

Genotipizacija izolata virusa hepatitisa A iz epidemije u Hrvatskoj 2017.

Ujević, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:940941>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Josip Ujević

**GENOTIPIZACIJA IZOLATA VIRUSA HEPATITISA A IZ EPIDEMIJE
U HRVATSKOJ 2017.**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“, pod vodstvom dr. sc. Ivane Grgić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Veliko hvala mentorici dr. sc. Ivani Grgić na stručnom vodstvu, pomoći i savjetima tijekom provedbe i pisanja ovog rada. Zahvaljujem se i suvoditeljici dr. sc. Silviji Černi na susretljivosti i izdvojenom vremenu za pregledavanje samog diplomskog rada.

Želio bih se zahvaliti i svim ostalim djelatnicima Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ na razumijevanju i ugodnoj radnoj atmosferi. Posebno hvala kolegici Margi na pomoći u laboratorijskom radu.

Zahvaljujem se obitelji i prijateljima na potpori tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

GENOTIPIZACIJA IZOLATA VIRUSA HEPATITISA A IZ EPIDEMIJE U HRVATSKOJ 2017.

Josip Ujević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virus hepatitisa A (HAV) uzročnik je hepatitisa A, akutnog oboljenja jetre. Virus se prenosi fekalno-oralnim putem, direktnim kontaktom sa zaraženom osobom ili konzumacijom zaražene hrane. Analizom genomske regije VP1-2A razlikuje se šest HAV-genotipova. Genotipovi koji inficiraju čovjeka su I, II i III s podtipovima A i B. Različiti genotipovi pokazuju različitu geografsku distribuciju. Prema podacima Europskog centra za sprječavanje i kontrolu bolesti u 2017. broj oboljelih od hepatitisa A u Europi neočekivano je porastao. U Hrvatskoj je krajem iste godine zabilježen porast broja zaraženih, prvo unutar populacije muškaraca koji imaju spolne odnose s muškarcima (MSM), a zatim i u općoj populaciji. Sekvenciranjem dijela VP1/P2A regije Sangerovom metodom te analizom sekvencija identificirano je ukupno sedam sojeva, koji pripadaju genotipu IA i IB. Iz rezultata istraživanja može se zaključiti da je u Hrvatskoj bilo ukupno sedam nezavisnih izvora zaraze. Dva soja virusa UK/Spain i Europride, koja su povezana s europskom epidemijom, dominiraju u zaraženih osoba u Hrvatskoj te su pretežito prisutna u MSM-populaciji. U općoj populaciji je identificirano pet sojeva virusa, za koji način prijenosa nije utvrđen. Dobiveni podaci o genotipovima i podtipovima analiziranih izolata mogu poslužiti za molekularno epidemiološku studiju rekonstrukcije puta rasprostranjivanja virusa hepatitisa A unutar i između zaraženih populacija.

(54 stranica, 22 slika, 14 tablica, 53 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: virusni hepatitis, VP1-2A regija, genotipovi, sekvenciranje, molekularna filogenija

Voditelj: dr. sc. Ivana Grgić, znanstvena suradnica

Suvoditelj: dr. sc. Silvija Černi, docent

Ocjenitelji: dr. sc. Silvija Černi, docent

dr. sc. Zlatko Liber, prof

dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 31. 01. 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

MOLECULAR TYPING OF HEPATITIS A VIRUS ISOLATES FROM EPIDEMIC IN 2017 IN CROATIA

Josip Ujević

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Hepatitis A virus (HAV) causes hepatitis A, an acute liver disease. It is transmitted by fecal-oral route, by direct contact with infected person or by contaminated food consumption. Six genotypes are distinguished by analyzing the genomic region VP1-2A. Genotypes, I, II and III, divided into subtypes A and B, infect humans. Different genotypes show different geographical distribution. According to the European Center for Disease Prevention and Control data, the number of hepatitis A cases in Europe unexpectedly increased in 2017. By the end of the same year, there was an increase in the number of infected in Croatia, first noticed in population of men who have sex with the men (MSM) and then in general population. Seven virus outbreak strains were detected by Sanger sequencing of VP1/P2A region followed by sequence analysis. Results suggest seven independent sources of infection in Croatia. Two virus strains, UK/Spain and EuroPride, linked to epidemic in Europe, dominate in Croatia and are predominantly present in MSM population. In general population, five strains of virus have been detected, for which method of transmission has not been elucidated. The observed results can be used for molecular epidemiological reconstruction of the virus transmission between and within infected population.

(54 pages, 22 figures, 14 tables, 53 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: viral hepatitis, VP1-2A region, genotype, sequencing, molecular phylogenetics

Supervisor: Dr. Ivana Grgić, Res. Assoc.

Cosupervisor: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Dr. Zlatko Liber, Prof.

Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 31. 01. 2019.

POPIS KRATICA

ALIX – protein X koji ulazi u interakciju s ALG-2 (*ALG-2 interacting protein X*)

ALT – alanin aminotransferaza (*alanine aminotransferase*)

AST – aspartat aminotransferaza (*aspartate transaminase*)

BLAST – računalni program za lokalno sravnjenje (*Basic Local Alignment Tool*)

ddNTP – dideoksinukleotid (*dideoxynucleotide*)

dNTP – deoksinukleozid trifosfat (*nucleoside triphosphate*)

cDNA – komplementarna DNA (*complementary DNA*)

ECDC – Europski centar za sprječavanje i kontrolu bolesti (*The European centre for disease prevention and control*)

eHAV –virus hepatitisa A s ovojnicom (*enveloped Hepatitis A virus*)

eIF4F – eukariotski inicijacijski faktor 4F (*eukaryotic initiation factor 4F*)

ESCRT – endosomalni sortirajući kompleks zadužen za transport (*endosomal sorting complex required for transport*)

EtOH – etanol

HAV –virus hepatitisa A (*Hepatitis A virus*)

HAVCR1 – stanični proteinski receptor 1 virusa hepatitisa A (*Hepatitis A virus cellular receptor 1 protein*)

HIV – virus humane imunodeficijencije (*Human Immunodeficiency Virus*)

IgG – imunoglobulin G

IgM – imunoglobulin M

IRES - unutarnje ribosomsko ulazno mjesto (*internal ribosomal entry site*)

ITAF – IRES trans aktivirajući faktori (*IRES trans-activating factors*)

MEGA X – analiza molekularne evolucijske genetike X (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis X*)

ML – metoda najveće vjerojatnosti (*maximum likelihood*)

MSM – muškarci koji prakticiraju spolne odnose s muškarcima (*men who have sex with men*)

MVB – multivezikularno tijelo (*multivesicular body*)

NCBI – Nacionalni centar za biotehnoške informacije (*National Centre for Biotechnology Information*)

NTPaza – nukleozid trifosfataza (*nucleoside-triphosphatase*)

ORF – otvoreni okvir čitanja (*open reading frame*)

PIC – preinicijacijski kompleks (*pre-initiation complex*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (*polymerase chain reaction*)

rpm – okretaja u minuti (*revolutions per minute*)

RT-PCR – reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)

ssRNA – jednolančana RNA (*single-stranded RNA*)

UTR – netranslatirajuća regija (*untranslated region*)

VPg – virusni protein (početnica) vezan na genom

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Virus hepatitis A	1
1.1.1. Organizacija genoma virusa hepatitis A.....	2
1.1.2. Struktura viriona	4
1.1.2.1. Virus hepatitis A s ovojnicom (eHAV)	5
1.1.3. Replikativni ciklus	7
1.1.4. Patogeneza virusa hepatitis A	9
1.1.5. Epidemiologija virusa hepatitis A	11
1.1.6. Detekcija i karakterizacija virusa hepatitis A	15
1.1.6.1. Dijagnostika virusa hepatitis A	15
1.1.6.2. Molekularna filogenija.....	15
1.1.6.2.1. Filogenetsko stablo	16
1.1.6.2.2. Izrada filogenetskog stabla.....	17
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJALI I METODE.....	21
3.1. Ispitanici	21
3.2. Biološki uzorci	22
3.3. Korišteni reagensi	22
3.3.1. Komplet reagensa za izolaciju virusne RNA iz seruma.....	22
3.3.2. Komplet reagensa za sintezu cDNA i umnožavanje reakcijom PCR.....	23
3.3.3. Komplet reagensa za sintezu DNA (ugniježđeni PCR)	23
3.3.4. Komplet reagensa za reakciju sekvenciranja	23
3.3.5. Komplet reagensa za pročišćavanje i denaturaciju amplikona	24
3.3.6. Oligonukleotidne početnice	24
3.4. Uređaji, potrošni materijali i računalni program.....	25
3.5. Metode.....	26
3.5.1. Izolacija RNA	26
3.5.2. RT-PCR i ugniježđeni PCR	26
3.5.3. Reakcija sekvenciranja, pročišćavanje i denaturacija uzoraka	29
3.5.4. Analiza rezultata	32
4. REZULTATI	33
4.1. Genotipizacija izolata virusa hepatitis A	33

4.2. Filogenetska analiza.....	37
4.3. Rekonstrukcija tijeka epidemije u Hrvatskoj	40
5. RASPRAVA.....	43
6. ZAKLJUČCI.....	47
7. LITERATURA.....	48
8. ŽIVOTOPIS.....	54

1. UVOD

1.1. Virus hepatitisa A

Virus hepatitisa A (HAV, *Hepatitis A virus*) jednolančani je RNA virus pozitivnog smisla i najčešći uzročnik zaraze akutnim hepatitisom u svijetu. Prema taksonomiji Međunarodnog vijeća za taksonomiju virusa (ICTV, *International Cometeet on Taxonomy of Viruses*) pripada rodu *Hepatovirus*, unutar obitelji *Picornaviridae*. Unutar porodice *Picornaviridae* nalazi se 35 rodova i 80 vrsta virusa (Zell i sur, 2017). Prvi put je uočen 1973. godine pomoću imunoelektronskog mikroskopa u uzorcima stolice osoba s akutnom zarazom (Feinstone i sur, 1973).

Hepatitis je upala jetre koja dovodi do oštećenja ili uništenja njezinih stanica. Upalno stanje može biti kratkotrajno (akutno) ili dugotrajno (kronično). Hepatitis mogu uzrokovati hepatotropni virusi, toksične supstance poput alkohola i lijekova te može biti posljedica autoimune bolesti. Najčešći uzročnici hepatitisa su virusi, a u skupinu primarnih hepatotropnih virusa spadaju pet vrsta virusa (virusi hepatitisa A, B, C, D i E) koji međusobno nisu srodni (World Health Organization, 2018a).

Virus hepatitisa A rasprostranjuje se fekalno-oralnim putem, kontaktnim prijenosom sa zaražene osobe na osobu ili konzumacijom kontaminirane hrane i pića. Prijenos virusa seksualnim kontaktom (primarno oroanalni, orogenitalni i digitoanalni kontakt) pretežito je povezan s populacijom muškaraca koji prakticiraju spolne odnose s muškarcima (MSM, *men who have sex with men*) (Ndumbi i sur, 2018). Prijenos virusa putem krvi uglavnom je povezan s intravenskim korisnicima droga koji dijele pribor za injiciranje droga (Lugoboni i sur, 2012). Zabilježeni su i rijetki slučajevi zaraze virusom nakon transfuzije krvi, tzv. posttransfuzijski hepatitis (da Silva i sur, 2016).

Simptomi hepatitisa A razlikuju se ovisno o dobi zaražene osobe. Simptomi u djece su pretežito blagi ili ih nema te HAV zarazu prebole bez komplikacija. U odraslih se javljaju blagi simptomi kao što su povišena temperatura, žutica i mučnina, a u rijetkim slučajevima dolazi do akutnog zatajenja jetre. Stopa smrtnosti je 0,8%, dok u osoba starijih od 50 godina ili imunokompromitiranih pojedinaca iznosi 1.8% (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017). Vrijeme inkubacije virusa traje od 15 do 50 dana (prosječno 28 dana), dok je

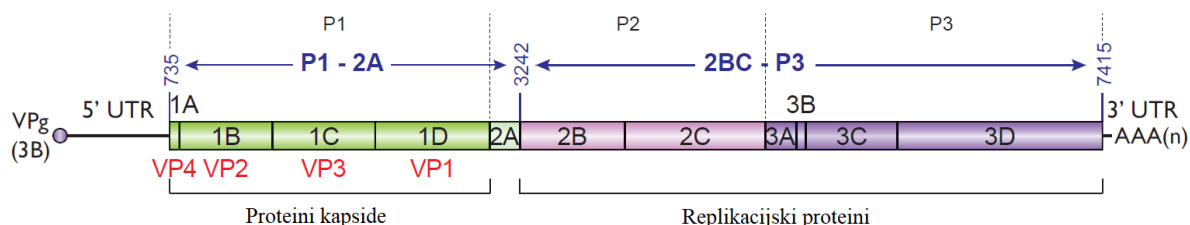
vrijeme trajanja bolesti od 2 do 6 tjedana. Postoji samo jedan serotip virusa te nakon preboljene infekcije dolazi do trajne imunosti (Vaughan i sur, 2014).

Efikasan način prevencije i zaštite od zaraze hepatitis A su cjeviva te se preporučuju skupinama koje imaju povećan rizik od infekcije. U rizične skupine pripadaju populacija MSM, intravenski narkomani, osobe koje putuju na područja gdje je hepatitis A učestao i zdravstveni radnici koji su u kontaktu s virusom. Trajna imunost na HAV se postiže nakon dvije doze cjeviva. U Europi su dostupna cjeviva koja sadrže HAV inaktiviran formaldehidom (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018a).

Virusni hepatitis A zajedno su uzrokovali 1.34 milijuna smrtnih slučajeva u svijetu u 2015. godini. Uzrok smrti obično je posljedica kronične upale ili karcinoma jetre. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, World Health Organization) hepatitis A je uzrokovao približno 11 000 smrtnih slučajeva (0,8% od ukupne smrtnosti uzrokovane virusnim hepatitisima) (Global hepatitis report, 2017).

1.1.1. Organizacija genoma virusa hepatitisa A

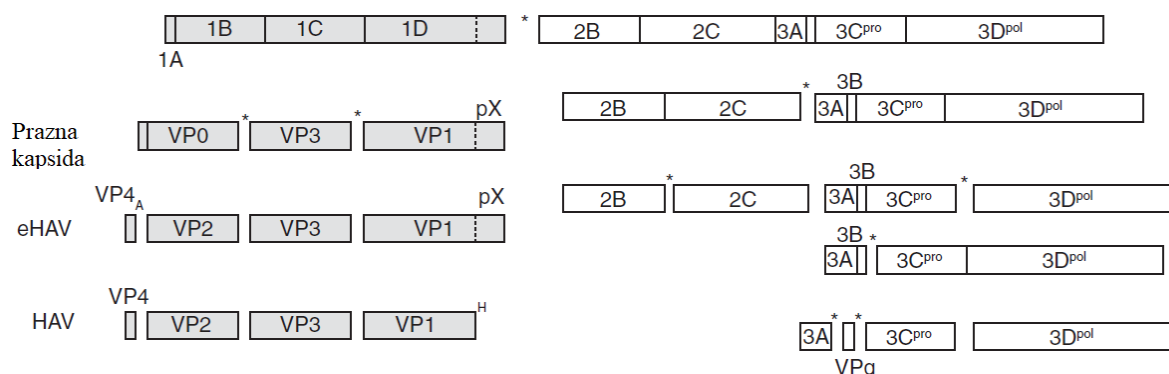
Genom virusa HAV dug je 7,5 kb i čini ga jednolančana RNA (ssRNA, *single-stranded RNA*) pozitivnog smisla. Sastoji se, kao i kod ostalih picornavirusa, od 3 karakteristične regije (Slika 1): 5' netranslatirajuće regije (UTR, *untranslated region*), otvorenog okvira čitanja (ORF, *open reading frame*) i regije 3' UTR (Lemon i sur, 2018). Otvoreni okvir čitanja kodira za poliprotein od približno 2227 aminokiselina i sastoji se od 3 domene (P1, P2 i P3). Proteolitički se cijepa cisteinskom proteinazom (3C), između P1-2A i 2BC-P3 regije (McKnight i Lemon, 2018).



Slika 1. Organizacija genoma virusa hepatitisa A (preuzeto i prilagođeno prema Hollinger i Martin, 2013).

Regija P1-2A se sastoji od proteina VP i 2A. Proteolitičkim cijepanjem P1-2A regije nastaju strukturni proteini VP0, VP3 i VP1-2A koji izgrađuju proteinsku ovojnicu (kapsidu) virusne čestice (Vaughan i sur, 2013). Za vrijeme pakiranja RNA u virusnu kapsidu dolazi do autokatalitičkog cijepanja VP0 te nastaju proteini VP4 i VP2 (Slika 2). Strukturni protein VP2 je jedna od glavnih komponenti sastavljene kapside, dok se VP4 ne nalazi u sastavu kapside, ali ima ulogu u formiranju kapside i stvaranju pora u lipidnim membranama stanice domaćina (McKnight i Lemon, 2018). Protein VP1 na C-terminalnom kraju ima vezan protein 2A ili pX. Uloga proteina pX je sastavljanje pentamerne strukture virusne čestice i biogeneza poluobavijenog HAV (eHAV, *enveloped Hepatitis A virus*). Protein VP1pX je karakterističan za praznu kapsidu i eHAV, a nakon gubitka ovojnice dolazi do proteolize VP1pX enzimom koji još nije detektiran (Jiang i sur, 2014).

U regiji 2BC-3P nalaze se geni koji kodiraju za nestrukturne proteine čija je uloga povezana s replikacijom i promjenom unutrašnjih membrana stanice d (McKnight i Lemon, 2018). Protein 2B ima hidrofobne regije koje pričvršćuju replikacijski kompleks za unutrašnje membrane, dok protein 2C ima helikazni motiv i NTPaznu aktivnost. Komplex 3AB ima hidrofobnu regiju koja se veže za membranu te domenu preko koje se veže za RNA (Hollinger i Martin, 2013). Gen 3B kodira za protein VPg koji se veže za 5' kraj RNA molekule i bitan je za vezanje replikacijskog kompleksa i sintezu RNA jer služi kao proteinska početnica. Gen 3C kodira za cisteinsku proteinazu koja cijepa HAV polipeptid te kao posljedica nastaje ukupno 10 zrelih proteina. RNA-ovisna RNA-polimeraza kodirana je genom 3D (McKnight i Lemon, 2018).



