

ΜΠΣ ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΜΗΜΑ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΤΣΑΓΚΟΒΙΤΣ

Μελέτη της Ηπατίτιδας C (HCV) σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών στην
Ελλάδα

ΑΘΗΝΑ, 2015

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ

που απονέμει η Ιατρική Σχολή και το Τμήμα Μαθηματικών του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και το Τμήμα Μαθηματικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Εγκρίθηκε την..... από την εξεταστική επιτροπή:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΘΜΙΔΑ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

Δ. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ (Επιβλέπων) **ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

Γ. ΜΑΓΙΟΡΚΙΝΗΣ

ΛΕΚΤΟΡΑΣ

.....

Β. ΣΥΨΑ

ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

*Στους αξιολάτρευτους γονείς μου,
Σωτήρη και Ασπασία*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Δημήτριο Παρασκευή, Επίκουρο Καθηγητή Επιδημιολογίας και Προληπτικής Ιατρικής για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση της ερευνητικής του ιδέας, αλλά και την ακούραστη καθοδήγηση και ενθάρρυνση καθ' όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της παρούσας διπλωματικής. Χάρη στην αφοσιωμένη και πρωτοποριακή του διδασκαλία μυήθηκα στη συναρπαστική επιστήμη της Μοριακής Επιδημιολογίας και Φυλογενετικής και γι' αυτό νιώθω ευγνώμων.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στην κ. Ασημίνα Ζαβιτσάνου, ΕΔΙΠ Επιδημιολογίας και Προληπτικής Ιατρικής, για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε όποτε την χρειάστηκα. Δε θα ολοκλήρωνα ποτέ την παρούσα εργασία χωρίς τις πολύτιμες γνώσεις της, που μου μετέδιδε πάντοτε με προθυμία. Της εύχομαι καλή συνέχεια και προκοπή στη ζωή και στο έργο της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κ. Γεωργία Βουρλή, Επιστημονική Συνεργάτη του Εργαστηρίου Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής για τις πολύ χρήσιμες συμβουλές και σημαντικές παρεμβάσεις της ως προς τη στατιστική μεθοδολογία που αποδείχθηκαν καίριες για τη συνέχιση της μελέτης.

Απέραντη ευγνωμοσύνη οφείλω στους συναδέλφους μου, Ιατρούς της ΩΡΛ κλινικής του Νοσοκομείου “Παμμακάριστος” για την ευγενική υποστήριξη και συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Δε θα μπορούσα να ανταπεξέλθω παράλληλα στις απαιτήσεις του μεταπτυχιακού προγράμματος και στα βάρη των επαγγελματικών υποχρεώσεων χωρίς την ανιδιοτελή προσφορά τους.

Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω το Θεό που ευδόκησε να φέρω σε πέρας αυτό το δύσκολο έργο.

Πίνακας Περιεχομένων

1. Ηπατίτιδα C και Ιός της Ηπατίτιδας C (HCV).....	8
1.1 Επιδημιολογία.....	8
1.2 Τρόποι μετάδοσης.....	12
1.3 Παθοφυσιολογία.....	16
1.4 Κλινική Εικόνα.....	18
1.5 Διάγνωση.....	20
1.6 Θεραπευτική Προσέγγιση.....	22
2. Ταξινόμηση του Ιού της Ηπατίτιδας C.....	24
2.1 Γενετική Ποικιλομορφία HCV.....	28
2.2 HCV Γονότυποι και Γεωγραφική Κατανομή.....	32
2.3 Γονότυποι HCV και ομάδες κινδύνου.....	36
2.4 Κλινική Σημασία των Γονότυπων.....	40
2.5 Επιδημιολογική Σημασία των Γονότυπων.....	42
3. Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών (XEN) και Ηπατίτιδα C.....	44
3.1 Υπότυποι και Προέλευση Επιδημίας στους XEN.....	50
3.2 HIV/HCV συλλοίμωξη.....	54
3.3 Προληψη της HCV επιδημίας στους XEN.....	56
4. Ηπατίτιδα C στην Ελλάδα.....	58
5. Το πρόγραμμα “Αριστοτέλης”.....	64
6. Ειδικό Μέρος.....	66
6.1 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	66
6.2 Μέθοδοι.....	68
6.2.1. Δείγματα Μελέτης.....	68
6.2.2. Απομόνωση ιικού RNA, PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).....	68
6.2.3. Σχεδιασμός των εκκινητών, Μη-εμπορικά διαθέσιμη διπλή PCR (In house nested PCR), Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	68
6.2.4. PCR αλληλούχισης (Sequencing PCR).....	69
6.2.5. Φυλογενετική ανάλυση.....	69
6.2.6. Εύρεση μονοφυλετικών ομάδων.....	75
6.2.7. Στατιστική Ανάλυση.....	76
6.3 Αποτελέσματα.....	78
6.4 Συζήτηση.....	90
Περίληψη.....	94

Abstract.....	96
Βιβλιογραφία.....	98

1. Ηπατίτιδα C και Ιός της Ηπατίτιδας C (HCV)

Η ηπατίτιδα C είναι μία λοίμωξη με αιτιολογικό παράγοντα τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), ο οποίος προσβάλλει το ήπαρ και οδηγεί σε φλεγμονή. Αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς το 3% του πληθυσμού, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), έχει μολυνθεί από τον ιό και πάνω από 185 εκατομμύρια άτομα πάσχουν από χρόνια λοίμωξη με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κίρρωσης του ήπατος ή ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Εκτιμάται επίσης, ότι κάθε χρόνο συμβαίνουν 3-4 εκατομμύρια νέες μολύνσεις και καταγράφονται 350,000 θάνατοι που σχετίζονται με τον ιό (WHO, 2014).

