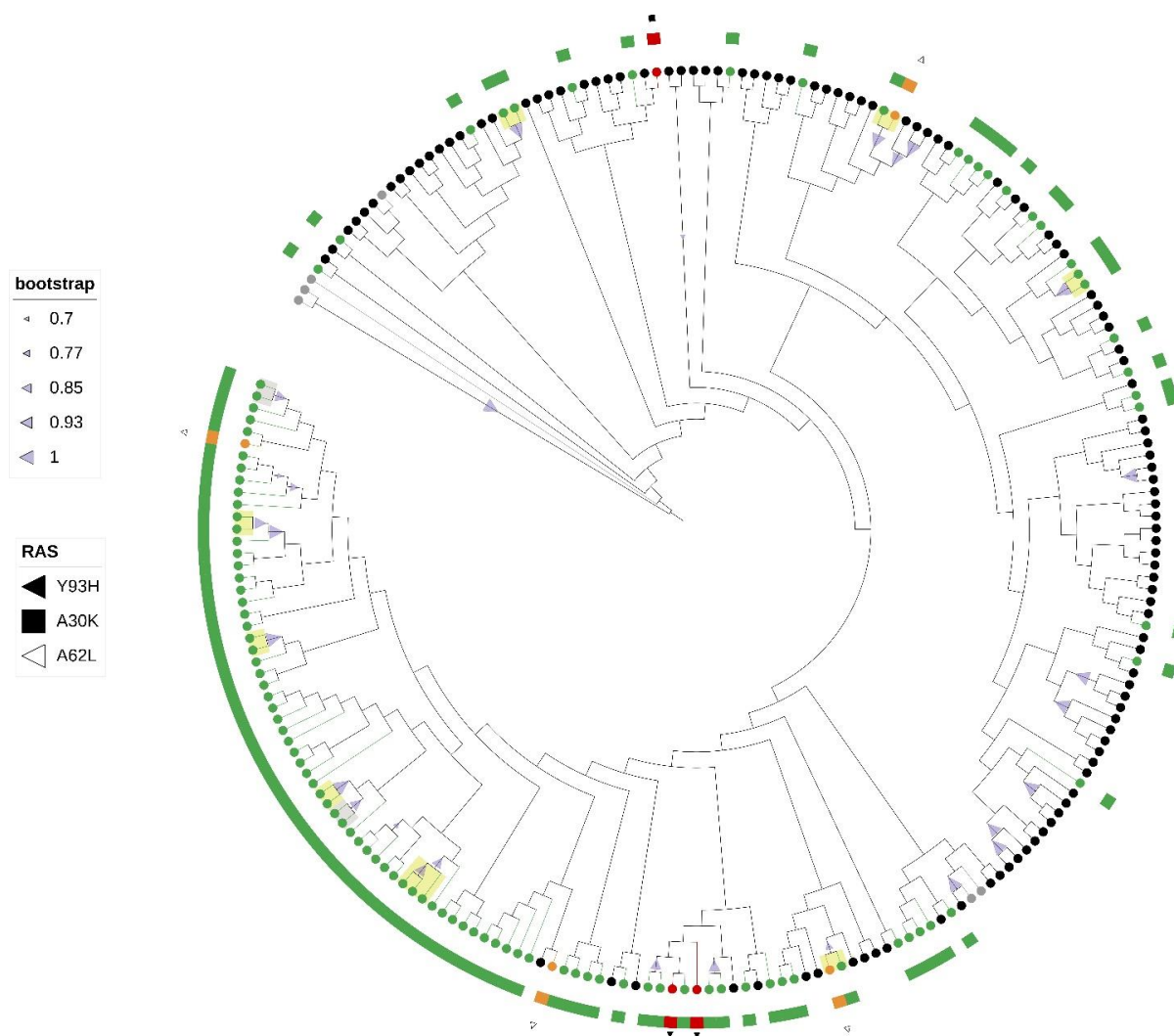


**Slika 29.** Filogenetsko stablo sekvencija gena NS3 virusa hepatitisa C podtipa 3a izrađeno metodom najveće vjerojatnosti pomoću supstitucijskog modela K2 + G + I uz 1000 pseudoreplikacija. *Bootstrap* vrijednosti između 70 % i 100 % prikazane su na čvorovima kao ljubičasti trokuti s veličinom proporcionalnom stupnju podrške grananja. Grane referentnih sekvencija obojane su sivo, grane kontrolnih sekvencija crno, a grane dobivenih sekvencija različitim bojama ovisno o prisutnosti mutacija povezanih s rezistencijom (RAS) na najmanje jedan inhibitor proteaze NS3 (crveno - rezistencija, narančasto - smanjena osjetljivost, zeleno - osjetljivost). Uočeni transmisivski parovi, odnosno klasteri među ispitanicima osjenčani su sivo ukoliko je njihovo postojanje podržano samo na danom stablu, odnosno žuto ukoliko se javljaju na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 3a. Uz pripadajuće sekvencije punim simbolom označene su utvrđene RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju, a praznim simbolom utvrđene RAS koje uzrokuju smanjenu osjetljivost na najmanje jedan inhibitor proteaze NS3.



#### **4.4.3.2. Filogenetska analiza sekvencija regije NS5A podtipa 3a**

Supstitucijski model K2 + G + I pokazao se najvjernijim za opisivanje skupine podataka koja sadrži sekvencije regije NS5A kod 111 ispitanika zaraženih podtipom 3a pokazao se model K2 + G + I. Topologija filogenetskog stabla sekvencija gena NS5A podtipa 3a pokazuje njihovu jednoliku zastupljenost na različitim granama bez izraženog grupiranja ili formiranja kladija. Dobivene sekvencije nisu raspodijeljene jednoliku na filogenetskom stablu u odnosu na kontrolne sekvencije, odnosno svrstavaju se pretežno na sestrinske grane filogenetskog stabla. Na filogenetskom stablu dobivenom pomoću sekvencija regije NS5A uočeno je 10 transmisijskih parova, odnosno klastera među ispitanicima, od čega je postojanje osam transmisijskih parova, odnosno klastera s ukupno 17 ispitanika (15,3 %) podržano na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 3a (Slika 30).

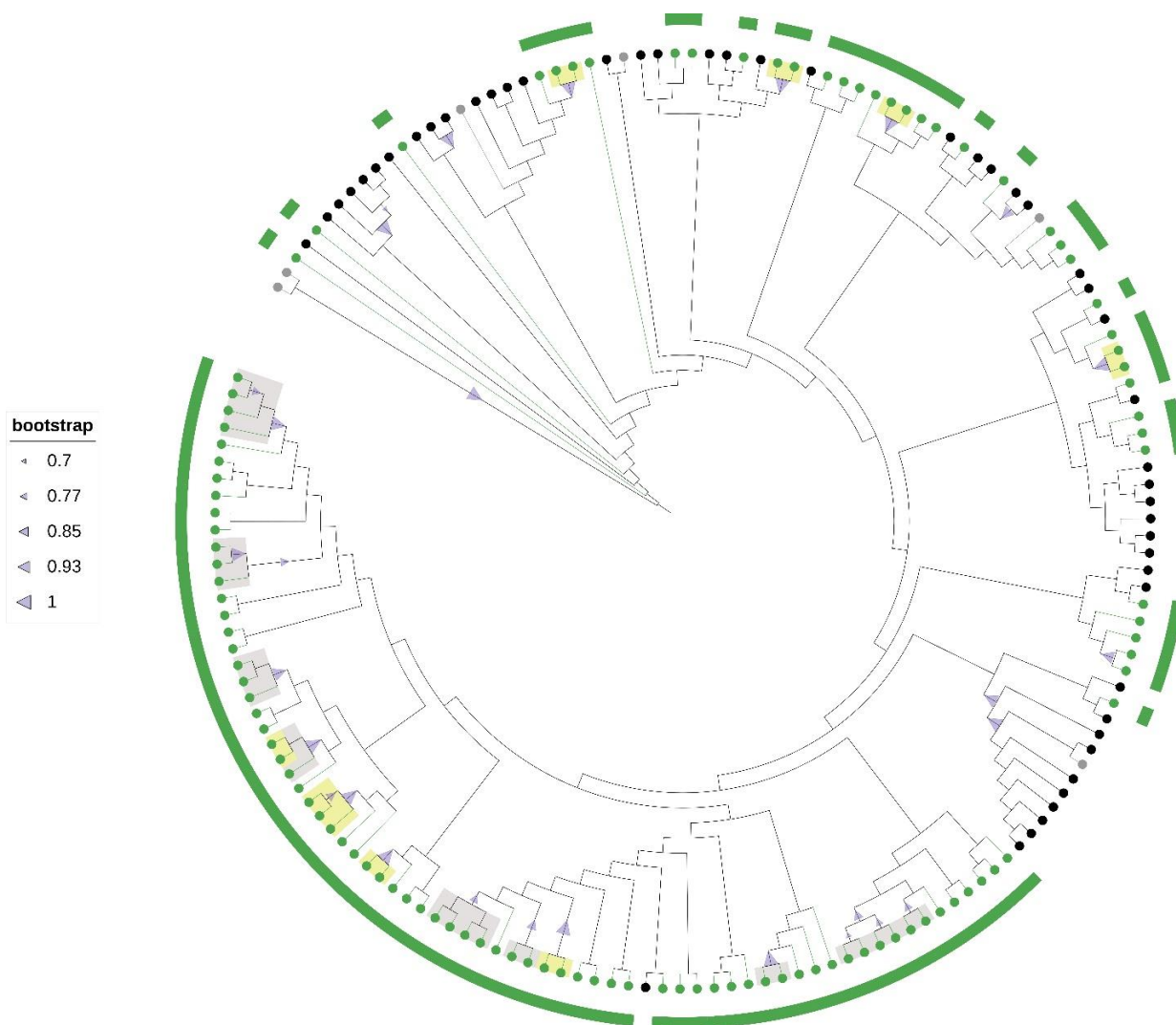


**Slika 30.** Filogenetsko stablo sekvencija gena NS5A virusa hepatitisa C podtipa 3a izrađeno metodom najveće vjerojatnosti pomoću supstitucijskog modela K2 + G + I uz 1000 pseudoreplikacija. *Bootstrap* vrijednosti između 70 % i 100 % prikazane su na čvorovima kao ljubičasti trokuti s veličinom proporcionalnom stupnju podrške grananja. Grane referentnih sekvencija obojane su sivo, grane kontrolnih sekvencija crno, a grane dobivenih sekvencija različitim bojama ovisno o prisutnosti mutacija povezanih s rezistencijom (RAS) na najmanje jedan inhibitor proteina NS5A (crveno - rezistencija, narančasto - smanjena osjetljivost, zeleno - osjetljivost). Uočeni transmisivski parovi, odnosno klasteri među ispitanicima osjenčani su sivo ukoliko je njihovo postojanje podržano samo na danom stablu, odnosno žuto ukoliko se javljaju na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 3a. Uz pripadajuće sekvencije punim simbolom označene su utvrđene RAS koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju, a praznim simbolom utvrđene RAS koje uzrokuju smanjenu osjetljivost na najmanje jedan inhibitor proteina NS5A.

#### 4.4.3.3. Filogenetska analiza sekvencija regije NS5B podtipa 3a

Za skupinu podataka koja sadrži sekvencije regije NS5B kod 111 ispitanika zaraženih podtipom 3a najvjerojatnijim supstitucijskim modelom pokazao se K2 + G + I. Topologija filogenetskog stabla sekvencija gena NS5B podtipa 3a pokazuje njihovu jednoliku zastupljenost na

različitim grana bez izraženog grupiranja ili formiranja kladija. Dobivene sekvencije nisu raspodijeljene jednoliko na filogenetskom stablu u odnosu na kontrolne sekvencije, odnosno svrstavaju se na sestrinske grane filogenetskog stabla. Na filogenetskom stablu dobivenom pomoću sekvencija regije NS5B uočeno je 17 transmisijskih parova, odnosno klastera među ispitanicima, od čega je postojanje osam transmisijskih parova, odnosno klastera s ukupno 17 ispitanika (15,3 %) podržano na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 3a (Slika 31).



**Slika 31.** Filogenetsko stablo gena NS5B sekvencija virusa hepatitisa C podtipa 3a izrađeno metodom najveće vjerojatnosti pomoću supstitucijskog modela K2 + G + I uz 1000 pseudoreplikacija. *Bootstrap* vrijednosti između 70 % i 100 % prikazane su na čvorovima kao ljubičasti trokuti s veličinom proporcionalnom stupnju podrške grananja. Grane referentnih sekvencija obojane su sivo, grane kontrolnih sekvencija crno, a grane dobivenih sekvencija različitim bojama ovisno o prisutnosti mutacija povezanih s rezistencijom na najmanje jedan inhibitor NS5B (crveno - rezistencija, narančasto - smanjena osjetljivost, zeleno - osjetljivost). Uočeni transmisijski parovi, odnosno klasteri među ispitanicima osjenčani su sivo ukoliko je njihovo postojanje podržano samo na danom stablu, odnosno žuto ukoliko se javljaju na filogenetskim stablima svih analiziranih gena podtipa 3a.

#### **4.4.4. Analiza transmisivskih parova i klastera ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a, 1b i 3a**

Od ukupnog broja ispitanika njih 27 (9,0 %) pripadalo je jednom od 13 identificiranih transmisivskih parova ili klastera čije je postojanje podržano na filogenetskim stablima svih analiziranih gena. Transmisivskim parovima pripadalo je 24 (8,0 %) ispitanika, a jednom identificiranom transmisivskom klasteru tri ispitanika (1,0 %). Kao dio transmisivskih parova, odnosno klastera, identificirano je ukupno osam od 109 (7,3 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a, dva od 80 (2,5 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b te 17 od 111 (15,3 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a. Od osam ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a koji su dio transmisivskih parova šest ispitanika (75,0 %) su bili intravenski korisnici droga, dok je za dva (25,0 %) ispitanika način zaraze bio nepoznat. Svi ispitanici koji pripadaju transmisivskim parovima bili su zaraženi kladijem I podtipa 1a. Način zaraze oba ispitanika zaražena HCV-om podtipa 1b koji su dio jednog uočenog transmisivskog para nije bio poznat. Od 17 ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a koji su dio transmisivskih parova ili klastera, osam ispitanika (47,1 %) bili su intravenski korisnici droga, za osam (47,1 %) ispitanika način zaraze nije bio poznat, dok je kod jednog ispitanika pretpostavljeni način zaraze bio rizični spolni odnos (5,4 %). Rezistencija na inhibitore NS3 detektirana je u šest ispitanika (22,2 %), rezistencija na inhibitore NS5A u četiri ispitanika (14,8 %), a rezistencija na NI inhibitore NS5B u dva (7,4 %) ispitanika koji su dio transmisivskih parova, odnosno klastera (Tablica 15).

**Tablica 15.** Karakteristike ispitanika koji su dio transmisijskih parova ili klastera.

Broj ispitanika	Podtip HCV-a	Broj transmisijskog para ili klastera	Pretpostavljeni način zaraze	NS3 RAS	NS5A RAS	NS5B RAS
1	1a	1	IDU	/	/	/
2	1a	1	IDU	/	/	/
3	1a	2	IDU	Q80K, N174S, R117H	/	/
4	1a	2	IDU	Q80K, N174S	/	/
5	1a	3	nepoznato	Q80K	/	/
6	1a	3	IDU	Q80K	/	/
7	1a	4	IDU	Q80K, N174S	L31M	/
8	1a	4	nepoznato	Q80K, N174S	/	/
9	1b	5	nepoznato	/	Y93H	L159F
10	1b	5	nepoznato	/	/	L159F
11	3a	6	IDU	/	/	/
12	3a	6	spolno	/	/	/
13	3a	7	nepoznato	/	/	/
14	3a	7	IDU	/	/	/
15	3a	8	IDU	/	/	/
16	3a	8	nepoznato	/	A62L	/
17	3a	9	nepoznato	/	A62L	/
18	3a	9	nepoznato	/	/	/
19	3a	10	IDU	/	/	/
20	3a	10	IDU	/	/	/
21	3a	11	IDU	/	/	/
22	3a	11	nepoznato	/	/	/
23	3a	11	nepoznato	/	/	/
24	3a	12	IDU	/	/	/
25	3a	12	nepoznato	/	/	/
26	3a	13	IDU	/	/	/
27	3a	13	nepoznato	/	/	/

Kazalo - RAS: supstitucije povezane s rezistencijom; NS3: regija za nestrukturani proteina 3; NS5A: regija za nestrukturani protein 5A; NS5B: regija za nestrukturani proteina 5B; IDU: intravensko korištenje droga

#### 4.5. Filodinamička analiza sekvencija podtipa 1a, 1b i 3a

Dinamika populacije sekvencija podtipa 1a, 1b i 3a ispitana je na spojenim sekvencijama regija NS3, NS5A i NS5B ispitanika zaraženih pojedinim genotipom HCV-a čija duljina je iznosila 2637 nukleotida. Nukleotidni supstitucijski model koji najbolje opisuje način na koji je došlo do nukleotidnih promjena u sekvencijama tijekom vremena bio je GTR + G + I za sve tri skupine podataka. Za sekvencije podtipa 1a i 1b sve ispitane kombinacije modela molekularnog sata i

demografskih modela izuzev modela konstantne populacije s nekoreliranim relaksiranim molekularnim satom uz eksponencijalnu raspodjelu rezultirale su zadovoljavajućim EES vrijednostima posteriorne raspodjele čimbenika tijekom 200 milijuna generacija. Kombinacije modela koje nisu konvergirale za sekvencije podtipa 3a bile su model konstantne populacije s nekoreliranim relaksiranim molekularnim satom uz eksponencijalnu raspodjelu te model Bayesova horizonta s nekoreliranim relaksiranim molekularnim satom uz eksponencijalnu raspodjelu. Ove kombinacije modela stoga nisu uzimane u obzir u daljnjim analizama. Filodinamičkom analizom provedenom metodom MCMC te analizom *Path Sampling* izračunate su MLE, stopa evolucije (s/n/y) i tMRCA s 95 % HPD sekvencija podtipa 1a (Tablica 16), 1b (Tablica 17) odnosno 3a (Tablica 18).

**Tablica 16.** Procjena vremena zadnjeg zajedničkog pretka i stope supstitucije s 95 %-tnim intervalima najveće posteriorne gustoće te procijenjene marginalne vjerojatnosti dobivene različitim modelima demografskog rasta i molekularnog sata metodom Bayesova zaključivanja za podtip 1a.

Model molekularnog sata		Model rasta populacije		
		KP	EP	BH
SMC	tMRCA (godina, 95 % HPD)	1963 (1943 – 1981)	1961 (1939 – 1980)	1941 (1893 – 1975)
	stopa supstitucije ( $10^{-3}$ , 95 % HPD)	1,4 (1,0 – 1,9)	1,3 (0,8 – 1,8)	1,0 (0,5 – 1,5)
	MLE (log)	-33778,2	-33691,4	-33669,4
NRMC s LR	tMRCA (godina, 95 % HPD)	1980 (1959 – 1995)	1982 (1963 – 1988)	1960 (1911 – 1994)
	stopa supstitucije ( $10^{-3}$ , 95 % HPD)	2,4 (1,4 – 3,5)	2,0 (1,1 – 3,0)	1,9 (0,5 – 2,4)
	MLE (log)	-33666,3	-33581,5	-33570,0
NRMC s ER	tMRCA (godina, 95 % HPD)	***	1996 (1984 – 2006)	1966 (1892 – 2004)
	stopa supstitucije ( $10^{-3}$ , 95 % HPD)	***	3,6 (1,8 – 5,7)	2,5 (0,5 – 4,5)
	MLE (log)	***	-33629,9	-33618,0

Kazalo - \*\*\*: model nije konvergirao; tMRCA: vrijeme zadnjeg zajedničkog pretka; 95 % HPD: 95 %-tni interval najveće posteriorne gustoće; log: prirodni logaritam s bazom 10; MLE: procijenjena marginalna vjerojatnost; SMC: strogi molekularni sat; NRMC: nekorelirani relaksirani molekularni sat; ER: eksponencijalna raspodjela; LR: lognormalna raspodjela; KP: konstantna populacija; EP: eksponencijalna populacija; BH: Bayesov horizont

**Tablica 17.** Procjena vremena zadnjeg zajedničkog pretka i stope supstitucije s 95 %-tnim intervalima najveće posteriorne gustoće te procijenjene marginalne vjerojatnosti dobivene različitim modelima demografskog rasta i molekularnog sata metodom Bayesova zaključivanja za podtip 1b.

Model molekularnog sata		Model rasta populacije		
		KP	EP	BH
SMC	tMRCA (godina, 95 % HPD)	1994 (1985 – 2002)	1990 (1980 – 1999)	1984 (1965 – 1999)
	stopa supstitucije ( $10^{-3}$ , 95 % HPD)	4,0 (2,7 – 5,4)	3,4 (2,3 – 4,6)	2,86 (1,6 – 4,3)
	MLE (log)	-32729,4	-32649,4	-32628,3
NRMC s LR	tMRCA (godina, 95 % HPD)	2004 (1997 – 2009)	1998 (1986 – 2007)	1994 (1973 – 2009)
	stopa supstitucije ( $10^{-3}$ , 95 % HPD)	7,0 (4,2 – 9,7)	4,5 (2,3 – 6,8)	3,8 (1,30 – 6,6)
	MLE (log)	-32680,1	-32595,2	-32572,0
NRMC s ER	tMRCA (godina, 95 % HPD)	***	2002 (1991 – 2010)	2003 (1983 – 2013)
	stopa supstitucije ( $10^{-3}$ , 95 % HPD)	***	7,1 (2,9 – 11,8)	8,2 (1,3 – 15,6)
	MLE (log)	***	-32639,6	-32631,4

Kazalo - \*\*\*: model nije konvergirao; tMRCA: vrijeme zadnjeg zajedničkog pretka; 95 % HPD: 95 %-tni interval najveće posteriorne gustoće; log: prirodni logaritam s bazom 10; MLE: procijenjena marginalna vjerojatnost; SMC: strogi molekularni sat; NRMC: nekorelirani relaksirani molekularni sat; ER: eksponencijalna raspodjela; LR: lognormalna raspodjela; KP: konstantna populacija; EP: eksponencijalna populacija; BH: Bayesov horizont

**Tablica 18.** Procjena vremena zadnjeg zajedničkog pretka i stope supstitucije s 95 %-tnim intervalima najveće posteriorne gustoće te procijenjene marginalne vjerojatnosti dobivene različitim modelima demografskog rasta i molekularnog sata metodom Bayesova zaključivanja za podtip 3a.