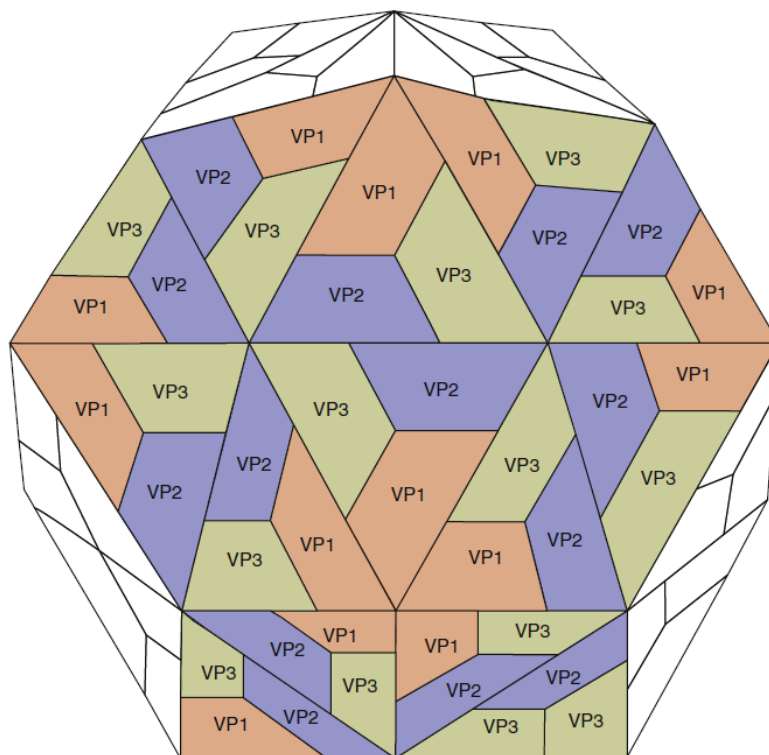
Slika 2. Procesiranje poliproteina virusa hepatitisa A (preuzeto i prilagođeno prema McKnigh i Lemon, 2018).

Netranslatirajuće 5' i 3' regije bogate su sekundarnim strukturama. Regija 5' UTR je najkonzerviranija regija u genomu i duga je oko 740 bp. Pikornavirusi nemaju 5' kapu te inicijacija translacije ovisi o sekundarnoj strukturi RNA. Dominanta struktura u 5' UTR regiji je unutarnje ribosomsko ulazno mjesto (IRES, *internal ribosomal entry site*) o kojem ovisi inicijacija translacije. Na visoko očuvanu IRES strukturu vežu se inicijacijski faktori (eIF4F kompleks) te dolazi do formiranja 43S preinicijacijskog kompleksa (PIC, *pre-initiation complex*). Velika 60S podjedinica ribosoma se veže na PIC i nastaje 80S eukariotski ribosom (Sadahiro i sur, 2018). Regija 3' UTR je duga 63 bp, te ima ulogu u inicijaciji replikacije i nastajanju ssRNA negativne polarnosti (McKnight i Lemon, 2018).

Oba kraja virusnog genoma su modificirana. Na 5' kraju kovalentno je vezan protein VPg, dok je na 3' kraju poliadenilna sekvencija (Cann, 2015).

1.1.2. Struktura viriona

Čestica virusa HAV je ikozaedralnog oblika, promjera od 27-30 nm i može ili ne mora imati ovojnicu (Jiang i sur, 2014). Zrela virusna čestica sastoji se od kapside unutar koje se nalazi virusni genom, te nema ovojnicu (Slika 3). Kapsida se sastoji od 60 proteomera, a svaki protomer od 3 monomerne podjedinice (VP1, VP2 i VP3). Protomeri se udružuju u oblik pentamera te je ikozaedarni oblik virusne čestice posljedica formiranja 12 pentamera (Cann, 2015). Primarna uloga kapside je zaštita genoma i izbjegavanje imunološkog odgovora kako bi se omogućio prijenos genoma u citoplazmu, gdje započinje replikacija virusa (Stuart i sur, 2018).



Slika 3. Struktura viriona picornavirusa (preuzeto od Cann, 2015).

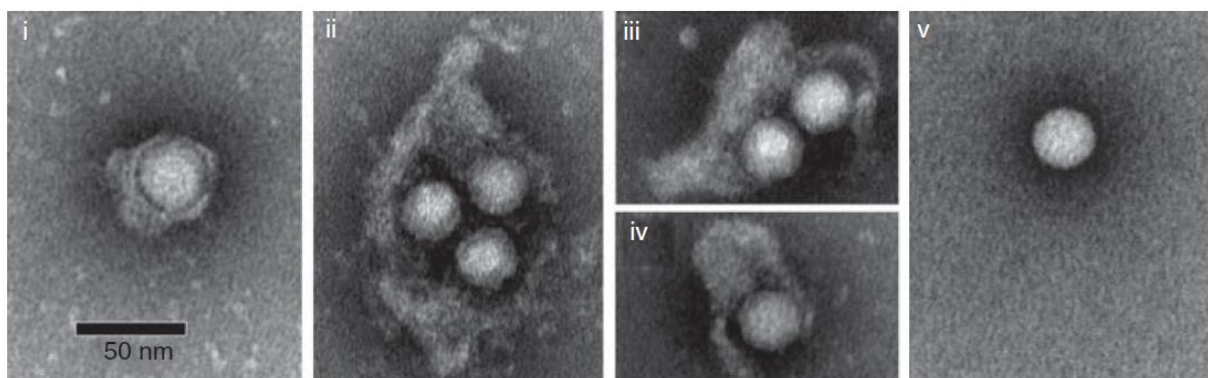
Zahvaljujući kapsidi, HAV je iznimno stabilan i može preživjeti mjesecima u kontaminiranim vodama, sedimentu te školjkašima. Ovaj virus je stabilan i na visokim temperaturama (inaktivira se na temperaturama većim od 80°C). Infektivan je i pri niskom pH te je otporan na isušivanje i organska otapala. Virus se inaktivira pretežito autoklaviranjem (121°C, 20 min), korištenjem otopina koje sadrže klor ili ultraljubičastim zračenjem (Hollinger i Martin, 2013).

1.1.2.1. Virus hepatitisa A s ovojnicom (eHAV)

Postoje dvije forme virusa HAV, virus s dvoslojnom lipidnom ovojnicom (eHAV) i zrela virusna čestica (HAV). Zrela virusna čestica se obavija lipidnom ovojnicom, koja je podrijetlom od stanice domaćina, prilikom izlaska iz zaražene stanice (Feng i sur, 2013). Na površini ovojnice nalaze se samo glikoproteini karakteristični za staničnu membranu domaćinske stanice pa se eHAV smatra poluobavijenim virusom jer na ovojnici nema karakteristične virusne glikoproteine poput klasičnih virusa s ovojnicom (Feng i sur, 2014).

Poluobavijene virusne čestice promjera su od 50 do 110 nm (Slika 4). Zrela virusna čestica i eHAV imaju različitu strukturu kapside. U poluobavijenim virusnim česticama nalazi se VP1pX proteinski kompleks, koji se nakon gubitka ovojnice cijepa na proteine VP1 i pX (Feng i sur, 2013).

Biogeneza ovojnice ovisi o endosomalnom sortirajućem kompleksu zaduženog za transport (ESCRT, *endosomal sorting complex required for transport*) i pomoćnom proteinu ALIX (*ALG-2-interacting protein X*). Virusne čestice se nakupljaju u multivezikularnom tjelešcu (MVB, *multivesicular body*) te se egzocitozom transportiraju izvan stanice (Feng i sur, 2014).



Slika 4. Elektronskomikroskopska snimka virusa hepatitisa A (preuzeto od McKnight i Lemon, 2014).

(i-iv) virusna čestica s ovojnicom

(v) zrela virusna čestica bez ovojnice

Dvije forme virusa omogućuju iznimnu prilagodbu na različite uvjete. Ovojnica bez virusnih antigena kompletno prekriva virusnu česticu te obavijeni virus može putovati krvotokom i tjednima nakon infekcija, a da ne dođe do imunološkog odgovora. Kroz probavni sustav virus izlazi iz organizma u „golom“ obliku, tj. kao zrela virusna čestica koja je ujedno i primarni uzročnik infekcija (Feng i sur, 2014).

1.1.3. Replikativni ciklus

Mehanizmi ulaska virusa u stanicu nisu još sasvim objašnjeni (Slika 5). Stanični receptor HAVCR1 (*Hepatitis A virus cellular receptor 1 protein*) ima domenu preko koje se veže za fosfatidilserin te se smatrao glavnim receptorom za ulazak virusa u stanicu (Kaplan i sur, 1996). Prema istraživanjima iz 2017. godine, utvrđeno je da samo male količine eHAV-a ulaze u stanicu preko receptora HAVCR1. Ulazak poluobavijenog virusa endocitozom u stanicu preko receptora HAVCR1 povezan je s fosfatidilserinom, koji je porijeklom od membrane zaražene stanice (Das i sur, 2017). U ranom endosomu HAV se veže za nepoznati receptor i ulazi u citoplazmu stanice. Za razliku od virusa bez ovojnice, eHAV se prenosi do kasnog endosoma te pod utjecajem lizosomskih enzima dolazi do razgradnje virusne membranske ovojnice. Razgradnja ovojnice omogućava interakciju strukturnih proteina s nepoznatim receptorom u endosomu te ulazak u citoplazmu stanice (McKnight i Lemon, 2018). Ulogu u prijenosu virusne RNA kroz membranu endosoma ima i protein VP4 koji stvara pore u membrani preko kojih se RNA može transportirati u citoplazmu (Shukla i sur, 2014).

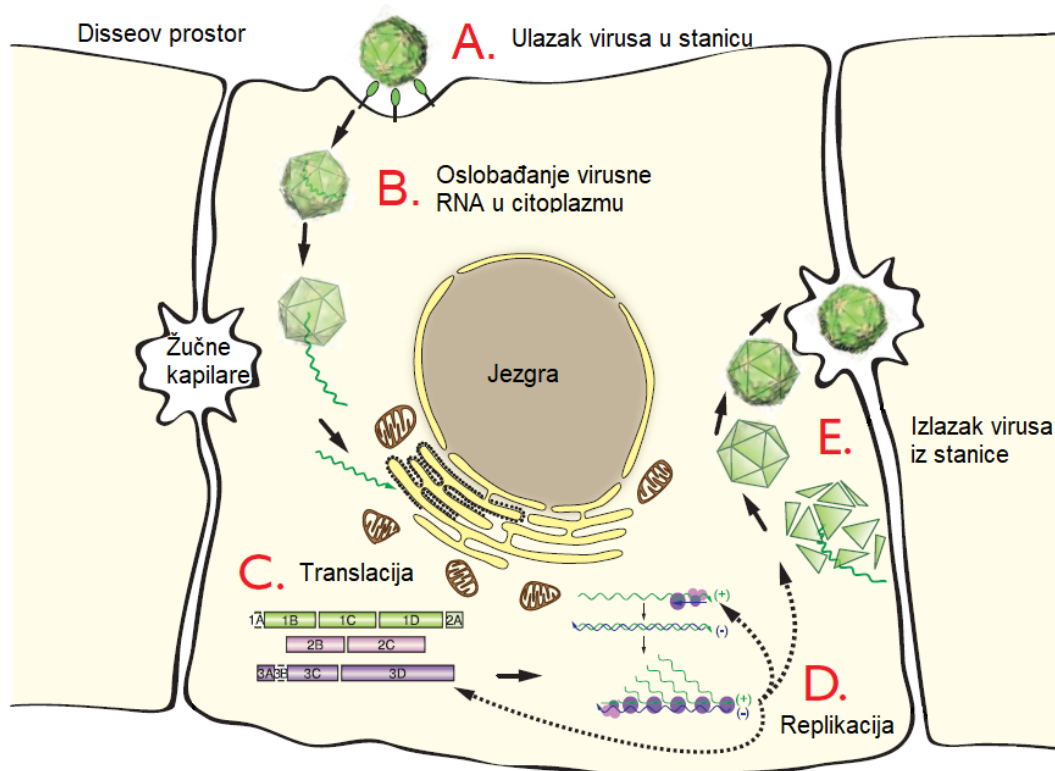
Nakon ulaska virusne RNA u citoplazmu stanice započinje proces translacije. Produkti translacije su dvije skupine proteina; strukturni proteini i replikacijski proteini (McKnight i Lemon, 2018). Inicijacija translacije ovisi o visoko očuvanoj IRES strukturi petlje koja se nalazi na 5' kraju virusnog genoma (Jackson i sur, 2010). Inicijacijski faktori translacije prepoznaju IRES strukturu te dovode 40S ribosomsku podjedinicu i zajedno čine kompleks 43S PIC. Mala ribosomska podjedinica pretražuje RNA u smjeru od 5' prema 3' i prepoznaje dva uzastopna start kodona. Prepoznavanjem dva AUG kodona dolazi do konformacijskih promjena u maloj 40S podjedinici te vezanjem 60S velike ribosomske podjedinice nastaje 80S ribosomski kompleks koji započinje sintezu polipeptida (Sadhiro i sur, 2018). IRES trans aktivacijski faktori (ITAF, *IRES*, *trans-activating factors*) vežu se za RNA i reguliraju aktivnost IRES elementa. Oni mogu pozitivno i negativno utjecati na aktivnost translacije. Smatra se da je visoki hepatotrofizam posljedica regulacije preko IRES elementa pomoću faktora ITAF, a ne specifičnih receptora koji se nalaze u hepatocitima (Sadhiro i sur, 2018).

Membranske vezikule, u kojima se nalazi replikacijski kompleks, su karakteristične za stanice inficirane virusom HAV. Virusi porodice *Picornaviridae* koriste stanične proteine i membrane te stvaraju male „organele“ u kojima se replicira virusna RNA. Proteini 2BC i 2C remodeliraju unutrašnje membrane i tako povećavaju njihovu permeabilnost (McKnight i Lemon, 2018). Virusna RNA se povezuje s membranom organela preko proteina 3AB koji ima

hidrofobnu domenu i domenu za vezanje RNA molekule. Za sintezu ssRNA pozitivnog i negativnog smisla potrebna je proteinska početnica (VPg, produkt gena 3B). Pomoću cis regulatornog elementa, 3CD prekursor proteina i polimeraze, proteinska početnica se modificira te nastaje VPg-pU-pU (Hollinger i Martin, 2013). Modificirana početnica se veže, zajedno s enzimom RNA-ovisna RNA-polimeraza, za poliA rep te omogućuje sintezu ssRNA negativnog smisla, koja služi kao kalup s kojeg se sintetizira veći broj ssRNA pozitivnog smisla. Nastale ssRNA pozitivnog smisla, pakiraju se u virusnu česticu ili se transliraju te nastaju strukturni proteini (VP0, VP1 i VP3) (McKnight i Lemon, 2018).

Virus se obavlja membranom zaražene stanice te procesom egzocitoze izlazi iz stanice u eHAV obliku. Mehanizam izlaska virusa ovisi o kompleksu ESCRT i pomoćnim proteinima koji imaju ulogu u transportu, remodeliranju membrana i stvaranju vezikula. Vezikule uzrokovane virusom uglavnom pupaju na endosomalnoj membrani te nastaje kompleks MVB. Protein pX, koji je C-terminalno vezan za VP1, ima konzerviranu regiju bogatu lizinom koja može biti ubikvitirana. Ubikvitinirane molekule se pomoću sustava ESCRT unose u vezikule i transportiraju (McKnight i Lemon, 2018). U HAV genomu su pronađene kasne domene (*late domains*) koje stupaju u interakciju s pomoćničkim proteinom ALIX uključenim u proces stvaranja vezikula. Virus iz stanice, pomoću ALIX i ESCRT sustava, može izaći direktno s plazme membrane ili se nakuplja u kompleksu MVB te izlazi iz stanice procesom egzocitoze (Feng i sur, 2014).

Hepatociti su polarizirane stanice epitelnog podrijetla (Trayer i Müsch, 2013). Virus koji izlazi bazolateralnom stranom okružen je membranskom ovojnicom i preko sinusoida ulazi u krvotok, stoga je u serumu prisutan samo eHAV (Feng i sur, 2014). Apikalna membrana okružuje žučne kapilare. Izlaskom preko apikalne membrane, HAV ulazi u žučne kapilare i prenosi se preko žučovoda do probavnog sustava (Slika 5). Tijekom prijenosa kroz žučovod eHAV stupa u kontakt s visokim koncentracijama žučnih soli koje razgrađuju membransku ovojnicu te naposljetku iz organizma probavnim putem izlazi u „golom“ obliku, kao zrela virusna čestica (McKnight i Lemon, 2018).

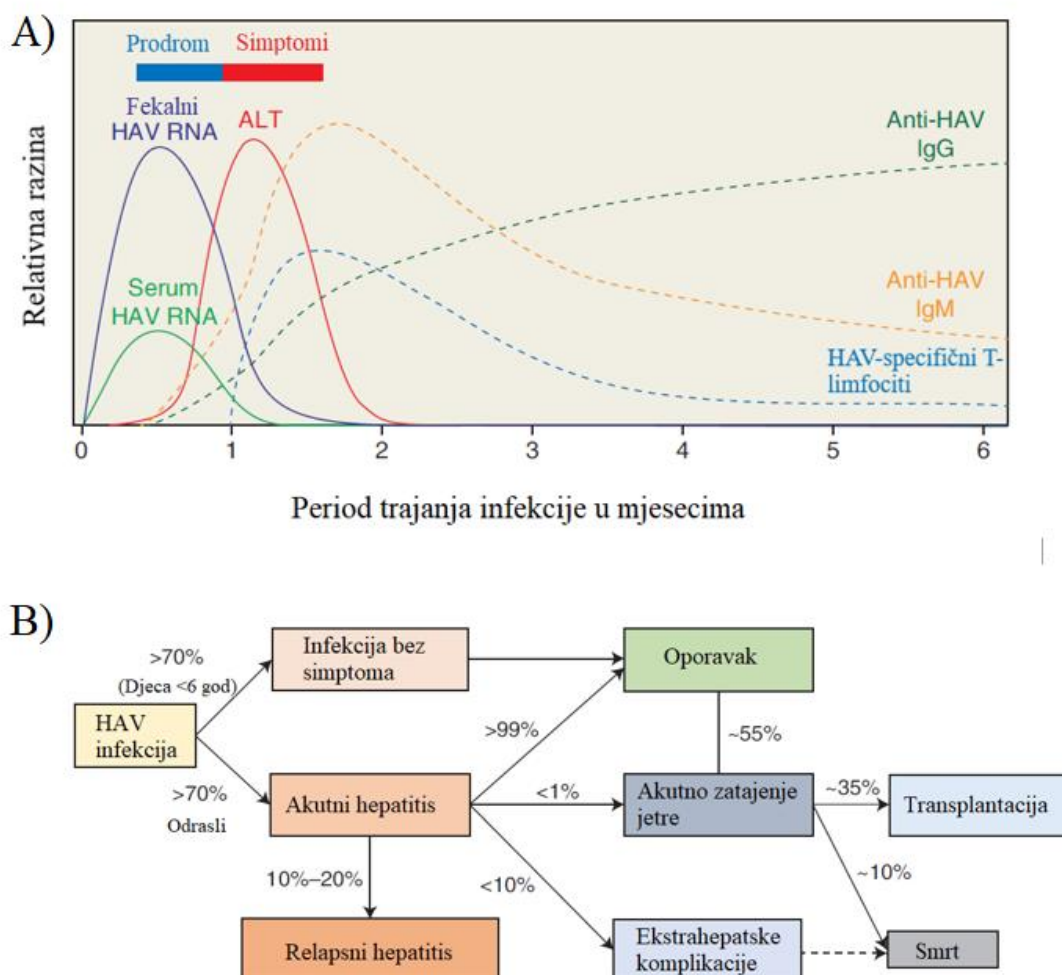


Slika 5. Replikativni ciklusa virusa HAV (preuzeto i prilagođeno prema Hollinger i Martin, 2013).