1.1 Επιδημιολογία

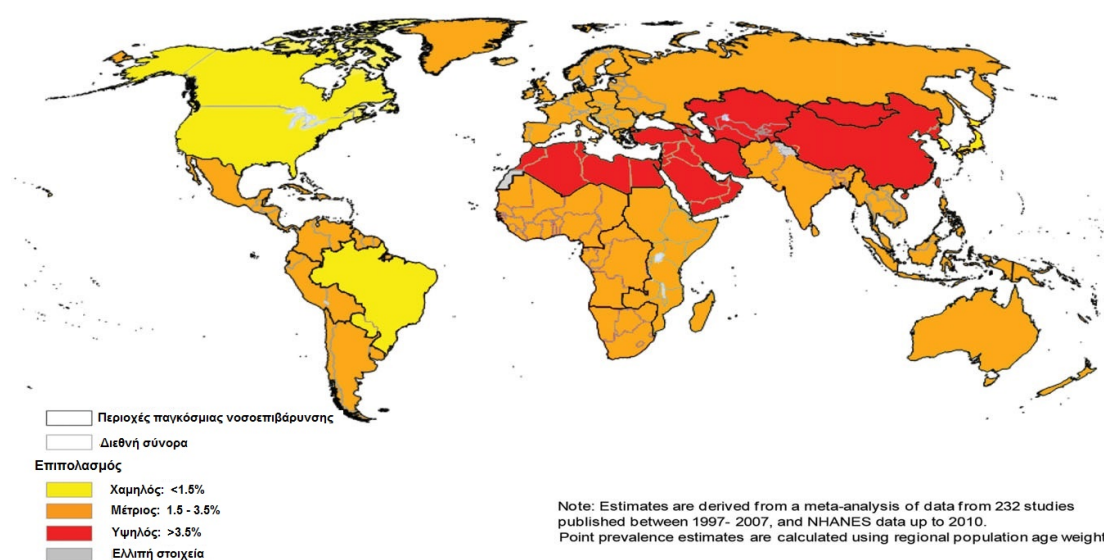
Ο επιπολασμός της ηπατίτιδας C διαφέρει ανά τον κόσμο (Πίνακας 1, Εικόνα 1) και τα μεγαλύτερα ποσοστά σημειώνονται σε χώρες της Κεντρικής και Ανατολικής Ασίας, της Βόρειας Αφρικής και της Μέσης Ανατολής. Εξαιτίας των μεγάλων ασιατικών πληθυσμών, υπολογίζεται ότι οι περιοχές της Νότιας και Ανατολικής Ασίας έχουν το μεγαλύτερο αριθμό ατόμων με χρόνια λοίμωξη.

Πίνακας 1 Παγκόσμιος επιπολασμός του HCV ανά περιοχή (WHO, 2014)

Περιοχή	Επιπολασμός (%)	Εκτιμώμενος αριθμός λοιμώξεων
Ασία Ειρηνικού	1.4	>2.4 εκατομμύρια
Κεντρική Ασία	3.8	>2.9 εκατομμύρια
Ανατολική Ασία	3.7	>50 εκατομμύρια
Νότια Ασία	3.7	>50 εκατομμύρια
Νοτιοανατολική Ασία	2.0	>11 εκατομμύρια
Αυστραλασία	2.7	>0.6 εκατομμύρια
Καραϊβική	2.1	>0.7 εκατομμύρια

Κεντρική Ευρώπη	2.4	>2.9 εκατομμύρια
Ανατολική Ευρώπη	2.9	>6.2 εκατομμύρια
Δυτική Ευρώπη	2.4	>10 εκατομμύρια
Λατινική Αμερική-Ζώνη των Άνδεων	2.0	>1.0 εκατομμύρια
Κεντρική Λατινική Αμερική	1.6	>3.4 εκατομμύρια
Νότια Λατινική Αμερική	1.6	>0.9 εκατομμύρια
Τροπική Λατινική Αμερική	1.2	>2.3 εκατομμύρια
Βόρεια Αφρική/Μέση Ανατολή	3.6	>15 εκατομμύρια
Βόρεια Αμερική	1.3	>4.4 εκατομμύρια
Ωκεανία	2.6	>0.2 εκατομμύρια
Κεντρική Υποσαχάρια Αφρική	2.3	>1.9 εκατομμύρια
Ανατολική Υποσαχάρια Αφρική	2.0	>6.1 εκατομμύρια
Νότια Υποσαχάρια Αφρική	2.1	>1.4 εκατομμύρια
Δυτική Υποσαχάρια Αφρική	2.8	>8.4 εκατομμύρια

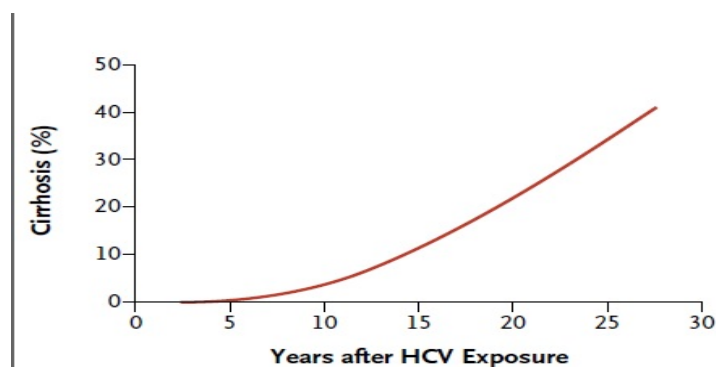
Οροθετικότητα αντισώματος έναντι HCV ανά περιοχή, 2005



Εικόνα 1. Χάρτης εκτιμώμενου επιπολασμού της οροθετικότητας του αντισώματος έναντι HCV (αντι-HCV) ανά περιοχή παγκόσμιας νοσοεπιβάρυνσης, 2005 (Mohd Hanafiah, Groeger, Flaxman, & Wiersma, 2013)

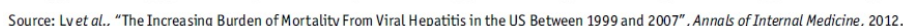
Παρά τον υψηλό επιπολασμό της νόσου, οι περισσότεροι πάσχοντες από χρόνια ηπατίτιδα C παραμένουν αδιάγνωστοι καθώς η νόσος συνήθως διατρέχει ασυμπτωματικά. Το γεγονός αυτό καθώς και η ελλιπής πρόσβαση στα διαγνωστικά τεστ συνέβαλαν στη συνεχιζόμενη εξάπλωση της λοίμωξης καθιστώντας τη μια παγκόσμια σιωπηλή επιδημία.