Model molekularnog sata		Model rasta populacije		
		KP	EP	BH
SMC	tMRCA (godina, 95 % HPD)	1964 (1940 – 1985)	1961 (1934 – 1981)	1929 (1853 – 1978)
	stopa supstitucije ( $10^{-3}$ , 95 % HPD)	1,9 (1,2 – 2,7)	1,7 (1,0 – 2,4)	1,2 (0,5 – 2,0)
	MLE (log)	-38484,1	-38378,8	-38363,0
NRMC s LR	tMRCA (godina, 95 % HPD)	1993 (1978 – 2004)	1990 (1975 – 2002)	1978 (1933 – 2004)
	stopa supstitucije ( $10^{-3}$ , 95 % HPD)	3,9 (2,2 – 5,5)	2,9 (1,6 – 4,2)	2,0 (0,5 – 3,7)
	MLE (log)	-38404,7	-38298,2	-38269,9
NRMC s ER	tMRCA (godina, 95 % HPD)	***	1999 (1987 – 2008)	***
	stopa supstitucije ( $10^{-3}$ , 95 % HPD)	***	4,9 (2,2 – 7,8)	***
	MLE (log)	***	-38342,0	***

Kazalo - \*\*\*: model nije konvergirao; tMRCA: vrijeme zadnjeg zajedničkog pretka; 95 % HPD: 95 %-tni interval najveće posteriorne gustoće; log: prirodni logaritam s bazom 10; MLE: procijenjena marginalna vjerojatnost; SMC: strogi molekularni sat; NRMC: nekorelirani relaksirani molekularni sat; ER: eksponencijalna raspodjela; LR: lognormalna raspodjela; KP: konstantna populacija; EP: eksponencijalna populacija; BH: Bayesov horizont



Najvjerojatnijim demografskim modelom i modelom molekularnog sata za sekvencije podtipa 1a, 1b i 3a pokazali su se model Bayesova horizonta u kombinaciji s modelom relaksiranog molekularnog sata s lognormalnom raspodjelom. Vrijednosti  $\log(\text{BF})$  ove kombinacije modela u usporedbi s drugima bile su u rasponu od 11,5 do 208,2 za podtip 1a (Tablica 19), od 23,2 do 157,3 za podtip 1b (Tablica 20) te od 28,3 do 214,2 za podtip 3a (Tablica 21), što predstavlja izrazitu podršku u korist ove kombinacije modela odnosno potvrdu da upravo oni najadekvatnije opisuju promjene u populaciji tijekom vremena.

Pod pretpostavkom nekoreliranog relaksiranog molekularnog sata s lognormalnom raspodjelom i demografskog modela Bayesova horizonta stopa supstitucije iznosila je  $1,5 \times 10^{-3}$  (95 % HPD,  $0,5 - 2,4 \times 10^{-3}$ ) za sekvencije podtipa 1a,  $3,8 \times 10^{-3}$  (95 % HPD,  $1,3 - 6,6 \times 10^{-3}$ ) za sekvencije podtipa 1b te  $2,0 \times 10^{-3}$  (95 % HPD,  $0,5 - 3,7 \times 10^{-3}$ ) za sekvencije podtipa 3a. Srednje procijenjene vrijednosti tMRCA analiziranih sekvencija bile su 1960. (95 % HPD, 1911. – 1994.) godina za podtip 1a, 1994. (95 % HPD, 1973. – 2009.) godina za podtip 1b te 1978. (95 % HPD, 1933. – 2004.) godina za podtip 3a (Tablica 16, Tablica 17, Tablica 18). Analiza Bayesova horizonta pokazuje kako je virusna populacija sekvencija podtipa 1a bila stalne veličine od vremena tMRCA do 1990. godine kada dolazi do dva uzastopna eksponencijalna rasta, nakon čega se od 2005. godine veličina populacije ustaljuje. Virusna populacija sekvencija podtipa 1b relativno je stalna od vremena tMRCA do danas, uz manji eksponencijalni skok u razdoblju od 2007. do 2010. godine. Virusna populacija sekvencija podtipa 3a ima neprekidan eksponencijalni rast od vremena tMRCA do 2010. godine nakon čega se veličina virusne populacije ustaljuje (Slika 32).

**Tablica 19.** Vrijednosti logaritma Bayesova faktora između pojedinih modela molekularnog sata i dinamike populacije za podtip 1a.

log(BF)	SMC + KP	SMC + EP	SMC + BH	NRMC s LR + KP	NRMC s LR + EP	NRMC s LR + BH	NRMC s ER + EP	NRMC s ER + BH
SMC + KP	0	-86,8	-108,8	-111,9	-196,7	-208,2	-148,3	-160,2
SMC + EP	86,8	0	-22,0	-25,1	-109,9	-121,4	-61,6	-73,5
SMC + BH	108,8	22,0	0	-3,1	-87,9	-99,4	-39,6	-51,5
NRMC s LR + KP	111,9	25,1	3,1	0	-84,6	-96,3	-132,8	-48,4
NRMC s LR + EP	196,7	109,9	87,9	84,6	0	-11,5	48,3	36,4
NRMC s LR + BH	208,2	121,4	99,4	96,3	11,5	0	59,8	47,9
NRMC s ER + EP	148,3	61,6	39,6	132,8	-48,3	-59,8	0	-11,9
NRMC s ER + BH	160,2	73,5	51,5	48,4	-36,4	-47,9	11,9	0

Kazalo - BF: Bayesov faktor; log: prirodni logaritam uz bazu 10; SMC: strogi molekularni sat; NRMC: nekorelirani relaksirani molekularni sat; ER: eksponencijalna raspodjela; LR: lognormalna raspodjela; KP: konstantna populacija; EP: eksponencijalna populacija; BH: Bayesov horizont

**Tablica 20.** Vrijednosti logaritma Bayesova faktora između pojedinih modela molekularnog sata i dinamike populacije za podtip 1b.

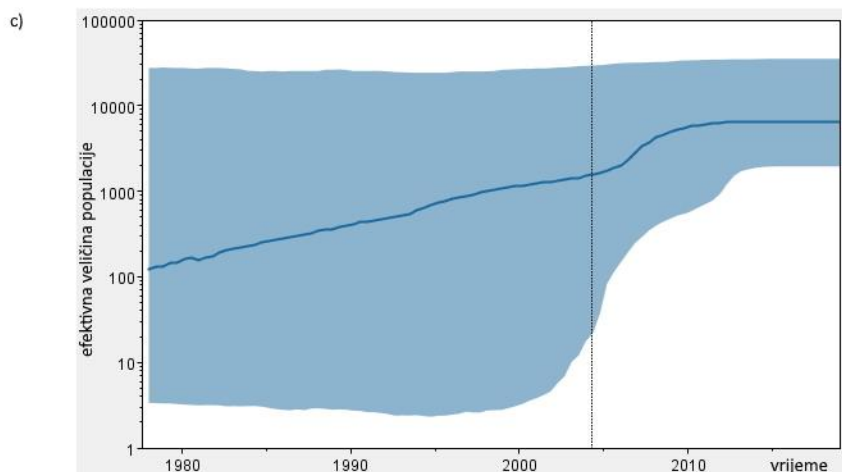
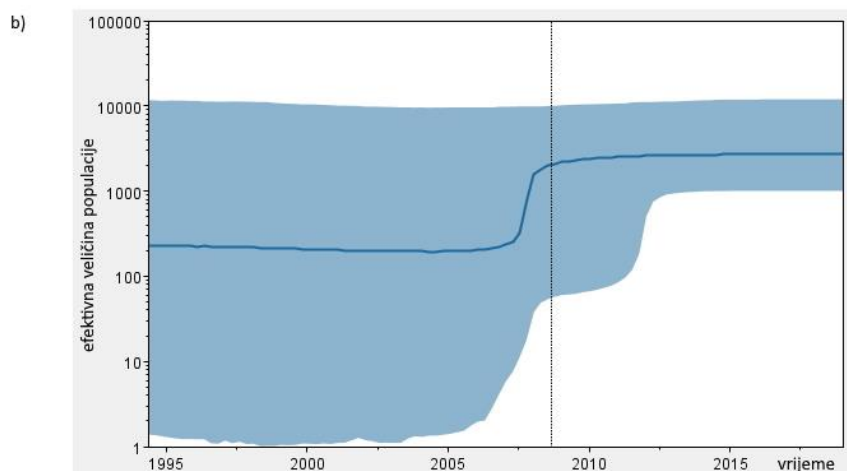
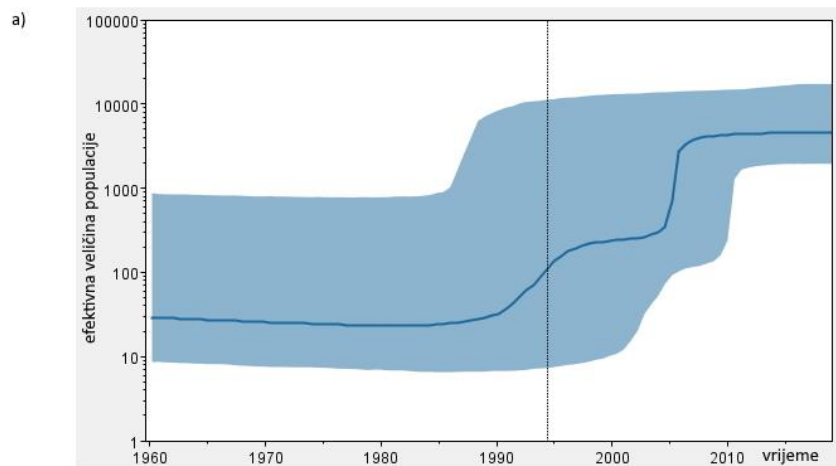
log(BF)	SMC + KP	SMC + EP	SMC + BH	NRMC s LR + KP	NRMC s LR + EP	NRMC s LR + BH	NRMC s ER + EP	NRMC s ER + BH
SMC + KP	0	-80,0	-101,1	-49,3	-134,1	-157,3	-89,8	-98,1
SMC + EP	80,0	0	-21,1	30,7	-54,2	-77,4	-9,8	-18,1
SMC + BH	101,1	21,1	0	51,8	-33,0	-56,2	11,3	3,1
NRMC s LR + KP	49,3	-30,7	-51,8	0	-84,8	-108,0	-41,5	-48,7
NRMC s LR + EP	134,1	54,2	33,1	84,8	0	-23,2	44,4	36,1
NRMC s LR + BH	157,3	77,4	56,2	108,0	23,2	0	67,6	59,3
NRMC s ER + EP	89,8	9,8	-11,3	41,5	-44,4	-67,6	0	-8,3
NRMC s ER + BH	98,1	18,1	-3,1	48,7	-36,1	-59,3	8,3	0

Kazalo - BF: Bayesov faktor; log: prirodni logaritam uz bazu 10; SMC: strogi molekularni sat; NRMC: nekorelirani relaksirani molekularni sat; ER: eksponencijalna raspodjela; LR: lognormalna raspodjela; KP: konstantna populacija; EP: eksponencijalna populacija; BH: Bayesov horizont

**Tablica 21.** Vrijednosti logaritma Bayesova faktora između pojedinih modela molekularnog sata i dinamike populacije za podtip 3a.

log(BF)	SMC + KP	SMC + EP	SMC + BH	NRMC s LR + KP	NRMC s LR + EP	NRMC s LR + BH	NRMC s ER + EP
SMC + KP	0	-105,3	-121,1	-79,4	-185,9	-214,2	-142,1
SMC + EP	105,3	0	-15,8	25,9	-80,7	-109,0	-36,8
SMC + BH	121,1	15,8	0	41,7	-64,8	-93,1	-21,0
NRMC s LR + KP	79,4	-25,8	-41,7	0	-106,5	-134,8	-62,7
NRMC s LR + EP	185,9	80,7	64,8	106,5	0	-28,3	43,9
NRMC s LR + BH	214,2	109,0	93,1	134,8	28,3	0	72,2
NRMC s ER + EP	142,1	36,8	21,0	62,7	-43,9	-72,2	0

Kazalo - BF: Bayesov faktor; log: prirodni logaritam uz bazu 10; SMC: strogi molekularni sat; NRMC: nekorelirani relaksirani molekularni sat; ER: eksponencijalna raspodjela; LR: lognormalna raspodjela; KP: konstantna populacija; EP: eksponencijalna populacija; BH: Bayesov horizont



**Slika 32.** Skice Bayesova horizonta koje pokazuju epidemiološku povijest a) sekvencija podtipa 1a b) sekvencija podtipa 1b i c) sekvencija podtipa 3a. Prikazane su procijenjena srednja vrijednost (plava linija) te 95 % intervali najveće posteriorne gustoće (plava osjenčana područja) efektivne veličine populacije (izražena logaritamskom skalom uz bazu 10) tijekom vremena (izraženog u godinama) od vremena zadnjeg zajedničkog pretka.

#### 4.6. Statistička analiza karakteristika ispitanika

Demografski, klinički i laboratorijski čimbenici (spol, dob, podtip HCV-a, stadij fibroze, viremija HCV-a) uspoređeni su među ispitanicima s i bez NS3, NS5A i NS5B RAS te ispitanicima koji su dio nekog transmisijskog para ili klastera u odnosu na ispitanike za koje nije uočena epidemiološka povezanost infekcije HCV-om. Spol, dob, viremija i stadij fibroze nisu se pokazali povezanima s prisutnošću RAS na DAA. Statistički značajna povezanost pokazala se između prisutnosti NS3 RAS i podtipa HCV-a pri čemu su ispitanici s NS3 RAS mnogo češće bili zaraženi podtipom 1a (68,8 %) u odnosu na podtip 1b (26,3 %) HCV-a ( $P < 0,001$ ). U oba podtipa genotipa 1 rezistencijske mutacije bile su prisutne u većem broju u odnosu na podtip 3a (1,8 %) ( $P < 0,001$ ). Osim toga, u ispitanika zaraženih podtipom 1a NS3 RAS utvrđene su češće unutar kladija I (79,4 %) u odnosu na kladij II (51,2 %) ( $P = 0,003$ ). Rezistencijske mutacije koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju na inhibitore proteaze NS3 također su mnogo zastupljenije u kladiju I (75,0 %) u odnosu na kladij II (14,6 %) podtipa 1a ( $P < 0,001$ ). Mutacija Q80K utvrđena je u 73,5 % ispitanika zaraženih kladijem I podtipa 1a HCV-a i samo 2,4 % ispitanika zaraženog kladijem II ( $P < 0,001$ ). Statistički značajna povezanost uočena je i između NS5A RAS i podtipa HCV-a pri čemu su ispitanici s NS5A RAS češće bili zaraženi podtipom 1a (15,6 %) i podtipom 1b HCV-a (21,3 %) u odnosu na podtip 3a (6,3 %) ( $P = 0,007$ ). Pojava NS5B RAS bila je vezana isključivo za podtip 1b HCV-a (31,3 %), pri čemu mutacije u ovoj regiji nisu uočene niti u jednog ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a i 3a ( $P < 0,001$ ). Prisutnost RAS u regiji NS3, NS5A ili NS5B nije bila povezana s pripadnošću ispitanika nekom od uočenih transmisijskih parova ili klastera. Ispitanici koji su dio nekog transmisijskog para ili klastera bili su mlađi (medijan dobi = 37,0 godina) u odnosu na ispitanike kod kojih nije uočena epidemiološka povezanost infekcije HCV-om (medijan dobi = 46,0 godina) ( $P < 0,001$ ) (Tablica 22). Statistički značajna povezanost pokazala se između podtipa HCV-a i pripadnosti transmisijskom paru ili klasteru pri čemu je najveći broj ispitanika koji su dio transmisijskog para ili klastera bio zaražen HCV-om podtipa 3a (15,3 %) ( $P = 0,008$ ). Pripadnost transmisijskom paru ili klasteru u bolesnika zaraženih podtipom 1a bila je povezana isključivo s kladijem I (11,8 %) ( $P = 0,024$ ). Transmisijski parovi ili klasteri bili su češći u ispitanika koji su naveli intravensko korištenje droga kao rizičan faktor (14,7 %) u odnosu na druge pretpostavljene načine zaraze (6,3 %) ( $P = 0,018$ ). Spol, viremija i stadij fibroze nisu se pokazali povezanima s pripadnošću transmisijskim parovima ili klasterima (Tablica 23).

**Tablica 22.** Usporedba demografskih, kliničkih i laboratorijskih karakteristika ispitanika s ili bez supstitucija povezanih s rezistencijom na direktno djelujuće antivirusne lijekove iz skupine inhibitora NS3, NS5A odnosno NS5B.

	Ispitanici s NS3 RAS	Ispitanici bez NS3 RAS	P vrijednost	Ispitanici s NS5A RAS	Ispitanici bez NS5A RAS	P vrijednost	Ispitanici s NS5B RAS	Ispitanici bez NS5B RAS	P vrijednost	Ukupno
Ispitanici	n (%)			n (%)			n (%)			N (%)
	98 (32,7)	202 (67,3)		41 (13,7)	259 (86,3)		25 (8,3)	275 (91,7)		300 (100)
Spol <sup>a</sup>	n (%)			n (%)			n (%)			N (%)
M	61 (32,6)	126 (67,4)	0,982	27 (14,4)	160 (85,6)	0,617	13 (7,0)	174 (93,1)	0,265	187 (62,3)
Ž	37 (32,7)	76 (67,3)		14 (12,4)	99 (87,6)		12 (10,6)	101 (89,4)		113 (37,7)
Dob, medijan godina (Q1 –Q3) <sup>c</sup>	44 (40 – 54)	46 (40 – 58)	0,168	46 (42,5 – 60,5)	45 (40 – 57)	0,271	57 (39 – 63)	45 (40 – 56)	0,111	45 (40 – 57)
Podtip HCV-a <sup>b</sup>	n (%)			n (%)			n (%)			N (%)
1a	75 (68,8)	34 (31,2)	<0,001	17 (15,6)	92 (84,4)	0,007	0 (0,0)	109 (100,0)	<0,001	109 (36,3)
1b	21 (26,3)	59 (73,8)		17 (21,3)	63 (78,8)		25 (31,3)	55 (68,8)		80 (26,7)
3a	2 (1,8)	109 (98,2)		7 (6,3)	104 (93,7)		0 (0,0)	111 (100,0)		111 (37,0)
Stadij fibroze <sup>a</sup>	n (%)			n (%)			n (%)			N* (%)
F0/1 – F2	61 (34,9)	114 (65,1)	0,278	23 (13,1)	152 (86,7)	0,609	14 (8,0)	161 (92,0)	0,920	175 (59,7)
F3 – F4	34 (28,8)	84 (71,2)		18 (15,3)	100 (84,8)		11 (9,3)	107 (90,7)		118 (40,3)

Viremija, medijan (Q1 – Q3), log IU/ml	6,0 (5,5 – 6,4)	6,0 (5,4 – 6,3)	0,303	6,0 (5,5 – 6,4)	6,0 (5,4 – 6,3)	0,849	5,9 (5,7 – 6,4)	6,0 (5,5 – 6,3)	0,682	6,0 (5,5-6,3)
Kladij podtipa 1a <sup>b</sup>	n (%)			n (%)			n (%)			N** (%)
1	54 (79,4)	14 (20,6)	<b>0,003</b>	12 (17,6)	56 (82,4)	0,589	0 (0,0)	68 (100,0)	1	68 (62,4)
2	21 (51,2)	20 (48,8)		5 (12,2)	36 (87,8)		0 (0,0)	41 (100,0)		41 (37,6)
Pripadnost TK <sup>a</sup>	n (%)			n (%)			n (%)			N (%)
da	6 (22,2)	21 (77,8)	0,225	4 (14,8)	23 (85,2)	0,225	2 (7,4)	25 (92,6)	0,855	27 (9,0)
ne	92 (33,7)	181 (66,3)		37 (13,6)	236 (86,4)		23 (8,4)	250 (91,6)		273 (81,0)

Kazalo - N: ukupan broj ispitanika; n: broj ispitanika u određenoj kategoriji; %: postotak ispitanika; Q1: prva kvartila; Q3: treća kvartila; log: prirodni logaritam s bazom 10; IU: internacionalna jedinica; RAS: supstitucije povezane s rezistencijom; TK: transmisijski klaster ili par; a: povezanost između navedenih kategorijskih varijabli ispitana je sa hi-kvadratom; b: povezanost između navedenih kategorijskih varijabli ispitana je sa Fisherovim egzaktnim testom; c: povezanost između navedenih kontinuiranih varijabli ispitana je sa Mann–Whitney-Wilcoxon-ovim testom; \*: podaci dostupni za ukupan broj ispitanika N = 293; \*\*: podaci za ukupan broj ispitanika podtipa 1a N = 109



**Tablica 23.** Usporedba demografskih, kliničkih i laboratorijskih karakteristika ispitanika koji su dio transmisijskog para ili klastera u odnosu na ispitanike za koje nije uočena epidemiološka povezanost infekcije virusom hepatitisa C.