1.1.4. Patogeneza virusa hepatitisa A

Simptomi hepatitisa A se javljaju u prosjeku 28 dana nakon infekcije virusom (Vaughan i sur, 2014). Rizik prijenosa virusa i stupanj viremije (broj kopija virusne RNA u mililitru krvi) je najviši za vrijeme prodroma, tj. prije pojavljivanja prvih kliničkih simptoma i biokemijskih manifestacija (Slika 6a). Virus HAV uzrokuje akutnu infekciju jetre koja ne prelazi u kronični hepatitis. HAV antigeni pronađeni su i u stanicama gušterače, limfnim čvorovima te stanicama kripta tankog crijeva što ukazuje da se HAV ne replicira samo u hepatocitima (Shin i sur, 2018). Vrhunac viremije prethodi oštećenju jetre, koje se manifestira povišenim enzimima kao što su aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) u serumu. Virus nema citopatski efekt nego je oštećenje jetre posljedica djelovanja stanica imunološkog sustav (limfocita, citokina i kemokina) (Shin i sur, 2016). Imunoglobulini (Ig, *immunoglobulins*) specifični za HAV (IgM i IgG) se pojavljuju u isto vrijeme kao i oštećenje jetre te pojavom specifičnih antitijela stupanj viremije drastično otpada. IgM ukazuje na akutnu infekciju te se može detektirati i do 6 mjeseci nakon infekcije. Doživotna imunost na HAV je posljedica IgG koji trajno ostaju u organizmu (Shin i Jeong, 2018).

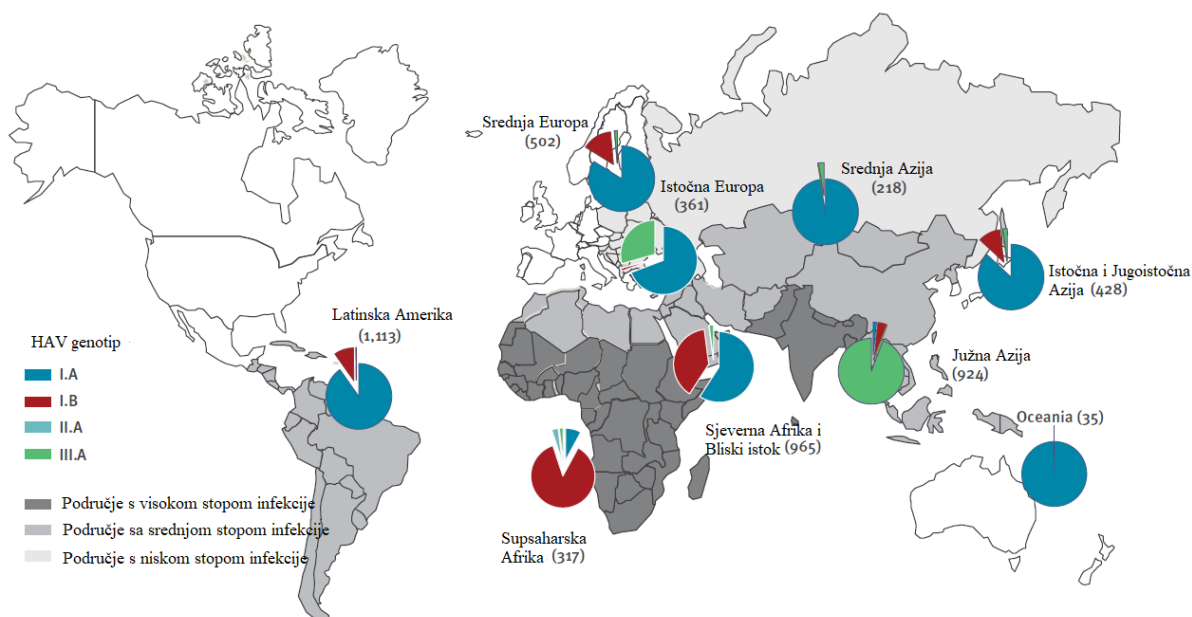
Kliničke manifestacije infekcije variraju i prvenstveno ovise o dobi i zdravlju jetre (Slika 6b). Simptomi zaraze koji su česti u odraslih su žutica, povišena temperatura, mučnina, povraćanje, malaksalost i taman urin (Voughan i sur, 2014). Komplikacije povezane s HAV zarazom su akutno zatajenje jetre, pankreatitis, Guillan-Barréov sindrom, akutna ozljeda bubrega i aplazija crvenih krvnih stanica. Za razliku od odraslih, djeca mlađa od 5 godina zarazu prebole uglavnom bez simptoma. U imunokomprimiranim pojedincima i osoba koji imaju kroničnu bolest jetre može doći do akutnog zatajenje jetre te u takvim slučajevima potrebna je transplantacija jetre (Shin i Jeong, 2018).



Slika 6. a) Produkcija virusnih čestica i protutijela u akutnoj fazi zaraze virusom hepatitisisa
 A b) Klinička manifestacija zaraze virusom hepatitisisa A (preuzeto i prilagođeno prema Shin i Jeong, 2018).

1.1.5. Epidemiologija virusa hepatitisa A

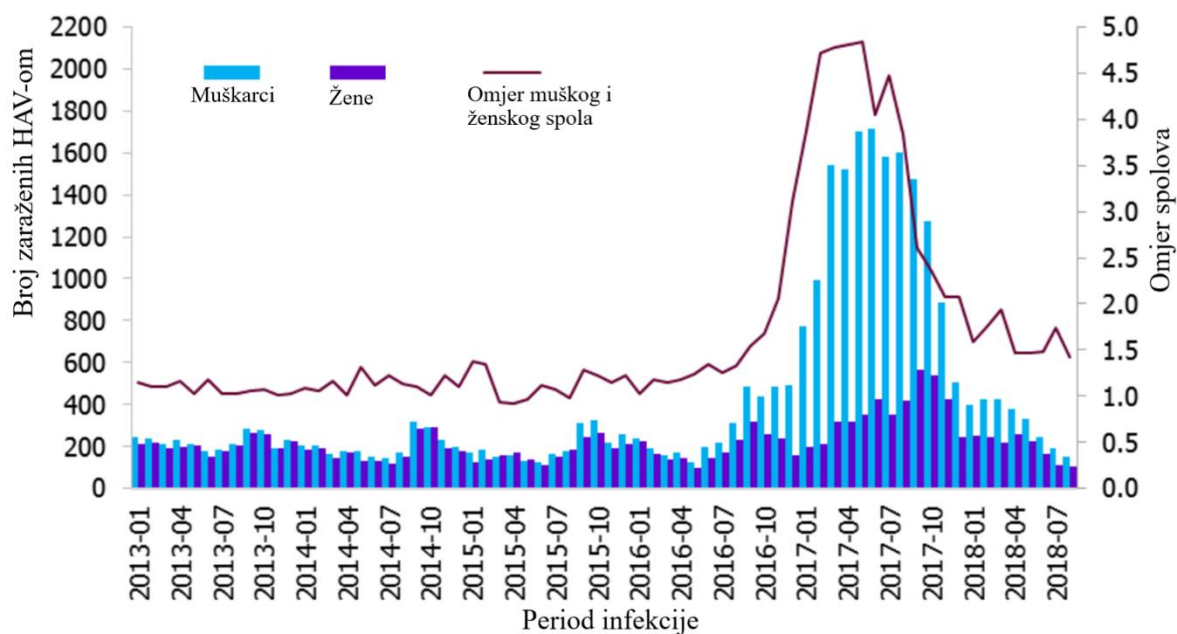
Virus HAV je najčešći uzročnik akutne zaraze jetre u svijetu. Prirodni rezervoari virusa su isključivo ljudi i primati (Hollinger i Martin, 2013). Učestalost infekcije virusom HAV ovisi o stopi razvijenosti određenog geografskog područja te se mogu razlikovati područja s visokom, srednjom i niskom stopom zaraze (Slika 7). Poboljšanje sanitarnih standarda i higijenskih uvjeta dovodi do smanjenja stope incidencije. Visoke stope zaraze su karakteristične za područja s niskim sanitarnim i higijenskim uvjetima. U takvim zemljama najugroženija su djeca te stopa infekcije u djece doseže i do 90%. Razvijene zemlje imaju jako dobre higijenske i sanitarne standard te je stopa zaraze niska (World Health Organization, 2018b). Zaraze virusom HAV u razvijenim zemljama su sporadične i uglavnom su povezane s visokorizičnim skupinama (homoseksualci, intravenozni narkomani) ili osobama koje putuju na područja gdje je hepatitis A učestao (World Health Organization, 2012). Takvim osobama su preporučena cjeviva protiv hepatitisa A, kao učinkovita mjera prevencije zaraze.



Slika 7. Globalna rasprostranjenost i učestalost virusa hepatitisa A u periodu od 2010.-2017. (preuzeto i prilagođeno prema Kroneman i sur, 2017).

Virus HAV se može podijeliti na šest genotipova na temelju rezultata filogenetske analize hipervarijabilne regije VP1-2A. Genotipovi su definirani kao grupa virusa koji u sekvenciji imaju sličnost nukleotida veću od 85%. Podtipovi se svrstavaju u grupe u kojima se sekvencije razlikuju ne više od 7.5% baznih parova (Costa-Mattioli i sur, 2003). Genotipovi virusa koju inficiraju ljude su I, II i III te mogu se dalje podijeliti na podtipove A i B (Bruni i sur, 2017). Genotipovi IV, V, VI su izolirani iz vrsta viših primata koji su razvili bolest hepatitis A (Aggarwal i Goel, 2015). Različitu geografsku distribuciju prikazuju HAV genotipovi i podtipovi. Najrasprostranjeniji genotip pripada skupini I, a podtip IA je češći nego podtip IB. U razvijenim zemljama prevladava genotip I (Lin i sur, 2017). Ostatak zaraza virusom HAV pripada uglavnom skupini III. Genotip III je izoliran u raznim državama u Aziji i u Europi te u Madagaskaru i u Sjedinjenim Američkim Državama (Vaughan i sur, 2014). Genotip II je rijedak tip virusa i smatra se da je podrijetlom iz Zapadne Afrike (Desbois i sur, 2010).

Prema podacima Europskog centra za sprječavanje i kontrolu bolesti (ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control*) u periodu od 2012. do 2014. prosječan broj zaraženih virusom hepatitis A na području 24 europskih država je bio 4671. U periodu od siječnja do prosinca 2017. godine, broj zaraženih je porastao i do 19979. Vrhunac epidemije je bio u ožujku 2017. godine, a broj zaraženih prema posljednjim podacima je u padu (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018a). U svrhu boljeg opisivanja epidemije koristi se informacija o omjeru spolova (Slika 8). U razdoblju od siječnja 2017. do kolovoza 2018., prosječan omjer spolova je iznosio tri zaražena muškarca u odnosu na jednu zaraženu ženu. Omjer spolova je bio najviši u periodu od ožujka do svibnja 2017. godine te je iznosio 4.8 zaražena muškarca na jednu zaraženu ženu. Zatim se broj muškaraca zaraženih virusom smanjuje te je u kolovozu 2018. iznosio 1.4 muškarca na jednu zaraženu ženu (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018a).

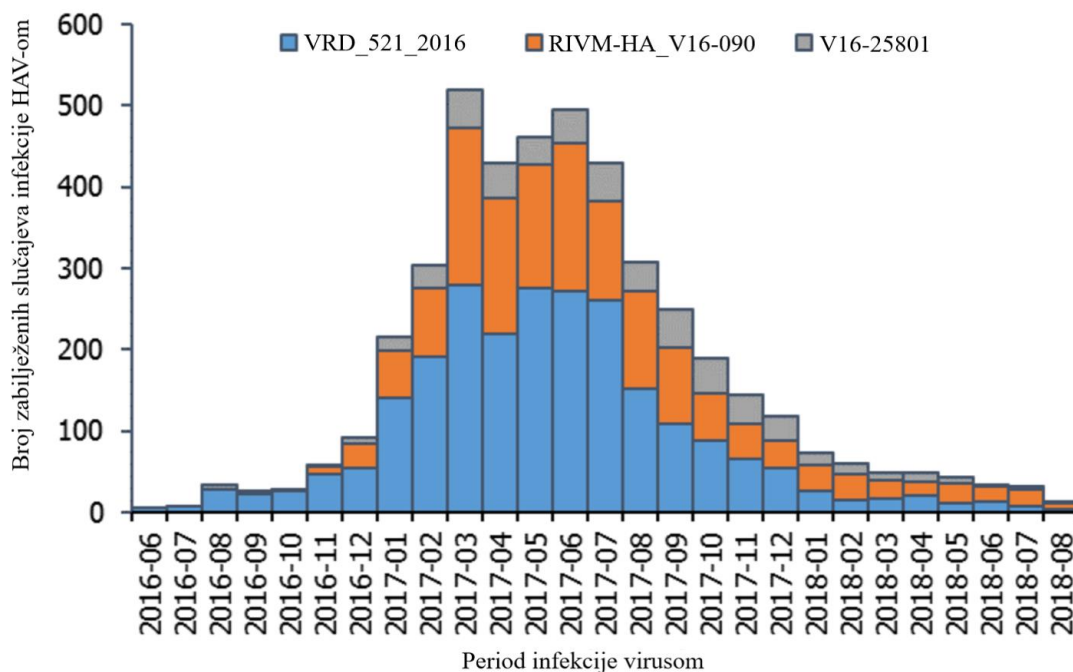


Slika 8. Distribucija zaraza virusom hepatitis A u 24 europske države po spolu i omjeru spolova (preuzeto i prilagođeno prema European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

Između siječnja 2017. i kolovoza 2018. genotipizirano je 22% (5537 od 25032) dijagnosticiranih slučajeva zaraze virusom HAV u 24 europske države. Većina (76%) genotipiziranih uzoraka pripada jednom od tri IA HAV soja (RIVM-HAV-069, VRD_521_2016 i V16-25801) (Slika 9) (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018a).

Soj Europride (RIVM-HAV-069) detektiran je ubrzo nakon održavanja Europride povorke ponosa u Amsterdamu tijekom 2016. godine u 11 ispitanika koji se identificiraju kao pripadnici populacije MSM. Filogenetskim analizama pokazalo se da je soj Europride identičan soju koji je zabilježen u populaciji MSM za vrijeme epidemije u Tajvanu. Do lipnja 2017. godine u 13 zemalja Europske Unije prijavljeno je 509 novih slučajeva zaraza sojem Europride, pretežito u populaciji MSM (Freidl i sur, 2017). Soj UK/Spain (VRD_521_2016) je prvotno zabilježen unutar populacije MSM u Ujedinjenom Kraljevstvu koji su tijekom vremena inkubacije putovali u Španjolsku. U periodu od srpnja 2016. do siječnja 2017. godine detektirano je 24 slučaja zaraze sojem UK/Spain. Filogenetskim analizama pokazalo se da je soj UK/Spain srodan soju koji je zabilježen u putnika koji se vraćaju iz Južne i Srednje Amerike. Do lipnja 2017. godine u 13 zemalja Europske Unije prijavljeno je 809 novih

slučajeva infekcije sojem UK/Spain, pretežito u populaciji MSM (Beebejaun i sur, 2018). Soj V16-25801 prvotno je zabilježen unutar populacije MSM u kolovozu 2016. godine u Njemačkoj. U bazi podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI, *National Centre for Biotechnology Information*) sekvencija koja dijeli 99,5% sličnosti sa sojem V16-25801 povezana je s hepatitis A epidemijom u Italiji tijekom 2013. godine. Do lipnja 2017. godine u 11 zemalja Europske Unije prijavljeno je 109 novih slučajeva zaraze sojem V16-25801, pretežito u populaciji MSM (Werber i sur, 2018). Epidemija u Hrvatskoj je dio europske epidemije te iako je prvotno zabilježena u općoj populaciji, prevladava u populaciji MSM.



Slika 9. Distribucija slučajeva zaraze virusom hepatitisa A u 24 europske države po mjesecu zaraze i identificiranom genotipu (preuzeto i prilagođeno prema European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

1.1.6. Detekcija i karakterizacija virusa hepatitis A

1.1.6.1. Dijagnostika virusa hepatitis A

Dijagnostika hepatitisa A se temelji na detekciji specifičnih protutijela u serumu ili detekcijom virusne RNA. Detektiranje specifičnih HAV protutijela serološkim metodama omogućuje razlikovanje hepatitisa A od ostalih virusnih hepatitisa. Primarni marker, koji se koristi za dijagnosticiranje akutne HAV zaraze, su protutijela anti-HAV IgM. Koncentracije anti-HAV IgM, u periodu od četiri do šest mjeseci nakon zaraze, su niske te ne daju pozitivan rezultat (Nainan i sur, 2006). U 6-11% slučajeva zaražene osobe ne prikazuju anti-HAV IgM za vrijeme rane faze infekcije, stoga je potrebno ponoviti testiranje na specifična protutijela dva do pet dana nakon prvog testiranja (Shin i Jeong, 2018). Preboljene zaraze HAV se detektiraju prisustvom protutijela anti-HAV IgG koji u organizmu može biti prisutan godinama i stvara imunost na taj virus (de Paula, 2012). Za vrijeme akutne infekcije male količine virusa se mogu detektirati i u slini (Leon i sur, 2015). Za detekciju IgM i ukupnih anti-HAV specifičnih protutijela dostupni su komercijalni testovi (radio-imuno test, imunokemijska metoda i enzimski imunotest na čvrstoj fazi). Molekularne metode se temelje na detekciji nukleinskih kiselina te se HAV može detektirati u uzorcima različitog podrijetla (serum, feces, okoliš i hrana). Molekularne metode koje se koriste za detekciju virusne RNA su: Southern blot, sekvenciranje, hibridizacija, reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom (RT-PCR, *reverse transcription polymerase chain reaction*) i polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (Nainan i sur, 2006).