Η νοσηρότητα και η θνητότητα της ηπατίτιδας C είναι υψηλή παρά τη βραδεία εξέλιξη της ασθένειας. Αποτελεί το 20% όλων των περιπτώσεων οξείας ηπατίτιδας στις Η.Π.Α. και 55-85% των περιπτώσεων αυτών μεταπίπτει σε χρόνια λοίμωξη (WHO, 2014). Η πιθανότητα ανάπτυξης κίρρωσης ήπατος έχει υπολογιστεί 20 χρόνια μετά τη λοίμωξη στο 15-30% και 1-5% θα καταλήξει λόγω της συγκεκριμένης ιϊκής λοίμωξης (Rosen, 2011) (Εικόνα 2). Είναι η πρώτη αιτία ηπατοκυτταρικού καρκίνου καθώς αναπτύσσεται στο 11-19% των ασθενών και αποτελεί την πρώτη αιτία μεταμόσχευσης ήπατος. Σύμφωνα με το Κέντρο Πρόληψης Νοσημάτων των Η.Π.Α. (Centers for Disease Control and Prevention- CDC) οι θάνατοι σχετιζόμενοι με ηπατίτιδα C ξεπέρασαν αυτούς από HIV λοίμωξη (Θνησιμότητα για τα έτη 2004-2007: 4.7 θάνατοι / 100.000 πληθυσμό / έτος) και φαίνεται να έχουν αυξητική τάση με βάση τα επιδημιολογικά δεδομένα (Centers for Disease Control and Prevention., 2012) (Εικόνα 3). Σχετικά με την ηλικιακή κατανομή των πασχόντων από HCV, φαίνεται ότι υπάρχει μια αυξητική τάση σε συνάρτηση με την ηλικία. Οι ηλικίες 45-65 ετών παρουσιάζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά λοίμωξης. Στις μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες ο επιπολασμός βαίνει μειούμενος ή σταθεροποιείται. Την μέγιστη συχνότητα στις συγκεκριμένες ηλικίες στις χώρες του Δυτικού κόσμου επεξηγεί η αλματώδης εμφάνιση και διάδοση της χρήσης ενδοφλέβιων ναρκωτικών στη δεκαετία του '70. Στις υπόλοιπες χώρες πιθανολογείται ότι κάποια άλλη όχι και τόσο καλά αναγνωρισμένη επίδραση κοορτής συμβάλει στο μέγιστο της κατανομής (Mohd Hanafiah et al., 2013) (Εικόνα 4).

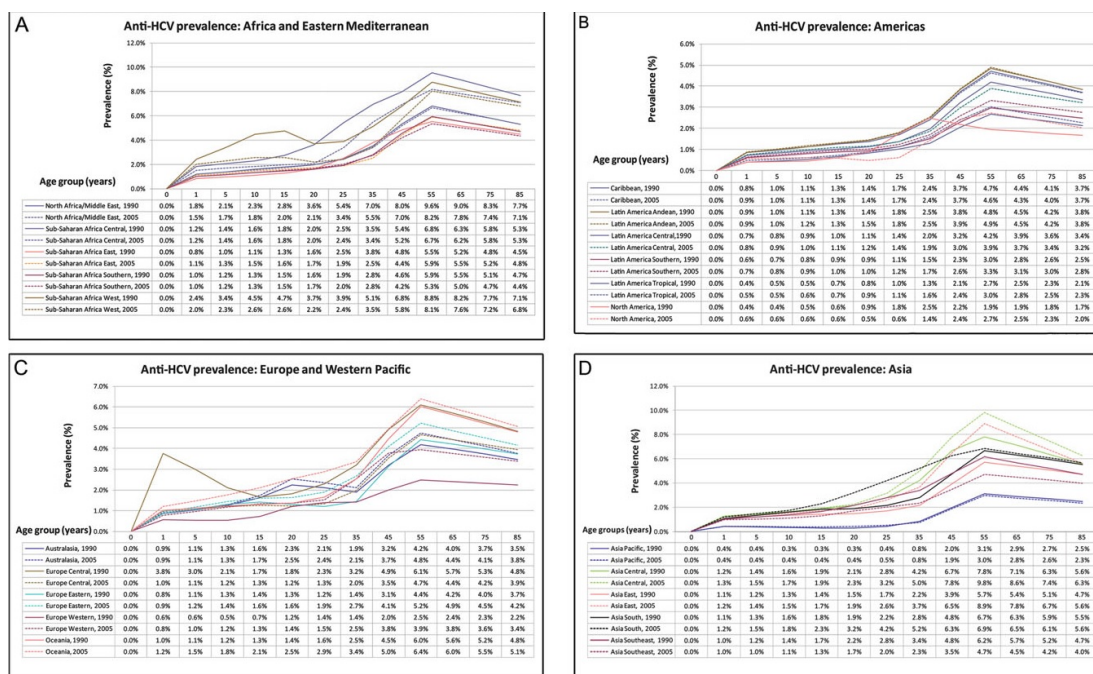


Εικόνα 2. Αθροιστικά ποσοστά κίρρωσης με βάση τα έτη έκθεσης στον HCV (Rosen, 2011).

(incidence per 100,000 people)



1997-2007 (Ly et al., 2012)



Εικόνα 4. Γράφημα και πίνακας επιπολασμού του αντισώματος έναντι του HCV ανά ηλικιακή ομάδα και περιοχή WHO για τα έτη 1990-2005 σε Α. Αφρική και Ανατολική Μεσόγειο, Β. Αμερική, Γ. Ευρώπη και χώρες του Δυτικού Ειρηνικού, Δ. Ασία.

1.2 Τρόποι μετάδοσης

Ο HCV προσβάλλει μόνο τον άνθρωπο και η μετάδοσή του γίνεται παρεντερικά και σπανιότερα μέσω σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη. Συνεπώς, η βασικότερη οδός μετάδοσης του HCV είναι η διαδερμική έκθεση σε μολυσμένο αίμα ή προϊόντα αίματος. Άλλοι τρόποι είναι η κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο νεογνό και η κοινή χρήση μολυσμένων συσκευών για ενδορρινικά ναρκωτικά. Η σεξουαλική επαφή μεταξύ ετεροφυλόφιλων αποτελεί σπάνια οδό μετάδοσης. Εξαίρεση αποτελεί η ομοφυλοφιλική επαφή χωρίς προφύλαξη μεταξύ αντρών μολυσμένων με HIV. Οι ομοφυλόφιλοι άντρες οροθετικοί για HIV αντιμετωπίζουν 4.1 φορές υψηλότερο κίνδυνο HCV λοίμωξης σε σχέση με τους ομοφυλόφιλους άντρες αρνητικούς για HIV (σταθμισμένη συχνότητα μετάδοσης: 6.08/1000 άτομα-χρόνια Vs 1.48/1000 άτομα-χρόνια) (Yaphe et al., 2012). Ορισμένες πληθυσμιακές ομάδες χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου για HCV λοίμωξη (Πίνακας 2). Παρόλα αυτά, η σημασία του κάθε παράγοντα κινδύνου διαφέρει από περιοχή σε περιοχή και εξαρτάται από γεωγραφικές και πληθυσμιακές παραμέτρους.