	Ispitanici koji su dio TK	Ispitanici koji nisu dio TK	P vrijednost	Ukupno
Ispitanici	n (%)			N (%)
	27 (9,0)	273 (91,0)		300 (100)
Spol <sup>a</sup>	n (%)			N (%)
M	18 (9,6)	169 (90,4)	0,626	187 (62,3)
Ž	9 (8,0)	104 (92,0)		113 (37,7)
Dob, medijan godina (Q1 – Q3) <sup>c</sup>	37 (33 – 41)	46 (41 – 57,5)	<b>&lt;0,001</b>	45 (40 – 57)
Podtip HCV-a <sup>b</sup>	n (%)			N (%)
1a	8 (7,3)	101 (92,7)	<b>0,008</b>	109 (36,3)
1b	2 (2,5)	78 (97,5)		80 (26,7)
3a	17 (15,3)	94 (84,7)		111 (37,0)
Stadij fibroze <sup>a</sup>	n (%)			N* (%)
F1 – F2	20 (11,4)	155 (88,6)	0,111	175 (59,7)
F3 – F4	7 (5,9)	111 (94,1)		118 (40,3)
Viremija, medijan (Q1 – Q3), log IU/ml	6,0 (4,9 – 6,6)	6,0 (5,5 – 6,3)	0,944	6,0 (5,5 – 6,3)
Kladij podtipa 1a <sup>b</sup>	n (%)			N** (%)
1	8 (11,8)	60 (88,2)	<b>0,024</b>	68 (62,4)
2	0 (0,0)	41 (100)		41 (37,6)
Način zaraze <sup>a</sup>	n (%)			N (%)
IDU	14 (14,7)	81 (85,3)	<b>0,018</b>	95 (31,7)
Ostalo/nepoznato	13 (6,3)	192 (93,7)		205 (68,3)

Kazalo - N: ukupan broj ispitanika; n: broj ispitanika u određenoj kategoriji; %: postotak ispitanika; Q1: prva kvartila; Q3: treća kvartila; log: prirodni logaritam s bazom 10; IU: internacionalna jedinica; TK: transmisijski klaster ili par; IDU: intravensko korištenje droga; a: povezanost između navedenih kategorijskih varijabli ispitana je sa hi-kvadratom; b: povezanost između navedenih kategorijskih varijabli ispitana je sa Fisherovim egzaktnim testom; c: povezanost između navedenih kontinuiranih varijabli ispitana je sa Mann–Whitney-Wilcoxon-ovim testom; \*: podaci dostupni za ukupan broj ispitanika N = 293; \*\*: podaci za ukupan broj ispitanika podtipa 1a N = 109

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju analizirana je epidemija HCV-a u Hrvatskoj u četverogodišnjem razdoblju. Analizirane su molekularne, virološke, kliničke i epidemiološke karakteristike infekcije s naglaskom na prevalenciju primarne rezistencije na direktno djelujuće antivirusne lijekove (DAA) iz skupine inhibitora NS3, NS5A i NS5B te filogenetske i filodinamičke odnose na razini transmisivnih mreža i evoluciju najčešće zastupljenih genotipova odnosno podtipova HCV-a. Analiza demografskih podataka uključenih ispitanika pokazala je kako je infekcija HCV-om u Hrvatskoj zastupljenija u muškaraca (62,3 %), naročito u podtipu 1a (67,0 %) i podtipu 3a (70,3 %), medijana dobi 45,0 godina, što je u skladu s prethodno provedenim višegodišnjim nacionalnim istraživanjima (Vince i sur., 2006; Vince i sur., 2018). Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako su ispitanici zaraženi HCV-om podtipa 1b (medijan dobi 61,0 godina) stariji od ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a (medijan dobi 44,0 godine) i 1a (medijan dobi 43,0 godine). Slični rezultati uočeni su u istraživanju raspodjele genotipova HCV-a u Hrvatskoj 1996. – 2005. godine gdje je medijan dobi bolesnika zaraženih HCV-om podtipa 1b iznosio 46,0 godina u odnosu na 32,0 godine u bolesnika zaraženih podtipovima 1a i 3a. U ovom istraživanju vidljiv je trend starenja populacije bolesnika u usporedbi s prethodno objavljenim podacima što se može pripisati dugotrajnosti infekcije HCV-om i specifičnim načinima zaraze karakterističnima za pojedini genotip.

Rezultati ovog rada pokazali su kako je najčešći prijavljeni put prijenosa u ispitanika zaraženih podtipovima 1a (44,0 %) i 3a (41,4 %) bio intravensko korištenje droga (IDU), a u ispitanika zaraženih podtipom 1b neprikladni medicinski postupci (31,3 %). Budući da je 1992. godine u Hrvatskoj uvedeno obavezno testiranje krvi dobrovoljnih davatelja na serumske biljege krvlju prenosivih bolesti, ovaj način prijenosa HCV-a karakterističan za podtip 1b značajno je smanjen (Vilibić i sur., 2015). Stoga je podtip 1b HCV-a najčešće zastupljen u osoba zaraženih prije više od trideset godina što objašnjava stariju dob ovih ispitanika. Podtipovi 1a i 3a u prethodnim istraživanjima pokazali su se karakterističnima za IDU u Hrvatskoj i Europi, a intravensko korištenje droga danas predstavlja dominantan način prijenosa HCV-a (Vince i sur., 2006, Vilibić i sur., 2015, Minosse i sur., 2021, Pérez i sur., 2019). U ovom istraživanju stadij fibroze F1 – F2 uočen je u nešto većeg broja ispitanika (58,3 %) u odnosu na stadij fibroze F3 – F4 (39,3 %). Budući da su terapijske smjernice do 2018. godine prednost liječenju davale osobama s uznapredovalim stadijima fibroze za očekivati je kako će u ukupnoj populaciji neliječenih bolesnika s kroničnim hepatitisom C biti veći broj osoba s manjim stadijem fibroze. Druga europska istraživanja također su pokazala kako su stadiji fibroze F1 – F2 učestaliji u prethodno neliječenih bolesnika, dok su u manjeg broja bolesnika uočeni stadiji fibroze F3 – F4, odnosno prisutnost hepatocelularnog karcinoma (Bertolli i sur., 2018; Parczewski i sur., 2018).

Pristup liječenju infekcije HCV-om danas se temelji na DAA koji su iznimno učinkoviti, gotovo bez nuspojava te omogućuju postizanje visoke stope trajnog virološkog odgovora (SVR). Neuspjeh liječenja uglavnom se javlja kod manje od 5 % bolesnika u kojih su većinom prisutne kliničke i virološke karakteristike koje objedinjeno smanjuju učinkovitost DAA. Među virološkim karakteristikama najčešće je riječ o supstitucijama (RAS) u genima čiji su produkti ciljne strukture lijekova što može dovesti do smanjenja njihove učinkovitosti (Bertolli i sur., 2018). Literaturni podaci o prevalenciji primarne rezistencije na DAA raznoliki su i značajno variraju između pojedinih istraživanja prvenstveno zbog nesukladnosti u klasifikaciji određenih supstitucija kao RAS. U ovom istraživanju primarna rezistencija definirana je kao prisutnost jedne ili više supstitucija iz skupine klinički značajnih rezistencijskih mutacija ili supstitucija koje uzrokuju smanjenu osjetljivost na najmanje jedan direktno djelujući antivirusni lijek iz pojedine skupine prema algoritmu *geno2pheno [hcv]* te su isključivo takve supstitucije karakterizirane kao RAS (Kalaghatgi, 2016). Prisutnost supstitucija koje nemaju dokazani učinak na smanjenje učinkovitosti najmanje jednog direktno djelujućeg antivirusnog lijeka nije analizirana u okviru rezistencije niti su takve supstitucije smatrane supstitucijama povezanim s rezistencijom. Standardizacija definicije RAS neophodna je kako bi se izbjegle nesukladnosti između različitih istraživanja ovisno o interpretacijskom algoritmu.

Prevalencija rezistencije na DAA u Hrvatskoj na nacionalnoj razini prethodno je analizirana u dva istraživanja, isključivo za bolesnike podtipa 1a, odnosno 1b te inhibitore proteina NS3 ili NS5A. Grgic i sur. (2017) analizirali su prevalenciju NS3 RAS u 136 bolesnika zaraženih HCV-om podtipa 1a prethodno neliječenih PI tijekom dijela 2015. i 2016. godine. Uočena je visoka prevalencija rezistencije na inhibitor proteina NS3 SMV (46,3 %), pri čemu se kao dominantna mutacija pokazala Q80K uočena u 42,6 % bolesnika. Druga najčešća mutacija koja uzrokuje smanjenu osjetljivost na TPV bila je N174S uočena u 39,7 % bolesnika. Ostale RAS s niskom učestalošću (manje od 3 %) bile su V36L, T54S, V55A, S122R, R155T i I170T (Grgic i sur., 2017). Rezultati ovog rada pokazali su kako je u ispitanika zaraženih podtipom 1a u Hrvatskoj prevalencija Q80K ostala izrazito visoka (46,8 %) slično kao i prevalencija N174S (39,5 %). Riječ je o mutacijama koje uzrokuju rezistenciju, odnosno smanjenu osjetljivost na inhibitore proteaza prve generacije koji danas više nisu dio najčešće korištenih terapijskih kombinacija te se stoga visoka prevalencija Q80K i N174S u Hrvatskoj ne može pripisati učestalom korištenju ovih lijekova. Međutim, poznato je kako je riječ o lijekovima koji imaju nisku barijeru za rezistenciju, a mutacija Q80K pokazala se izrazito stabilnom i lako prenosivom varijantom (De Luca i sur., 2015, McCloskey i sur., 2015). Za razliku od većeg broja manje učestalih RAS uočenih u prethodnim nacionalnim istraživanjima, u ovom istraživanju uočene su još samo dvije različite RAS (T54S i V55A) s prevalencijom 3,7 – 7,3 %.

U istraživanju provedenom tijekom dijela 2017. i 2018. godine, analizirana je prevalencija rezistencije na inhibitore proteina NS5A u 84 bolesnika zaraženih genotipom 1 HCV-a u sklopu predterapijske obrade (Simicic i sur., 2019). Ukupna prevalencija klinički značajnih NS5A RAS u genotipu 1 bila je 14,3 % i razlikovala se ovisno o podtipu virusa. U bolesnika zaraženih HCV-om podtipa 1a prevalencija klinički značajnih NS5A RAS iznosila je 7,8 %, dok je u bolesnika zaraženih HCV-om podtipa 1b uočen značajno veći udio klinički značajnih NS5A RAS, čak 24,2 %. U podtipu 1a ukupno su uočene dvije mutacije koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju (M28T (2,0 %) i Q30R (5,9 %)), dok je podtipu 1b u svih ispitanika s klinički značajnim NS5A RAS uočena isključivo supstitucija Y93H (24,2 %). Prisutnost jedne ili više RAS na najmanje jedan DAA iz skupine inhibitora proteina NS5A pronađena je u 19,1 % ispitanika, od toga 13,7 % ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a te 27,3 % ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b (Simicic i sur., 2019). Rezultati ovog rada pokazali su kako je prevalencija RAS u Hrvatskoj i dalje nejednoliko zastupljena među podtipovima genotipa 1, pri čemu je u 17 (15,6 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a, 17 (21,3 %) ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b utvrđena je prisutnost jedne ili više RAS na najmanje jedan DAA iz skupine inhibitora proteina NS5A. Prevalencija klinički značajnih NS5A RAS u ovom istraživanju bila je niža te iznosi 4,6 % u ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a i 20,0 % u ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b. Budući da je riječ o četverogodišnjem istraživanju s većim brojem uključenih ispitanika može se pretpostaviti kako je i sam uzorak populacije bolesnika s kroničnim hepatitisom C reprezentativniji. Udio i vrsta uočenih RAS u podtipu 1a slični su u ovom i prethodnom istraživanju, dok je u podtipu 1b u novoj analizi uočeno više različitih klinički značajnih RAS s prevalencijom višom od 5 % (Y93H, R30Q, L31M) te posljedično prevalencija Y93H nije tako visoka (11,3 %) budući da ne predstavlja više jedinu rezistencijsku mutaciju. Mutacija Y93H povezana je sa značajnim smanjenjem učinkovitosti liječenja u nekim genotipovima HCV-a, poput podtipa 1a i genotipa 3 te kliničkim stanjima poput prisutnosti ciroze (Bertolli i sur., 2018). U hrvatskih ispitanika mutacija Y93H uočena je u 1,8 % ispitanika zaraženih podtipom 3a, dok u ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a ova mutacija nije bila prisutna.

Prevalencija primarne i sekundarne rezistencije intenzivno je proučavana u posljednjem desetljeću, pri čemu je samo manji broj nacionalnih istraživanja analizirao rezistenciju na sve dostupne DAA za sve genotipove HCV-a. NS5A predstavlja najvažniju genomsku regiju za ispitivanje klinički značajnih RAS budući da sadrži najveći broj potencijalnih mutacija, a mnoge kombinacije DAA sadrže neki od inhibitora iz ove skupine lijekova (Brandão i sur., 2018). Trenutno odobreni inhibitori NS5A pokazuju nisku do srednju barijeru za rezistenciju s brzom selekcijom RAS u domeni I. Prisutnost NS5A RAS može rezultirati značajnim smanjenjem stope SVR-a, a ove mutacije mogu se zadržati godinama nakon neuspješnog liječenja DAA (Li i Chung, 2019; Ahmad i Feemle, 2015). Podaci o prevalenciji RAS na inhibitore NS5A u susjednim državama oskudni su, a

najveći broj istraživanja proveden je u Italiji. U talijanskom opazajnom istraživanju koje je uključivalo 1032 bolesnika prethodno neliječenih DAA s kroničnom infekcijom HCV-om iz 23 klinička centra između 2011. i 2016. godine Bertolli i sur. (2018) uočili su ukupnu prevalenciju RAS na najmanje jedan DAA u 20,7 % od 1455 bolesnika (Bertolli i sur., 2018). Ukupna prevalencija RAS na inhibitore NS5A u talijanskom istraživanju iznosila je 20,1 %, s prevalencijom od 10,2 % u podtipu 1a, 29,7 % u podtipu 1b te 16,9 % u podtipu 3a (Bertolli i sur., 2018). U našem istraživanju pokazana je dvostruko viša ukupna prevalencija RAS (45,7 %). Međutim, budući da je u ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1a utvrđena viša prevalencija RAS na inhibitore NS5A (15,6 %), a niža u bolesnika zaraženih podtipom 1b (21,3 %) i 3a (6,3 %), opća stopa prevalencije NS5A RAS u Hrvatskoj je bila niža (13,7 %). Kada je analiza ograničena na aminokiselinske supstitucije povezane s klinički značajnom rezistencijom, prevalencija mutacija u talijanskom istraživanju iznosila je 6,8 % u podtipu 1a, 10,3 % u podtipu 1b i 8,5 % u podtipu 3a (Bertolli i sur., 2018). Prevalencija klinički značajnih RAS u Hrvatskoj bila je podjednaka u ispitanika zaraženih podtipom 1a (4,6 %), gotovo dvostruko viša u ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b (20,0 %) i niža (2,7 %) u ispitanika zaraženih podtipom 3a. I u talijanskom istraživanju najčešće uočenom RAS u regiji NS5A pokazala se mutacija Y93H u podtipu 1b (10,1 %) čija je prevalencija podjednaka u prevalenciji u Hrvatskoj (11,3 %) (Bertolli i sur., 2018). U hrvatskih ispitanika zaraženih podtipom 1a najčešća mutacija bila je M28V (10,1 %) koja je u talijanskom istraživanju uočena u samo 3,4 % ispitanika. Bertolli i sur. (2018) uočili su osam različitih NS5A RAS u podtipu 1a, 14 različitih NS5A RAS u podtipu 1b i šest različitih NS5A RAS u podtipu 3a, dok su u ispitanika zaraženih podtipom 1a u ovom istraživanju uočene su samo četiri različite NS5A RAS, a u ispitanika zaraženih podtipovima 1b i 3a po tri različite NS5A RAS (Bertolli i sur., 2018). U drugom talijanskom istraživanju Bartolini i sur. (2017) analizirali su prisutnost RAS u 42 ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a i uočili rezistencijske mutacije u regiji NS5A u 11,9 % bolesnika pri čemu je najčešće uočena RAS bila A30K (9,5 %) (Bartolini i sur., 2017). U hrvatskih ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a mutacije u regiji NS5A manje su zastupljene, naročito ako se u obzir uzmu samo klinički značajne RAS (2,7 %). U trećem talijanskom istraživanju Caudai i sur. (2017) analizirali su frekvenciju RAS u 122 bolesnika genotipa 1 s kroničnim hepatitisom C iz četiri različite klinike u Italiji. NS5A RAS uočili su u 13,9 % bolesnika, od toga 4,9 % podtipa 1a i 23,0 % podtipa 1b (Caudai i sur., 2017). Unatoč visokoj prevalenciji NS5A RAS u podtipu 1b koja je slična prevalenciji u hrvatskih ispitanika, učestalost mutacije Y93H bila je nešto niža (6,6 %). Slično kao u ovom istraživanju, u talijanskom istraživanju uočene su samo četiri različite RAS u podtipu 1a i šest različitih RAS u podtipu 1b.

Od ostalih istraživanja u južnoj Europi, u Španjolskoj su Carrasco i sur. (2017) uočili NS5A RAS u ukupno 36,1 % od 166 bolesnika s kroničnim hepatitisom C u sklopu predterapijske obrade u Madridu (Carrasco i sur., 2017). Susstitucije su uočene u 18,9 % bolesnika zaraženih HCV-om

podtipa 1a, 41,3 % bolesnika zaraženih podtipom 1b te 23,5 % zaraženih podtipom 3a (Carrasco i sur., 2017). Prevalencija rezistencijskih mutacija, naročito u podtipu 1b i 3a, viša je nego u ovom istraživanju. Drugo španjolsko istraživanje proučavalo je prisutnost RAS u 232 bolesnika s kroničnim hepatitisom C u dvije bolnice u sjevernoj Španjolskoj pri čemu su Grandal i sur. (2018) uočili 5,5 % klinički značajnih RAS u genotipu 1a s veoma sličnim rezistencijskim profilom kao u hrvatskih ispitanika - najčešća supstitucija bila je Q30H/R (3,1 %) dok su preostale RAS (M28T, L31M, H58D, Y93H) bile zastupljene manje od 1 % (Grandal i sur., 2018). U španjolskom istraživanju NS5A RAS nisu uočene u bolesnika zaraženih genotipom 3 (Grandal i sur., 2018). U portugalskoj kohorti, NS5A RAS bile su prisutne u 28,4 % od 81 bolesnika zaraženih genotipom 1, odnosno u 23,2 % bolesnika zaraženih podtipom 1a (M28V, Q30H/R, L31M, Y93C/H) i 16 % bolesnika zaraženih podtipom 1b (L31M i Y93H) (Brandão i sur., 2018). Ovo je ujedno i jedno od rijetkih istraživanja gdje se prevalencija RAS pokazala višom u podtipu 1a u odnosu na podtip 1b genotipa 1. Najčešće uočena NS5A RAS bila je Y93C/H s prevalencijom od 12 % u genotipu 1b i 8,9 % u genotipu 1a (Brandão i sur., 2018). U hrvatskih ispitanika mutacija Y93H uočena je isključivo u ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 1b.

Prevalencija i tip RAS u regiji NS5A ispitanika iz sjeverne i zapadne Europe također su se pokazali raznolikim. U škotskoj kohorti prevalencija NS5A RAS uočena je u 16,8 % od 525 bolesnika zaraženih HCV-om podtipa 1a, slično kao u hrvatskih ispitanika. Najčešće uočene supstitucije bile su M28V (5,0 %) i Q30R (1,5 %), jednako kao i u oba hrvatska nacionalna istraživanja. Međutim, u škotskom istraživanju uočeno je 13 različitih RAS u ispitanika zaraženih podtipom 1a, dok su u ispitanika iz Hrvatske u ovom istraživanju uočene samo četiri različite RAS (Bradley Stewart i sur., 2018). Lindström i sur. (2015) uočili su nisku prevalenciju (5,8 %) NS5A RAS u Švedskoj gdje su u po jednog ispitanika zaraženog podtipom 1a (2 %) pronađene mutacije Q30H odnosno Y93H te u jednog ispitanika zaraženog podtipom 3a (3 %) mutacija Y93H (Lindström i sur., 2015). U 14 ispitanika zaraženih podtipom 1b nisu uočene NS5A RAS, što je veoma netipično, ali se može pripisati izrazito malom uzorku (Lindström i sur., 2015). Istraživanje iz Velike Britanije uočilo je mutacije povezane s rezistencijom na inhibitore NS5A u 4,8 % od 42 bolesnika zaraženih podtipom 1a i 13,0 % 23 bolesnika zaraženih podtipom 1b (McCormick i sur., 2014).

Najveći broj podataka o povezanosti aminokiselinskih varijanti i uspjeha liječenja dostupan je za inhibitore proteaza kojima je ciljno mjesto djelovanja protein NS3, a ujedno predstavljaju prve odobrene DAA (Cuypers i sur., 2017a). Mutacije u regiji NS3 u prethodnim istraživanjima pokazale su se specifičnima za genotip virusa što se može objasniti činjenicom da je manje od 50 % aminokiselinskih ostataka proteina NS3 konzervirano među genotipovima. Također, samo nekoliko ključnih mutacija u ovom enzimu dovoljno je za uzrokovanje značajne rezistencije, naročito na prvu

generaciju inhibitora NS3 (Zeuzem i sur., 2017; Sorbo i sur., 2018). Podaci o prevalenciji RAS na inhibitore NS3 u susjednim državama oskudni su, a veći broj istraživanja proveden je u Italiji. U talijanskom opazajnom istraživanju prevalencija rezistencije na inhibitore NS3 iznosila je 20,4 %, a najčešće je bila uočena u podtipu 1a (45,2 %) i podtipu 1b (10,8 %) dok je ukupna prevalencija RAS u podtipu 3a bila 4,6 % (Bertolli i sur., 2018). Iako su u talijanskom istraživanju analizirane sve RAS koje uzrokuju povećanje srednje učinkovite koncentracije lijekova više od 2 puta, u ovom istraživanju uočena je gotovo za 20 % viša prevalencija rezistencije na inhibitore NS3 u bolesnika zaraženih podtipom 1a (68,8 %) i 1b (27,5 %), a nešto niža u bolesnika zaraženih podtipom 3a (1,8 %). Opća stopa prevalencije NS3 RAS stoga je u ovom istraživanju također bila viša (33,0 %). Iako se i u talijanskom istraživanju najčešće uočenom RAS u regiji NS3 pokazala Q80K u podtipu 1a (17 %), u hrvatskih ispitanika prevalencija ove RAS bila je gotovo tri puta viša (46,8 %). U hrvatskih ispitanika zaraženih podtipom 1b dominantna mutacija bila Y56F (22,5 %) koja je u talijanskom istraživanju uočena svega u jednog ispitanika (0,2 %). Bertolli i sur. (2018) uočili su 12 različitih NS3 RAS u podtipu 1a, 13 različitih RAS u podtipu 1b i šest različitih RAS u podtipu 3a, dok su ovom istraživanju u ispitanika zaraženim podtipom 1a i 1b uočene su samo četiri različite NS3 RAS, a u ispitanika zaraženih podtipom 3a dvije različite NS3 RAS (Bertolli i sur., 2018). U drugom talijanskom istraživanju Ferraro i sur. (2014) uočili su prisutnost šest različitih RAS u 14 % od 125 bolesnika zaraženih HCV-om podtipa 1b pri čemu je T54S (4 %) bila najčešće uočena mutacija. Prevalencija mutacije T54S slična je kao u ovom istraživanju (2,5 %), a niti talijansko istraživanje nije dokazalo RAS Y56F koja je dominantna u hrvatskih ispitanika (Ferraro i sur. 2014).