1.1.6.2. Molekularna filogenija

Filogenija je znanstvena disciplina koja se bavi analiziranjem i određivanjem evolucijskih odnosa između organizama. Prije napredovanja tehnologije DNA sekvenciranja, isključivo se koristila za opisivanje srodnosti između vrsta u sistematici i taksonomiji. Danas se primjenjuje u gotovo svakoj grani biologije. Osim proučavanja odnosa između organizama, filogenija se bavi istraživanjem odnosa između paralognih gena, povijesti populacije i epidemiološke dinamike patogena (Yang i Rannala, 2012).

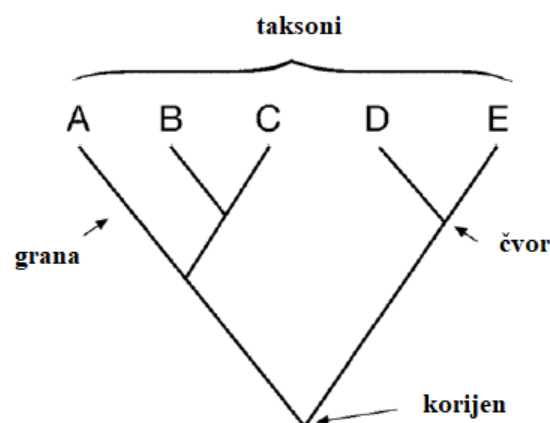
Za određivanje evolucijskih odnosa mogu se koristiti molekularni podaci kao što su sekvencije nukleotida ili aminokiselina. Evolucijom organizma dolazi do nakupljanja mutacija u genetskom materijalu te dolazi do promijene fenotipa. Na temelju sličnosti sekvencije DNA

ili proteina, odnosno homologije mogu se razlučiti evolucijski odnosi između organizama. Rezultati filogenetskog istraživanja prikazuju se u obliku filogenetskog stabla (Xiong, 2006).

Korištenje molekularnih podataka u svrhu rekonstruiranja evolucijske prošlosti zahtjeva uzimanje u obzir određenih pretpostavki. Sekvencije korištene za izradu filogenetskog stabla trebaju biti homologne, što znači da imaju zajedničkog pretka te su genetički divergirale tijekom vremena. Filogenetska divergencija je proces razdvajanja „roditeljske“ grane u dvije grane „kćeri“. Varijabilnost među sekvencijama je posljedica neovisne evolucije te je dovoljno informativna za konstrukciju filogenetskog stabla (Xiong, 2006).

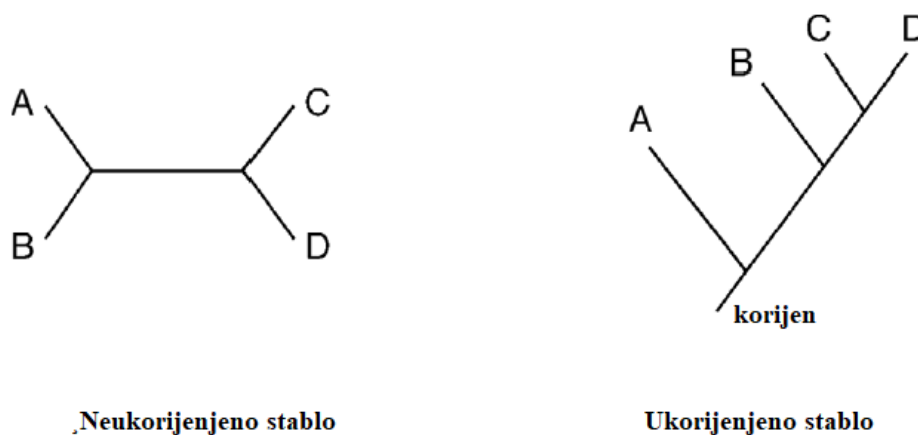
1.1.6.2.1. Filogenetsko stablo

Cilj filogenetskih istraživanja je izrada filogenetskog stabla, odnosno rekonstruiranje evolucijske prošlosti (Slika 10). Filogenetsko stablo se sastoji od čvorova koji spajaju grane. Svaka grana predstavlja taksonomsku jedinicu kroz određeno vrijeme, dok svaki čvor predstavlja nastajanje nove taksonomske jedinice (Yang i Rannala, 2012). Korijen predstavlja zajedničkog pretka svih članova stabla, a na vrhu grana se nalaze sadašnje taksonomske jedinice. Odnosi između taksa su definirani topologijom grana. Različiti tipovi stabla imaju različitu topologiju, primjer su kladogrami i filogrami. U filogramima dužine grana predstavljaju vrijednost genetičke divergencije, dok u kladogramima dužine grana nisu proporcionalne broju evolucijskih promjena te nemaju filogenetski značaj (Xiong 2006).



Slika 10. Shema i nazivlje filogenetskog stabla (preuzeto i prilagođeno prema Xiong, 2006).

Filogenetsko stablo može biti ukorijenjeno ili neukorijenjeno (Slika 11). Zajednički predak nije određen u neukorijenjenom stablu te stoga evolucijski smjer nije prikazan. Za definiranje smjera evolucije potrebno je ukorijeniti stablo korištenjem vanjske grupe. Vanjska grupa predstavlja sekvenciju koja je srodna, ali je genetski udaljenija od sekvencija od interesa tj. unutarnje grupe (Xiong, 2006).



Slika 11. Prikaz neukorijenjenog i ukorijenjenog stabla (preuzeto i prilagođeno prema Xiong, 2006).

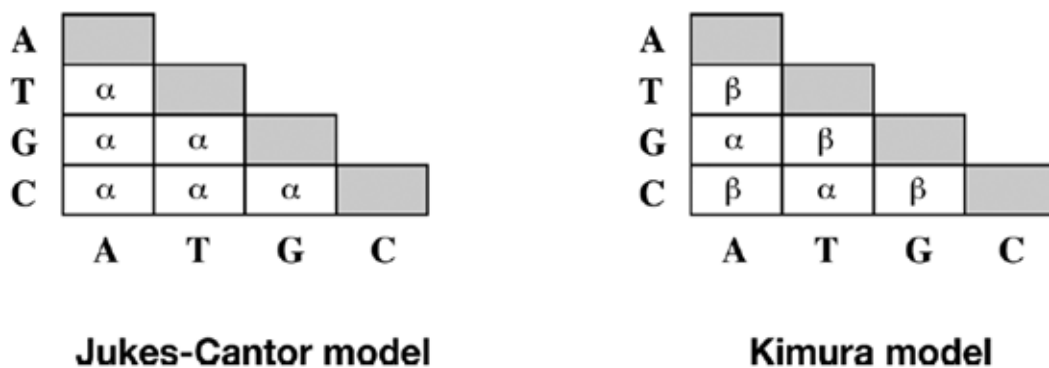
1.1.6.2.2. Izrada filogenetskog stabla

Proces konstrukcije filogenetskog stabla može se podijeliti u pet koraka: odabir molekularnog markera (1), poravnanje svih sekvencija (2), odabir evolucijskog modela (3), odabir metode za izradu filogenetskog stabla (4) i procjena pouzdanosti stabla (5).

Informacije za izradu filogenetskog stabla zapisane su u obliku sekvencije nukleotida ili aminokiselina. Molekularni markeri za izradu ispravnog stabla biraju se ovisno o organizmima koji se analiziraju i cilju istraživanja. Za analizu srodnih organizama koriste se nukleotidne sekvencije jer evoluiraju puno brže od aminokiselinskih sekvencija. Određena područja u genomu imaju različitu stopu mutacija, te se u svrhu analiziranja iznimno srodnih organizama koriste regije koje imaju veću stopu mutacije, dok za analizu različitih grupa organizama koriste se regije koje imaju nisku stopu mutacija ili proteinske sekvencije (Xiong, 2006).

Sekvencije koje se analiziraju potrebno je sravniti (*alignment*) korištenjem računalnog algoritma te nakon analize su prikazane u matičnom obliku gdje se sekvencije nalaze u redcima, a nukleotidi ili aminokiseline u stupcima. Nakon sravnjivanja u stupcima se nalaze isti nukleotidi ili dijelovi sekvencija, ali i praznine koje nastaju kao posljedica insercijskih i delecijских mutacija te povećavaju sličnost sekvencija. (San Mauro i Agorreta, 2010).

Supstitucija je zamjena jednog nukleotidnog para drugim. Divergencije između sravnjenih sekvencija proporcionalne su broju uočenih supstitucija. Supstitucijski ili evolucijski modeli u obzir uzimaju različitu stopu supstitucija za određeni nukleotid te izrađuju pretpostavku ispravnoga slijeda evolucijskih događaja. Dva najjednostavnija evolucijska modela koja se koriste za izradu filogenetskog stabla su Jukes-Cantor i Kimura model (Slika 12). Jukes-Cantor model pretpostavlja da je stopa supstitucije jednaka za sve nukleotide te se koriste samo za iznimno slične sekvencije. Sofisticiraniji model koji u obzir uzima različitu frekvenciju tranzicije i transverzije zove se Kimura model. Tranzicije su češći događaji nego transverzije i stoga pruža realističniju pretpostavku evolucijske udaljenosti. Osim nabrojanih modela, za izradu filogenetskog stabla koriste se i kompliciraniji modeli, kao što su Tamura Nei, HYK i GTR model, koji u obzir uzimaju više parametara (Xiong, 2006).



Slika 12. Stope nukleotidnih supstitucija za Jukes-Cantor i Kimura model. U Jukes-Cantor modelu svi nukleotidi imaju istu stopu supstitucije (α), dok u Kimura modelu stopa tranzicije (α) i transverzije (β) nije jednaka (preuzeto od Xiong, 2006).

Metode koje se koriste za izradu filogenetskog stabla mogu se podijeliti u dvije skupine: metode koje se temelje na stanju znakova (*characters*) i metode koje se temelje na matrici udaljenosti. Prva metoda se temelji na sličnosti znakova u sravnjenim sekvencijama. Osnovna pretpostavka je da su znakovi, koji se nalaze na određenim pozicijama u matrici višestruko sravnjenih sekvencija, homologni. Svaki znak je zasebna evolucijska jedinica te njegova promjena ne ovisi o drugim znakovima. U prvu skupinu spadaju metode najveće vjerojatnosti (ML, *maximum likelihood*), metoda najveće štedljivosti (*maximum parsimony*) i Bayesijanske metode. Metode koje se temelje na matrici udaljenosti su bazirane na izračunu različitosti između parova sravnjenih sekvencija. Metode koje spadaju u drugu grupu su metoda susjedskog sparivanja (*neighbour joining*), UPGMA, Fitch-Margoliash metoda i generalizirano susjedsko sparivanje (Xiong, 2006).

Metoda samoučitanja (*bootstrapping*) je statistička analiza ponovnog uzorkovanja prema kojoj se procjenjuje vjerodostojnost konstruiranog filogenetskog stabla. Cilj metode samoučitanja je procijeniti distribucije koje se mogu teško izračunati tako da se originalni set podataka nasumično poduzorkuje i analizira određen broj puta. Poželjan broj ponavljanja nasumičnog uzorkovanja je između 500 i 2000. Vrijednosti samoučitanja (*bootstrap values*) iznad 70% smatraju se statistički pouzdanim rezultatima te se prikazuju na granama filogenetskog stabla (San Mauro i Agorreta, 2010).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U svrhu identifikacije izvora zaraza virusom hepatitisa A u Hrvatskoj i načina njegovog rasprostranjivanja između i unutar zaraženih populacija potrebno je molekularno karakterizirati izolate virusa kod zaraženih osoba. Određivanjem slijeda nukleotida genske regije VP1-2A mogu se razlučiti sojevi virusa koji ujedno i predstavljaju broj izvora zaraze. Informacija o broju izvora zaraze može poslužiti u epidemiološkoj analizi te pomoći u daljnjem suzbijanju rasprostranjivanja hepatitisa A. Kako bi se odredila srodnost virusa koji je prisutan u hrvatskoj populaciji definirani su sljedeći ciljevi istraživanja:

- Odrediti slijed nukleotida regije VP1-2A virusa hepatitisa A izoliranih iz 54 ispitanika u periodu od veljače 2017. do kolovoza 2018.
- Odrediti virusni genotip i podtip koristeći bioinformatički algoritam „Hepatitis A Virus Genotyping Tool Version 1.0“
- Izraditi filogenetsko stablo svih sekvencija s ciljem identifikacije virusnih sojeva i utvrđivanja srodnosti virusnih izolata

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanje su uključene 54 osobe s akutnom zarazom virusom hepatitisa A liječene u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu u periodu od veljače 2017. do kolovoza 2018. (Tablica 1). U sklopu rutinske dijagnostičke obrade svim ispitanicima po primitku u kliničku skrb određena su protutijela anti-HAV IgM, što je pokazatelj akutne zaraze ovim virusom te se na taj način selektirani ispitanici s akutnom zarazom. Svi korišteni uzorci odobreni su od strane nadležnog etičkog povjerenstva Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“:

Ukupno 45 od 54 (83.3%) ispitanika uključeno u istraživanje bili su muškarci, a ostalih 9 (16.7%) ispitanika bili su pripadnici ženskog spola. Ukupno 25 (46%) ispitanika se identificiralo kao pripadnici skupine MSM; a 12 (22.2%) ispitanika bilo je pozitivno na virus humane imunodeficijencije (HIV, *Human immunodeficiency virus*), od čega su svi HIV pozitivni ispitanici dio populacije MSM. Općoj populaciji pripadalo je 19 (35%) ispitanika, a za 10 (19%) ispitanika muškog spola podatak o pripadnosti nekoj od rizičnih skupina nije naveden. U prosjeku je oboljelo pet puta više muškaraca od žena. Medijan dobi ispitanika muškog spola s HAV infekcijom iznosio je 39 godina (1-58 godina), a medijan dobi za ispitanike ženskog spola iznosio je 52 godine (25-70 godina).

Tablica 1. Odabrani demografski i biološki parametri ispitanika

Ukupan broj ispitanika (n):	54		
	Muškarci:	Žene:	
Spol (n, %)	45 (83.3%)	9 (16.7%)	
Omjer spolova (m:ž)	5:1		
Dob (medijan, minimum i maksimum, godine)	39 (1-58)	52 (25-70)	
	populacija MSM*:	Opća populacija:	Nije poznato:
Seksualna orijentacija (n, %):	25 (46.3%)	19 (35.2%)	10 (18.5%)
HIV+ status (n, %)	12 (22.2%)	0	0

*Muškarci koji prakticiraju spolne odnose s muškarcima

3.2. Biološki uzorci

Uzorci krvi osoba pozitivnim na anti-HAV IgM prikupljeni su u Zavodu za virusni hepatitis Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. U sterilne epruvete bez antikoagulansa, venepunkcijom je prikupljena periferna krvi pacijenata. Nakon inkubacije od 15 minuta pri sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 3500 okretaja u minuti (rpm, *revolutions per minute*). Centrifugiranjem je serum u obliku supernatanta odvojen od stanica krvi i fibrinogena. Serum je Pasteur pipetom prenesen u sterilnu epruvetu i pohranjen pri -20°C do obrade.