Πίνακας 2 Ομάδες υψηλού κινδύνου για HCV λοίμωξη (WHO, 2014)

Πληθυσμός	Σχόλια
Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών	Τα άτομα που εγχύουν ναρκωτικές ουσίες ενδοφλεβίως ή με άλλη διαδερμική τεχνική διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο λοίμωξης. Ο επιπολασμός της νόσου στην ομάδα αυτή παγκοσμίως αγγίζει το 67%.
Δέκτες μεταγγίσεων μολυσμένου αίματος ή προϊόντων του	Ο κίνδυνος εξαρτάται από τη συχνότητα των μεταγγίσεων καθώς και το επίπεδο των μέτρων ασφαλείας στην αντίστοιχη μονάδα παροχής υγείας.
Άτομα στα οποία έγιναν επεμβατικές πράξεις σε μονάδες υγείας με ανεπαρκή μέτρα προφύλαξης	Ο κίνδυνος εξαρτάται από τη συχνότητα των επεμβατικών πράξεων (π.χ. ενέσεις, αιμοκάθαρση) καθώς και το επίπεδο των μέτρων ασφαλείας στην αντίστοιχη μονάδα παροχής υγείας. Η μεγάλη συχνότητα ενέσεων και το χαμηλό επίπεδο μέτρων ελέγχου μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλό επιπολασμό του HCV και στο γενικό πληθυσμό.
Παιδιά που γεννήθηκαν από μητέρες με HCV λοίμωξη	Ο κίνδυνος μετάδοσης του HCV εκτιμάται στο 4-8% όταν δεν υπάρχει HIV συλλοίμωξη στη

	μητέρα, ενώ φτάνει το 17-25% στις μητέρες με HIV συλλοίμωξη.
Άτομα με σεξουαλικό σύντροφο μολυσμένο με HCV	Υπάρχει χαμηλός έως μηδενικός κίνδυνος μετάδοσης μεταξύ ετεροφυλόφιλων ή ομοφυλόφιλων ζευγαριών χωρίς HIV συλλοίμωξη. Ο κίνδυνος μετάδοσης συνδέεται ισχυρά με προϋπάρχουσα HIV λοίμωξη
Άτομα με HIV λοίμωξη	Τα άτομα με HIV λοίμωξη και ιδιαίτερα οι ομοφυλόφιλοι άντρες αντιμετωπίζουν αυξημένο κίνδυνο μετάδοσης του HCV μέσω σεξουαλικής επαφής χωρίς προφύλαξη.
Άτομα που κάνουν ενδορρινική χρήση ναρκωτικών (π.χ. κοκαΐνη)	Ο κίνδυνος προέρχεται από κοινή χρήση μολυσμένων συσκευών εισπνοής
Άτομα με τατουάζ ή διακοσμητικά τρυπήματα (piercing)	Ο επιπολασμός του HCV στα άτομα με τατουάζ είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τα άτομα χωρίς τατουάζ (odds ratio = 2.24, 95% ΔΕ (2.01,2.50)
Άτομα που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση σε τακτική βάση	Ο Αμερικανικός Οργανισμός Έρευνας για Νόσους του Ήπατος (American Association for the Study of Liver Disease) συστήνει περιοδικό προληπτικό έλεγχο για το αντίσωμα έναντι HCV.

Στις δυτικές κοινωνίες οι περισσότερες νέες λοιμώξεις παρουσιάζονται στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών. Η αυξημένη επίπτωση της HCV λοίμωξης στη συγκεκριμένη ομάδα κινδύνου οφείλεται στην κοινή χρήση συριγγών που έχουν μιανθεί από τον ιό. Με τον ίδιο τρόπο γίνεται η μετάδοση του ιού και στους χρήστες ενδορρινικών ναρκωτικών όπου χρησιμοποιούνται κοινές συσκευές εισπνοής.

Οι μεταγγίσσεις μολυσμένου αίματος ή προϊόντων του αποτελούσαν κάποτε τη βασικότερη πηγή μετάδοσης του HCV. Παρόλα αυτά, από το 1992 καθιερώθηκε ο υποχρεωτικός έλεγχος του αίματος των αιμοδοτών και ο κίνδυνος μετάδοσης περιορίστηκε σημαντικά (1 / 103,000 μεταγγιζόμενες μονάδες). Με την εισαγωγή και χρήση των πιο ευαίσθητων μοριακών τεχνικών όπως η PCR που αποτελεί κανόνα πλέον στις αιμοδοσίες των αναπτυγμένων χωρών η πιθανότητα μετάδοσης HCV από μετάγγιση έχει ελαττωθεί σε 0.52 / 10⁶ μεταγγιζόμενες μονάδες (Prati, 2006). Για το λόγο αυτό, όλα τα άτομα που μεταγγίστηκαν με αίμα ή προϊόντα του πριν τη χρονολογία όπου ξεκίνησε ο υποχρεωτικός έλεγχος του αίματος για τον HVC θεωρούνται ομάδα υψηλού

κινδύνου. Σημειώνεται ότι υπάρχει ένας ελάχιστος υπολειπόμενος κίνδυνος μετάδοσης παρά την εξέλιξη της ιατρικής τεχνολογίας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο αιμοδότης μπορεί να βρίσκεται στην «περίοδο παραθύρου» της λοίμωξης, δηλαδή στο χρόνο που μεσολαβεί από τη μόλυνση από τον HCV μέχρι τη στιγμή που μπορεί να ανιχνευθεί με τις εφαρμοζόμενες τεχνικές. Ο χρόνος αυτός για τον HCV έχει υπολογιστεί στις 2-4 εβδομάδες με τη χρήση της PCR (Centers for Disease Control and Prevention., 2014). Επίσης, άλλη αιτία είναι να έχει γίνει κάποιο εργαστηριακό λάθος το οποίο οφείλεται είτε σε ανθρώπινο παράγοντα ή σε σφάλμα του μηχανήματος. Στην Ελλάδα ο μοριακός έλεγχος με PCR για την ανίχνευση του HCV εφαρμόζεται από το 2003 (Varaklioti A., 2008).

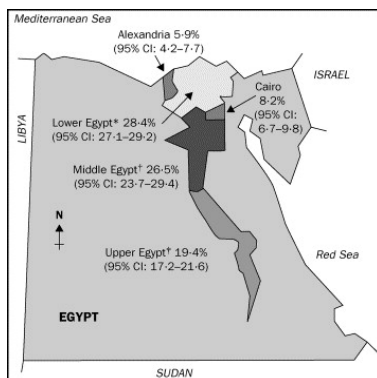
Σύμφωνα με έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για την ασφάλεια του αίματος, 39 χώρες εξακολουθούν να μην ελέγχουν το αίμα που προορίζεται για μετάγγιση ως διαδικασία ρουτίνας (WHO, 2011). Σε αυτό έρχεται να προστεθεί το γεγονός ότι περίπου 8-12 δισεκατομμύρια διαδερμικές ενέσεις πραγματοποιούνται κάθε χρόνο ανά τον κόσμο στα πλαίσια ιατρικών πράξεων και το 50% έχει υπολογιστεί ότι γίνεται με μη ασφαλή τρόπο κυρίως στις χώρες της υποσαχάριας Αφρικής και της Ασίας (WHO, 2010). Το πιο καλά καταγεγραμμένο παράδειγμα εξάπλωσης του HCV εξαιτίας μη ασφαλούς τεχνικής που αφορά τις ενέσεις υπάρχει στην Αίγυπτο τις δεκαετίες '50 έως '80. Για την καταπολέμηση μιας ενδημικής νόσου, της σχιστοσωμιάσης, χρησιμοποιήθηκαν ενέσεις φαρμάκου με σύριγγες πολλαπλής χρήσης με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μία τεράστια δεξαμενή HCV στη χώρα. Ο επίσημα καταγεγραμμένος επιπολασμός του HCV το 2008 ήταν 9.8% και σε ορισμένες αγροτικές περιοχές της χώρας έφτασε μέχρι και το 25% (Strickland, 2006) (Εικόνα 5).