I druga europska istraživanja uočila su različite stope prevalencije rezistencije na inhibitore NS3, pri čemu je u bolesnika zaraženih podtipom 1a HCV-a najčešće prisutna RAS bila Q80K. Jimenez-Sousa i sur. (2016) ispitali su prevalenciju NS3 RAS u 2568 bolesnika s kroničnim hepatitisom C iz 115 bolnica diljem Španjolske. Najčešće uočena mutacija bila je Q80K (11,1 %) dok su druge najčešće zastupljene RAS bile S122G (6,2 %), T54S (3,5 %), V55A (2,6 %) te V55I (2,2 %). Prevalencija ostalih RAS (V36L/M, R155K i D168E) bila je niža od 2 %. Uočeno je kako prevalencija Q80K nije ujednačena unutar države već je zastupljena u rasponu 7,3 – 22,2 % (Jimenez-Sousa i sur., 2016). Beloukas i sur (2015) proučavali su prevalenciju mutacije Q80K u 238 bolesnika s kroničnim hepatitisom C u različitim regijama Engleske (Beloukas i sur. 2015). Mutacija Q80K bila je prisutna u 18,5 % ispitanika u rasponu 14,9 – 27,1 % unutar države. Sekvenciranjem nove generacije koje omogućava granicu uočavanja RAV čiji ukupni udio u virusnoj populaciji čini manje od 1 %, prevalencija Q80K iznosila je više od 40 %. Među bolesnicima s mutacijom Q80K, 11,4 % imalo je dodatne RAS u regiji NS3 od kojih su s učestalošću većom od 10 % bile prisutne V36L i V55A (Beloukas i sur. 2015).



Izrazita konzerviranost aktivnog mjesta NS5B neophodna za očuvanje enzimske RNA-polimerazne aktivnosti ovog proteina omogućuje pangnotipsku učinkovitost NI NS5B i visoku gensku barijeru za nastanak rezistencije (Li i Chung, 2019). Ovim istraživanjem je prvi put u Hrvatskoj ispitana prisutnost rezistencijskih mutacija na NI u regiji NS5B HCV-a. Jedina uočena supstitucija bila je L159F, prisutna isključivo u podtipu 1b HCV-a (31,3 %). Literaturni podaci o prevalenciji NS5B rezistencije u nacionalnim istraživanjima oskudni su. U talijanskom istraživanju Bertolli i sur. (2018) ispitivali su prisutnost NS5B RAS u 496 ispitanika zaraženih podtipovima 1a, 1b i 3a HCV-a, pri čemu su NI NS5B RAS uočene također samo u podtipu 1b (21,1 %). Najčešće prisutne mutacije bile su L159F (13,4 %) i C316N (19,1 %) (Bertolli i sur., 2018). U drugom talijanskom istraživanju Bartolini i sur. (2017) analizirali su prisutnost RAS u 42 ispitanika zaraženih HCV-om podtipa 3a u kojih nisu uočili rezistencijske mutacije u regiji NS5B (Bartolini i sur., 2017). U portugalskom istraživanju, Brandão i sur. (2018) ispitivali su prisutnost NS5B RAS u 81 ispitanika zaraženih genotipom 1 koje su uočene s prevalencijom od 14,8 % i to isključivo u podtipu 1b. Supstitucija L159F koja uzrokuje smanjenu osjetljivost na NI NS5B SOF uočena je u 24 % ispitanika zaraženih podtipom 1b HCV-a. Međutim, svi ispitanici postigli su SVR nakon 12 tjedana liječenja kombinacijom SOF/LDV što naglašava važnost i učinkovitost kombinirane terapije (Brandão i sur., 2018).

Iako su neka nacionalna istraživanja proučavala prisutnost RAS u više različitih regija virusnog genoma, većina regionalnih istraživanja bila je usmjerena samo na pojedine genotipove HCV-a, poput genotipa 1 kojim je zaraženo više od 60 % osoba s kroničnim hepatitisom C u Europi (Petruzello i sur., 2016; Gower i sur., 2014). U nekoliko europskih zemalja uočena je prevalencija rezistencije na sve DAA usporediva s podacima iz Hrvatske. Dietz i sur. (2015) proveli su paralelno populacijsko sekvenciranje regija NS3, NS5A i NS5B 312 prethodno neliječenih bolesnika zaraženih genotipom 1 u Njemačkoj. Rezistencija na inhibitore NS3, NS5A i NS5B uočena je u 20,5 %, 11,9 %, odnosno 22,1 % ispitanika, s bitnim razlikama u prevalenciji ovisno o podtipovima (Dietz i sur., 2015). Najčešće uočena mutacija u regiji NS3 bila je Q80K (19,9 %), naročito u podtipu 1a (34,7 %) dok su ostale RAS uočene rijetko. NS5A RAS identificirane su u 7,1 % ispitanika zaraženih podtipom 1a i 17,6 % ispitanika zaraženih podtipom 1b. U podtipu 1a najčešća mutacija bila je M28V (3,5 %) dok su ostale mutacije (L31M, Y93F/N, Q30H, L31M, Y93H) bile zastupljene s manje od 2 %. U podtipu 1b najčešća mutacija bila je Y93H (14,1 %) praćena sekundarnim mutacijama na položajima R30, P58 i Q54. RAS na NNI polimeraze NS5B uočene su u 3,5 % sekvencija podtipa 1a i 44,4 % sekvencija podtipa 1b (Dietz i sur., 2015). Parczewski i sur. (2018) uspoređivali su učestalost NS3 i NS5A RAS u 387 bolesnika zaraženih HCV-om genotipa 1 u Poljskoj. RAS na inhibitore NS3 uočili su u 33,3 % bolesnika zaraženih podtipom 1a i 2,6 % bolesnika zaraženih podtipom 1b. RAS na inhibitore NS5A uočili su u 5,6 % ispitanika zaraženih podtipom 1a i 9,3 % ispitanika zaraženih

podtipom 1b HCV-a. Varijacije na položajima 31 i 93 bile su prisutne samo u podtipu 1b (Parczewski i sur., 2018).

Za razliku od nacionalnih istraživanja koja su uglavnom ispitivala prevalenciju rezistencije na određene DAA u pojedinim genotipovima HCV-a, globalna istraživanja omogućuju pregled RAS na inhibitore NS3, NS5A i NS5B u većine epidemijski rasprostranjenih genotipova. Najčešće je riječ o analizama temeljenim na prethodno unesenim sekvencijama dostupnim u različitim bazama podataka ili kliničkim istraživanjima učinkovitosti pojedinih skupina DAA. Ova istraživanja ujedno omogućuju pouzdanije praćenje raznolikosti raspodjele RAS ovisno o geografskim regijama budući da ne dolazi do nesukladnosti u definiciji RAS koja se često javlja u interpretaciji podataka između različitih istraživanja. Patiño-Galindo i sur. (2016) prikupili su podatke iz tri različite baze podataka 2013. godine te analizirali prisutnost NS3 RAS u 2901 sekvencija, NS5A RAS u 2216 sekvencija i NS5B RAS u 1344 sekvencija genotipova HCV-a 1 – 6 (Patiño-Galindo i sur., 2016). Pokazalo se kako je među NS3 RAS Q80K bila visoko zastupljena u podtipu 1a (36,6 %) za koji su se karakterističnim pokazale i V55A/I (3,9 %). Ostale RAS bile su zastupljene manje od 2 %. Najznačajnijim RAS povezanim s kliničkom rezistencijom na inhibitore NS5A pokazale su se L31V/M te Y93H/N. Y93H bila je zastupljena u 4,8 % bolesnika zaraženim podtipom 1b i 3,1 % ispitanika zaraženih genotipom 3. Učestalost NS5B RAS također bila je različito zastupljena među genotipovima HCV-a. Među varijacijama koje utječu na NI, L159F identificirana je samo u 4,5 % sekvencija podtipa 1b, gotovo pet puta manje u odnosu na hrvatske ispitanike (Patiño-Galindo i sur., 2016). Kliemann i sur. (2016) prikupili su podatke iz Europske baze podataka za hepatitis C i analizirali RAS u 798 sekvencija NS3, 699 sekvencija NS5A i 535 sekvencija NS5B podtipova 1a, 1b i 3a HCV-a bolesnika prethodno neliječenih DAA (Kliemann i sur., 2016). U regiji NS3 najčešće uočena mutacija bila je Q80K u podtipu 1a (44,7 %) s visokom prevalencijom sličnom kao u hrvatskih ispitanika. Također, u ovim istraživanjem dokazana je visoka prevalencija Y56F (15,9 %). U regiji NS5A uočeno je više različitih RAS s prevalencijom nižom od 3 % u podtipu 1a (L23M, M28T, Q30H, Q30R, L31M, P58S, Y93C), dok su u podtipu 1b NS5A RAS zastupljene više od 2 % bile L28M, R30Q, M31L, P58S i Y93H. U podtipu 3a prevalencija NS5A RAS iznosila je 3,6 % s uočenim supstitucijama M28I, A30L i P58R. Prevalencija NS5B RAS bila je niža od 1 % osim S556G (7,8 %) koja u bolesnika genotipa 1 uzrokuje rezistenciju na NNI DCV (Kliemann i sur., 2016). Chen i sur. (2016) analizirali su globalnu prevalenciju RAS za sve regije i genotipove na 1455 sekvencija HCV-a duljine veće od 9000 pb iz baze podataka GenBank porijeklom od bolesnika koji prethodno nisu liječeni DAA (Chen i sur., 2016). Najmanje jedna dominantna rezistentna varijanta uočena je u 58,7 % sekvencija - od toga 74,1 % u Aziji, 71,9 % u Africi, 35,5 % u Americi i 51,4 % u Europi. Kada je analiza ograničena samo na klinički značajne RAS opća prevalencija rezistencije iznosila je 37,9 % - od toga 48,4 % u Americi, 29,3 % u Europi, 18,5 % Aziji i 31,3 % u Africi. Prevalencija

RAS bila je 40,0 % u regiji NS5A, 29,6 % u regiji NS3 i niža od 4,0 % u regiji NS5B. Klinički značajne RAS uočene su s prevalencijom od 12 % na inhibitore NS5A, 25,1 % na inhibitore NS3, 0,1 % na NI polimeraze NS5B te 3,8 % na NNI polimeraze NS5B što je usporedivo s rezultatima ovog istraživanja. Također, ukupna prevalencija RAS (45,7 %) i klinički značajnih RAS (27,7 %) uočena u ovom radu odgovara vrijednostima karakterističnim za Europu (Chen i sur., 2016).

Podaci nekoliko istraživanja upućuju na to kako bi prevalencija specifičnih RAS mogla varirati ovisno o geografskoj regiji. Primjerice, pokazalo se kako prevalencija RAS Y93H u genotipu 3, koja je uočena u 1,8 % hrvatskih ispitanika, varira između 0 i 17 % u različitim geografskim regijama (Hernandez i sur., 2013). Sarrazin i sur. (2016) analizirali su podatke liječenja 2144 bolesnika zaraženih HCV-om podtipa 1a ili 1b u sklopu druge i treće faze kliničkog ispitivanja LDV i SOF pomoću populacijskog sekvenciranja i sekvenciranja nove generacije (Sarrazin i sur., 2016). Prevalencija RAS u regiji NS5A prethodno neliječenih bolesnika iznosila je 16 % neovisno o podtipu HCV-a - 15,6 % u podtipu 1a te 16,4 % u podtipu 1b. Od 338 bolesnika s NS5A RAS, 316 (93,5 %) postiglo je SVR nakon liječenja LDV/SOF s ili bez ribavirina u usporedbi s 1741 od 1770 (98,4 %) bolesnika bez NS5A RAS. Usporedbom bolesnika iz EU i SAD-a uočene su manje razlike u geografskoj raspodjeli NS5A RAS koje su za podtip 1a bile prisutne češće u EU (20,9 %) u odnosu na SAD (15 %). Sličan trend uočen je i za podtip 1b pri čemu su NS5A RAS također češće utvrđene u bolesnika iz EU (17,1 %) u odnosu na SAD (15,5 %). U podtipu 1a uočena je slična prevalencija pojedinačnih RAS (L31M, Q30H/R i Y93H) neovisno o regiji, dok je prevalencija RAS u podtipu 1b bila viša u EU (15,0 %) u odnosu na SAD (9,3 %). Od 202 bolesnika prethodno neliječenih inhibitorima NS3, 11,4 % imalo je NS3 RAS, od kojih je 95,5 % postiglo SVR. Od ukupno 1692 bolesnika za koje su dobivene sekvencije regije NS5B NI RAS uočene su u 41 ispitanika (2,4 %), pri čemu je najzastupljenija RAS bila L159F (2,1 %) (Sarrazin i sur., 2016). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazuju kako je prevalencija NS5A RAS po podtipovima u Hrvatskoj niža i bliža vrijednostima iz SAD-a. Krishnan i sur. (2015) pratili su učinkovitost liječenja PTV, OBV i LDV 406 bolesnika zaraženih genotipom 1 HCV-a u sklopu druge faze kliničkog ispitivanja ovih lijekova (Krishnan i sur., 2015). NS3 RAS uočene su u 45 % bolesnika zaraženih podtipom 1a, pri čemu je učestalost Q80K iznosila 46,8 % među sekvencijama iz SAD-a i 13,5 % među sekvencijama iz EU. NS5A RAS na poziciji M28, Q30, L31, H58, ili Y93 uočene su u 15 % bolesnika zaraženih podtipom 1a, pri čemu je najučestalija mutacija bila M28V (7 %), koja je uočena isključivo u sekvencijama porijeklom iz SAD-a. Mutacije Q80K te M28V također su bile najzastupljenije NS5A i NS3 RAS u podtipu 1a u hrvatskih ispitanika, a čini se kako je njihova učestalost viša od vrijednosti karakterističnih za Europu te usporediva s vrijednostima tipičnim za SAD. U bolesnika zaraženih podtipom 1b prevalencija NS5A RAS na poziciji L28, R30, L31, P58 ili Y93 bila je 25 % pri čemu je najčešće uočena mutacija bila Y93H (5,4 %) (Krishnan i sur., 2015). Zeuzem i sur. (2017)

analizirali su podatke iz 35 istraživanja prve, druge i treće faze kliničkih ispitivanja u 22 države kako bi ustanovili prevalenciju NS5A RAS prije primjene DAA u 3507 bolesnika zaraženih podtipom 1a i 1886 zaraženih podtipom 1b (Zeuzem i sur., 2017). NS5A RAS uočene su u 13,0 % bolesnika zaraženih podtipom 1a i 17,6 % bolesnika zaraženih podtipom 1b diljem svijeta, odnosno 12,1 % bolesnika zaraženih podtipom 1a i 16,8 % bolesnika zaraženih podtipom 1b u Europi. Najčešće uočene mutacije u podtipu 1a bile su M28V (5,4 %) i L31M (2,3 %), dok je mutacija Y93H je u podtipu 1b uočena mnogo češće od ostalih (10,6 %), bez velikih razlika u regionalnoj zastupljenosti što je usporedivo s rezultatima ovog istraživanja. Valja napomenuti kako u većini takozvanih globalnih analiza veliki dijelovi svijeta ipak nisu uključeni odnosno kako su mutacije koje uzrokuju rezistenciju bitno manje proučavanje u Africi, Aziji i Južnoj Americi (Zeuzem i sur., 2017).

Dobro je poznato kako svaki lijek ili porodica lijekova potiče specifičan mutacijski profil za određeni virusni genotip odnosno podtip te kako svaku skupinu DAA karakterizira različita genska barijera za rezistenciju. Međutim, iako se specifične rezistencijske mutacije za svaki individualni lijek u određenoj skupini razlikuju, postoji mogućnost križne rezistencije između komponenti različitih skupina lijekova (Kliemann, 2016). Manji broj istraživanja pratio je istovremenu prisutnost RAS na sve tri skupine DAA za svakog pojedinog ispitanika, prvenstveno zbog nedostupnosti dovoljno dugačkih sekvencija odnosno sekvencija koje obuhvaćaju sve značajne regije genoma. Chen i sur. (2016) su u globalnoj analizi 1455 sekvencija genotipova 1 – 6 uočili nisku prevalenciju višestrukih RAS u različitim nestrukturnim regijama istog genoma (1,2 – 3,5 %), uz iznimku NS3 + NS5A RAS (15,6 %). Prevalencija višestrukih klinički značajnih RAS bila je još rjeđa, naročito kombinacije u koje je uključena regija NS5B (0,2 – 0,7 %) (Chen i sur., 2016). Krishnan i sur. (2015) u sklopu druge faze kliničkog istraživanja koje je uključivalo 406 bolesnika zaraženih genotipom 1 HCV-a nisu uočili RAS u sve tri regije, a samo u dva (0,5 %) bolesnika uočili su NS5A + NS5B RAS (Krishnan i sur., 2015). Brandão i sur. (2018) su u portugalskom radu koji se fokusirao na prevalenciju RAS u regiji NS5 genotipa 1 uočili RAS na dvije skupine inhibitora NS5 (NS5A + NS5B) u 4,9 % od 81 ispitanika (Brandão i sur., 2018). Itakura i sur. (2015) uočili su nisku prevalenciju NS3 + NS5A RAS (1,3 %) u 493 bolesnika podtipa 1b u Japanu (Itakura i sur., 2015). U talijanskom nacionalnom istraživanju Bertolli i sur. (2018) ustanovili su kako je od 372 bolesnika genotipova 1 – 4 za koje je ispitana rezistencija na sva tri gena, 29 (7,3 %) bilo rezistentno na dvije ili više skupina DAA (Bertolli i sur., 2018). Najučestalija je bila kombinacija NS3 + NS5A RAS (2,7 %), potom NS3 + NS5B RAS (1,9 %) te NS5A + NS5B RAS (1,6 %). Rezistencija na sve tri skupine DAA uočena je samo u dva (0,5 %) bolesnika zaražena podtipom 1b (Bertolli i sur., 2018). U ovom istraživanju uočena je slična prevalencija višestrukih RAS u tri najčešće zastupljena genotipa u Hrvatskoj (8,3 %). Najčešćim su se pokazale NS3 + NS5A RAS (5 %), dok su kombinacije RAS koje uključuju regiju NS5B bile naročito rijetke (manje od 2 %). Rezistencija na tri skupine DAA također je uočena samo u dva

bolesnika podtipa 1b (0,7 %). Ovo je ujedno jedino dosad provedeno istraživanje u Hrvatskoj koje je istraživalo istovremenu prisutnost RAS na više od jedne skupine DAA. Uloga višestrukih RAS u nastanku rezistencije nije u potpunosti definirana, a analiza nekoliko bolesnika koji nisu postigli SVR ukazuje na potencijalan učinak dvostruke rezistencije NS3 + NS5A što valja uzeti u obzir budući da mnoge najčešće korištene kombinacije DAA sadrže inhibitore NS3 i inhibitore NS5A (Bertolli i sur., 2018).

Većina istraživanja rezistenciju HCV-a na DAA ispitivala je s obzirom na genotip virusa pri čemu su prevalencija i tip RAS uglavnom pratili obrazac specifičan za genotip. Svega nekoliko istraživanja pratilo je prevalenciju rezistencije na DAA u okviru drugih kliničkih, demografskih i laboratorijskih karakteristika bolesnika. Bertolli i sur. (2018) nisu uočili povezanost prevalencije NS3 ili NS5A RAS u bolesnika s cirozom jetre u odnosu na bolesnike bez ciroze (Bertolli i sur., 2018). U istraživanju Parczewski i sur. (2018) prisutnost NS3 RAS nije bila povezana s fibrozom jetre, ali se učestalost NS5A RAS značajno razlikovala u bolesnika s različitim stadijima fibroze (Parczewski i sur., 2018). Povećana frekvencija NS5A RAS pronađena je u slučajevima s uznapredovalom fibrozom jetre pri čemu je prevalencija rezistencije na inhibitore NS5A iznosila 17,2 % za bolesnike s F3 – F4 stadijem fibroze u odnosu na 6,9 % za bolesnike s F0 – F2 stadijem fibroze ( $P = 0,004$ ). Također, viša prevalencija NS5A RAS uočena je u bolesnika s cirozom jetre (20,3 %) u odnosu na bolesnike bez ciroze (7,7 %) ( $P = 0,003$ ). Nije uočena povezanost između NS3 ili NS5A RAS i spola ispitanika, viremije te koinfekcije s virusom hepatitisa B (Parczewski i sur., 2018). U ovom istraživanju jedina statistički značajna povezanost uočena je između prisutnosti NS3, NS5A i NS5B RAS i genotipa virusa, dok se spol, dob, viremija i stadij fibroze nisu pokazali povezani s prisutnošću RAS na DAA.