3.3. Korišteni reagensi

3.3.1. Komplet reagensa za izolaciju virusne RNA iz seruma

- „QIAamp Viral RNA Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Njemačka)

Tablica 2. Sadržaj kompleta reagensa za izolaciju virusne RNA iz seruma „QIAamp Viral RNA Mini Kit“

Naziv	Kratak opis
RNA nosač (poli A)	Smanjuje vjerojatnost degradacije virusne RNA, poboljšava vezanje RNA za membranu izolacijske kolone
Pufer AVL	Reakcijska smjesa koja sadrži kaotropne soli (soli gvanidina) za denaturaciju proteina i deterdžent za razgradnju stanica
Pufer AW1 (koncentrat)	Pufer za ispiranje nečistoća; potrebno dodati apsolutni etanol
Pufer AW2 (koncentrat)	Pufer za ispiranje nečistoća; potrebno dodati apsolutni etanol
Elucijski pufer AVE	Voda bez RNaze s dodatkom 0.04% Natrijevog azida (inhibira rast mikroorganizama i aktivnost RNaze)
Kolekcijske epruvete	Epruvete za sakupljanje
QIAamp Mini kolone	Kolone za s membranom od silikagela za koju se vežu nukleinske kiseline

3.3.2. Komplet reagensa za sintezu cDNA i umnožavanje reakcijom PCR

- „SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity“ (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD)

Tablica 3. Sadržaj kompleta reagensa za sintezu cDNA i umnožavanje reakcijom PCR „SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity“

Naziv	Kratak opis
Smjesa enzima „SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme Mix“	Smjesa SuperScript™ III reverzne transkriptaze (sinteza cDNA iz ukupne RNA) i Platinum™ Taq DNA polimeraze visoke vjernosti (rekombinantna Taq DNA polimeraza i Platinum Taq™ protutijela, koja sprječavaju aktivnost polimeraze pri sobnoj temperaturi – „Hot Start PCR“)
2x reakcijski pufer	Reakcijska smjesa s nukleotidima (200 μM) i 1,2 mM MgSO ₄
5 mM magnezijev sulfat	Kofaktor za DNA polimerazu

3.3.3. Komplet reagensa za sintezu DNA (ugniježđeni PCR)

- „FastStart™ High Fidelity PCR System“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

Tablica 4. Sadržaj kompleta reagensa za sintezu DNA „FastStart™ High Fidelity PCR System“

Naziv	Kratak opis
Smjesa enzima „FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5U/ul)“	Smjesa „Hot start FastStart Taq DNA“ polimeraze i termostabilnog proteina koji ima lektorirajuću ulogu (aktiviraju se pri temperaturi od +95°C)
Reakcijski pufer „FastStart High Fidelity“, 10x koncentriran uz 18mM MgCl ₂	10x koncentrirani reakcijski „FastStart“ pufer s 18 mM MgCl ₂
Reakcijski pufer „FastStart High Fidelity“, 10x koncentriran bez 18mM MgCl ₂	10 koncentrirani reakcijski FastStart pufer bez MgCl ₂
Otopina MgCl ₂ , 25mM	Kofaktor za DNA polimerazu
DMSO	Organsko otapalo
Smjesa nukleotida za PCR	Otopina koja sadrži 10 mM nukleotida

3.3.4. Komplet reagensa za reakciju sekvenciranja

- „BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Warrington, UK)

Tablica 5. Sadržaj kompleta reagensa za reakciju sekvenciranja „BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“

Naziv	Kratki opis
Reakcijska smjesa „BigDye™ Terminator v3.1. Ready Reaction Mix“	Reakcijska smjesa za Sangerovu dideoksi metodu sekvenciranja koja sadrži fluorescentno označene ddNTP-ove i AmpliTaq® DNA polimerazu
5x pufer za sekvenciranje „BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1“	Specifično optimiziran pufer za korištenje s reagensima „BigDye™ Terminator v3.1.“

- Matriks za razdvajanje DNA fragmenata pri kapilarnoj elektroforezi – "POP-7™ polymer" (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- Pufer za kapilarnu elektroforezu – „310 and 31xx Running Buffer, 10x“ (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- Kapilare za elektroforezu - „3130/3100 Avant Genetic Analyzer 4-Capillary Array, 36 cm“ (Applied Biosystems, Warrington, UK)

3.3.5. Komplet reagensa i otopina za pročišćavanje i denaturaciju amplikona

- Sol za precipitaciju DNA - Natrijev acetat, pH = 5,2 (Sigma, Njemačka)
- Etilni alkohol za otapanje DNA - 99% i 70% Etanol (T.T.T. d.o.o., Hrvatska)
- Reagens za otapanje taloga i denaturaciju - Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems, Warrington, UK)

3.3.6. Oligonukleotidne početnice

- Početnice korištene za reakciju RT-PCR (VP1f1 i VP1r1)
- Početnice korištene za ugniježdenu PCR reakciju i reakciju sekvenciranja (VP1Nf2 i VP1Nr2)

Tablica 6. Oligonukleotidne početnice korištene za reakcije RT-PCR, ugniježdenu PCR i reakciju sekvenciranja (Wang i sur, 2013)

Početnica	Pozicija u genomu	Sekvencija početnice (5'-3')	Orijentacija
VP1f1	2167-2192	GTTTGTCTCTCTTTATCATGCTATG	Nizvodna
VP1r1	3384-3363	CATCCATCTCAAGAGTCCACAC	Uzvodna
VP1Nf2	2181-2200	TATCATGCTATGGATGTTAC	Nizvodna
VP1Nr2	3286-3267	TTCATTATTTTCATGCTCCTC	Uzvodna

3.4. Uređaji, potrošni materijali i računalni programi

Popis svih uređaja, potrošnog materijala i računalnih programa korištenih tijekom izrade diplomskog rada su prikazani u tablici 7. i tablici 8.

Tablica 7. Popis uređaja i računalnih programa

Uređaj/Računalni program	Proizvođač
Centrifuga „Hettich EBA 20“	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Hettich), Tuttlingen, Njemačka
Centrifuga 5430	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Sekvencer „ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer“	Applied Biosystems, Warrington, UK
Uređaj za PCR „GeneAmp PCR System 9700“	Applied Biosystems, Warrington, UK
Ultracentrifuga „SIGMA 3K30“	Sigma, Darmstadt, Njemačka
Uspravna ledenica „LA 60 390.BV“	Končar, Zagreb, Hrvatska
Vrtložna miješalica „Agitateur Top-Mix 1118“	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD
Računalni program za HAV genotipizaciju „Hepatitis A virus genotyping tool“ (https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/hav/)	RIVM, Bilthoven, Nizozemska
Računalni program za izradu filogenetskog stabla „MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis“	Institute for Genomics and Evolutionary Medicine, PA, SAD
Računalni program za uređivanje sekvencija „Vector NTI Software“	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD

Tablica 8. Popis potrošnog materijala

Potrošni materijal	Proizvođač
Eppendorf epruvete	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Epruvete Vacutainer	Becton Dickinson, New Jersey, SAD
Gumeni pokrovi za pločice od 96 jažica	Applied Biosystems, Warrington, UK
Blok za hlađenje	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Mikroepreveta (1,5mL i 2mL)	Sarsted, Numbrecht, Njemačka
MicroAmp® epruvete (0,2 mL) i čepovi	Applied Biosystems, Warrington, UK
Mikropipete	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Mikropipete	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD
Nastavci za pipete	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Papirnati ručnici (staničevina)	Medicpro, Čakovec, Hrvatska
Pasteur pipeta	Copan, Brescia, Italija
Plastični stalak, držač i nosač za pločice od 96 jažica	Applied Biosystems, Warrington, UK

3.5. Metode

3.5.1. Izolacija RNA

Virusna RNA je izolirana iz seruma pomoću „QIAamp Viral RNA Mini Kit“ komercijalnog kompleta reagensa, prema uputama proizvođača (Tablica 2). U mikroeprevetu od 2 ml dodao sam 6 µL RNA nosača te 560 µL AVL pufera za razgradnju stanica i denaturaciju proteina. Tome sam dodao 140 µL seruma. Uzorak sam miješao 15 sekundi na vrtložnoj miješalici te ga inkubirao pri sobnoj temperaturi 10 min. Nakon inkubacije, u mikroeprevetu sam dodao 560 µL apsolutnog etanola te sam ponovo uzorak miješao 10 sekundi na vrtložnoj miješalici. Jednu polovinu uzorka (630 µL) sam prenio mikropipetom na QIAamp kolonu s membranom na koju se vežu molekule RNA. Uzorak sam centrifugirao 1 min pri 8 000 rpm-a. Nakon centrifugiranja dodao sam ostatak uzorka (630 µL) na kolonu s membranom, ali sam prethodno promijenio epruvetu za sakupljanje uzorka. Uzorak sam ponovo centrifugirao 1 min pri 8 000 rpm-a. Kolonu za izolaciju sam prebacio u čistu epruvetu za sakupljanje te dodao 500 µL pufera za ispiranje 1 (AW1) kako bih se riješio nečistoća. Uzorke sam centrifugirao pri 8 000 rpm-a tijekom 1 min. Ponovo sam promijenio epruvetu za sakupljanje i u kolonu s membranom sam dodao 500 µL pufera za ispiranje 2 (AW2). Uzorke sam centrifugirao 3 min pri 14 500 rpm-a. Da bi uklonio sve ostatke pufera, koji sadrži etanol te stoga inhibira PCR, kolonu s membranom sam stavio u čistu epruvetu za sakupljanje i centrifugirao, bez dodavanja reagensa, pri 14 500 rpm-a tijekom 1 min. Zatim sam kolonu s membranom stavio u označenu Eppendorf epruvetu i dodao 60 µL elucijskog pufera (AVE). Elucijski pufer otapa RNA molekulu i omogućava prolazak kroz membranu te inhibira RNaze u slučaju kontaminacije izolata. Nakon inkubacije od 1 min, uzorke sam centrifugirao 1 min pri 8 000 rpm-a. Izolirane RNA molekule iz seruma sakupio sam u Eppendorf epruveti. Kolone sam uklonio, a epruvete s izolatima sam pohranio pri -20°C ili koristio odmah za reakciju lančane polimeraze s reverznom transkripcijom.

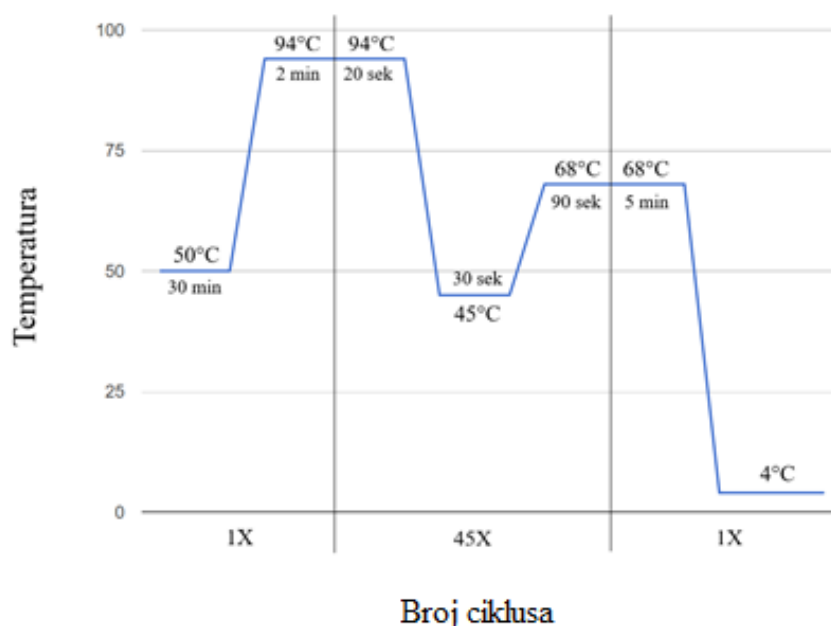
3.5.2. RT-PCR i ugniježđeni PCR

Korištenjem „SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity Enzyme Mix“ kompleta reagensa (Tablica 3) pripremio sam reakcijsku smjesu za prevođenje izolirane RNA u cDNA. Produkt reakcije je umnožena molekula cDNA komplementarna dijelu VP1-2A regije genoma HAV. Sastav i volumen svih komponenti reakcijske smjese prikazani su u tablici 9.

Pomiješao sam 20 μL reakcijske smjese i 5 μL izolirane RNA te uzorke stavio u uređaj za PCR „GeneAmp PCR System“. Uvjeti reakcije prikazani su na slici 13. Nakon završetka reakcije, ampikone sam pohranio na -20°C ili koristio odmah za ugniježđenu lančanu reakciju polimeraze.

Tablica 9. Prikaz reakcijske smjese za RT-PCR

Komponente reakcijske smjese	Volumen (μL)
2x reakcijski pufer	12,5
Počelnica VP1f1	0,25
Počelnica VP1r1	0,25
Smjesa enzima „SuperScript™ III RT/Platinum® Taq High Fidelity,,	0,5
H ₂ O, autoklavirana i destilirana	6,5
Konačni volumen reakcijske smjese	20
HAV RNA	5
Ukupno	25



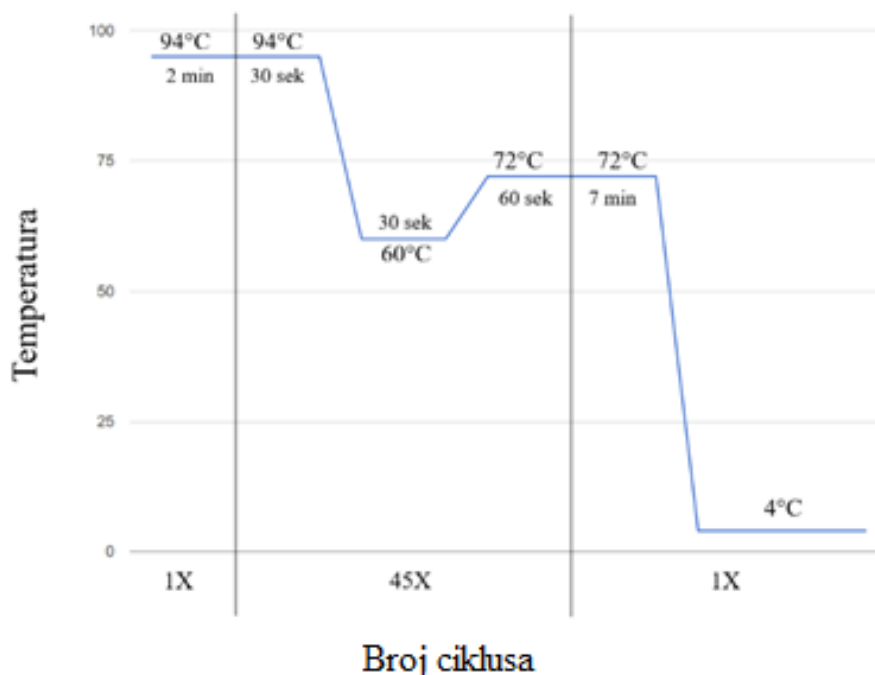
Slika 13. Uvjeti lančane reakcije polimerazom s reverznom transkripcijom (reverzna transkripcija 50°C , 30 min; inicijalna denaturacija 94°C , 2 min; denaturacija 94°C , 30 sek; prijanjanje početnica 45°C , 30 sek; elongacija 68°C , 90 sek; završna elongacija 68°C , 5 min; hlađenje 4°C , ∞).

Nakon reakcije RT-PCR dobivene produkte sam specifično umožio metodom ugniježđenog PCR-a. Unutarnje početnice VP1Nf2 i VP1Nr2 (Tablica 6) se vežu na dio umnožene VP1-2A regije te ugniježđenim PCR-om postizemo veću specifičnost amplicona.

Za umnažanje varijabilne VP1-2A regije koristio sam komplet reagensa „FastStart™ High Fidelity Enzyme Blend“ (Tablica 4). Pripremio sam reakcijsku smjesu (Tablica 10) i stavio sam je u blok za hlađenje. Zatim sam pomiješao reakcijsku smjesu (24,5 µL) i umnoženu DNA (0,5 µL) iz prethodnog PCR-a. Uzorke sam stavio u uređaj za PCR „GeneAmp PCR System“. Reakciju amplifikacije sam postavio prema zadanom programu (Slika 14). Nakon završetka reakcije, amplicone sam pohranio pri -20°C ili koristio odmah za reakciju sekvenciranja.

Tablica 10. Prikaz reakcijske smjese za ugniježđeni PCR

Komponente reakcijske smjese	Volumen (µL)
Smjesa enzima „FastStart High Fidelity“ (5U/ µL)	0,25
Početnica VP1Nf2	0,2
Početnica VP1Nr2	0,2
Smjesa dNTP-ova (10mM)	0,5
10x reakcijski pufer s 18Mm MgCl ₂	2,5
H ₂ O, autoklavirana i destilirana	20,85
Konačni volumen reakcijske smjese	24,5
PCR produkt	0,5
Ukupno	25



Slika 14. Uvjeti ugniježdene lančane reakcije polimerazom (inicijalna denaturacija 94°C, 2 min; denaturacija 94°C, 30 sek; prijanjanje početnica 60°C, 30 sek; elongacija 72°C, 60 sek; završna elongacija 72°C, 7 min; hlađenje 4°C, ∞).

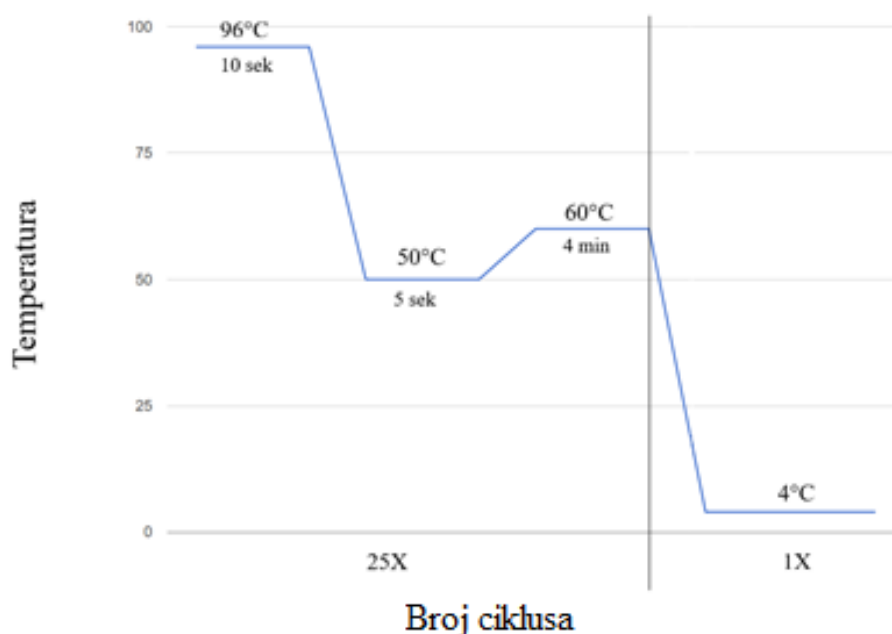
3.5.3. Reakcija sekvenciranja, pročišćavanje i denaturacija uzoraka

Sekvenciranjem očitavamo primarnu strukturu dijela VP1-2A umnožene DNA regije. Metoda temeljena na ugradnji fluorescentno označenih dideoški nukleotida tijekom PCR sinteze komplementarnog lanca DNA naziva se Sangerova dideoksi metoda.

Pripremio sam reakcijsku smjesu prema protokolu (Tablica 11). Koristio sam komplet reagensa „BigDye™ Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit“ u kojem se nalaze fluorescentno označeni ddNTP-ovi, DNA polimeraza i reakcijski pufer (Tablica 5). Zatim sam u MicroAmp® epruvetu od 0,2 ml dodao 8,4 μL reakcijske smjese i 0,6 μL početnice (nizvodna ili uzvodna). Za svaki uzorak je bilo potrebno napraviti dvije reakcijske smjese, u kojoj se nalaze ili nizvodne ili uzvodne početnice, jer se fragmenti DNA sekvenciraju samo u jednom smjeru. Na kraju sam razrijedio PCR produkt u vodi (50x) i u svaku smjesu dodao 1 μL produkta. Uzorke sam stavio na uređaj za PCR „GeneAmp PCR System“. Umnažanje VP1-2A regije i ugradnja fluorescentnih ddNTP-ova u komplementarni lanac provedeno je prema zadanom programu (Slika 15).