Άλλες πιο σπάνιες αιτίες μετάδοσης της νόσου αφορούν σε επαγγελματίες υγείας κατόπιν επαγγελματικής έκθεσης αυτών. Η πιθανότητα HCV μόλυνσης μετά από τρύπημα από μιασμένη βελόνα ή άλλο αιχμηρό αντικείμενο είναι 1.8% (Centers for Disease Control and Prevention., 2014). Έχει καταγραφεί ιατρογενής μετάδοση μέσω ανεπαρκώς απολυμασμένου κολονοσκοπίου (Saludes et al, 2013), αιμοκάθαρσης και χειρουργείου μεταμόσχευσης οργάνου (Ison et al., 2009).

Ο HCV δε μεταδίδεται με τις συνήθεις επαφές εντός του νοικοκυριού ούτε με το σάλιο. Σε ένα ποσοστό 10-40% των ατόμων που μολύνθηκαν από HCV δεν αναγνωρίζεται κανένας από τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου (American Association for the Study of Liver Diseases, 2014a).

Στις Η.Π.Α. το 2012 εκδόθηκαν κατευθυντήριες οδηγίες από το CDC όπου συστήνεται ο προληπτικός έλεγχος για HCV τουλάχιστον μία φορά σε άτομα που γεννήθηκαν κατά τα έτη 1945-1965 ασχέτως των υπόλοιπων παραγόντων κινδύνου. Η συγκεκριμένη ηλικιακή κοορτή θεωρείται πλέον ξεχωριστός παράγοντας κινδύνου εξαιτίας του γεγονότος ότι αντιπροσωπεύει τα 3 / 4 όλων των μολύνσεων στις Η.Π.Α με πενταπλάσιο επιπολασμό σε σύγκριση με τις υπόλοιπες. Επιπλέον,

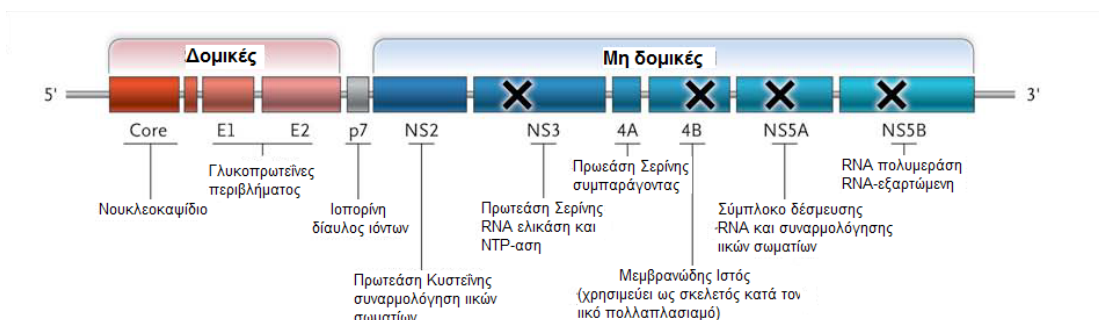
οι προϋπάρχουσες οδηγίες οι οποίες σύστηναν έλεγχο με βάση τους ήδη γνωστούς παράγοντες κινδύνου απέτυχαν να αναγνωρίσουν πάνω από το 50% των μολύνσεων από HCV (Centers for Disease Control and Prevention., 2012).



Εικόνα 5. Επιπολασμός HCV ανά περιοχή της Αιγύπτου (Frank et al., 2000).

1.3 Παθοφυσιολογία

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) είναι ένας σφαιρικός μονόκλωνος RNA ιός με περίβλημα θετικής πολικότητας με 9,600 νουκλεοτίδια περίπου. Ανήκει στην οικογένεια των Flaviviridae και στο γένος *Hepacivirus*. Κωδικοποιεί μία πολυπρωτεϊνική αλυσίδα 3,000 αμινοξέων (Εικόνα 6). Τα κύτταρα-στόχοι του ιού είναι τα ηπατοκύτταρα και πιθανόν τα Β λεμφοκύτταρα. Η κάθαρση από τον ιό εξαρτάται από την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και οφείλεται στη δράση των Τ-βοηθητικών CD4⁺ κυττάρων και των Τ-κυτταροτοξικών CD8⁺ κυττάρων. Μετά την προσβολή η ιαίμια παραμένει στα 3 / 4 των ατόμων που μολύνονται και προκαλεί διαφορετικούς βαθμούς φλεγμονής και ίνωσης. Σε άτομα με χρόνια ηπατίτιδα C μπορεί να έχει προσβληθεί μέχρι και το 50% των κυττάρων του ήπατος (Rosen, 2011).



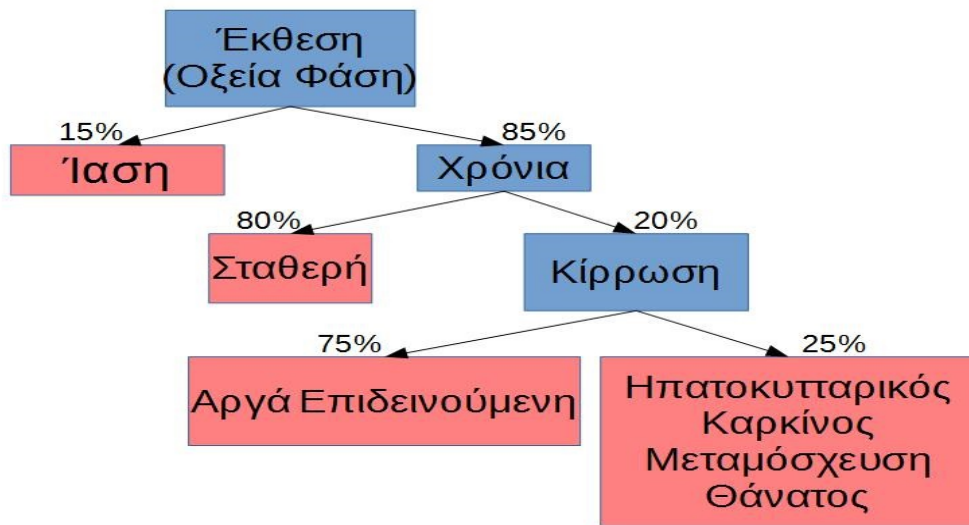
Εικόνα 6. Γονιδίωμα του HCV. Από τη διάσπαση της πολυπρωτεΐνης από πρωτεάσες του ιού ή των κυττάρων του ξενιστή προκύπτουν οι δομικές πρωτεΐνες (core και πρωτεΐνες περιβλήματος E1 και E2) και οι μη δομικές πρωτεΐνες (NS2 έως NS5B) που θεωρείται ότι επιτελούν μία σειρά από λειτουργίες. Οι στόχοι των φαρμάκων σημειώνονται με X.