Iznimno velika molekularna raznolikost HCV-a uzrokovana neprekidnim procesom genske varijacije, kompeticije i selekcije omogućuje praćenje evolucijskih i epidemioloških obrazaca u kratkom vremenskom razdoblju. Rezultati filogenetske analize sekvencija podtipa 1a pokazuju kako se sve sekvencije grupiraju u dva kladija – kladij I u koji se svrstavaju sekvencije 68 ispitanika (62,4 %) i kladij II u koji se svrstavaju sekvencije 41 ispitanika (37,6 %) uključenih u ovo istraživanje. Udio sekvencija koje pripadaju kladiju I nešto je viši u odnosu na prethodna nacionalna istraživanja. Filogenetska analiza 136 sekvencija podtipa 1a tijekom 2015. i 2016. godine provedena u sklopu istraživanja prevalencije rezistencije na inhibitore NS3 u Hrvatskoj pokazala je kako su kladiju I pripadale 72 sekvencije (52,9 %), a kladiju II 64 sekvencije (47,1 %) (Grgic i sur, 2017). Filogenetska analiza 51 sekvencije podtipa 1a uzorkovanih tijekom 2017. i 2018. godine u Hrvatskoj provedena sklopu istraživanja prevalencije rezistencije na inhibitore NS5A pokazala je kako je kladiju I pripadalo 28 sekvencija (54,9 %), a kladiju II 22 sekvencije (43,1 %) (Simicic i sur., 2019). Također,

ovo istraživanje pokazalo je statistički značajnu povezanost između prisutnosti NS3 RAS i kladija podtipa 1a pri čemu su NS3 RAS uočene češće unutar kladija I (79,4 %) u odnosu na kladij II (51,2 %) ( $P = 0,003$ ). Rezistencijske mutacije koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju na inhibitore proteaze NS3 također su bile mnogo zastupljenije u kladiju I (75,0 %) u odnosu na kladij II (14,6 %), jednako kao i mutacija Q80K uočena u 73,5 % ispitanika zaraženih kladijem I i samo 2,4 % ispitanika zaraženih kladijem II podtipa 1a HCV-a ( $P < 0,001$ ). Podaci prethodnog nacionalnog istraživanja u kojem je mutacija Q80K uočena u 80,6 % bolesnika zaraženih kladijem I i niti u jednog bolesnika zaraženih kladijem II podtipa 1a HCV-a upućuju na to kako je udio Q80K u kladiju I u Hrvatskoj neprekidno visok (Grgić i sur., 2017).

Segregacija podtipa 1a u dva različita kladija po prvi put je uočena 2011. godine na temelju filogenetskih rekonstrukcija čitavog virusnog genoma HCV-a. Filogenetski informativna mjesta koja omogućuju razlikovanje kladija I od kladija II raspodijeljena su duž genoma, a naročito su koncentrirana u regijama E1, E2, NS3, NS5A i NS5B. Mnoga od ovih mjesta locirana su na kodonima ili u blizini kodona povezanih s rezistencijom na DAA (Pickett, Striker i Lefkowitz, 2011). Krishnan i sur. (2015) ustanovili su kako se većina sekvencija podtipa 1a s RAS Q80K u regiji NS3 svrstavala u kladij I (98 %) pri čemu je ukupna prevalencija Q80K u kladiju I bila 66,4 % (Krishnan i sur., 2015). Razdioba sekvencija podtipa 1a na kladij I i kladij II te pojava mutacije Q80K uglavnom u kladiju I uočena je i u brojnim drugim istraživanjima. Jimenes Souisa i sur. (2016) također su uočili mnogo višu prevalenciju mutacije Q80K u bolesnicima zaraženim kladijem I (41,5 %) u odnosu na bolesnike zaražene kladijem II (1,6 %) ( $P < 0,001$ ) (Jimenes Souisa i sur. 2016). De Luca i sur. (2015) uočili su kako je kladij I češći u ne-europskim zemljama, prvenstveno u SAD-u (75,7 %), u usporedbi s Europom (49,3 %) (De Luca i sur., 2015). Također, mutacija Q80K uočena je u 111 (51,6 %) ispitanika zaraženih kladijem I, a niti u jednog od 141 ispitanika zaraženih kladijem II podtipa 1a HCV-a (0 %). Prevalencija RAS Q80K u kladiju I bila je 56,6 % u sekvencijama porijeklom iz Europe i 48,2 % u sekvencijama porijeklom iz SAD-a. Zbog različite prevalencije mutacije Q80K u dva kladija podtipa 1a i njihove drugačije geografske raspodjele ukupna prevalencija Q80K u podtipu 1a bila je viša u SAD-u (36,5 %) u odnosu na Europu (27,6 %). Druge rezistencijske mutacije bile su uočene vrlo rijetko i nisu bile jednoliko zastupljene u dva kladija. Također, razdvajanje kladija od zajedničkog pretka je događaj za koji su De Luca i sur. (2015) ustanovili da se dogodio približno oko 1964. godine odnosno kako se kladij II pojavio u razdoblju 1961. – 1989. godine, gotovo desetljeće nakon kladija I (1952. – 1975. godine) (De Luca i sur., 2015). Filogenetska analiza sekvencija podtipa 1a po geografskim regijama pokazala je kako je većina (96 %) sekvencija s mutacijom Q80K potječe od jedne supstitucijske promjene koja je nastala oko 1940. godine na području SAD-a. Ova evolucijska povijest mogla bi objasniti prethodno uočene geografske razlike u prevalenciji mutacije Q80K. Pretpostavlja se kako je do unosa ove mutacije u Europu došlo u više nezavisnih navrata.

Cuypers i sur. (2017b) pokazali su kako je prva pojava kladija I u Italiji utvrđena oko 1962. godine (95 % HPD, 1958. – 1966.) (Cuypers i sur., 2017b). Također, vrijeme porijekla mutacije Q80K te stabilnost i visoka prevalencija u podtipu 1a upućuju na to kako ova mutacija u populaciji nije nastala kao odgovor na liječenje DAA, odnosno da je riječ o prethodno postojećoj supstituciji koji ujedno uzrokuje smanjenu osjetljivost na lijekove, a u odsutnosti lijekova pozitivno utječe na virusni *fitness* (McCloskey i sur., 2015). Činjenica da je mutacija Q80K usko povezana s kladijem I, a da kladij I i II segregiraju nezavisno o prisutnosti Q80K upućuje da bi segregacija kladija ipak mogla prethoditi nastanku supstitucije Q80K (De Luca i sur., 2015).

Rezultati ovog istraživanja upućuju na to kako nema statistički značajne povezanosti između prisutnosti NS5A RAS neovisno o njihovoj kliničkoj značajnosti i kladija podtipa 1a, dok NS5B RAS nisu uočene niti u jednom kladiju podtipa 1a. Podaci prethodnih nacionalnih istraživanja također pokazuju jednoliku zastupljenost NS5A RAS u kladiju I (4,3 %) i kladiju II (10,7 %) (Simicic i sur., 2019). Caudai i sur. (2017) ustanovili su kako NS5A RAS u 61 ispitanika nisu značajno povezane s kladijem podtipa 1a pri čemu su rezistencijske mutacije bile prisutne s prevalencijom od 2,9 % u kladiju I te 7,4 % u kladiju II ( $P = 0,579$ ) (Caudai i sur., 2017). Topologija filogenetskih stabala podtipova 1b i 3a u ovom istraživanju pokazuje njihovu jednoliku zastupljenost na različitim granama bez izraženog grupiranja ili formiranja kladija. Ipak, dok su sekvencije podtipa 1b jednoliko raspršene duž filogenetskih stabala među sekvencijama porijeklom iz drugih država, sekvencije podtipa 3a svrstavaju se pretežno na sestrinske grane što upućuje na njihovu veću međusobnu gensku sličnost. Druga europska i globalna istraživanja također nisu pokazala segregaciju podtipova 1a i 3a u kladije.

Molekularna analiza sekvencija brzo evoluirajućih virusa poput HIV-a i HCV-a pokazala se učinkovitim metodom praćenja virusnih transmisijskih događaja (Hackman i sur., 2021). Rezultati ovog istraživanja pokazali su pripadnost 27 ispitanika (9,0 %) jednom od 13 identificiranih transmisijskih parova ili klastera. Statistički značajna povezanost bila je dokazana između podtipa HCV-a i pripadnosti transmisijskom paru ili klasteru pri čemu je najveći broj ispitanika koji su dio transmisijskog para ili klastera bio zaražen HCV-om podtipa 3a (15,3 %) ( $P = 0,008$ ) u skladu s početnom hipotezom. Također, ispitanici koji su dio nekog transmisijskog para ili klastera bili su mlađi (medijan dobi = 37,0 godina) u odnosu na ispitanike kod kojih nije uočena epidemiološka povezanost infekcije HCV-om (medijan dobi = 46,0 godina) ( $P < 0,001$ ). U istraživanju Parczewski i sur. (2018) uočili su kako su sekvencije dobivene od bolesnika s uznapredovalom cirozom jetre (F3 – F4) manje često (22,2 %) formirale klasterne i parove u odnosu na sekvencije od ispitanika s manjim stupnjem fibroze (F0 – F2) (43,7 %) ( $P < 0,001$ ). Također, NS5A RAV bile su manje učestale među sekvencijama koje su formirale klasterne i parove (5,2 %) u odnosu na sekvencije u kojih nije pokazana epidemiološka povezanost (11,2 %) ( $P = 0,039$ ). Klasteri i parovi bili su mnogo zastupljeniji u

bolesnicima s podtipom 1a (70,4 %) u odnosu na podtip 1b (34,1 %) (Parczewski i sur., 2018). U ovom radu stadij fibroze i prisutnost RAS nisu se pokazali povezanima s pripadnošću transmisijским parovima. Također, iznimno velik broj klastera uočen u istraživanju Parczewski i sur. (2018) može se pripisati različitim kriterijima primijenjenim za identifikaciju transmisijских parova odnosno klastera (Parczewski i sur., 2018). Većina istraživanja definirala je pripadnost transmisijским parovima ili klasterima za sekvencije koje imaju genetsku udaljenost manju od 3 – 4,5 % uz podršku grananja 70 – 90 % (Murphy i sur., 2019; Palladino i sur.; 2020, Clipman i sur., 2021; Minosse i sur., 2021). Parczewski i sur. (2018) koristili su kriterij maksimalne genetske udaljenosti od 8 % što može objasniti velik udio utvrđenih transmisijских klastera u populaciji ispitanika (Parczewski i sur., 2018). U istraživanju Palladino i sur. (2020) uočili su 10,5 % transmisijских klastera odnosno parova na temelju regije NS5A genotipa 1a u Španjolskoj (Palladino i sur., 2020). Transmisijски parovi i klasteri pretežno su se nalazili u kladiju II (79,3 %), a više od polovice transmisijских parova i klastera činili su samo muškarci (58,6 %). U ovom istraživanju spol ispitanika nije bio povezan s pripadnošću transmisijским parovima, a svi transmisijски parovi bolesnika zaraženih podtipom 1a bili su povezani isključivo s kladijem I (11,8 %) ( $P = 0,024$ ). Valja istaknuti kako je u istraživanju Palladino i sur. (2020) kladij II (82,3 %) bio učestaliji od kladija I (17,7 %) te kako je njegovo pretpostavljeno porijeklo bilo starije (1912. godina) u odnosu na kladij I (1952. godina) što čini epidemiološku povijest podtipa 1a u Španjolskoj bitno drugačijom od ostatka Europe (Palladino i sur., 2020).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako je u svim ili gotovo svim transmisijским parovima koje čine ispitanici podtipa 1a odnosno 3a najmanje jedan ispitanik bio IDU. Metode molekularne epidemiologije korištene su u brojnim istraživanjima kako bi se identificirale transmisijские mreže IDU. U istraživanju Hackman i sur. su u populaciji 820 IDU zaraženih podtipom 1a pokazali kako je 46 % bilo dio nekog transmisijskog para ili klastera. Analiza klastera pokazala je kako je za sudionike mlađe od 35 godina bilo vjerojatnije kako će biti dio klastera (Hackman i sur., 2021). U istraživanju Clipman i sur. (2021) na 483 IDU zaražena HCV-om u Indiji (Clipman i sur., 2021) transmisijским klasterima ukupno je pripadalo 28,8 % sekvencija HCV-a s prosječnom veličinom klastera od tri osobe. Bolesnici s genetski povezanom infekcijom HCV-om bili su većinom muškog spola i značajno mlađi s medijanom dobi od 33 godine. Najčešći podtip u ovoj populaciji bio je 3b, a nisu identificirani drugi rizični faktori za svrstavanje u transmisijские klastere (Clipman i sur., 2021). Potrebno je istaknuti kako je praćenje transmisijских događaja HCV-a, naročito u visokorizičnim populacijama kao što su IDU, veoma složeno. Teško je ustanoviti točno vrijeme uspostave infekcije HCV-om budući da u 25 – 35 % zaraženih osoba dolazi do spontanog izlječenja, a nakon izlječenja postoji stalan rizik od reinfekcije. Također, u uspostavi inicijalne infekcije može sudjelovati više različitih virusnih sojeva (koinfekcija), a osobe koje razviju kroničnu infekciju mogu se u budućnosti zaraziti novih virusnim sojevima (superinfekcija). Postojanje kvazivirsa HCV-a



dovodi do nastanka visokostrukturiranih populacija u pojedinoj zaraženoj osobi tijekom vremena. Virusne varijante uzorkovane u jednoj vremenskoj točki ne odražavaju nužno pravi sastav virusne populacije, a stopa evolucije može biti veoma različita za pojedine subpopulacije (Rose i sur., 2018).

Pouzdanost evolucijske povezanosti dobivene temeljem filogenetskih rekonstrukcija raste s povećanjem dužine sekvencija. Iz tog razloga poželjno je sekvencirati duže dijelove virusnog genoma, a preciznost filodinamičkih procjena može se povećati i spajanjem više genomskih fragmenata (Pérez i sur., 2019). Stoga je u ovoj studiji dinamika populacije sekvencija podtipa 1a, 1b i 3a ispitana na spojenim sekvencijama regija NS3, NS5A i NS5B ispitanika zaraženih pojedinim genotipom HCV-a. Procijenjena stopa evolucije, izražena kao broj nukleotidnih supstitucija po mjestu po godini, bila je najveća za sekvencije podtipa 1b ( $3,8 \times 10^{-3}$ ; 95 % HPD,  $1,3 - 6,6 \times 10^{-3}$ ), dok je za sekvencije podtipa 1a ( $1,5 \times 10^{-3}$ ; 95 % HPD,  $0,5 - 2,4 \times 10^{-3}$ ) i podtipa 3a ( $2,0 \times 10^{-3}$ ; 95 % HPD,  $0,5 - 3,7 \times 10^{-3}$ ) bila nešto niža. Srednje procijenjene vrijednosti tMRCA upućuju kako zadnji zajednički predak sekvencija podtipa 1a u Hrvatskoj datira oko 1960. (95 % HPD, 1911. – 1994.) godine, sekvencija podtipa 1b oko 1994. (95 % HPD, 1973. – 2009.) godine, a sekvencija podtipa 3a oko 1978. (95 % HPD, 1933. – 2004.) godine. Brojna istraživanja proučavala su evolucijsku povijest epidemijskih podtipova poput 1a, 1b i 3a u okviru njihova porijekla i širenja diljem svijeta, a manji broj nacionalnih istraživanja bio je usmjeren na filodinamičke analize ovih potipova na regionalnoj razini.

Iako se izvornim područjem porijekla cjelokupnog genotipa 1 smatra zapadna Afrika, filogeografske analize pokazale su kako su se podtipovi 1a i 1b u 20. stoljeću vjerojatno proširili iz razvijenih zemalja u zemlje u razvoju (Magiorikinis i sur., 2009). Pretpostavlja se kako je porast broja osoba zaraženih podtipom 1a HCV-a od sredine 20. stoljeća povezan s povećanom zlouporabom droga i jatrogenim prijenosom. Cuypers i sur. (2017b) proučavali su filogenetsku povijest talijanskih bolesnika zaraženih podtipom 1a u razdoblju 2011. – 2015. godine na temelju sekvencija regije NS3 pri čemu su ustanovili kako prva pojava podtipa 1a u Italiji datira oko 1958. (95% HPD, 1949. – 1964.) godine (Cuypers i sur., 2017b). Obrazac klasteriranja pokazao je kako je do unosa podtipa 1a u Italiju došlo u više nezavisnih navrata iz zapadne Europe i SAD-a. Period nakon završetka Drugog svjetskog rata koji obilježavaju velike migracije vojnog i civilnog stanovništva mogao bi objasniti unos ovog podtipa iz Amerike u Europu (Cuypers i sur., 2017b). Ovim istraživanjem pokazano je kako zadnji zajednički predak sekvencija podtipa 1a također datira u razdoblju nakon Drugog svjetskog rata. Hoshino i sur. (2018) proučavali su filogenetsku povijest podtipa 1a na temelju sekvencija čitavog genoma na japanskom otoku Okinawi koji je nakon Drugog svjetskog rata bio pod američkom okupacijom, a karakterizira ga visok broj infekcija podtipom 1a (Hoshino i sur., 2018). Ustanovili su kako je rast efektivne populacije podtipa 1a dokazan u dva razdoblja, 1960. – 1980.

godine te početkom 21. stoljeća što se podudara s porastom kriminalnih radnji povezanih s drogama uočenom u ovom periodu na Okinawi. Infekcija među mladim IDU mogla bi biti odgovorna za period porasta efektivne populacije podtipa 1a nakon 2000. godine (Hoshino i sur., 2018). Filodinamička analiza provedena u sklopu ovog istraživanja pokazala je sličan obrazac pri čemu je virusna populacija sekvencija podtipa 1a bila stalne veličine od vremena tMRCA do 1990. godine kada dolazi do dva uzastopna eksponencijalna rasta, nakon čega se od 2005. godine veličina populacije ustaljuje. U istraživanju Pérez i sur. (2019) nastojali su identificirati obrasce rasprostranjenja podtipa 1a u španjolskoj populaciji na temelju sekvencija regija NS3, NS5A i NS5B 283 ispitanika, većinom IDU, uzorkovanih u razdoblju 2014. – 2016. godine. Španjolsko istraživanje također je potvrdilo sjevernu Ameriku kao mjesto porijekla trenutne epidemije podtipom 1a (Pérez i sur., 2019).

Zehender i sur. proučavali su raspodjelu genotipova među osobama s kroničnim hepatitisom C u Crnoj Gori u razdoblju 2007. – 2010. godine te istraživali filodinamiku i filogeografiju najzastupljenijih podtipova 1b i 3a na temelju parcijalnih sekvencija NS5B (Zehender i sur., 2013). Slično kao u ovom istraživanju, podtip 3a pokazao se zastupljenijim među mlađim osobama i IDU, dok je podtip 1b bio češći u starijih bolesnika te povezan s jatrogenim prijenosom. Vremenska i prostorna analiza pokazala je kako je podtip 1b vjerojatno unesen u Europu početkom 20. stoljeća preko Egejskog mora, te se s juga proširio po ostatku Europe, uz eksponencijalni porast efektivnog broja infekcija između 1950. i 1970. godine nakon čega se virusna populacija ustalila. Porast broja infekcija sredinom 20. stoljeća može se pripisati široko rasprostranjenom praksom nesterilnih medicinskih postupaka, naročito u okviru ratnih i poslijeratnih zbivanja (Zehender i sur., 2013). Podaci istraživanja provedenog u sklopu ove doktorske disertacije omogućuju praćenje samo nedavne povijesti podtipa 1b budući da zadnji zajednički predak ovih sekvencija datira početkom 90-ih godina 20. stoljeća, odnosno u vrijeme uvođenja univerzalnog testiranja darovane krvi na krvlju prenosive bolesti. Nakon tog perioda efektivna populacija sekvencija podtipa 1b u Hrvatskoj je relativno stalna, uz jedan manji eksponencijalni skok između 2007. i 2010. godine. Magiorkinis i sur. (2009) istraživali su porijeklo različitih podtipova genotipa 1 pomoću sekvencija regija E2P7NS2 i NS5B dobivenih od bolesnika s kroničnim hepatitisom C u Grčkoj u razdoblju 1994. – 2006. godine (Magiorkinis i sur., 2009). Epidemija uzrokovana podtipovima 1a i 1b bila je relativno stabilna u prvoj polovici 20. stoljeća, a potom je nagli porast populacije podtipa 1b uočen krajem 40-ih, a populacije podtipa 1a 60-ih godina 20. stoljeća. Ovaj vremenski okvir upućuje na to kako je globalna epidemija oba podtipa povezana s naglim povećanjem parenteralnih jatrogenih postupaka tijekom i nakon Drugog svjetskog rata. Širenje podtipa 1b koja za najmanje 16 godina prethodi širenju podtipa 1a vjerojatno je neposredno povezana s povećanjem transfuzija i neprikladnih medicinskih postupaka, dok je širenje podtipa 1a snažnije povezana povećanjem populacije IDU nakon 1960. (Magiorkinis i sur., 2009).

Filogenetske i filogeografske analize podtipa 3a u Crnoj Gori pokazale su kako je najvjerojatnije porijeklo podtipa 3a indijski potkontinent prije približno 300 godina. Zehender i sur. (2013) ustanovili su kako većina virusa podtipa 3a danas u svijetu potječe od jednog kladija čije porijeklo datira u prvoj polovici 20. stoljeća kada je ovaj podtip vjerojatno unesen s indijskog potkontinenta u zapadnu Europu (Zehender i sur., 2013). Evolucijska dinamika pokazala je kako je podtip 3a unesen u Crnu Goru vjerojatno kasnih 70-ih godina 20. stoljeća nakon čega je broj zaraženih osoba nastavio rasti (Zehender i sur., 2013). Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako zadnji zajednički predak hrvatskih ispitanika podtipa 3a također datira nešto prije 1980. što upućuje na sličan vremenski obrazac. Istraživanje ur Rehman i sur. (2014) pokazuje kako zadnji zajednički predak pakistanskih sekvencija podtipa 3a datira na prijelazu 19. u 20. stoljeće (ur Rehman i sur., 2014). Područje zlatnog polumjeseca na indijskom potkontinentu koje se prostire duž Irana, Afganistana i Pakistana ima dugu tradiciju proizvodnje opijuma, a na svjetskom tržištu drogama počelo je dominirati 70-ih godina 20. stoljeća. Pretpostavlja se kako je krijumčarenje droga i povećanje populacije IDU dovelo do širenja podtipa 3a iz navedenog područja u Europu i ostatak svijeta (Khan i sur., 2009). Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako se u Hrvatskoj tek u posljednjem desetljeću efektivna veličina populacije podtipa 3a počinje ustaljivati odnosno kako od vremena tMRCA ima eksponencijalni rast što sugerira gotovo neprekidan rast populacije IDU u posljednjih 40 godina. I druga istraživanja temeljena na koalescentnoj teoriji upućuju na to kako je razdoblje epidemijskog rasta podtipa 3a u Europi započelo tijekom druge polovice 20. stoljeća. Palladino i sur. (2018) rekonstruirali su epidemiološku povijest najčešćih podtipova HCV-a u Portugalu na temelju parcijalnih sekvencija NS5B pri čemu su ustanovili kako zadnji zajednički predak podtipa 1a u Portugalu datira 1950. (95 % HPD, 1922. – 1973.) godine, podtipa 1b 1946. (95 % HPD, 1847. – 1965.) godine, a podtipa 3a 1963. (95 % HPD, 1947. – 1977.) godine (Palladino i sur., 2018). Ovi podaci upućuju na to kako je do prvog značajnog povećanja u prevalenciji infekcije HCV-om u Portugalu došlo početkom 20. stoljeća uzrokovano gotovo isključivo epidemijom podtipa 1b. Ova epidemija uzrokovala je polako rastući neprekidan porast populacije zaraženih osoba sve do otkrića HCV-a 1989. godine i početka testiranja donirane krvi na krvlju prenosive bolesti. Epidemija podtipa 3a pojavila se 60-ih godina 20. stoljeća. povećanjem intravenskog korištenja droga. Najbrže rastuća epidemija bila je epidemija podtipa 1a u razdoblju 1980. – 1990. godine za koju se smatra da je uzrokovana značajnim povećanjem populacije IDU uslijed socioloških i kulturnih promjena te povećanom dostupnošću heroína (Palladino i sur., 2018).