Tablica 11. Prikaz reakcijske smjese za reakciju sekvenciranja

Komponente reakcijske smjese	Volumen (μL)
„BigDye™ Terminator v3.1“ reakcijska smjesa	0,5
„BigDye™ Terminator“ 5x reakcijska smjesa za sekvenciranje	2
H ₂ O, autoklavirana i destilirana	5,9
Konačni volumen reakcijska smjesa	8,4
Početnice (VP1Nf2 ili VP1Nr2)	0,6
Razrijeđeni PCR produkt	1
Ukupno	10



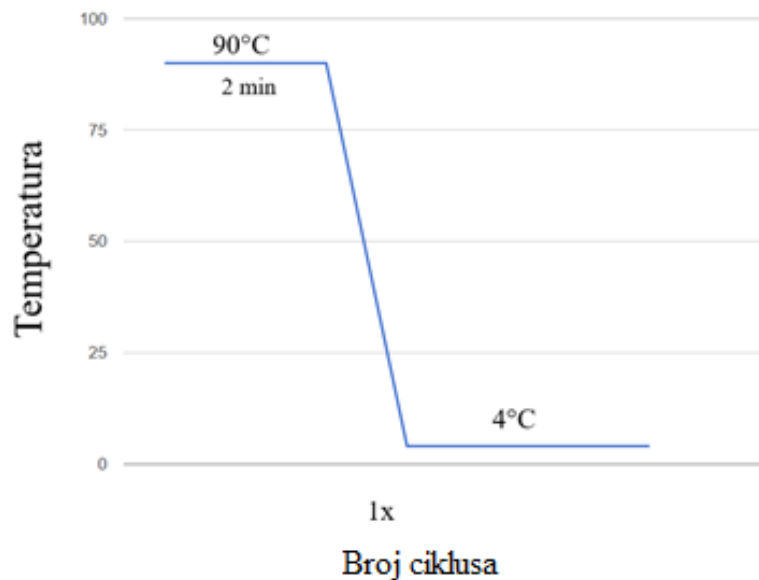
Slika 15. Uvjeti za reakciju sekvenciranja (denaturacija 96°C, 10 sek; prijanjanje početnica 50°C, 5 sek; produžena elongacija 60°C, 4 min; hlađenje 4°C, ∞).

Nakon reakcije sekvenciranja, umnožene fragmente DNA potrebno je pročistiti od neugrađenih ddNTP/dNTP-ova i početnica. Pročišćavanje se provodi pomoću smjese natrijevog acetata i 99% etanola.

U svaku MicroAmp® epruvetu sam dodao 52 μL smjese (2 μL NaAc i 50 μL EtOH). Uzorke sam poklopio, promiješao okretanjem epruvete te centrifugirao 20 min pri 2 000 x g. Nakon centrifugiranja, uklonio sam čepove te sam uzorke poklopio s papirnatim ručnicima i preokrenuto centrifugirao uzorke pri 150 x g tijekom 1 min. Zatim sam u uzorke dodao 150 μL

70% hladnog etanola, zatvorio novim čepovima, promiješao i ponovo centrifugirao pri 2 000 x g u trajanju od 5 min. Odmah nakon završetka centrifugiranja uklonio sam čepove i stavio papirnate ručnike te preokrenuto centrifugirao 1min pri 150 x g.

Fragmente DNA, koji se nalaze u talogu, resuspendirao sam pomoću visoko deioniziranog formamida. U svaki uzorak sam dodao 20 μ L formamida, pažljivo sam ih resuspendirao te postavio u uređaj za PCR. Uzorke sam denaturirao prema protokolu za denaturaciju (Slika 16). Uzorci u kojima se nalaze fragmenti DNA s fluorescentno označenim ddNTP-ovima sekvencirani su na uređaju „ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer“. Za razdvajanje fragmenata pri kapilarnoj elektroforezi korišten je POP-7 polimer i kapilare od 36 cm.



Slika 16. Uvjeti za reakciju denaturacije (denaturacija 90°C, 2 min; hlađenje 4°C, ∞).

3.5.4. Analiza rezultata

Rezultati sekvenciranja pohranjeni su u obliku datoteka ab1 i seq. Za analizu rezultata koristio sam samo ab1 datoteke. U računalnom programu „Vector NTI“ analizirao sam ukupno 45 eksperimentalno dobivenih sekvencija koje obuhvaćaju dio VP1-2A regije u genomu virusa.

U svrhu točnije analize rezultata, skratio sam loše očitane početke i krajeve fragmenata te preklopio fragmente, dobivene korištenjem uzvodne i nizvodne početnice, u sastavljenu sekvenciju tzv. „contig“. Kromatograme sastavljenih sekvencija sam pregledao te ručno ispravio pogreške (pogrešno očitani signal, preklapanje dviju baza). Pomoću računalnog algoritma „Hepatitis A Virus Genotyping Tool Version 1.0“ odredio sam genotip i podtip virusa te provjerio autentičnost sekvencija. Dobivene sekvencije sam usporedio s postojećima iz baze podataka pomoću računalnog programa za lokalno sravnjenje BLAST (*Basic Local Alignment Tool*).

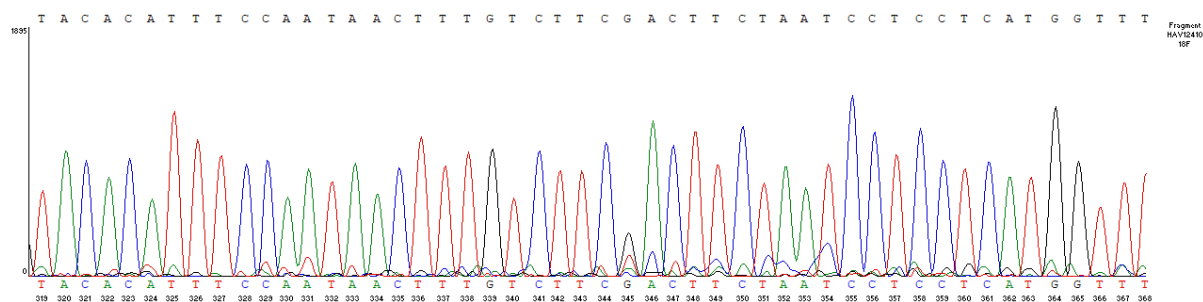
Osim 45 eksperimentalno dobivenih sekvencija, za izradu stabla koristio sam i 12 referentnih sekvencija iz NCBI banke gena. Sekvencije sam sravnio koristeći CustalW program unutar paketa MEGA X te je duljina sravnjenih sekvencija iznosi 880 nukleotida. Za konstrukciju filogenetskog stabla metodom najveće vjerojatnosti koristio sam računalni program MEGA X. Stablo sam izradio koristeći Tamura Nei evolucijski model i metodu samoučitanja s 1000 replika. Sekvencije regije VP1-2A pohranio sam u GenBank pod pristupnim brojevima: MK396845-MK396889.

4. REZULTATI

4.1. Genotipizacija izolata virusa hepatitis A

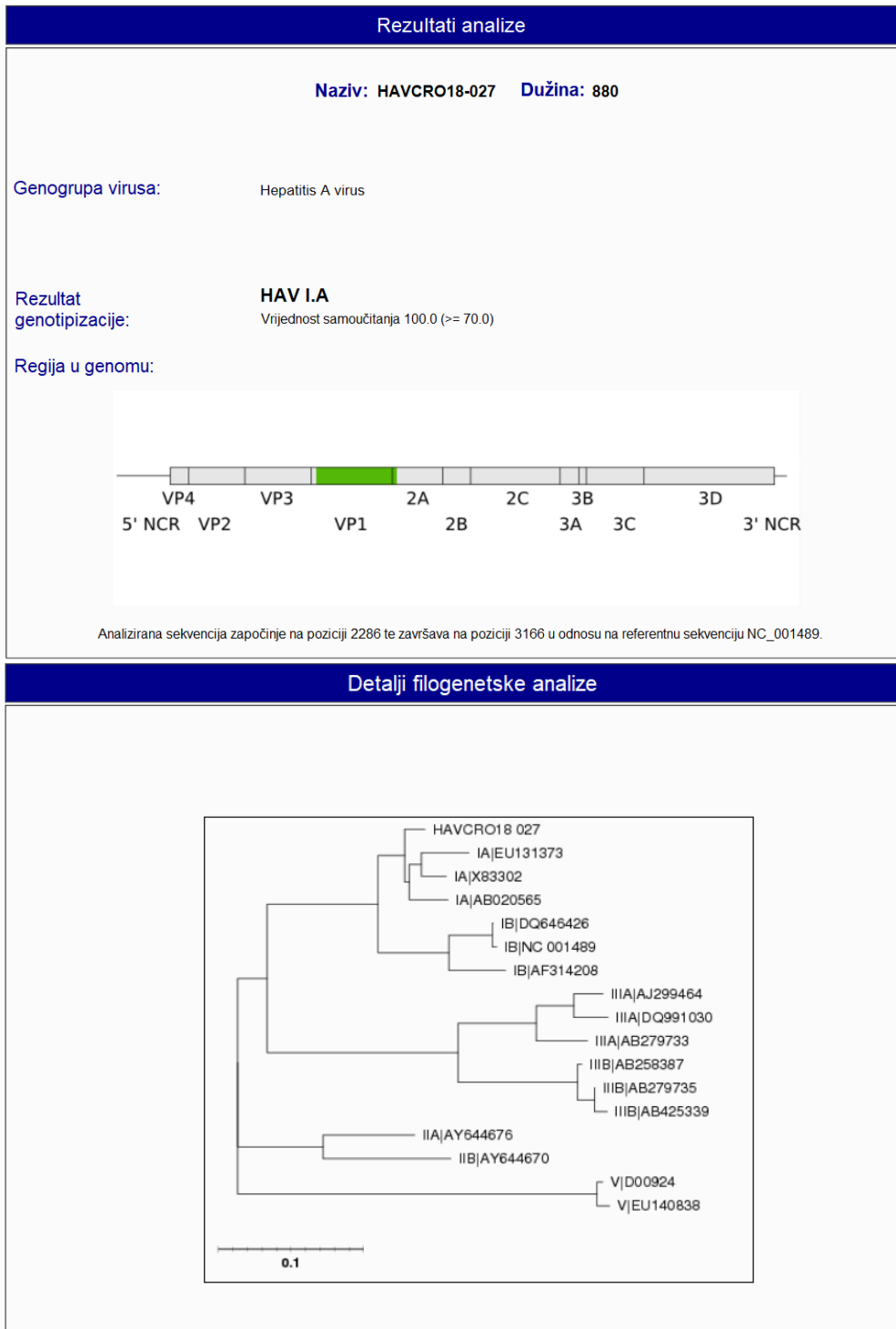
U istraživanje uključeno je 54 ispitanika kojima su u serumu, u sklopu rutinske dijagnostičke obrade, detektirana specifična protutijela anti-HAV IgM, što je pokazatelj akutne infekcije ovim virusom. Uzorci krvi zaraženih osoba prikupljeni su u Odjelu za virusni hepatitis Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u periodu od veljače 2017. do kolovoza 2018.

Iz seruma je izolirana virusna RNA i umnožena je reakcijom PCR te su amplikoni svih uzoraka direktno podvrgnuti reakciji sekvenciranja. Od 54 uzorka uključena u analizu, genotipizacija je uspješno provedena za 45 (83.3%) uzoraka, dok za devet (16.7%) uzoraka genotip nije određen. Budući da test za dokazivanje prisustva virusne RNA u serumu nije napravljen, u svrhu provjere ispravnosti postupka genotipizacije, reakcija sekvenciranja je ponovljena dva puta za svih devet uzoraka kojima genotip nije određen. Iz rezultata sekvenciranja zaključeno je da se virus nije aktivno replicirao u trenutku prikupljanja seruma, pa stoga nije bilo ni virusne RNA u uzorcima. Radilo se o 5 uzoraka pripadnika populacije MSM i 4 uzorka pripadnika opće populacije. Na slici 17. prikazan je rezultat sekvenciranja u računalnom programu „Vector NTI“.



Slika 17. Djelomični prikaz DNA sekvencije regije VP1-2A virusa hepatitis A.

Pomoću računalnog algoritma „Hepatitis A Virus Genotyping Tool Version 1.0“ genotipizirano je 45 izolata virusa (Slika 18). Analizirane sekvencije se uspoređuju s referentnim sekvencijama, koje pripadaju različitim genotipovima, i na temelju sličnosti u slijedu nukleotida uzorci se svrstavaju u genotipove, odnosno podtipove (Tablica 12). Prema identičnosti definiraju se genotipovi, kao grupa virusa koji u sekvenciji imaju sličnost nukleotida veću od 85%, odnosno podtipovi koji se svrstavaju u grupe u kojima razlike u sekvenciji nisu veće od 7.5% baznih parova. Ukupno 44 od 45 genotipiziranih uzoraka pripada genotipu IA, a genotip IB je detektiran samo u jednom uzorku.



Slika 18. Prikaz rezultata genotipizacije izolata virusa hepatitisa A u računalnom programu “Hepatitis A Virus Genotyping Tool Version 1.0”.

Tablica 12. Postotak identičnosti analiziranih sekvencija virusa hepatitis A regije VP1-2A u odnosu na referentnu sekvenciju NC_001489 (IB genotip) korištenjem bioinformatičkog algoritma BLAST. Označen je izolat virusa koji pripada podtipu IB.

Naziv sekvencije	Postotak sličnosti	Naziv sekvencije	Postotak sličnosti	Naziv sekvencije	Postotak sličnosti
HAVCRO17-001	90%	HAVCRO18-002	89%	HAVCRO18-017	91%
HAVCRO17-002	90%	HAVCRO18-003	90%	HAVCRO18-018	91%
HAVCRO17-003	90%	HAVCRO18-004	91%	HAVCRO18-019	91%
HAVCRO17-004	90%	HAVCRO18-005	89%	HAVCRO18-020	91%
HAVCRO17-005	90%	HAVCRO18-006	90%	HAVCRO18-021	91%
HAVCRO17-006	90%	HAVCRO18-007	91%	HAVCRO18-022	91%
HAVCRO17-007	89%	HAVCRO18-008	90%	HAVCRO18-023	94%
HAVCRO17-008	90%	HAVCRO18-009	91%	HAVCRO18-024	89%
HAVCRO17-009	90%	HAVCRO18-010	91%	HAVCRO18-025	91%
HAVCRO17-010	90%	HAVCRO18-011	90%	HAVCRO18-026	89%
HAVCRO17-011	90%	HAVCRO18-012	91%	HAVCRO18-027	91%
HAVCRO17-012	90%	HAVCRO18-013	91%	HAVCRO18-028	90%
HAVCRO17-013	89%	HAVCRO18-014	90%	HAVCRO18-029	91%
HAVCRO17-014	90%	HAVCRO18-015	91%	HAVCRO18-030	91%
HAVCRO18-001	89%	HAVCRO18-016	90%	HAVCRO18-031	91%
HAVCRO: sekvencije regije VP1-2A virusa hepatitis A					

Uzorci su podijeljeni na dvije populacije, MSM i opća. Kada se promatra distribucija genotipova unutar pojedinih populacija (Tablica 13), u populaciji MSM genotip IA je detektiran u 20 ispitanika, dok u pet ispitanika virusna RNA nije detektirana. U zaraženoj općoj populaciji genotip IA je detektiran u 14 ispitanika, genotip IB je detektiran u samo jednom ispitaniku, a genotip nije određen u četiri ispitanika jer virusna RNA nije detektirana. Genotip IA je detektiran u deset muških ispitanika u kojih podatak o pripadnosti nekoj od rizičnih skupina nije poznat.

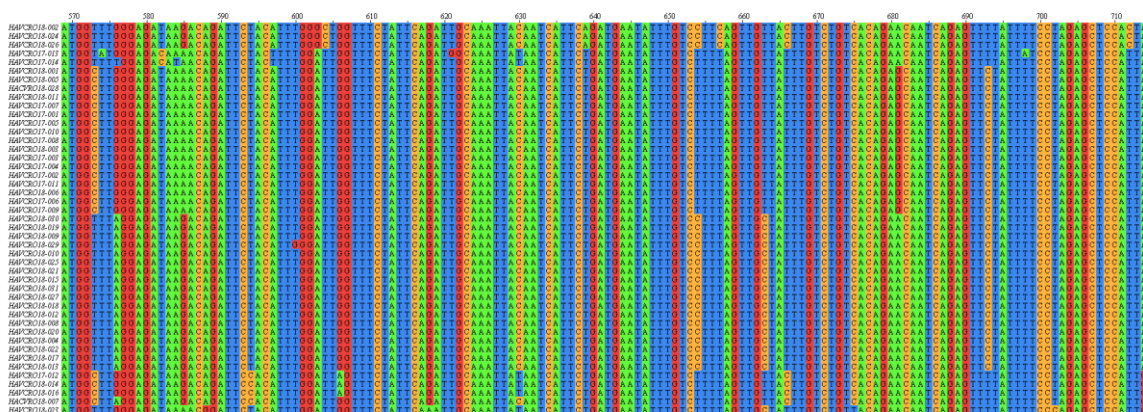
Tablica 13. Distribucija genotipova virusa hepatitis A po zaraženim populacijama

		Genotip			
		IA	IB	Neodređeno	Ukupno
Populacija (n, %)	Populacija MSM*	20 (37%)	0	5 (9.3%)	25 (46.3%)
	Opća populacija	14 (25.9%)	1 (1.9%)	4 (7.4%)	19 (35.2%)
	Nije poznato	10 (18.5%)	0	0	10 (18.5%)
Ukupno (n, %)		44 (81.4%)	1 (1.9%)	9 (16.7%)	54 (100%)

*Muškarci koji prakticiraju spolne odnose s muškarcima

4.2. Filogenetska analiza

Filogenetska analiza provedena je s ciljem utvrđivanja virusnih sojeva unutar detektiranih genotipova. Sravnjene sekvencije virusa HAV korištene pri izradi filogenetskog stabla duge su 880 nukleotida (Slika 19). Analizom dijela genoma varijabilne regije VP1-2A konstruirano je filogenetsko stablo metodom najveće vjerojatnosti (Slika 20). Sekvencija genotipa V korištena je za ukorjenjivanje stabla. Pri konstrukciji stabla korišten je Tamura Nei evolucijski model i metoda samoučitanja s 1000 ponavljanja. Statistički pouzdanim rezultatima smatraju se grananja koja imaju ≥ 70 vrijednost samoučitanja. Prikazano je stablo s najvećom log vrijednosti (-4521.05).