Η RNA-εξαρτώμενη RNA-πολυμεράση είναι ένα βασικό ένζυμο για τον ιικό πολλαπλασιασμό. Δεν έχει δυνατότητες επιδιόρθωσης του RNA που αντιγράφει και παράγει ένα μεγάλο αριθμό μεταλλαγμένων ιών (quasispecies) με γενετική ετερογένεια 1-2%. Οι νέοι αυτοί ιοί δυσκολεύουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή στον ιό και την κάθαρση από αυτόν και ίσως να επεξηγούν την ετερογενή κλινική εικόνα και πορεία της HCV λοίμωξης και πιθανόν την αδυναμία ανάπτυξης αποτελεσματικού εμβολίου.

1.4 Κλινική Εικόνα

Οι περισσότεροι ασθενείς με οξεία ή χρόνια λοίμωξη είναι ασυμπτωματικοί ή έχουν ήπια μη ειδικά συμπτώματα όπως κόπωση ή κακουχία. Στο 15-30% των ατόμων που θα μολυνθούν, η λοίμωξη αυτοπεριορίζεται. Συμπτώματα από οξεία HCV λοίμωξη εμφανίζει κάτω από το 30% των ασθενών σε διάστημα 2-26 εβδομάδων από τη μόλυνση με μέσο χρόνο εμφάνισης συμπτωμάτων τις 6-7 εβδομάδες (Marcellin, 1999). Αυτά περιλαμβάνουν την τυπική κλινική εικόνα της οξείας ηπατίτιδας: πυρετός, ναυτία, ανορεξία, μυαλγίες, αρθραλγίες, κοιλιακό άλγος, κνησμός, καταβολή, ίκτερος, υπέρχρωση ούρων. Τρεις στους τέσσερις ασθενείς με οξεία λοίμωξη θα αναπτύξουν χρόνια ηπατίτιδα C. Τα αρχικά συμπτώματα της χρόνιας ηπατίτιδας είναι συνήθως εξωηπατικά και περιλαμβάνουν εκδηλώσεις από τους νεφρούς, το δέρμα, τα μάτια, τις αρθρώσεις, το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα. Αναφέρονται οι πιο συχνές: βραδεία δερματική πορφυρία, λεύκη, ομαλός λειχήνας, κρυοσφαιριναιμία, ξηροστομία / ξηροφθαλμία, αισθητική νευροπάθεια (Cacoub et al., 1999). Δεκαπέντε έως 30% των ασθενών θα εμφανίσει κίρρωση ήπατος εντός 30 ετών, μία μη αναστρέψιμη, διάχυτη διαταραχή στην αρχιτεκτονική του ήπατος που χαρακτηρίζεται από ίνωση και δυσλειτουργία του ήπατος. Στους ασθενείς με κίρρωση ο ρυθμός εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκίνου κάθε χρόνο είναι 1-4%. Παράγοντες κινδύνου που συσχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα ηπατοκυτταρικού καρκίνου είναι συνυπάρχουσα λοίμωξη από HIV ή HBV, κατανάλωση αλκοόλ, ηλικία λοίμωξης >40έτη (Εικόνα 7).

Κλινική Πορεία ΗCV λοίμωξης



Εικόνα 7. Φυσική ιστορία της λοίμωξης από HCV. Παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα κίρρωσης είναι η διάρκεια λοίμωξης, η λοίμωξη σε ηλικία >40 ετών, το ανδρικό φύλο, η συλλοίμωξη με HBV ή HIV και η κατανάλωση αλκοόλ (>50 gr/ημέρα) (Seeff, 1997)

1.5 Διάγνωση

Η διάγνωση της χρόνιας HCV λοίμωξης τίθεται με την παρουσία θετικών αντισωμάτων έναντι του HCV (αντι-HCV). Με τις ανοσοενζυμικές μεθόδους δεύτερης και τρίτης γενιάς (ELISA) η ευαισθησία και η ειδικότητα του τεστ είναι άνω του 99% (CDC-MMWR, 2003). Επί θετικών αποτελεσμάτων χρειάζεται επιβεβαίωση με τη μοριακή τεχνική HCV-RNA PCR (100% ευαισθησία και ειδικότητα). Ορισμένες φορές ο έλεγχος με HCV RNA πραγματοποιείται και σε άτομα με αρνητικά αντισώματα όταν είναι ανοσοκατεσταλμένα (π.χ. αιμοκαθαιρόμενα άτομα) ή με πρόσφατη έκθεση στον ιό οπότε δεν πρόλαβαν να αναπτύξουν αντισώματα. Επισημαίνεται ότι μία μόνο αρνητική εξέταση για HCV RNA ορού δεν αποκλείει την HCV λοίμωξη σε άτομα με κλινικοεργαστηριακές ενδείξεις πιθανής HCV λοίμωξης και χρειάζεται επανεξέταση για αποκλεισμό παροδικά πολύ χαμηλών επιπέδων HCV ιαιμίας (Παπαθεοδωρίδης et al, 2012). Επίσης, άτομα που νόσησαν από τον ιό, αλλά τον απέβαλαν και δε μετέπεσαν σε χρόνια λοίμωξη έχουν θετικά αντισώματα και αρνητική PCR.

Όταν τεθεί η διάγνωση θα πρέπει να ακολουθήσει ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων HCV RNA με τη μέθοδο της real-time PCR και προσδιορισμός του HCV γονοτύπου. Η τελευταία εξέταση έχει προβλεπτική αξία όσον αφορά την πιθανότητα ανταπόκρισης στη θεραπεία. Οι γονότυποι 2 και 3 αποτελούν ευνοϊκούς παράγοντες για μακροχρόνια ιολογική ανταπόκριση και επηρεάζουν καθοριστικά τη συνιστώμενη θεραπευτική αγωγή (Παπαθεοδωρίδης et al., 2012). Η ποσοτική PCR είναι αναγκαία για την καταγραφή του αρχικού επιπέδου ιαιμίας και την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία (American Association for the Study of Liver Diseases, 2014b).