Upravo se porast intravenskog korištenja droga krajem 20. stoljeća i popratnih rizičnih radnji, poput dijeljenja i korištenja nesterilnog pribora smatra glavnim razlogom učinkovitog širenja podtipova 1a i 3a HCV-a i visoke incidencije infekcije među IDU (Morice, 2006). Novije crnogorsko istraživanje u razdoblju 2013. – 2014. godine pokazalo je kako zadnji zajednički predak uključenih

IDU datira oko 1960. godine, a kako je do eksponencijalnog porasta u ovoj populaciji došlo naglo između 1995. i 2005. godine (Mugosa i sur., 2017). Minosse i sur. (2021) istraživali su molekularne karakteristike infekcije HCV-om među IDU u Italiji pri čemu su ustanovili kako je od 101 bolesnika s viremijom, većina bila zaražena podtipom 1a (47 %) i 3a (34,9 %). Filodinamičke analize pokazale su kako je podtip 1a uočen u Italiji oko 1960. godine, a porast podtipa 1a u populaciji uočen je od sredine 80-ih do sredine 90-ih godina 20. stoljeća. Analiza sekvencija podtipa 3a upućuje kako je ovaj podtip prvi put uočen 80-ih godina 20. stoljeća. od kada je populacija zaražena ovim podtipom relativno stalna (Minosse i sur., 2021). Pretpostavlja se kako je korištenje droga u Hrvatskoj započelo 60-ih, a bitan socioekonomski problem postalo 80-ih godina 20. stoljeća. kada je uočen porast zlouporabe heroína. Veliki skok registriranih korisnika heroína ranih 90-ih godina 20. stoljeća. i njihov neprekidan porast do sredine prvog desetljeća novog tisućljeća mogli bi objasniti veliku promjenu efektivne populacije HCV-a podtipa 1a i 3a uočen u ovom istraživanju tijekom navedenog razdoblja u Hrvatskoj (Zovko i Dubreta, 2020). Početkom 21. stoljeća uvedeni su prvi programi smanjenja štete koji djelatnostima poput besplatne podjele šprica i igala, anonimnog testiranja na HIV i HCV te supstitucijske terapije za opijatsku ovisnost nastoje smanjiti štetu koja nastaje kao posljedica zlouporabe droga, ovisnosti i rizičnog načina života (Zovko i Dubreta, 2020). Učinkovitost ovih programa odražava se i na dinamiku populacije HCV-a podtipova 1a i 3a u Hrvatskoj za koju je u ovom istraživanju ustanovljeno kako je u posljednjem desetljeću stalne veličine.

Potrebno je istaknuti kako je dio ovih istraživanja za procjene demografske povijesti virusne populacije koristio prethodno publicirane stope supstitucije, odnosno kako ih nisu dobili na temelju vlastitih podataka. Primjerice, Zehender i sur. (2013) nisu imali raspoložive datume uzorkovanja za sve sekvencije podtipa 1b uključene u analizu te su stoga koristili fiksnu stopu evolucije iznosa  $0,84 \times 10^{-3}$  (95 % HPD,  $0,6 - 1,5 \times 10^{-3}$ ) s/n/y (Zehender i sur., 2013). Međutim, Magiorkinis i sur. (2009) su analizom sekvencija podtipa 1b ustanovili kako je stopa evolucije za regiju NS5B 2 – 4 puta veća ( $2,6 \times 10^{-3}$ ; 95 % HPD,  $1,5 - 3,7 \times 10^{-3}$ ) od prethodnih procjena (Magiorkinis i sur., 2009). U ovom istraživanju stopa evolucije za sekvencije podtipa 1b pokazala se još većom, uz djelomično preklapanje 95 % HPD intervala s prethodnim istraživanjima. Stopa evolucije procijenjena direktno za sekvencije podtipa 3a u istraživanju Zehender i sur. (2013) iznosila je  $1,3 \times 10^{-3}$  (95 % HPD,  $1,0 - 1,5 \times 10^{-3}$ ) s/n/y što je u skladu s podacima dobivenim u ovom istraživanju (Zehender i sur., 2013). Procijenjena stopa evolucije u istraživanju Hoshino i sur. (2018) za podtip 1a bila je  $1,1 \times 10^{-3}$  (95 % HPD,  $9,7 \times 10^{-4} - 1,3 \times 10^{-3}$ ) s/n/y što je slično kao za spojene sekvencije hrvatskih ispitanika (Hoshino i sur., 2018).

Tradicionalna filogenetska istraživanja HCV-a, poput ovog, imaju nekoliko ograničenja. Sekvencije dobivene iz pojedinog domaćina u kasnijem stadiju infekcije mogu se razlikovati od onih

u ranijem stadiju budući da uslijed virusne adaptacije i selekcije potaknute imunskim sustavom može doći do promjena u genomu virusa. Stoga virusne sekvencije dobivene od bolesnika u kroničnoj fazi infekcije HCV-om mogu manje vjerno predstavljati izvorne transmisijske sojeve. Budući da se akutna infekcija HCV-om zbog nedostatka simptoma dijagnosticira iznimno rijetko, uzorci iz ove faze infekcije uglavnom nisu dostupni. Također, najtočniji prikaz filogenetskih odnosa dobio bi se na temelju sekvencija čitavog genoma, dok se u većini istraživanja iz praktičnih razloga koriste samo pojedini segmenti virusnog genoma. Nadalje, sekvenciranje prve generacije koje se koristi u većini istraživanja ne omogućava praćenje raznolikosti kvazivrsta prisutnih u manje od 15 % virusne populacije. Osim toga, mnoga istraživanja obuhvaćaju ograničeno geografsko područje i vremensko razdoblje što otežava njihovu međusobnu usporedbu (Rodrigo i sur., 2017). Također, virus uzorkovan iz periferne krvi daje nepotpunu sliku dinamike cjelokupne virusne populacije te bi usporedna analiza uzoraka iz drugih izvora (primjerice bioptata ili eksplantata jetre) mogla omogućiti najbolji uvid u složenost kvazivrsta (Gray i sur., 2012). Međutim, budući da se procjena fibroze jetre danas provodi isključivo neinvazivnim metodama poput fibroelastografije, takva istraživanja više nisu etički prihvatljiva.

Ovo istraživanje predstavlja sveobuhvatnu analizu molekularne epidemiologije najčešćih podtipova HCV-a u Hrvatskoj. Utvrđeno je kako je epidemija podtipova 1a i 3a naročito raširena među IDU srednje životne dobi. Analiza raznolikosti pojedinih sekvencija unutar podtipova pokazala je kako su klinički značajne mutacije česte u prethodno neliječenih bolesnika, naročito Q80K u podtipu 1a i Y93H u podtipu 1b. Činjenica da je u svakoj regiji uočeno svega nekoliko različitih RAS upućuje na visoku razinu homogenosti virusne populacije. Iako je većina uočenih RAS vjerojatno nastala nedavno i nasumično, neke RAS može se povezati s dugotrajnom, geografski specifičnom, usmjerenom transmisijom. Dobiveni rezultati potvrdili su važnost korištenja kombinacije DAA koji ciljaju više genomskih regija, odnosno DAA s visokom barijerom za rezistenciju, kako bi se osiguralo postizanje SVR-a neovisno o prisutnim RAS. Filodinamičke analize pokazale su kako je epidemija podtipova HCV-a u Hrvatskoj specifična u različitim razdobljima i potaknuta različitim načinima prijenosa karakterističnima za pojedini podtip. Intravensko korištenje droga danas je glavni uzročnik infekcija HCV-om, a prevencija infekcije u ovoj populaciji predstavlja značajan izazov. Veliki napredak u liječenju infekcije HCV-om u proteklom desetljeću doveo je do usvajanja strategije WHO-a za eliminaciju HCV-a kao javnozdravstvenog problema do 2030. godine. Bolje razumijevanje transmisijske dinamike u populaciji IDU ključno je za uspostavu i provedbu učinkovitih programa eliminacije HCV-a.

## 6. ZAKLJUČCI

- 1) Podtipovi 1a (109/300, 36,3 %) i 3a (111/300, 37,0 %) HCV-a u Hrvatskoj učestali su među intravenskim korisnicima droga, dok je za podtip 1b (80/300, 26,7 %) HCV-a karakterističan jatrogeni prijenos virusa.
- 2) Hrvatska je zemlja s visokom prevalencijom rezistencije na inhibitore proteina NS3 (33,0 %), umjerenom prevalencijom rezistencije na inhibitore proteina NS5A (13,7 %) te niskom prevalencijom rezistencije na nukleozidne inhibitore proteina NS5B (8,3 %), dok je rezistencija na sve tri skupine direktno djelujućih antivirusnih lijekova veoma rijetka (0,7 %).
- 3) Analiza primarne rezistencije pokazala je kako je rezistencija na inhibitore proteaze NS3 viša u ispitanika zaraženih podtipom 1a (68,8 %) i 1b (27,5 %) u odnosu na ispitanike zaražene podtipom 3a (1,8 %), a viša učestalost primarne rezistencije na inhibitore proteina NS5A utvrđena je u ispitanika zaraženih podtipom 1a (15,6 %) i 1b (21,3 %) u odnosu na ispitanike zaražene podtipom 3a (6,3 %).
- 4) Istraživanjem primarne rezistencije utvrđena je rezistencija na nukleozidne inhibitore proteina NS5B samo u ispitanika zaraženih podtipom 1b.
- 5) Analiza učestalosti pojedinih mutacija otkrila je kako su najučestalije mutacije Q80K u ispitanika zaraženih podtipom 1a te mutacija Y93H u ispitanika zaraženih podtipom 1b.
- 6) Filogenetska analiza pokazala je podjelu svih sekvencija podtipa 1a u dva kladija pri čemu su mutacije koje uzrokuju klinički značajnu rezistenciju na inhibitore proteaze NS3 (Q80K, V55A, T54S, D168E) zastupljenije u kladiju I u odnosu na kladij II.
- 7) Filogenetska analiza pokazala je kako manji broj sekvencija (9,0 %) svih podtipova pripada transmisijskim parovima ili klasterima.
- 8) Analiza transmisijskih parova pokazala je kako je najveći broj ispitanika koji su dio transmisijskog para ili klastera zaražen HCV-om podtipa 3a, dok je pripadnost transmisijskom paru ili klasteru u bolesnika zaraženih podtipom 1a bila povezana isključivo s kladijem I.
- 9) Istraživanjem epidemiološke povezanosti infekcija HCV-om podtipova 1a i 3a utvrđeno je kako se u gotovo svakom transmisijskom paru ili klasteru nalazi najmanje jedan intravenski korisnik droga.
- 10) Rezistencija na direktno djelujuće antivirusne lijekove iz skupine inhibitora NS3, NS5A i NS5B nije povezana s formiranjem transmisijskih parova ili klastera.
- 11) Filodinamičke analize pokazale su da krajem 20. stoljeća dolazi do eksponencijalnog rasta efektivne populacije sekvencija podtipa 1a i 3a što je u skladu s velikim porastom broja intravenskih korisnika droga u Hrvatskoj.

## 7. LITERATURA

Abadi S, Azouri D, Pupko T, Mayrose I. Model selection may not be a mandatory step for phylogeny reconstruction. *Nat Commun.* 2019; 10: 934. doi: 10.1038/s41467-019-08822-w.

Ahmed A, Felmler DJ. Mechanisms of Hepatitis C Viral Resistance to Direct Acting Antivirals. *Viruses.* 2015; 7: 6716-29. doi: 10.3390/v7122968.

Ajawatanawong P. Molecular Phylogenetics: Concepts for a Newcomer. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2016; 160: 185-96. doi: 10.1007/10\_2016\_49.

Akaberi D, Bergfors A, Kjellin M, Kameli N, Lidemalm L, Kolli B, Shafer RW, Palanisamy N, Lennerstrand J. Baseline dasabuvir resistance in Hepatitis C virus from the genotypes 1, 2 and 3 and modeling of the NS5B-dasabuvir complex by the in silico approach. *Infect Ecol Epidemiol.* 2018; 8: 1528117. doi: 10.1080/20008686.2018.1528117.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215: 403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Ascher D, Wielens J, Nero T, Doughty L, Morton CJ, Parker MW. Potent hepatitis C inhibitors bind directly to NS5A and reduce its affinity for RNA. *Sci Rep.* 2014; 4: 4765. <https://doi.org/10.1038/srep04765>.

Bartolini B, Giombini E, Taibi C, Lionetti R, Montalbano M, Visco-Comandini U, D'Offizi G, Capobianchi MR, McPhee F, Garbuglia AR. Characterization of Naturally Occurring NS5A and NS5B Polymorphisms in Patients Infected with HCV Genotype 3a Treated with Direct-Acting Antiviral Agents. *Viruses.* 2017; 9: 212. doi: 10.3390/v9080212.

Baumert TF, Berg T, Lim JK, Nelson DR. Status of Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection and Remaining Challenges. *Gastroenterology.* 2018; 156: 431-45. doi: 10.1053/j.gastro.2018.10.024.

Beloukas A, King S, Childs K, Papadimitropoulos A, Hopkins M, Atkins M, Agarwal K, Nelson M, Geretti AM. Detection of the NS3 Q80K polymorphism by Sanger and deep sequencing in hepatitis C virus genotype 1a strains in the UK. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21: 1033-9. doi: 10.1016/j.cmi.2015.07.017.

Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic acids research.* 2012; 41: D36-42.

Bertoli A, Sorbo MC, Aragri M, Lenci I, Teti E, Polilli E, Di Maio VC, Gianserra L, Biliotti E, Masetti C, Magni CF, Babudieri S, Nicolini LA, Milana M, Cacciatore P, Sarmati L, Pellicelli A, Paolucci S, Craxì A, Morisco F, Palitti VP, Siciliano M, Coppola N, Iapadre N, Puoti M, Rizzardini G, Taliani G, Pasquazzi C, Andreoni M, Parruti G, Angelico M, Perno CF, Cento V, Ceccherini-Silberstein F; HCV Virology Italian Resistance Network (VIRONET-C). Prevalence of Single and Multiple Natural NS3, NS5A and NS5B Resistance-Associated Substitutions in Hepatitis C Virus Genotypes 1-4 in Italy. *Sci Rep.* 2018; 8: 8988. doi: 10.1038/s41598-018-26862-y.

Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu C-H, Xie D, Suchard MA, Rimbau A, Drummond AJ. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput Biol.* 2014; 10: e1003537. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>.

Bradley-Stewart A, Goldstein E, MacLean A, Gunson R. Prevalence of pre-treatment hepatitis C virus NS5A resistance associated amino-acid substitutions in genotype 1A infected patients in Scotland. *J Clin Virol.* 2018; 101: 44-46. doi: 10.1016/j.jcv.2018.01.014.

Brandão R, Marcelino R, Gonçalves F, Diogo I, Carvalho A, Cabanas J, Costa I, Brogueira P, Ventura F, Miranda A, Mansinho K, Gomes P. Characterization of NS5A and NS5B Resistance-Associated Substitutions from Genotype 1 Hepatitis C Virus Infected Patients in a Portuguese Cohort. *Viruses.* 2018; 10: 223. doi: 10.3390/v10050223.

Calleja JL, Llerena S, Perelló C, Crespo J. NS5A Resistance: Clinical Implications and Treatment Possibilities. *AIDS Rev.* 2016; 18: 15-22.

Carrasco I, Arias A, Benítez-Gutiérrez L, Lledó G, Requena S, Cuesta M, Cuervas-Mons V, de Mendoza C. Baseline NS5A resistance associated substitutions may impair DAA response in real-world hepatitis C patients. *J Med Virol.* 2017; 90: 532-6. doi: 10.1002/jmv.24971.

Caudai C, Materazzi A, Saladini F, Di Giambenedetto S, Torti C, Ricciardi B, Rossetti B, Almi P, De Luca A, Zazzi M. Natural NS5A inhibitor resistance associated substitutions in hepatitis C virus genotype 1 infected patients from Italy. *Clin Microbiol Infect.* 2017; 24: 308.e5-308.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2017.08.003.

Chen ZW, Li H, Ren H, Hu P. Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data. *Sci Rep.* 2016; 6: 20310. doi: 10.1038/srep20310.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone



derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989; 244: 359-62. doi: 10.1126/science.2523562.

Clipman SJ, Mehta SH, Rodgers MA, Duggal P, Srikrishnan AK, Saravanan S, Balakrishnan P, Vasudevan CK, Ray SC, Kumar MS, Quinn TC, Cloherty GA, Lucas GM, Solomon SS. Spatiotemporal Phylodynamics of Hepatitis C Among People Who Inject Drugs in India. *Hepatology*. 2021; 74: 1782-94. doi: 10.1002/hep.31912.

Cuypers L, Libin P, Schrooten Y, Theys K, Di Maio VC, Cento V, Lunar MM, Nevens F, Poljak M, Ceccherini-Silberstein F, Nowe A, Van Laethem K, Vandamme AM. Exploring resistance pathways for first-generation NS3/4A protease inhibitors boceprevir and telaprevir using Bayesian network learning. *Infect Genet Evol*. 2017a; 53: 15-23. doi: 10.1016/j.meegid.2017.05.007.

Cuypers L, Vrancken B, Fabeni L, Marascio N, Cento V, Di Maio VC, Aragri M, Pineda-Peña AC, Schrooten Y, Van Laethem K, Balog D, Focà A, Torti C, Nevens F, Perno CF, Vandamme AM, Ceccherini-Silberstein F. Implications of hepatitis C virus subtype 1a migration patterns for virus genetic sequencing policies in Italy. *BMC Evol Biol*. 2017b; 17: 70. doi: 10.1186/s12862-017-0913-3.

Darriba D, Taboada G, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*. 2012; 9: 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.

De Luca A, Di Giambenedetto S, Lo Presti A, Sierra S, Prosperi M, Cella E, Giovanetti M, Torti C, Caudai C, Vicenti I, Saladini F, Almi P, Grima P, Blanc P, Fabbiani M, Rossetti B, Gagliardini R, Kaiser R, Ciccozzi M, Zazzi M. Two Distinct Hepatitis C Virus Genotype 1a Clades Have Different Geographical Distribution and Association With Natural Resistance to NS3 Protease Inhibitors. *Open Forum Infect Dis*. 2015; 2: ofv043. doi: 10.1093/ofid/ofv043.

Dietz J, Susser S, Berkowski C, Perner D, Zeuzem S, Sarrazin C. Consideration of Viral Resistance for Optimization of Direct Antiviral Therapy of Hepatitis C Virus Genotype 1-Infected Patients. *PLoS One*. 2015; 10: e0134395. doi: 10.1371/journal.pone.0134395.

Dietz J, Susser S, Vermehren J, Peiffer KH, Grammatikos G, Berger A, Ferenci P, Buti M, Müllhaupt B, Hunyady B, Hinrichsen H, Mauss S, Petersen J, Buggisch P, Felten G, Hüppe D, Knecht G, Lutz T, Schott E, Berg C, Spengler U, von Hahn T, Berg T, Zeuzem S, Sarrazin C; European HCV Resistance Study Group. Patterns of Resistance-Associated Substitutions in Patients With Chronic HCV Infection Following Treatment With Direct-Acting Antivirals. *Gastroenterology*. 2017; 154: 976-988.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2017.11.007.

- Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012; 76: 159-216. doi: 10.1128/MMBR.05023-11.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol.* 2005; 22: 1185-92. doi: 10.1093/molbev/msi103.
- Drummond AJ, Ho SY, Phillips MJ, Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 2006; 4: e88. doi: 10.1371/journal.pbio.0040088.
- Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* 2007; 7: 214. doi: 10.1186/1471-2148-7-214.
- Du L, Tang H. An insight into the molecular characteristics of hepatitis C virus for clinicians. *Saudi Med J.* 2016; 37: 483-91. doi: 10.15537/smj.2016.5.14178.
- Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *J Hepatol.* 2014; 61: S3-S13. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.031.
- El-Shamy A, Hotta H. Impact of hepatitis C virus heterogeneity on interferon sensitivity: an overview. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 7555-69. doi: 10.3748/wjg.v20.i24.7555.
- Eltahla A, Leung, P, Pirozyan, M, Rodrigo C, Grebely J, Applegate T, Maher L, Luciani F, Lloyd AR, Bull RA. Dynamic evolution of hepatitis C virus resistance-associated substitutions in the absence of antiviral treatment. *Sci Rep.* 2017; 7: 41719. doi: 10.1038/srep41719.
- Felsenstein J. *Inferring Phylogenies.* Sunderland, MA: Sinauer Associates; 2003. 664 p.
- Ferraro D, Urone N, Di Marco V, Craxì A. HCV-1b intra-subtype variability: Impact on genetic barrier to protease inhibitors. *Infect Genet Evol.* 2014; 23: 80-5. doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.028.
- Flisiak R, Zarębska-Michaluk D, Frankova S, Grgurevic I, Hunyady B, Jarcuska P, Kupčinskis L, Makara M, Simonova M, Sperl J, Tolmane I, Vince A. Is elimination of HCV in 2030 realistic in Central Europe. *Liver Int.* 2021;41: 56-60. doi: 10.1111/liv.14834.
- Fourati S, Pawlotsky JM. Virologic Tools for HCV Drug Resistance Testing. *Viruses.* 2015; 7: 6346-59. doi: 10.3390/v7122941.
- Gao J, Ju C. Research progress on the direct antiviral drugs for hepatitis C virus. *Biosci Trends.* 2017; 11: 41-45. doi: 10.5582/bst.2016.01266.