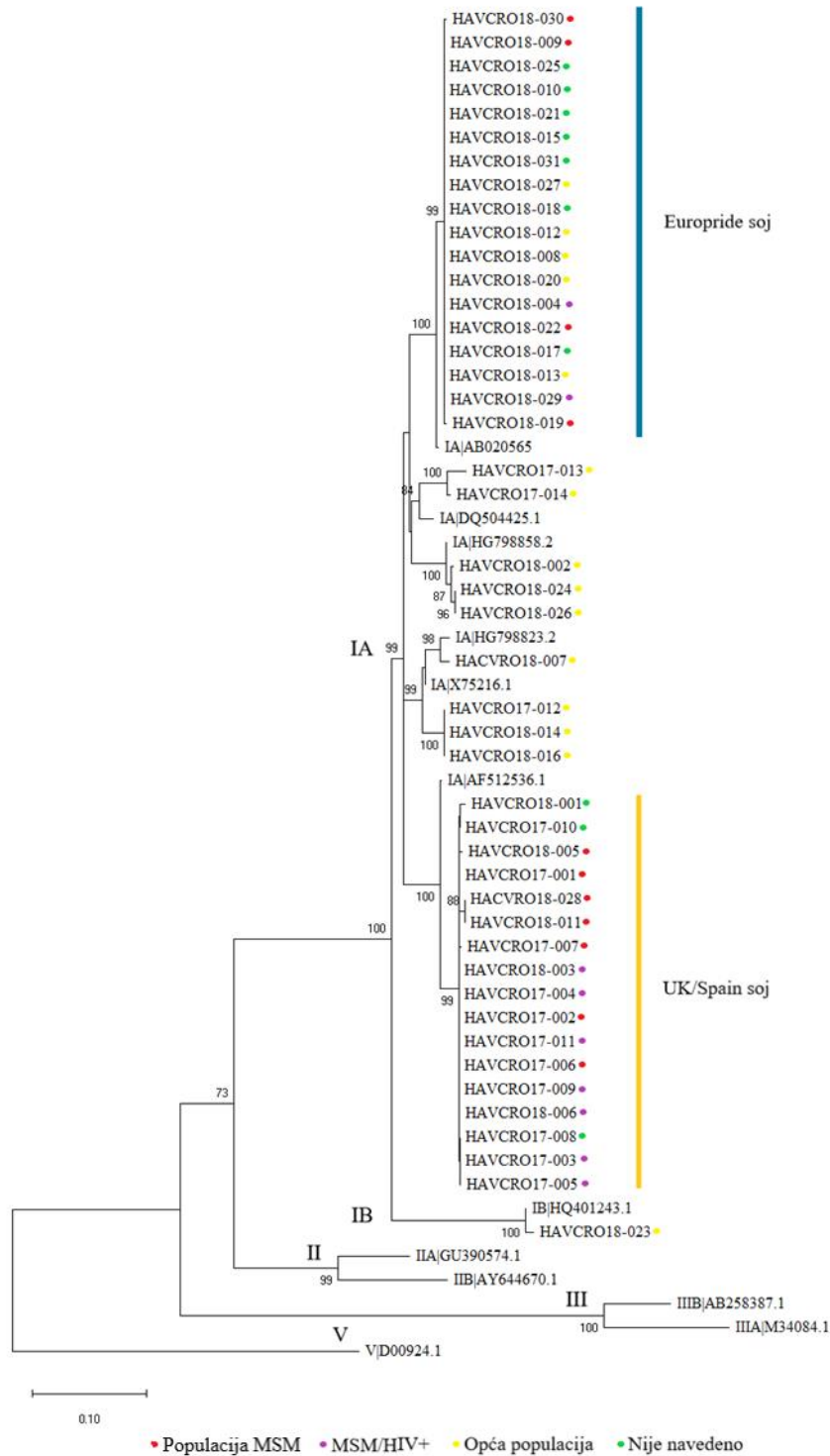


Slika 19. Prikaz dijela višestrukog sravnjanja 45 analiziranih sekvencija virusa hepatitis A.

Referentne sekvencije označene su pristupnim brojem iz banke gena NCBI i odgovarajućim genotipom, dok je 45 eksperimentalno dobivenih sekvencija označeno kao „HAVCRO“. Na filogenetskom stablu može se uočiti sedam grupa, odnosno klastera koje predstavljaju sojeve virusa. Posebno se ističu dva soja virusa karakteristična za populaciju MSM (Europride i UK/Spain), na stablu označena ravnim linijama, koja dominiraju u epidemiji na području Europe.

Sojevi Europride i UK/Spain opaženi su u 77.7% (35 od 45) genotipiziranih izolata virusa. Sojem UK/Spain zaraženo je 17 ispitanika, od čega 14 ispitanika pripadaju populaciji MSM, dok za tri muška ispitanika podatak o pripadnosti nekoj od rizičnih skupina nije poznat. Sojem Europride zaraženo je ukupno 18 ispitanika, od čega se šest ispitanika identificira kao pripadnici populacije MSM, pet muških ispitanika pripada općoj populaciji, dok za sedam muških ispitanika podatak o pripadnosti nekoj od rizičnih skupina nije naveden. Žene i osobe mlađe od 20 godina nisu zaražene ovim sojevima virusa.

Ukupno 22,3% (10 od 45) genotipiziranih izolata virusa može se povezati sa sojevima koji inficiraju opću populaciju. Analizirano je pet uzoraka koji pripadaju ženama i pet uzoraka koji pripadaju muškarcima. Prisutna su četiri soja koja pripadaju IA genotipu i jedan koji pripada IB genotipu te nisu srodni sojevima virusa koji su opisani u epidemijama koje su zahvatile Europu. Usporedbom sekvencija, koje pripadaju općoj populaciji, sa sekvencijama iz NCBI baze podataka dobije se identičnost koja je u rasponu od 97 do 99%, ovisno o soju virusa kojem pripadaju. Svih pet žena je zaraženo različitim sojem virusa.

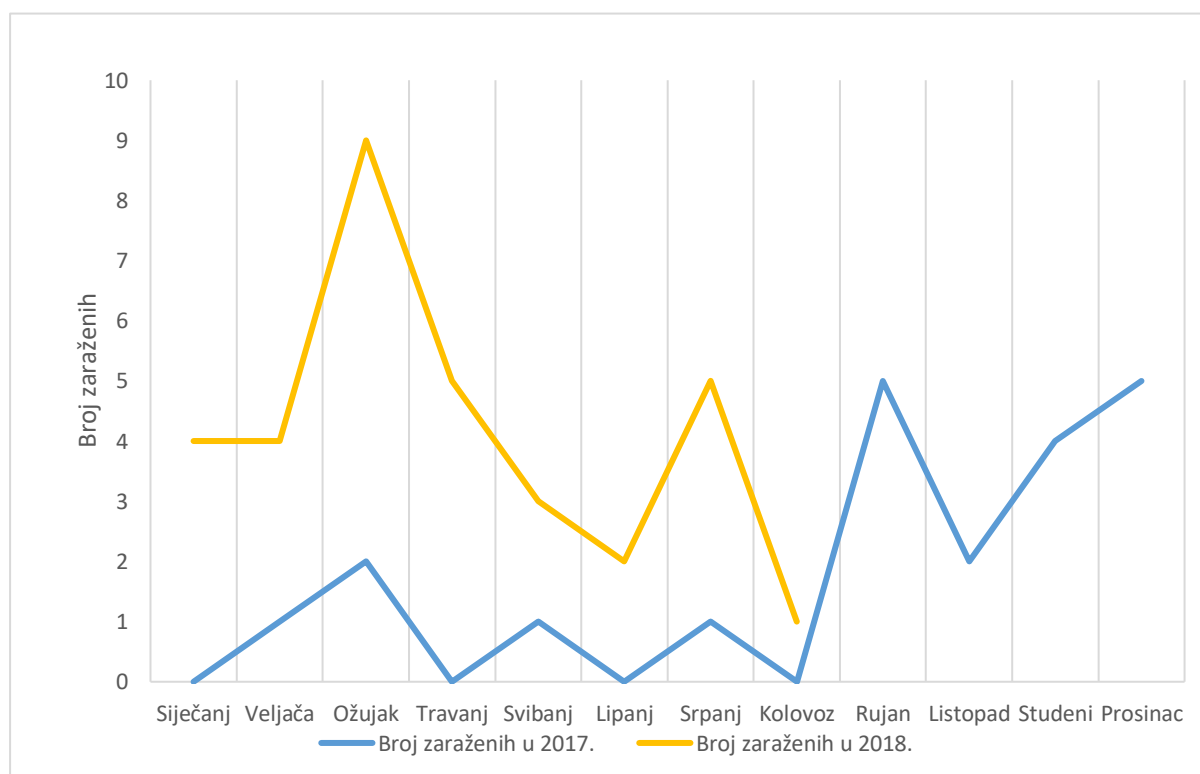


Slika 20. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog analizom dijela VP1-2A regije virusa hepatitis A koristeći metodu najveće vjerojatnosti. Duljina grana proporcijonalna je broju substitucija (mjerna crtica označava 0.10 substitucija). Vrijednosti samoučitanja ($\geq 70\%$) prikazane su na granama stable. Genotipovi su prikazani rimskim brojevima, a sojevi su označeni ravnim linijama. Demografski podaci su označeni točkicama.

4.3. Rekonstrukcija tijeka epidemije u Hrvatskoj

U 2017. godini zabilježen je ukupno 21 slučaj HAV zaraze. Početkom godine bili su to sporadični slučajevi u općoj populaciji, a u drugoj polovini godine bilježi se povećan broj oboljelih u populaciji MSM (Slika 21).

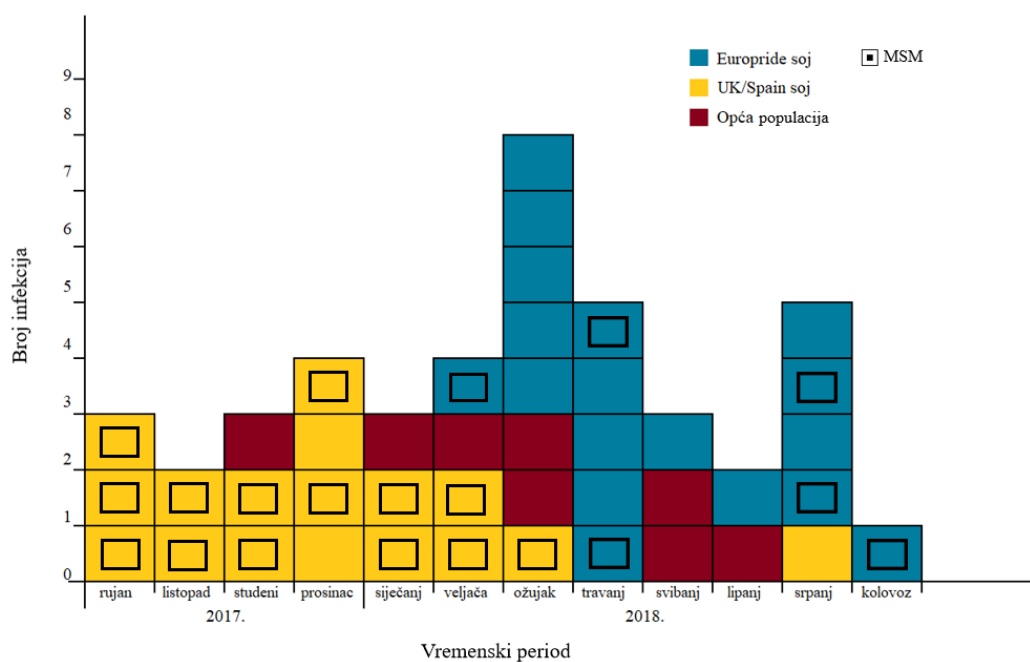
Iz 2017. godine genotipizirano je ukupno 14 od 21 izolata virusa. U tri analizirana izolata detektirana su dva nepoznata soja virusa, koja su povezana s općom populacijom. U preostalih 11 izolata detektiran je soj UK/Spain koji je prvotno uočen u MSM ispitaniku u rujnu 2017. Devet ispitanika, zaraženih sojem UK/Spain, pripadaju populaciji MSM, dok za dva muška ispitanika podatak o pripadnosti nije poznat (Slika 22). Sedam ispitanika, koji su zaraženi sojem UK/Spain, ujedno su i pozitivni na HIV.



Slika 21. Prikaz epidemije hepatitisa A u Hrvatskoj od veljače 2017. do kolovoza 2018.

Trend porasta zaraze virusom HAV nastavlja se i u 2018. godini. Vrhunac epidemije u Hrvatskoj zabilježen je u ožujku 2018. godine te nakon ožujka broj zaraženih opada. Tijekom osam mjeseci u 2018. godini, virusom su se zarazile ukupno 33 osobe (Slika 21).

U 2018. godini prevladava soj Europride te je detektiran u 18 od 31 genotipiziranih uzoraka. Soj je prvotno uočen u osobi MSM u veljači 2018. godine. Dva ispitanika zaražena sojem Europride su pozitivna na HIV. U periodu od veljače do rujna 2018. godine, zabilježeno je ukupno 18 slučajeva zaraze sojem Europride i to šest slučajeva u populaciji MSM, pet slučajeva u općoj populaciji, dok za sedam slučajeva zaraze nije poznat podatak o pripadnosti nekoj od rizičnih skupina. U 2018. godini sojem UK/Spain se zarazilo šest muških ispitanika, pet ispitanika pripada populaciji MSM, dok za jednog zaraženog ispitanika podatak o pripadnosti nekoj od rizičnih skupina nije poznat. U općoj populaciji detektirana su tri nepoznata soja virusa u sedam genotipiziranih izolata.



Slika 22. Prikaz sojeva virusa hepatitis A u zaraženim populacijama, period od rujna 2017. do kolovoza 2018.

Ukupno je identificirano sedam sojeva virusa koji ukazuju na sedam nezavisnih izvora zaraze. U općoj populaciji prisutno je pet nepoznatih sojeva virusa, dok su u populaciji MSM zabilježena dva soja virusa. Soj Europride, karakterističan za populaciju MSM, detektiran je i u općoj populaciji. Distribucija sojeva virusa, tijekom 2017. i 2018. godine, prikazana je u tablici 14.

Tablica 14. Distribucija sojeva virusa hepatitis A u zaraženim populacijama u Hrvatskoj tijekom 2017. i 2018. godine

Populacija:		2017. godina			2018. godina			Ukupno:
		MSM*	Opća	Nije navedeno	MSM*	Opća	Nije navedeno	
Soj virusa (n)	UK/Spain	9	0	2	5	0	1	17
	Europride	0	0	0	6	5	7	18
	Nepoznat	0	3	0	0	7	0	10
Ukupno (n):		14			31			45

*Muškarci koji prakticiraju spolne odnose s muškarcima

5. RASPRAVA

Stopa incidencije infekcija virusom hepatitis A u Europi je u padu zahvaljujući dobrim sanitarnim standardima i higijenskim uvjetima. Unos virusa HAV u zemlje s niskom stopom zaraze je uglavnom povezan s kretanjem migranata, putovanjima na područja gdje je HAV učestao ili konzumacijom kontaminirane hrane koje je uvezena iz zemalja s visokom incidencijom infekcija. Jednom uneseni na određeno područje, sojevi virusa se rasprostranjuju kontaktnim prijenosom sa zaražene osobe na osobu, a stopa zaraze viša je u populaciji MSM zbog rizičnog spolnog kontakta (D'Andrea i sur, 2015). Prema rezultatima istraživanja iz 2011. godine, anti-HAV seroprevalencija u Hrvatskoj populaciji iznosi 41.6%, što znači da više od pola populacije nema razvijenu imunost na ovaj virus (Vilibic-Cavlek i sur, 2011).

Epidemija hepatitisa A, koja je zahvatila populaciju MSM u Europi, započela je sredinom 2016. godine. Sojevi virusa koji prevladavaju u epidemiji su prvotno identificirani u Nizozemskoj, Ujedinjenom Kraljevstvu i Njemačkoj (Freidl i sur, 2017; Beebeejaun i sur, 2018; Werber i sur, 2018). Molekularnim analizama identificirana su tri soja virusa, RIVM-HAV-090 (Europride), VRD_521_2016 (UK/Spain) i V16_25801 (Germany), koja pripadaju genotipu IA te su dominantno zastupljeni u populaciji MSM. Prema podacima Europskog centra za kontrolu i sprječavanje bolesti iz 2018. godine, u periodu od siječnja 2017. do kolovoza 2018. godine, 76% (4217 od 5537) genotipiziranih uzoraka na području 24 europski zemalja je zaraženo jednim od tri detektirana soja. U Hrvatskoj je također zabilježen povećan broj oboljelih od hepatitisa A tijekom 2017. i 2018. godine te je u prosjeku oboljelo pet puta više muškaraca od žena. Prema rezultatima genotipizacije u Hrvatskoj prevladava genotip IA, dok je genotip IB prisutan u samo jednom izolatu. U ovom istraživanju detektirano je ukupno sedam sojeva virusa koji su zarazili hrvatsku populaciju, što ukazuje na sedam nezavisnih izvora zaraze. Dva soja virusa (Europride i UK/Spain) prevladavaju u zaraženoj hrvatskoj populaciji te su već prethodno identificirana i povezana su s epidemijom u Europi koja je zahvatila populaciju MSM (Freidl i sur, 2017; Beebeejaun i sur, 2018). Za ostalih pet sojeva informacija o pripadnosti nekoj od grupa nije poznata. Vrhunac epidemije u Europi zabilježen je u ožujku 2017. godine i zatim dolazi do pada broja oboljelih od hepatitisa A, dok je vrhunac epidemije u Hrvatskoj zabilježen u ožujku 2018. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018a).

Posljednja epidemija hepatitisa A u Europi, koja je zahvatila populaciju MSM, zabilježena je 2008. godine (Ndumbi i sur, 2018). U Hrvatskoj su tijekom 2017. i 2018. godine pretežito oboljele osobe koje pripadaju populaciji MSM te su bile inficirane dvama sojevima koji prevladavaju u epidemiji karakterističnoj su za europsku populaciju MSM. Europride sojem zarazilo se ukupno 12 muških osoba koje ne pripadaju populaciji MSM, u tu grupu spada pet osoba koje su se deklarirale kao pripadnici opće populacije te sedam osoba čiji podaci nisu bili dostupni. Prema rezultatima istraživanja Friesema i sur (2018), rasprostranjivanje virusnog soja Europride između dvije populacije zabilježeno je u Nizozemskoj te se u prosjeku za svaka dva zabilježena slučaja zaraze osobe MSM karakterističnim sojem virusa zarazila i jedna osoba iz opće populacije, češće muškarci nego žene. U Hrvatskoj su se na jednu zaraženu osobu MSM sojem Europride u prosjeku zarazile dvije muške osobe, koje pripadaju općoj populaciji ili nemaju naveden podatak o pripadnosti nekoj od rizičnih skupina. Jedno od objašnjenja zašto su muškarci iz opće populacije podložniji zarazi sojem karakterističnim za MSM osobe je da određen broj muških osoba ne želi prijaviti podatak o seksualnoj orijentaciji. Pretpostavlja se da je mogućnost prijenosa u uobičajenim slučajevima između dva muškarca češći nego između muškarca i žena, primjerice u javnim toaletima. Slučajevi zaraze djece sojem virusa, koji se uobičajeno detektira u populaciji MSM, su rijetki i to ukazuje da se soj rasprostranjuje samo između odraslih osoba zbog prakticiranja rizičnog spolnog kontakta (Friesema i sur, 2018).