Άλλες απαραίτητες εξετάσεις μετά τη διάγνωση της χρόνιας HCV λοίμωξης είναι ο έλεγχος για συνυπάρχουσα ηπατίτιδα Β, ηπατίτιδα Α και HIV λόγω παρόμοιων τρόπων μετάδοσης (HBV, HIV). Επίσης, η παρουσία συλλοίμωξης από τους παραπάνω ιούς σηματοδοτεί χειρότερη πρόγνωση και τροποποιεί τη θεραπευτική αγωγή (Hernandez & Sherman, 2011), (American Association for the Study of Liver Diseases, 2014). Εφόσον ο ορολογικός έλεγχος για τις υπόλοιπες ηπατίτιδες είναι αρνητικός, συνιστάται ο εμβολιασμός για τους παραπάνω ιούς, αν δεν υπάρχει ανοσία.

Η βιοψία ήπατος παραμένει η εξέταση αναφοράς για την εκτίμηση της ιστολογικής βλάβης του ήπατος και σταδιοποίησης της νόσου. Παρέχει αντικειμενικές και ημι-ποσοτικές πληροφορίες που αφορούν την ποσότητα και το είδος της εναπόθεσης κολλαγόνου ή ουλώδους ιστού. Ανάλογα με

το σκορ ίνωσης του ήπατος εξαρτάται η απόφαση για θεραπευτική παρέμβαση. Παρόλα αυτά, η εξέταση έχει κάποια μικρή αλλά υπαρκτή πιθανότητα επιπλοκών και δεν είναι επιθυμητή από τους ασθενείς σε επαναληπτική βάση (European Association for the Study of the Liver, 2014).

Εναλλακτικά, άλλες μη παρεμβατικές εξετάσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν με εξίσου καλή προβλεπτική αξία όπως ελαστογραφία και αιματολογικοί βιοδείκτες (τρανσαμινάσες, χρόνος πήξης, αλβουμίνη, χολερυθρίνη, γενική αίματος, ο δείκτης ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης / άνω όριο φυσιολογικής αμινοτρανσφεράσης προς αριθμό αιμοπεταλίων: APRI), (Παπαθεοδωρίδης et al, 2012). Απεικονιστικές εξετάσεις όπως το υπερηχογράφημα ήπατος σπληνός μπορούν να προσδιορίσουν την ύπαρξη κίρρωσης ή ασυμπτωματικής πυλαίας υπέρτασης (Chou & Wasson, 2013). Ο συνδυασμός της ελαστογραφίας και των παραπάνω βιοδεικτών μπορεί να βελτιώσει την ακρίβεια στη σταδιοποίηση της ηπατικής ίνωσης και να μειώσει την ανάγκη για βιοψία ήπατος μόνο σε περιπτώσεις όπου υπάρχει αβεβαιότητα ή άλλες πιθανές επιπρόσθετες αιτίες ίνωσης (European Association for the Study of the Liver, 2014).

1.6 Θεραπευτική Προσέγγιση

Ανεξαρτήτως της ανάγκης για θεραπευτική παρέμβαση οι ασθενείς με χρόνια HCV λοίμωξη πρέπει να αποφεύγουν την κατανάλωση οινοπνεύματος και να προσέχουν το σωματικό τους βάρος (αποφυγή παχυσαρκίας). Κατά αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η περαιτέρω βλάβη στο ήπαρ.

Κύριος στόχος της θεραπευτικής παρέμβασης είναι η επίτευξη μακροχρόνιας ιολογικής ανταπόκρισης (Sustained Virologic Response – SVR), δηλαδή η απουσία ανιχνεύσιμου HCV RNA στον ορό με χρήση ευαίσθητης μεθοδολογίας ποιοτικού ή ποσοτικού προσδιορισμού με όριο ανίχνευσης ≤ 15 IU/ml στις 12 εβδομάδες και στις 24 εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας (European Association for the Study of the Liver, 2014). Η εξάλειψη του ιού επιφέρει σημαντική ιστολογική βελτίωση ως προς τη νεκροφλεγμονώδη δραστηριότητα και την ίνωση του ήπατος, αναστέλλει την εξέλιξη της ηπατικής νόσου, ελαττώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου και βελτιώνει την επιβίωση των ασθενών.

Η θεραπεία συνιστάται σε συνδυασμό αντιικών φαρμάκων τα οποία είναι:

- πεγκυλιωμένες ιντερφερόνες: PEG-IFN α -2a, PEG-IFN α -2b
- ριμπαβιρίνη
- αναστολείς πρωτεάσης: boceprevir, telaprevir, simeprevir
- daclatasvir: αναστολέας του συμπλόκου αντιγραφής HCV-NS5A
- sofosbuvir: νουκλεοτιδικό ανάλογο αναστολέας της RNA πολυμεράσης

Τα χορηγούμενα θεραπευτικά σχήματα που συστήνονται εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως ο γονότυπος του ιού, προηγηθείσα θεραπεία για HCV, αντένδειξη λήψης ιντερφερόνης ή άλλου αντιικού φαρμάκου, η ανίχνευση στελέχους με τον πολυμορφισμό Q80K. Η ύπαρξη του γονοτύπου 1 σηματοδοτεί πτωχή ανταπόκριση στο κλασσικό διπλό σχήμα ιντερφερόνης και ριμπαβιρίνης και απαιτεί προσθήκη ενός αναστολέα πρωτεάσης ή αναστολέα της RNA-πολυμεράσης για την επίτευξη μακροχρόνιας ιολογικής ανταπόκρισης (American Association for the Study of Liver, 2014; European Association for the Study of the Liver, 2014). Η παρουσία του πολυμορφισμού Q80K στην NS3 περιοχή του υπότυπου 1a φαίνεται ότι συνεπάγεται μειωμένο ποσοστό μακροχρόνιας ιολογικής ανταπόκρισης. Η διάρκειά της θεραπείας κυμαίνεται από 12-24 εβδομάδες.