Garrido-Cardenas JA, Garcia-Maroto F, Alvarez-Bermejo JA, Manzano-Agugliaro F. DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors (Basel)*. 2017; 17: 588. doi: 10.3390/s17030588.

Gogela NA, Lin MV, Wisocky JL, Chung RT. Enhancing our understanding of current therapies for hepatitis C virus (HCV). *Curr HIV/AIDS Rep*. 2015;12: 68-78. doi: 10.1007/s11904-014-0243-7.

Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*. 2014; 61:S45-S57. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.027.

Gozlan Y, Ben-Ari Z, Moscona R, Shirazi R, Rakovsky A, Kabat A, Veizman E, Berdichevski T, Weiss P, Cohen-Ezra O, Lurie Y, Gafanovich I, Braun M, Cohen-Naftaly M, Shlomai A, Shibolet O, Zigmund E, Zuckerman E, Carmiel-Haggai M, Nimer A, Hazzan R, Maor Y, Kitay-Cohen Y, Shemer-Avni Y, Kra-Oz Z, Schreiber L, Peleg O, Sierra S, Harrigan PR, Mendelson E, Mor O. HCV genotype-1 subtypes and resistance-associated substitutions in drug-naive and in direct-acting antiviral treatment failure patients. *Antivir Ther*. 2017; 22: 431-41. doi: 10.3851/IMP3123.

Grandal M, Pernas B, Tabernilla A, Mariño A, Álvarez H, Valcarce N, Mena A, Castro-Iglesias A, Pérez AB, Delgado M, Poveda E. Prevalence of NS5A resistance associated substitutions in patients with hepatitis C virus genotypes 1a and 3: Impact on current therapeutic strategies. *J Med Virol*. 2018; 90: 1094-8. doi: 10.1002/jmv.25048.

Gray RR, Parker J, Lemey P, Salemi M, Katzourakis A, Pybus OG. The mode and tempo of hepatitis C virus evolution within and among hosts. *BMC Evol Biol*. 2011; 11: 131. doi.org: 10.1186/1471-2148-11-131.

Gray RR, Salemi M, Klenerman P, Pybus OG. A new evolutionary model for hepatitis C virus chronic infection. *PLoS Pathog*. 2012; 8: e1002656. doi: 10.1371/journal.ppat.1002656.

Grgic I, Planinic A, Santak M, Gorenec L, Lepej S Z, Vince A. High Prevalence of Q80K Among NS3 Resistance-Associated Substitutions in Subtype 1a Patients with Chronic Hepatitis C Prior to Treatment with Direct Acting Antivirals: The Croatian Data. *Hepat Mon*. 2017; 17: e45543. doi: 10.5812/hepatmon.45543.

Hackman J, Falade-Nwulia O, Patel EU, Mehta SH, Kirk GD, Astemborski J, Ray SC, Thomas DL, Laeyendecker O. Correlates of hepatitis C viral clustering among people who inject drugs in Baltimore. *Infect Genet Evol*. 2020; 77: 104078. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104078.

Harrison CJ, Langdale JA. A step by step guide to phylogeny reconstruction. *Plant J*. 2006; 45: 561-

72. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02611.x.

Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* 1985; 22: 160–74. doi: 10.1007/BF02101694.

HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing and Treating Hepatitis C. 2020. [pristup 10.01.2019.] Dostupno na: <https://www.hcvguidelines.org/>

Hernandez D, Zhou N, Ueland J, Monikowski A, McPhee F. Natural prevalence of NS5A polymorphisms in subjects infected with hepatitis C virus genotype 3 and their effects on the antiviral activity of NS5A inhibitors. *J Clin Virol.* 2013; 57: 13-8. doi: 10.1016/j.jcv.2012.12.020.

Ho SY, Shapiro B. Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Mol Ecol Resour.* 2011; 11: 423-34. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.02988.x.

Ho SY, Duchêne S. Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. *Mol Ecol.* 2014; 23: 5947-65. doi: 10.1111/mec.12953.

Holmes S. Bootstrapping Phylogenetic Trees: Theory and Methods. *Statist. Sci.* 2003; 18: 241-55. doi: 10.1214/ss/1063994979.

Hoshino K, Sugiyama M, Date T, Maruwaka S, Arakaki S, Shibata D, Maeshiro T, Hokama A, Sakugawa H, Kanto T, Fujita J, Mizokami M. Phylogenetic and phylodynamic analyses of hepatitis C virus subtype 1a in Okinawa, Japan. *J Viral Hepat.* 2018; 25: 976-985. doi: 10.1111/jvh.12898.

ICTV HCV Classification Database. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2019 [pristupljeno 10.06.2021.] Dostupno na: [https://talk.ictvonline.org/ictv\\_wikis/flaviviridae/w/sg\\_flavi/56/hcv-classification](https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification)

Issur M, Götte M. Resistance patterns associated with HCV NS5A inhibitors provide limited insight into drug binding. *Viruses.* 2014; 6: 4227-41. doi: 10.3390/v6114227.

Itakura J, Kurosaki M, Takada H, Nakakuki N, Matsuda S, Gondou K, Asano Y, Hattori N, Itakura Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Takahashi Y, Maekawa S, Enomoto N, Izumi N. Naturally occurring, resistance-associated hepatitis C virus NS5A variants are linked to interleukin-28B genotype and are sensitive to interferon-based therapy. *Hepatol Res.* 2015; 45: E115-21. doi: 10.1111/hepr.12474.

Jackowiak P, Kuls K, Budzko L, Mania A, Figlerowicz M, Figlerowicz M. Phylogeny and molecular evolution of the hepatitis C virus. *Infect Genet Evol.* 2014; 21: 67-82. doi:

10.1016/j.meegid.2013.10.021.

Jimenez-Sousa MÁ, Gutiérrez-Rivas M, Álvaro-Meca A, García-Álvarez M, Harrigan PR, Fedele CG, Briz V, Vázquez-Morón S, Resino S. NS3 Resistance-Associated Variants (RAVs) in Patients Infected with HCV Genotype 1a in Spain. *PLoS One*. 2016; 11: e0163197. doi: 10.1371/journal.pone.0163197.

Jukes TH, Cantor CH. Evolution of Protein Molecules. In Munro HN (ed.). *Mammalian Protein Metabolism*. Vol.3. 1st ed. Elsevier; 1969. p 21–132.

Kalaghatgi P, Sikorski AM, Knops E, Rupp D, Sierra S, Heger E, Neumann-Fraune M, Beggel B, Walker A, Timm J, Walter H, Obermeier M, Kaiser R, Bartenschlager R, Lengauer T. Geno2pheno[HCV] - A Web-based Interpretation System to Support Hepatitis C Treatment Decisions in the Era of Direct-Acting Antiviral Agents. *PLoS One*. 2016; 11: e0155869. doi: 10.1371/journal.pone.0155869.

Kanwal F, Kramer JR, Ilyas J, Duan Z, El-Serag HB. HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. *Hepatology*. 2014; 60: 98-105. doi: 10.1002/hep.27095.

Kass RE, Raftery AE. Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association*. *J Am Stat Assoc*. 1995; 90: 773–795.

Khan A, Tanaka Y, Azam Z, Abbas Z, Kurbanov F, Saleem U, Hamid S, Jafri W, Mizokami M. Epidemic spread of hepatitis C virus genotype 3a and relation to high incidence of hepatocellular carcinoma in Pakistan. *J Med Virol*. 2009; 81: 1189-97. doi: 10.1002/jmv.21466.

Kim CW, Chang KM. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin Mol Hepatol*. 2013; 19: 17-25. doi: 10.3350/cmh.2013.19.1.17.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980; 16: 111-20. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.

Kliemann DA, Tovo CV, da Veiga AB, de Mattos AA, Wood C. Polymorphisms and resistance mutations of hepatitis C virus on sequences in the European hepatitis C virus database. *World J Gastroenterol*. 2016; 22: 8910-8917. doi: 10.3748/wjg.v22.i40.8910.

Kohler JJ, Nettles JH, Amblard F, Hurwitz SJ, Bassit L, Stanton RA, Ehteshami M, Schinazi RF.

Approaches to hepatitis C treatment and cure using NS5A inhibitors. *Infect Drug Resist.* 2014; 7: 41-56. doi: 10.2147/IDR.S36247.

Kolarić B, Stajduhar D, Gajnik D, Rukavina T, Wiessing L. Seroprevalence of blood-borne infections and population sizes estimates in a population of injecting drug users in Croatia. *Cent Eur J Public Health.* 2010; 18: 104-9. doi: 10.21101/cejph.a3576.

Krishnan P, Tripathi R, Schnell G, Reisch T, Beyer J, Irvin M, Xie W, Larsen L, Cohen D, Podsadecki T, Pilot-Matias T, Collins C. Resistance analysis of baseline and treatment-emergent variants in hepatitis C virus genotype 1 in the AVIATOR study with paritaprevir-ritonavir, ombitasvir, and dasabuvir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 5445-54. doi: 10.1128/AAC.00998-15.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35: 1547-49. doi: 10.1093/molbev/msy096.

Kwon HJ, Xing W, Chan K, Niedziela-Majka A, Brendza KM, Kirschberg T, Kato D, Link JO, Cheng G, Liu X, Sakowicz R. Direct binding of ledipasvir to HCV NS5A: mechanism of resistance to an HCV antiviral agent. *PLoS One.* 2015; 10: e0122844. doi: 10.1371/journal.pone.0122844.

Lapa D, Garbuglia AR, Capobianchi MR, Del Porto P. Hepatitis C Virus Genetic Variability, Human Immune Response, and Genome Polymorphisms: Which Is the Interplay? *Cells.* 2019; 8: 305. doi: 10.3390/cells8040305.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007; 23: 2947-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.

Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics.* 2014; 30: 3276-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btu531.

Laugi H. Discovery of Hepatitis C Virus: 2020 Nobel Prize in Medicine. *Euroasian J Hepatogastroenterol.* 2020; 10: 105-8. doi: 10.5005/jp-journals-10018-1326.

Lee MH, Yang HI, Yuan Y, L'Italien G, Chen CJ. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 9270-80. doi: 10.3748/wjg.v20.i28.9270.

Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49: W293-W296. doi: 10.1093/nar/gkab301.

- Li DK, Chung RT. Overview of Direct-Acting Antiviral Drugs and Drug Resistance of Hepatitis C Virus. *Methods Mol Biol.* 2019; 1911: 3-32. doi: 10.1007/978-1-4939-8976-8\_1.
- Li Y, Yamane D, Masaki T, Lemon SM. The yin and yang of hepatitis C: synthesis and decay of hepatitis C virus RNA. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13: 544-58. doi: 10.1038/nrmicro3506.
- Lim PJ, Galloway PA. Hepatitis C NS5A protein: two drug targets within the same protein with different mechanisms of resistance. *Curr Opin Virol.* 2014; 8: 30-7. doi: 10.1016/j.coviro.2014.04.012.
- Lindenbach BD, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11: 688-700. doi: 10.1038/nrmicro3098.
- Lindström I, Kjellin M, Palanisamy N, Bondeson K, Wesslén L, Lannergard A, Lennerstrand J. Prevalence of polymorphisms with significant resistance to NS5A inhibitors in treatment-naive patients with hepatitis C virus genotypes 1a and 3a in Sweden. *Infect Dis (Lond).* 2015; 47: 555-62. doi: 10.3109/23744235.2015.1028097.
- Macarthur KL, Smolic R, Smolic MV, Wu CH, Wu GY. Update on the Development of Anti-Viral Agents Against Hepatitis C. *J Clin Transl Hepatol.* 2013; 1: 9-21. doi: 10.14218/JCTH.2013.007XX.
- Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Ho SY, Shapiro B, Pybus OG, Allain JP, Hatzakis A. The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS Med.* 2009; 6: e1000198. doi: 10.1371/journal.pmed.1000198.
- McCloskey CM, Liang RH, Joy JB, Krajden M, Montaner JSG, Harrigan PR, Poon AFY. Global Origin and Transmission of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 3 Q80K Polymorphism. *J Infect Dis.* 2015; 8: 1288–95. doi: 10.1093/infdis/jiu613.
- McCormick AL, Wang L, Garcia-Diaz A, Macartney MJ, Webster DP, Haque T. Prevalence of baseline polymorphisms for potential resistance to NS5A inhibitors in drug-naive individuals infected with hepatitis C genotypes 1-4. *Antivir Ther.* 2015; 20: 81-5. doi: 10.3851/IMP2763.
- Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2015; 61: 77-87. doi: 10.1002/hep.27259.
- Minosse C, Salichos L, Taibi C, Luzzitelli I, Nardozi D, Capobianchi MR, D'Offizi G, McPhee F, Garbuglia AR. Phylogenetic and Phylodynamic Analyses of HCV Strains Circulating among Patients Using Injectable Drugs in Central Italy. *Microorganisms.* 2021; 9: 1432. doi: 10.3390/microorganisms9071432.

Morice Y, Cantaloube JF, Beaucourt S, Barbotte L, De Gendt S, Goncales FL, Butterworth L, Cooksley G, Gish RG, Beaugrand M, Fay F, Fay O, Gonzalez JE, Martins RM, Dhumeaux D, Vanderborght B, Stuyver L, Sablon E, de Lamballerie X, Pawlotsky JM. Molecular epidemiology of hepatitis C virus subtype 3a in injecting drug users. *J Med Virol.* 2006; 78: 1296-303. doi: 10.1002/jmv.20692.

Mugosa B, Cella E, Lai A, Lo Presti A, Blasi A, Vratnica Z, Vujošević D, Ebranati E, Laušević D, Guarino M, Zehender G, Milano T, Pascarella S, Spoto S, Angeletti S, Ciccozzi M. Hepatitis C virus genotype 3A in a population of injecting drug users in Montenegro: Bayesian and evolutionary analysis. *Arch Virol.* 2017; 162: 1549-61. doi: 10.1007/s00705-017-3224-5.

Murphy DG, Willems B, Deschênes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 1102-12. doi: 10.1128/JCM.02366-06.

Nascimento FF, Reis MD, Yang Z. A biologist's guide to Bayesian phylogenetic analysis. *Nat Ecol Evol.* 2017; 1: 1446-54. doi: 10.1038/s41559-017-0280-x.

Nejabat N, Hosseini SY, Sarvari J, Gorzin AA, Fattahi MR, Rasoolian M. The Investigation of Drug Resistance Substitutions in NS3 Protease Sequence of Hepatitis C Virus from Non-Responder Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019; 20: 2311-2317. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.8.2311.

Palladino C, Ezeonwumelu IJ, Marcelino R, Briz V, Moranguinho I, Serejo F, Velosa JF, Marinho RT, Borrego P, Taveira N. Epidemic history of hepatitis C virus genotypes and subtypes in Portugal. *Sci Rep* 2018; 8: 12266. doi: 10.1038/s41598-018-30528-0.

Palladino C, Ezeonwumelu IJ, Mate-Cano I, Borrego P, Martínez-Román P, Arca-Lafuente S, Resino S, Taveira N, Briz V. Epidemic history and baseline resistance to NS5A-specific direct acting drugs of hepatitis C virus in Spain. *Sci Rep.* 2020; 10: 13024. doi: 10.1038/s41598-020-69692-7.

Parczewski M, Kordek J, Janczewska E, Pisula A, Łojewski W, Socha Ł, Wawrzynowicz-Syczewska M, Bociąga-Jasik M, Szymczak A, Cielniak I, Siwak E, Mularska E, Aksak-Wąs B, Urbańska A, Lübke N. Hepatitis C virus (HCV) genotype 1 NS5A resistance-associated variants are associated with advanced liver fibrosis independently of HCV-transmission clusters. *Clin Microbiol Infect.* 2019; 25: 513.e1-513.e6. doi: 10.1016/j.cmi.2018.06.028.

Patiño-Galindo JÁ, Salvatierra K, González-Candelas F, López-Labrador FX. Comprehensive Screening for Naturally Occurring Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antivirals in the



NS3, NS5A, and NS5B Genes in Worldwide Isolates of Viral Genotypes 1 to 6. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60: 2402-16. doi: 10.1128/AAC.02776-15.

Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol.* 2004; 12: 96-102. doi: 10.1016/j.tim.2003.12.005.

Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E. NS5A inhibitor resistance-associated polymorphisms in Brazilian treatment-naive patients infected with genotype 1 hepatitis C virus. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 726-30. doi: 10.1093/jac/dku462.

Pérez AB, Vrancken B, Chueca N, Aguilera A, Reina G, García-Del Toro M, Vera F, Von Wichman MA, Arenas JI, Téllez F, Pineda JA, Omar M, Bernal E, Rivero-Juárez A, Fernández-Fuertes E, de la Iglesia A, Pascasio JM, Lemey P, Garcia F, Cuypers L. Increasing importance of European lineages in seeding the hepatitis C virus subtype 1a epidemic in Spain. *Euro Surveill.* 2019; 24: 1800227. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.9.1800227.

Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2016; 22: 7824-40. doi: 10.3748/wjg.v22.i34.7824.

Pickett BE, Striker R, Lefkowitz EJ. Evidence for separation of HCV subtype 1a into two distinct clades. *J Viral Hepat.* 2011; 18: 608-18. doi: 10.1111/j.1365-2893.2010.01342.x.

Piñeiro D, Martinez-Salas E. RNA structural elements of hepatitis C virus controlling viral RNA translation and the implications for viral pathogenesis. *Viruses.* 2012; 4: 2233-50. doi: 10.3390/v4102233.

Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017; 2: 161-76. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30181-9.

Popescu CI, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y, Dubuisson J. Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology (Basel).* 2014; 3: 892-921. doi: 10.3390/biology3040892.

Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008; 25: 1253-6. doi: 10.1093/molbev/msn083.

Preciado MV, Valva P, Escobar-Gutierrez A, Rahal P, Ruiz-Tovar K, Yamasaki L, Vazquez-Chacon C, Martinez-Guarneros A, Carpio-Pedroza JC, Fonseca-Coronado S, Cruz-Rivera M. Hepatitis C

virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 15992-6013. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.15992.

Ragonnet-Cronin M, Hodcroft E, Hué S, Fearnhill E, Delpech V, Brown AJ, Lycett S; UK HIV Drug Resistance Database. Automated analysis of phylogenetic clusters. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14: 317. doi: 10.1186/1471-2105-14-317.

Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G and Suchard MA. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology.* 2018; 5: 901-4. doi: 10.1093/sysbio/syy032.

Rodrigo C, Eltahla AA, Bull RA, Luciani F, Grebely J, Dore GJ, Applegate T, Page K, Bruneau J, Morris MD, Cox AL, Osburn W, Kim AY, Shoukry NH, Lauer GM, Maher L, Schinkel J, Prins M, Hellard M, Lloyd AR; InC3 Collaborative. Phylogenetic analysis of full-length, early infection, hepatitis C virus genomes among people with intravenous drug use: the InC<sup>3</sup> Study. *J Viral Hepat.* 2017; 24: 43-52. doi: 10.1111/jvh.12616.

Rose R, Lamers SL, Massaccesi G, Osburn W, Ray SC, Thomas DL, Cox AL, Laeyendecker O. Complex patterns of Hepatitis-C virus longitudinal clustering in a high-risk population. *Infect Genet Evol.* 2018; 58: 77-82. doi: 10.1016/j.meegid.2017.12.015.

Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 2010; 138: 447-62. doi: 10.1053/j.gastro.2009.11.055.

Sarrazin C, Dvory-Sobol H, Svarovskaia ES, Doehle BP, Pang PS, Chuang SM, Ma J, Ding X, Afdhal NH, Kowdley KV, Gane EJ, Lawitz E, Brainard DM, McHutchison JG, Miller MD, Mo H. Prevalence of Resistance-Associated Substitutions in HCV NS5A, NS5B, or NS3 and Outcomes of Treatment With Ledipasvir and Sofosbuvir. *Gastroenterology.* 2016; 151: 501-12.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2016.06.002.

Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med.* 2013; 19: 837-49. doi: 10.1038/nm.3248.

Scornavacca C, Delsuc F, Galtier N. *Phylogenetics in the Genomic Era.* No commercial publisher. Authors open access book; 2020. 568 p

Sesmero E, Thorpe IF. Using the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase as a Model to Understand Viral Polymerase Structure, Function and Dynamics. *Viruses.* 2015; 7: 3974-94. doi: 10.3390/v7072808.

Sharafi H, Alavian SM. Hepatitis C resistance to NS5A inhibitors: Is it going to be a problem? *World J Hepatol.* 2018; 10: 543-8. doi: 10.4254/wjh.v10.i9.543.

Simicic P, Grgic I, Santak M, Vince A, Lepej SZ. Frequency of baseline NS5A resistance-associated substitutions in patients infected with genotype 1 of hepatitis C virus in Croatia. *Microb Pathog.* 2019; 136: 103694. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103694.

Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology.* 2014;59: 318-27. doi: 10.1002/hep.26744.

Sorbo MC, Cento V, Di Maio VC, Howe AYM, Garcia F, Perno CF, Ceccherini-Silberstein F. Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. *Drug Resist Updat.* 2018; 37: 17-39. doi: 10.1016/j.drug.2018.01.004.

Sullivan, Jack, and Paul Joyce. Model Selection in Phylogenetics. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2005; 36: 445–66. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152633.

Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993; 10: 512-26. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.