U općoj populaciji detektirani su sojevi virusa za koje informacija o pripadnosti nekoj od grupa nije poznata. Svih pet sojeva prisutno je samo u općoj populaciji te ukazuje na pet nezavisnih izvora zaraze. Četiri soja pripadaju podtipu IA, dok jedan pripada podtipu IB. Sojevi virusa koji pripadaju IA podtipu te su povezani sa zarazama opće populacije u Europi tijekom 2018. godine nisu slični sojevima virusa koji su ranije opaženi u hrvatskoj općoj populaciji (Enkirch i sur 2018; European Centre for Disease Prevention and Control, 2018b). Slučajevi zaraze sojevima virusa koji pripadaju IB podtipu u Europi povezani su s epidemijom u Maroku te su zabilježeni u osoba koje imaju povijest putovanja u tu državu (Gassowski i sur, 2018). U ovom istraživanju podaci o povijesti putovanja za zaražene ispitanike nisu prijavljeni te stoga izvori zaraze u populaciji još uvijek nisu poznati. Prema rezultatima Server i sur (2015) u Europi su zabilježeni slučajevi zaraze virusom HAV nakon konzumiranja zaleđenog bobičastog voća te konzumacije kontaminirane hrane, što može biti jedan od uzročnika zaraze i u hrvatskoj populaciji. Velika raznolikost sojeva virusa unutar malog broja zaraženih osoba iz opće populacije ukazuje na zarazu povezanu s konzumacijom različitih kontaminiranih prehrambenih proizvoda ili zaraze povezane s putnicima. Rezultati ovakvog istraživanja mogu

poslužiti u daljnjoj epidemiološkoj analizi sa svrhom pronalaska izvora zaraze identificiranih sojeva koji su pronađeni u općoj populaciji te suzbijanja daljnjega rasprostranjivanja virusa.

Tijekom 2013. i 2014. godine zabilježena je najveća epidemija hepatitisa A koja je zahvatila Europu, a uzrokovana je konzumacijom zaražene hrane. U godinu dana zarazilo se preko 1500 osoba na području 13 europskih država, 90% slučajeva zabilježeno je u Italiji. Molekularnim analizama detektiran je jedan soj virusa genotipa IA, koji prevladava u zaraženim osobama i uzročnik je epidemije. Iz rezultata istraživanja zaključeno je da uzrok epidemije zaleđeno bobičasto voće (Severi i sur, 2015). U 2018. godini su također zabilježeni slučajevi infekcije preko smrznutog bobičastog voća u Švedskoj i Austriji. Zbog brzog djelovanja znanstvenika i poznavanja sličnog slučaja koji se dogodio u Italiji, veći broj zaraženih osoba je izbjegnuto jer su se kontaminirani proizvodi brzo prepoznali i povukli iz prodaje (Enkirch i sur, 2018). Ova i ostale nedavne epidemije hepatitisa A, povezane s kontaminiranim smrznutim voćem, upućuju da se zaleđeno bobičasto voće treba smatrati potencijalno visokorizičnim proizvodima u Europi. U posljednjih 15 godina uočena je povezanost između povećane učestalosti epidemija uzrokovane konzumacijom zaražene hrane i trenda konzumacije sirove hrane (Severi i sur, 2015). Iz navedenog razloga, preporuka je bobičasto voće potrebno je prije konzumacije termički obraditi s ciljem smanjenja rizika od zaraze hepatitisa A (Severi i sur, 2015).

U 2018. godini ECDC je objavio procjenu rizika za dva nova soja virusa HAV (DK2018_231 i DK2018_267) koji su uzrokovali zaraze u općoj populaciji u šest država Europske Unije. Pripadaju genotipu IA i nisu povezani sa sojevima koji su karakteristični za populaciju MSM. Oba soja su već od prije poznata i povezana su s epidemijom u Maroku (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018b). Osim IA genotipa, u Maroku je prisutan i soj virusa koji pripada genotipu IB. U periodu od travnja do svibnja 2018. godine, u Europi su zabilježeni i slučajevi zaraze sojem IB (V18_16428) u putnika koji su se vratili iz Maroka (Gassowski i sur, 2018). Veliki udio osoba zaraženih jednim od IA sojeva virusa nemaju povijest putovanja u Maroko te su se zarazili autohtono u Europi. Smatra se da se sojevi DK2018_231 i DK2018_267 rasprostranjuju kontaktnim prijenosom sa zaražene osobe na osobu ili preko kontaminirane hrane. Oba soja su iznimno homogena i predložena je hipoteza rasprostranjivanja virusa preko jednog prehrambenog proizvoda koji je distribuiran u nekoliko europskih država (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018b). Veliki udio ispitanika zaraženih IB sojem prijavilo je putovanje u Maroko, u razdoblju od 50 dana prije pojavljivanja simptoma, što ukazuje da je izvor zaraze u Maroku.

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javna zdravstvo cjepivo protiv hepatitisa A nije uključeno u program obaveznog cijepljenja u Republici Hrvatskoj te se preporučuje osobama koje putuju u zemlje u kojima je povećan rizik zaraze virusom HAV. Zbog epidemije koja je zahvatila Europu u 2016. godini, potrebno je razmotriti mogućnost uključivanja i rizičnih skupina u preporuku za cjepivo protiv hepatitisa A. Ostale preventivne mjere, u svrhu suzbijanja daljnjih zaraza, su osiguranje i provedba higijenskih sanitarnih mjera, izbjegavanje konzumacije sirove hrane u zemljama s visokom stopom HAV zaraze, edukacija o osobnim higijenskim mjerama zaštite te se savjetuje i odgovorno spolno ponašanje radi sprječavanja rizika od hepatitisa A, ali i ostalih prenosivih zaraza (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2017).

6. ZAKLJUČCI

1. Slijed nukleotida regije VP1-2A utvrđen je kod 45 izolata virusa koji su prikupljeni u periodu od veljače 2017. do kolovoza 2018.
2. Molekularnim analizama hipervarijabilne regije virusa HAV ustanovljena je prisutnost podtipa IA kod 44 zaraženih ispitanika te prisutnost podtipa IB kod jednog zaraženog ispitanika.
3. U Hrvatskoj je detektirano sedam različitih sojeva, od toga dominiraju dva soja (VRD_521_2016 i RIVM-HAV-069) koja su karakteristična za populaciju MSM, dok za ostalih pet sojeva, koji su detektirani u općoj populaciji, informacija o pripadnosti nekoj od grupa nije poznata.

7. LITERATURA

- Aggarwal R., Goel A. (2015): Hepatitis A: Epidemiology in resource-poor countries. *Curr Opin Infect Dis* **28**: 488–496.
- Beebejaun K., Degala S., Balogun K., Simms I., Woodhall S. C., Heinsbroek E., i sur (2017): Outbreak of hepatitis A associated with men who have sex with men (MSM), England, July 2016 to January 2017. *Euro Surveill* **2**: 1560-7917.
- Bruni R., Taffon S., Equestre M., Cella E., Presti A. L., Costantino A., i sur (2017): Hepatitis a virus genotypes and strains from an endemic area of Europe, Bulgaria 2012-2014. *BMC Infect Dis* doi:10.1186/s12879-017-2596-1.
- Cann A. J. (2015): Principles of Molecular Virology, 6th edition. London: Academic Press.
- Costa-Mattioli M., Napoli A. D., Ferré V., Billaudel S., Perez-Bercoff R., Cristina J. (2003): Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* doi:10.1099/vir.0.19532-0.
- da Silva S. G. C., Leon L. A. A., Alves G., Brito S. M., Souza Sandes V., Lima M. M. A. F., i sur (2016): A Rare Case of Transfusion Transmission of Hepatitis A Virus to Two Patients with Haematological Disease. *Transfus Med Hemotherapy* **43**: 137–141.
- Das A., Hirai-Yuki A., González-López O., Rhein B., Moller-Tank S., Brouillette R., i sur (2017): TIM1 (HAVCR1) is not essential for cellular entry of either quasi-enveloped or naked hepatitis a virions. *MBio* **8**: 1–14.
- D'Andrea L., Pérez-Rodríguez F. J., de Castellarnau M., Manzanares S., Lite J., Guix S., i sur (2015): Hepatitis A virus genotype distribution during a decade of universal vaccination of preadolescents. *International journal of molecular sciences* **16**: 6842-54. doi:10.3390/ijms16046842
- de Paula V.S. (2012): Laboratory diagnosis of hepatitis A. *Future Virol.* **7**: 461-472
- Desbois D., Couturier E., Mackiewicz V., Graube A., Letort M. J., Dussaix E., i sur (2010): Epidemiology and genetic characterization of hepatitis A virus genotype IIA. *J Clin Microbiol* doi:10.1128/JCM.00667-10.

- European Centre for Disease Prevention and Control, (2018a): Epidemiological update: Hepatitis A outbreak in the EU/EEA mostly affecting men who have sex with men. Dostupno na: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men-2> (pristupljeno 1.12.2018).
- European Centre for Disease Prevention and Control, (2018b): Multi-country outbreak of hepatitis A virus genotype IA infections affecting EU countries in 2018 – 21 May 2018. Stockholm: ECDC; 2018.
- European Centre for Disease Prevention and Control, (2017): Hepatitis A outbreaks in the EU/EEA mostly affecting men who have sex with men – third update, 28 June 2017. Stockholm: ECDC; 2017.
- Enkirch T., Eriksson R., Persson S., Schmid D., Aberle S. W., Löf E., i sur (2018): Hepatitis A outbreak linked to imported frozen strawberries by sequencing, Sweden and Austria, June to September 2018. *Eurosurveillance* **23**. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.41.1800528
- Feinstone S. M., Kapikian A. Z., Purceli R. H. (1973): Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* **7**: 1026-8.
- Feng Z., Hirai-Yuki A., McKnight K. L., Lemon S. M. (2014): Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annu Rev Virol* **1**: 539–560.
- Feng Z., Hensley L., McKnight K. L., Hu F., Madden V., Ping L., i sur (2013): A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* **496**: 367–371.
- Freidl G. S., Sonder G. J., Bovée L. P., Friesema I. H., van Rijckevorsel G. G., Ruijs W. L., i sur (2017): Hepatitis a outbreak among men who have sex with men (MSM) predominantly linked with the EuroPride, the Netherlands, July 2016 to February 2017. *Eurosurveillance* doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.8.30468.
- Friesema I. H., Sonder G. J., Petrignani M. W., Meiberg A. E., van Rijckevorsel G. G., Ruijs W. L. i sur (2018): Spillover of a hepatitis A outbreak among men who have sex with

- men (MSM) to the general population, the Netherlands, 2017. *Eurosurveillance* **23** doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.23.1800265
- Gassowski M., Michaelis K., Wenzell J. J., Faber M., Figoni J., Mouna L., i sur (2018): Two concurrent outbreaks of hepatitis A highlight the risk of infection for non-immune travellers to Morocco, January to June 2018. *Eurosurveillance* **23**: 1800329.
- Global Hepatitis Report (2017): Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Hollinger F. B. i Martin A. (2013): Hepatitis A Virus U: Knipe D. M. i Howley P. M. (ur.) *Fields virology*, 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, str. 550-581.
- Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2017): Epidemija hepatitisa A u europskim zemljama Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/epidemija-hepatitisa-a-u-europskim-zemljama/> (pristupljeno 1.12.2018)
- Jackson R. J., Hellen C. U., Pestova T. V. (2010): The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 113–127.
- Jiang P., Liu Y., Ma H. C., Paul A. V., Wimmer E. (2014): Picornavirus Morphogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **78**: 418–437.
- Kaplan G., Totsuka A., Thompson P., Akatsuka T., Moritsugu Y., Feinstone S. M (1996): Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J* **15**: 4282–4296.
- Kroneman A., de Sousa R., Verhoef L., Koopmans M. P. G., Vennema H. (2018): Usability of the international HAVNet hepatitis A virus database for geographical annotation, backtracing and outbreak detection. *Euro Surveill.* **23** doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.37.1700802.
- Lin K. Y., Chen G. J., Lee Y. L., Huang Y. C., Cheng A., Sun H. Y., i sur (2017): Hepatitis A virus infection and hepatitis A vaccination in human immunodeficiency virus-positive patients: A review. *World J Gastroenterol* **23**: 3589.
- Lemon S. M., Ott J. J., Van Damme P., Shouval D. (2017): Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention, *Journal of Hepatology* **5**: 32278-X.

- Leon L. A. A., De Almeida A. J., De Paula V. S., Tourinho R. S., Villela D. A. M., Gaspar A. M. C., i sur (2015): Longitudinal Study of Hepatitis A Infection by Saliva Sampling: The Kinetics of HAV Markers in Saliva Revealed the Application of Saliva Tests for Hepatitis A Study. *PLoS One* **10**: 1–12.
- Lugoboni F., Pajusco B., Albiero A., Quaglio G. (2012): Hepatitis A virus among drug users and the role of vaccination: A review. *Front Psychiatry* **2**: 1–9.
- McKnight K. L., Lemon S. M. (2018): Hepatitis A Virus Genome Organization and Replication Strategy. *Cold Spring Harb Perspect Med* a033480 doi:10.1101/cshperspect.a033480.
- Ndumbi P., Freidl G. S., Williams C. J., Mårdh O., Varela C., Avellón A., i sur (2018): Hepatitis A outbreak disproportionately affecting men who have sex with men (MSM) in the European Union and European Economic Area, June 2016 to May 2017. *Euro Surveill* **23**: 1560-7917.
- Nian O. V., Xia G., Vaughan G., Margolis H. S. (2006): Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev* **19**: 63-79.
- Sadahiro A., Fukao A., Kosaka M., Funakami Y., Takizawa N., Takeuchi O., i sur (2018): Translation of hepatitis A virus IRES is upregulated by a hepatic cell-specific factor. *Front Genet* **9**: 1–10.
- San Mauro D., Agorreta A. (2010): Molecular systematics: A synthesis of the common methods and the state of knowledge. *Cell Mol Biol Lett* **15**: 311-41.
- Severi E., Verhoef L., Thornton L., Guzman-Herrador B. R., Faber M., Sundqvist L., i sur (2015): Large and prolonged food-borne multistate hepatitis A outbreak in Europe associated with consumption of frozen berries, 2013 to 2014. *Eurosurveillance* **20**: 21192
- Shin S. Y., Jeong S. H., Sung P. S., Lee J., Kim H. J., Lee H. W., i sur (2016): Comparative analysis of liver injury-associated cytokines in acute hepatitis A and B. *Yonsei Med J* **57**: 652–657.
- Shin E. C., Jeong S. H. (2018): Natural History, Clinical Manifestations, and Pathogenesis of Hepatitis A. *Cold Spring Harb Perspect Med* a031708 doi:10.1101/cshperspect.a031708.

- Shukla A., Padhi A. K., Gomes J., Banerjee M. (2014): The VP4 Peptide of Hepatitis A Virus Ruptures Membranes through Formation of Discrete Pores. *J Virol* **88**: 12409–12421.
- Stuart D. I., Ren J., Wang X., Rao Z., Fry E. E. (2018): Hepatitis A Virus Capsid Structure. *Cold Spring Harb Perspect Med* a031807 doi:10.1101/cshperspect.a031807.
- Treyer A., Müsch A. (2013). Hepatocyte polarity. *Compr Physiol* **3**: 243-87
- Vilibic-Cavlek T., Kucinar J., Ljubin-Sternak S., Kolaric B. (2011): Seroepidemiology of Hepatitis A in the Croatian Population. *Hepat Mon* **11**: 997-999
- Vaughan G., Xia G., Forbi J. C., Purdy M. A., Rossi L. M. G., Spradling P. R., i sur (2013): Genetic relatedness among hepatitis a virus strains associated with food-borne outbreaks. *PLoS One* **8**: 1–10.
- Vaughan G., Goncalves Rossi L. M., Forbi J. C., de Paula V. S., Purdy M. A., Xia G., i sur (2014): Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infect Genet Evol* **21**: 227–243.
- Wang H., Zheng H., Cao J., Zhou W., Yi Y., Jia Z., i sur (2013): Genetic Diversity of Hepatitis A Virus in China: VP3-VP1-2A Genes and Evidence of Quasispecies Distribution in the Isolates. *PLoS One* doi:10.1371/journal.pone.0074752.
- Werber D., Michaelis K., Hausner M., Sissolak D., Wenzel J., Bitzegeio J., i sur (2017): Ongoing outbreaks of hepatitis A among men who have sex with men (MSM), Berlin, November 2016 to January 2017 - linked to other German cities and European countries. *Euro Surveill* **2**: 1 560-7917.
- World Health Organization (2018a): What is hepatitis? Dostupno na: www.who.int/features/qa/76/en/ (pristupljeno 1.12.2018).
- World Health Organization (2018b): Hepatitis A. Dostupno na: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-a> (pristupljeno 1.12.2018).
- World Health Organization (2012): Weekly epidemiological record Dosupno na: http://www.who.int/wer/2012/wer8728_29.pdf (pristupljeno 1.12.2018).
- Xiong J. (2006): Essential Bioinformatics. Cambridge: Cambridge University Press.
- Yang Z., Rannala B. (2012): Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet* **28**: 303-14.

Zell R., Delwart E., Gorbalenya A. E., Hovi T., King A. M. Q., Knowles N. J., i sur (2017):
ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol* **98**: 2421-2422.

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Josip Ujević

Obrazovanje:

2016. – danas **Diplomski studij Molekularne biologije**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
2013. - 2016. **Preddiplomski studij Biologije i ekologije mora**
Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za studije mora,
2009. - 2013. Prirodoslovna gimnazija Split

Laboratorijska stručna praksa:

- 3/2017. – 6/2017. Zavod za mikrobiologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Ostale vještine:

Engleski jezik (C1)

Spretan sam u radu s računalom i novim tehnologijama te posjedujem iskustvo u radu s Microsoft Office

Vozačka dozvola B-kategorije