Tavaré S. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. *Lect Math Life Sci.* 1986; 17: 57–86.

Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, Tavis JE, Kiss A, Levin TR, Gish RG, Busch MP, Reingold AL, Alter MJ. Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology.* 2013; 57: 881-9. doi: 10.1002/hep.26164.

The Lecturio Medical Concept Library. Hepatitis C Virus. 2021. [pristup 15.11.2021.] Dostupno na: <https://www.lecturio.com/concepts/hepatitis-c-virus/>

Thompson JR. Emerging therapeutic options for the management of hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 7079-88. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7079.

TIBCO Statistica. 2018. [pristup 02.10.2021.] Dostupno na: <https://docs.tibco.com/products/tibco-statistica-13-5-0>

ur Rehman I, Vaughan G, Purdy MA, Xia GL, Forbi JC, Rossi LM, Butt S, Idrees M, Khudyakov YE. Genetic history of hepatitis C virus in Pakistan. *Infect Genet Evol.* 2014; 27: 318-24. doi:

10.1016/j.meegid.2014.08.005.

Vallet S, Viron F, Henquell C, Le Guillou-Guillemette H, Lagathu G, Abravanel F, Trimoulet P, Soussan P, Schvoerer E, Rosenberg A, Gouriou S, Colson P, Izopet J, Payan C; ANRS AC11 HCV Group. NS3 protease polymorphism and natural resistance to protease inhibitors in French patients infected with HCV genotypes 1-5. *Antivir Ther.* 2011; 16: 1093-102. doi: 10.3851/IMP1900.

Verma M, Kulshrestha S, Puri A. Genome Sequencing. *Methods Mol Biol.* 2017; 1525: 3-33. doi: 10.1007/978-1-4939-6622-6\_1.

Vilibic-Cavlek T, Kucinar J, Kaic B, Vilibic M, Pandak N, Barbic L, Stevanovic V, Vranes J. Epidemiology of hepatitis C in Croatia in the European context. *World J Gastroenterol.* 2015; 21: 9476-93. doi: 10.3748/wjg.v21.i32.9476.

Vince A, Iščić-Beš J, Židovec Lepej S, Baća-Vrakela I, Bradarić N, Kurelac I, Vince DB. Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes in Croatia – A 10 Year Retrospective Study of Four Geographic Regions. *Coll Antropol.* 2006; 30: 139-43.

Vince A, Židovec Lepej S, Bingulac-Popović J, Miletić M, Kuret S, Sardelić S, Vrakela IB, Kurelac I. Distribution of hepatitis C virus genotypes and subtypes in Croatia: 2008-2015. *Cent Eur J Public Health.* 2018; 26: 159-63. doi: 10.21101/cejph.a5021.

Vince A, Dugan E, Nemeth-Blažić T, Filipec T, Hrstic I, Lukšić B, Nonkovic D, Reic T, Coleman S, Razavi H, Blach S. Strategies to eliminate hepatitis C in Croatia, a modelling study. *Lijec Vjesn.* 2020; 142: 285-95. doi: 10.26800/LV-142-9-10-44.

Volz EM, Koelle K, Bedford T. Viral phylodynamics. *PLoS Comput Biol.* 2013; 9: e1002947. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002947.

Watkins WJ, Ray AS, Chong LS. HCV NS5B polymerase inhibitors. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2010; 13: 441-65.

Webster DP, Klenerman P, Dusheiko GM. Hepatitis C. *Lancet.* 2015; 385: 1124-35. doi: 10.1016/S0140-6736(14)62401-6.

WHO, Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. Towards ending viral hepatitis. World Health Organization. 2016 [pristup 14.09.2021.] Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/246177>

WHO, Hepatitis C in the WHO European Region. World Health Organization. 2017 [pristup

02.10.2021] Dostupno na: <https://www.who.int/topics/hepatitis/factsheets/en/>

WHO, Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. World Health Organization. 2018 [pristup 03.03.2021] Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550345>

WHO, Hepatitis C. World Health Organisation. 2021a [pristup 15.11.2021.] Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>

WHO, Fact sheet – Hepatitis C in the WHO European Region. World Health Organization. 2021b [pristup 02.12.2021] Dostupno na: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/hepatitis/data-and-statistics/fact-sheet-hepatitis-c-in-the-who-european-region-2021>

Wilkins T, Akhtar M, Gititu E, Jalluri C, Ramirez J. Diagnosis and Management of Hepatitis C. *Am Fam Physician*. 2015; 91: 835-42.

Wyles DL, Luetkemeyer AF. Understanding Hepatitis C Virus Drug Resistance: Clinical Implications for Current and Future Regimens. *Top Antivir Med*. 2017; 25: 103-9.

Xue W, Yang Y, Wang X, Liu H, Yao X. Computational study on the inhibitor binding mode and allosteric regulation mechanism in hepatitis C virus NS3/4A protein. *PLoS One*. 2014; 9: e87077. doi: 10.1371/journal.pone.0087077.

Yang Z, Rannala B. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet*. 2012; 13: 303-14. doi: 10.1038/nrg3186.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.

Zehender G, Sorrentino C, Lai A, Ebranati E, Gabanelli E, Presti AL, Vujošević D, Laušević D, Terzić D, Shkjezi R, Bino S, Vratnica Z, Mugosa B, Galli M, Ciccozzi M. Reconstruction of the evolutionary dynamics of hepatitis C virus subtypes in Montenegro and the Balkan region. *Infect. Genet. Evol*. 2013; 17: 223-30. doi: 10.1016/j.meegid.2013.04.003.

Zeuzem S: Treatment options in hepatitis C—the current state of the art. *Dtsch Arztebl Int*. 2017; 114: 11–21. doi: 10.3238/arztebl.2017.0011.

Zeuzem S, Mizokami M, Pianko S, Mangia A, Han KH, Martin R, Svarovskaia E, Dvory-Sobol H, Doehle B, Hedskog C, Yun C, Brainard DM, Knox S, McHutchison JG, Miller MD, Mo H, Chuang

WL, Jacobson I, Dore GJ, Sulkowski M. NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: Prevalence and effect on treatment outcome. *J Hepatol.* 2017; 66: 910-8. doi: 10.1016/j.jhep.2017.01.007.

Zhou K, Liang Z, Wang C, Hu F, Ning C, Lan Y, Tang X, Tucker JD, Cai W. Natural Polymorphisms Conferring Resistance to HCV Protease and Polymerase Inhibitors in Treatment-Naïve HIV/HCV Co-Infected Patients in China. *PLoS One.* 2016; 11: e0157438. doi: 10.1371/journal.pone.0157438.

Zovko S, Dubreta N. A Sociohistorical Overview of Harm Reduction Development in Croatia. *Interdisciplinary Description of Complex Systems.* 2020. 18: 57-71. <https://doi.org/10.7906/indecs.18.1.5>.

Zuckerkindl E, Pauling L. Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. In Kasha, M., Pullman, B (eds.). *Horizons in Biochemistry.* New York: Academic Press.; 1962. p.189-225.

## 8. POPIS KRATICA

A – adenin

apo – apolipoprotein

BF – Bayesov faktor

BH – Bayesov horizont

BOC – boceprevir

C – citozin

CSW – prodavatelji seksualnih usluga

DAA – direktno djelujući antivirusni lijekovi

DCV – daclatasvir

ddNTP – dideoksinukleotid trifosfat

dNTP – deoksinukleotid trifosfat

DSV – dasabuvir

EBR – elbasvir

EP – eksponencijalna populacija

ER – eksponencijalna raspodjela

ESS – efektivna veličina uzorka

G – gvanin

G – gama raspodjela

GDB – globalno opterećenje bolešću

GLE – glecaprevir

GTR – opći vremenski reverzibilni (model)

GZR – grazoprevir

HCV – virus hepatitisa C

HIV – virus ljudske imunodeficijencije

HKY85 – Hasegawa, Kishino i Yano, 1985

HPD – najveća posteriorna gustoća

I – nevarijabilan

IU – internacionalna jedinica

IDU – intravenski korisnici droga

JC69 – Jukes i Cantor, 1969

K80 – Kimura, 1980

KP – konstantna populacija

KZIB – Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević”

LDL – lipoprotein niske gustoće

LDV – ledipasvir

LR – lognormalna raspodjela

MCMC – Markovljev lanac Monte Carlo

MLE – procijenjena marginalna vjerojatnost

MSM – muškarci koji imaju spolne odnose s muškarcima

NI – nukleozidni inhibitor

NNI – nenukleozidni inhibitor

NRMC – nekorelirani relaksirani molekularni sat

NS – nestrukturni

OBV – ombitasvir

ORF – otvoreni okvir čitanja

PI – inhibitor proteaza

PIB – pibrentasvir

PTV – paritaprevir

RAS – supstitucija povezana s rezistencijom

RAV – varijanta povezana s rezistencijom

s/n/y – broj supstitucija po nukleotidnom mjestu po godini

SMC – strogi molekularni sat

SMV – simeprevir

SOF – sofosbuvir

STD – spolno prenosive bolesti

SVR – trajni virološki odgovor

T – timin

TK – transmisijski klaster ili par

tMRCA – vrijeme najstarijeg zajedničkog pretka

TN93 – Tamura i Nei, 1993

TPV – telaprevir



UTR – netranslatirajuća regija

VEL – velpatasvir

VLDL – lipoprotein jako niske gustoće

VOX – voxilaprevir

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija

**Aminokiseline:**

A – alanin

C – cistein

D – asparaginska kiselina

E – glutaminska kiselina

F – fenilalanin

G – glicin

H – histidin

I – izoleucin

K – lizin

L – leucin

M – metionin

N – asparagin

P – prolin

Q – glutamin

R – arginin

S – serin

T – treonin

V – valin

W – triptofan

Y – tirozin

## 9. SAŽETAK

Molekularna epidemiologija infekcije virusom hepatitisa C (HCV) izrazito je složena zbog velike raznolikosti virusnog genoma na temelju koje se kategorizira u brojne genotipove i podtipove te postojanja kvazivrsta, odnosno genski različitih varijanti unutar virusne populacije u jednom domaćinu podvrgnutih neprekidnom procesu kompeticije i selekcije. Primjena direktno djelujućih antivirusnih lijekova u posljednjem desetljeću značajno je unaprijedila liječenje akutnog i kroničnog hepatitisa C, a njihova učinkovitost dovela je do uspostave programa Svjetske zdravstvene organizacije usmjerenog na eliminaciju HCV-a kao javnozdravstvenog problema do 2030. godine. Poznato je kako neke virusne kvazivrste nose mutacije u genima čiji su produkti ciljne strukture lijekova što može utjecati na ishod antivirusnog liječenja odnosno dovesti do nastanka rezistencije. Cilj ovog istraživanja bio je provesti analizu epidemije HCV-a u Hrvatskoj u četverogodišnjem razdoblju. Istraživane su molekularne, virološke, kliničke i epidemiološke karakteristike infekcije s naglaskom na primarnu rezistenciju na lijekove iz skupine inhibitora proteina NS3, NS5A i NS5B te karakterizaciju genske raznolikosti, dinamike rasprostranjivanja i epidemiološke prošlosti najčešće zastupljenih genotipova odnosno podtipova. U istraživanje je uključeno 300 ispitanika, od kojih je njih 109 (36,3 %) bilo je zaraženo podtipom 1a, 80 (26,7 %) podtipom 1b, a 111 (37,0 %) podtipom 3a HCV-a. Prisutnost jedne ili više supstitucija povezanih s rezistencijom na najmanje jedan lijek iz skupine inhibitora proteina NS3, NS5A ili NS5B uočena je metodom Sangerova sekvenciranja u 137 (45,7 %) ispitanika. Prevalencija rezistencije na inhibitore NS3, inhibitore NS5A i inhibitore NS5B iznosila je 33,0 %, 13,7 % odnosno 8,0 %. Rezistencijske mutacije u regiji NS3 i NS5A uočene su češće u ispitanika zaraženih podtipom 1a i 1b u odnosu na podtip 3a, dok su supstitucije povezane s rezistencijom u regiji NS5B uočene isključivo u ispitanika zaraženih podtipom 1b. Filogenetske analize pokazale su grupiranje svih sekvencija podtipa 1a u dva kladija, kladij I (62,4 %) i kladij II (37,6 %), a rezistencijske mutacije na inhibitore proteaze NS3 bile su zastupljenije u kladiju I. Ukupno 27 od 300 (9,0 %) ispitanika pripadalo je jednom od 13 identificiranih transmisivskih parova ili klastera. Analiza transmisivskih parova pokazala je kako je najveći broj ispitanika koji su dio transmisivskog para ili klastera zaražen HCV-om podtipa 3a te kako se u gotovo svakom transmisivskom paru ili klasteru podtipa 1a ili 3a nalazi najmanje jedan intravenski korisnik droga. Filodinamičke analize pokazale su da krajem 20. stoljeća dolazi do eksponencijalnog rasta efektivne populacije sekvencija podtipa 1a i 3a što je u skladu s velikim porastom broja intravenskih korisnika droga u Hrvatskoj. Rezultati ovog istraživanja naglašavaju važnost korištenja kombinacije lijekova koji ciljaju više genomskih regija, odnosno onih s visokom barijerom za rezistenciju, kako bi se osiguralo postizanje trajnog virološkog odgovora neovisno o prisutnim mutacijama te ukazuju na potrebu za neprekidnim praćenjem i boljim razumijevanjem transmisivske dinamike u populaciji intravenskih korisnika droga u svrhu povećanja uspješnosti programa eliminacije HCV-a.

## 10. SUMMARY

Molecular epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection is exceptionally complex due to highly diverse viral genome, which is classified into multiple genotypes and subtypes. Furthermore, the existence of a quasispecies, which is described as distributions of genetically nonidentical but related genomes subjected to a continuous process of competition and selection in a given host, is another factor contributing to extensive HCV genetic diversity. The discovery of new direct acting antivirals spurred a revolution in the treatment of HCV patients and their efficacy has prompted the World Health Organization to launch strategy which calls for the elimination of viral hepatitis as a public health threat by 2030. Some quasispecies variants bear polymorphisms in drug-targeted genes, which may negatively impact antiviral treatment and confer resistance to direct acting antivirals. The aim of this study was to conduct a comprehensive analysis of molecular, virological, clinical and epidemiological characteristics of HCV epidemic in Croatia in a four-year period. Genetic diversity, transmission dynamics and epidemic history of the most common HCV genotypes were inferred. A total of 300 patients were included in this study. HCV genotype distribution was as follows: subtype 1a (36,3 %), subtype 1b (26,7%) and subtype 3a (37,0 %). The overall prevalence of single or multiple NS3, NS5A or NS5B resistance associated substitutions in at least 1 direct acting antiviral target detected by Sanger sequencing was 45,7 %. Prevalence of resistance to NS3, NS5A and NS5B inhibitors was 33,0 %, 13,7 % and 8,0 %, respectively. NS3 and NS5A resistance associated substitutions were more common in patients infected with HCV subtype 1a and 1b compared with subtype 3a. Resistance associated mutations in NS5B region were detected exclusively in patients infected with HCV subtype 1b. Phylogenetic tree reconstructions showed two distinct clades within the subtype 1a, clade I (62,4 %) and clade II (37,6 %). NS3 resistance associated substitutions were preferentially associated with clade I. Phylogenetic analysis demonstrated that 27 (9,0 %) HCV sequences had a presumed epidemiological link with another sequence and classified into 13 transmission pairs or clusters which were predominantly comprised of subtype 3a viruses. Intravenous drug users were a part of almost every subtype 1a and 3a transmission pair or cluster. Phylodynamic analysis highlighted an exponential increase in subtype 1a and 3a effective population size in the late 20th century which is a period associated with explosive increase in number of intravenous drug users in Croatia. This study highlights the importance of combination regimens with a high genetic barrier to resistance and different target sites as the new standard of care for HCV treatment. A better understanding of transmission dynamics in the population of intravenous drug users is critical for the increase in effectiveness of designed HCV elimination programs.

## 11. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA

### Petra Šimičić

Matični broj znanstvenika: 373403

### Osobni podaci:

Datum rođenja: 26.05.1993.

Adresa: Ulica Milana Pavelića 1b, Zagreb, Hrvatska

E-mail: petrasimicic@gmail.com

Broj mobitela: 0915910790

### Obrazovanje:

**2018.** – poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij molekularnih bioznanosti, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, Sveučilište u Dubrovniku

**2015. – 2017.** diplomski sveučilišni studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

**2012. – 2015.** preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

**2008. – 2012.** V. gimnazija, Zagreb

### Zaposlenje:

**2018.** – biolog/doktorand na istraživačkom projektu Znanstvenog centra izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva „Jačanje kapaciteta CerVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji”, Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević”, Zagreb

### Priznanja i nagrade:

**2017.** najveća pohvala (*summa cum laude*) na diplomskom sveučilišnom studiju

**2011. – 2017.** stipendija Grada Zagreba za izvrsnost

### Popularizacija znanosti i nastavna djelatnost:

**2019.** demonstriranje i prezentacija projektnih aktivnosti tijekom događaja “Meet the Biologist”

**2015.** sudjelovanje u izvođenju nastave iz kolegija „Histologija i histokemija” i „Osnove histologije i embriologije” na preddiplomskom sveučilišnom studiju biologije i molekularne biologije

**2014., 2016.** organizacija i održavanje radionica tijekom manifestacije „Noć Biologije”

**Znanstveni radovi u časopisima indeksiranim u bazama *Web of Science*, *Scopus* ili *Medline*:**

Simicic P, Grgic I, Santak M, Vince A, Zidovec Lepej S. Resistance to NS5A protein inhibitors in patients infected with genotype 1 of hepatitis C virus: the Croatian data, *Microbial Pathogenesis*, 2019;36:103694.

**Znanstveni radovi u ostalim časopisima:**

Zidovec Lepej S, Korac P, Skoric D, Batović M, Grsković P, Begic V, Harabajsa, S, Radmanic L, Simicic P. Biological features of SARS-CoV-2 and current approaches to antiviral therapy and vaccination. *Molecular and experimental biology in medicine*, 2020;3(2),1-16.

Radmanic L, Cetinic Balent N, Simicic P, Vince A, Zidovec Lepej S, Dakovic Rode O. The Need for Systematic Monitoring and Improved Surveillance of Hepatitis C Patients in Croatia, *Southeastern European Medical Journal*, 2020;2(4),28-34.

**Sažeci na domaćim i međunarodnim skupovima:**

Radmanić L, Bodulić K, Šimičić P, Vince A, Korać P, Židovec Lepej S. The effect of treatment-induced viral eradication on cytokine and growth factor expression in chronic hepatitis C, 32nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 23 – 26, 2022, Lisabon, Portugal.

Simicic P, Vince A, Radmanic L, Zidovec Lepej S. Characterization of NS5A, NS3 and NS5B resistance-associated substitutions in patients with hepatitis C virus subtype 1a, 1b and 3a in Croatia, 3rd South-East European Conference on Travel, Tropical, Migration Medicine and HIV and the 4th Croatian Conference on Travel, Tropical, Migration Medicine and HIV, September 16 – 19, 2021, Zadar, Hrvatska.

Radmanić L, Šimičić P, Papić N, Kurelac I, Židovec Lepej S, Vince A. Demographic, laboratory and clinical characteristics of newly diagnosed HCV patients during COVID-19 pandemic, 3rd South-East European Conference on Travel, Tropical, Migration Medicine and HIV and the 4th Croatian Conference on Travel, Tropical, Migration Medicine and HIV, September 16 – 19, 2021, Zadar, Hrvatska.

Radmanić L, Korać P, Gorenc L, Šimičić P, Vince A, Židovec Lepej S. SMAD-6 overexpression and CAV-1 underexpression as potential biomarkers of hepatitis C infection. 6th European Congress of Immunology, September 1 – 4, 2021, online.

Simicic P, Slovic A, Vince A, Radmanic L, Zidovec Lepej S. Genetic diversity, transmission and

resistance pattern of hepatitis C virus in treatment-naïve patients in Croatia, 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, July 9 – 12, 2021, online.

Šimičić P, Radmanić L, Grgić I, Vince A, Židovec Lepej S. High prevalence of NS3 resistance-associated substitutions in treatment naïve patients infected with genotype 1 of hepatitis C virus in Croatia, 1st Croatian Conference on Liver and Infection with international participation, November, 12 – 14, 2020, Zagreb, Hrvatska.

Radmanić L, Šimičić P, Grgić I, Begovac J, Židovec Lepej S. Prevalence of human leukocyte antigen HLA-B\*57:01 in HIV-1 infected patients in Croatia, 4th Symposium of Biologists and Ecologists of Republic of Srpska with international participation, November, 12 – 14, 2020, online.

Šimičić P, Radmanić L, Erceg Tušek M, Dubravic D, Krešović J, Beganović T, Dišković A, Zekan S, Židovec Lepej S. Chlamydia and gonorrhoea prevalence among men who have sex with men in community based centre in Zagreb, Croatia, 4th Symposium of Biologists and Ecologists of Republic of Srpska with international participation, November, 12 – 14, 2020, online.

Radmanić L, Cetinić Balent N, Baća Vrakela I, Mikulić R, Šimičić P, Vince A, Židovec Lepej S, Đaković Rode O. Diagnosis of hepatitis C virus from 2014 to 2018 at the University Hospital for Infectious Diseases „Dr. Fran Mihaljević“ in Zagreb, 12th Croatian Congress of Clinical Microbiology and 9th Croatian Congress on Infectious Diseases with international participation, October 24 – 27, 2019, Split, Hrvatska.

Šimičić P, Židovec Lepej S, Grgić I, Baća Vrakela I, Radmanić L, Vince A. Virologic relapse after treatment of a patient with HCV genotype 3a and Y93H mutation with glecaprevir/pibrentasvir, 12th Croatian Congress of Clinical Microbiology and 9th Croatian Congress on Infectious Diseases with international participation, October 24 – 27, 2019, Split, Hrvatska.

Grgić I, Simić P, Santak M, Gorenec L, Židovec Lepej S, Vince A. Resistance to NS5A inhibitors in chronic hepatitis C patients infected with subtype 1a and 1b from Croatia, 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April, 21 – 24, 2018, Madrid, Španjolska.