Η συμμόρφωση των ασθενών στη θεραπεία είναι σημαντικός παράγοντας για επίτευξη μακροχρόνιας ιολογικής ανταπόκρισης. Η συζήτηση με τον θεράποντα ιατρό για τη σημασία της συμμόρφωσης και τις ανεπιθύμητες ενέργειες της θεραπείας, η αξιολόγηση των ψυχιατρικών

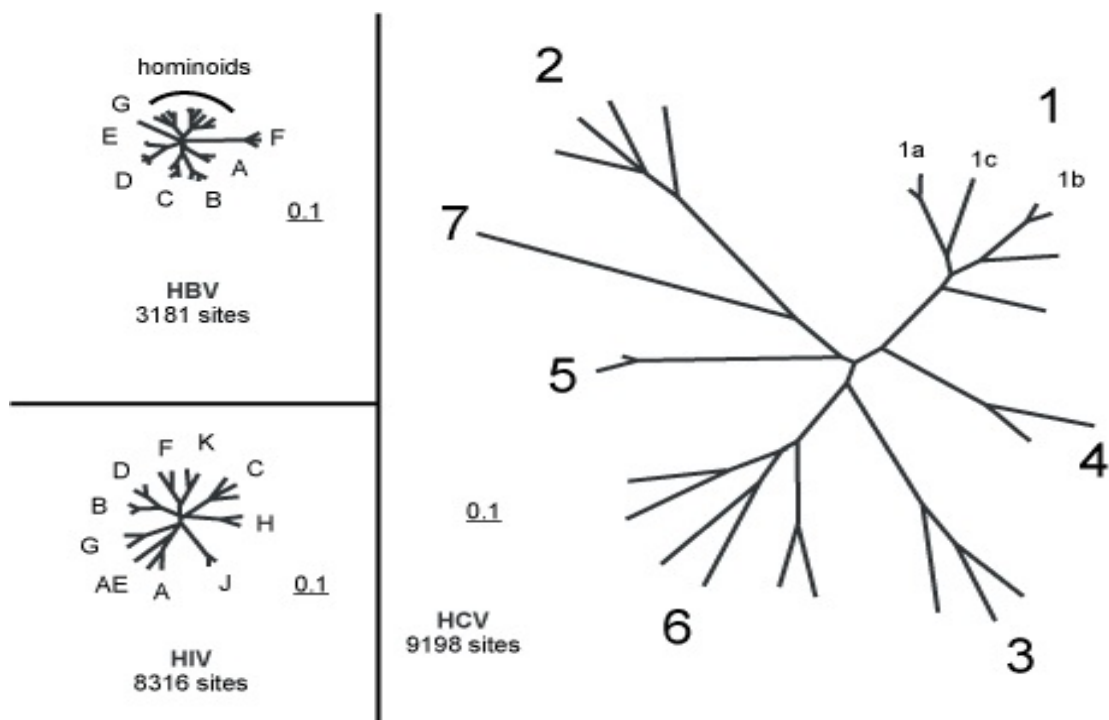
παραμέτρων (κατάθλιψη) καθώς και η αντιμετώπιση τυχόν χρήσης τοξικών ουσιών ή αλκοόλ θεωρούνται αναπόσπαστες πλευρές της επιτυχίας της θεραπευτικής παρέμβασης (American Association for the Study of Liver Diseases, 2014b)

2. Ταξινόμηση του Ιού της Ηπατίτιδας C

Ο HCV ταξινομείται σε επτά διακριτούς γονότυπους (1-7), οι οποίοι με τη σειρά τους διαιρούνται σε υπότυπους (a,b,c...) με βάση τη φυλογενετική ανάλυση της NS5B περιοχής του γονιδιώματος του ιού (Πίνακας 3, Εικόνα 8). Ο κάθε γονότυπος είναι γενετικά ετερογενής σε σύγκριση με τους υπόλοιπους κατά 31-34% ως προς τη νουκλεοτιδική αλληλουχία και κατά 30% ως προς την πολυπεπτιδική αλυσίδα (Simmonds, 2001). Μεταξύ των υπότυπων του ίδιου γονότυπου η γενετική απόκλιση είναι 25% περίπου (P. Simmonds et al., 1993) (Εικόνα 9).

Πίνακας 3 Επιβεβαιωμένοι HCV γονότυποι / υπότυποι (Smith et al., 2014)

Genotype*	Locus/Isolate(s) ¹	Accession number(s)	Reference(s)	Genotype*	Locus/Isolate(s) ¹	Accession number(s)	Reference(s)
Genotype 1				Genotype 5			
1a	HPCPLYPRE, HPCCGAA	M62321, M67463	29,30	5a	EUH1480, SA13 [§]	Y13184, AF064490	53,54
1b	HPCJCG, HPCCHUMR	D90208, M58335	31,32	Genotype 6			
1c	HPCCGS, AY051292	D14853, AY051292	33	6a	EUHK2, 6a33	Y12083, AY859526	55,56
1e	148636	KC248194	9	6b	Th580	D84262	57
1g	1804	AM910652	34	6c	Th846	EF424629	58
1h	EBW443, EBW9	KC248198, KC248199	9	6d	VN235	D84263	57
1i	136142, EBW424	KC248193, KC248197	9	6e	GX004	DQ314805	59
Genotype 2				6f	C-0044	DQ835760	60
2a	HPCPOLP, JFH-1	D00944, AB047639	35,36	6g	HPCJK046E2	D63822	47
2b	HPCJ8G, JPUT971017	D10988, AB030907	37,38	6h	VN004	D84265	57
2c	BEBE1	D50409	39	6i	Th602	DQ835770	60
2d	QC259	JF735114	40	6j	Th553	DQ835769	60
2e	QC64	JF735120	40	6k	VN405	D84264	57
2i	D54	DQ155561	41	6l	537796	EF424628	58
2j	C1799, QC232	HM777358 JF735113	6,40	6m	B4/92	DQ835767	60
2k	VAT96	AB031663	42	6n	KM42, D86/93	DQ278894, DQ835768	17,60
2m	QC178, BID-G1314	JF735111, JX227967	40,8	6o	QC227	EF424627	58
2q	963, 852	FN666428, FN666429	43	6p	QC216	EF424626	58
2r	QC283	JF735115	40	6q	QC99	EF424625	58
Genotype 3				6r	QC245	EU408328	61
3a	HPCEGS, HPCK3A	D17763, D28917	44,45	6s	QC66	EU408329	61
3b	HPCFG	D49374	46	6t	VT21, D49	EF632071, EU246939	62,19
3g	BID-G1243, QC260	JX227954, JF735123	8,21	6u	D83	EU246940	19
3h	QC29	JF735121	21	6v	NK46, KMN-02	EU158186, EU798760	62,63
3i	IND-HCV, BID-G1244	FJ407092, JX227955	8	6w	GZ52557, D140	DQ278892, EU643834	17,64
3k	HPCJK049E1, QC105	D63821, JF735122	47,21	6xa	DH012, DH028	EU408330, EU408332	18
Genotype 4				Genotype 7			
4a	ED43	Y11604	48	7a	QC69	EF108306	
4b	QC264	FJ462435	16	Additions and changes from assignments proposed in ² shown in bold . *Consensus proposed genotype/subtype names. Where multiple sequences of a HCV genotype are available, two sequences have been listed, prioritized by (a) publication date or (b) submission date when unpublished. ¹ Locus (or isolate name if locus is the same as the accession number). ² Previously described as 4b. ^{7,14} [§] Sequence obtained from acute phase plasma of a chimpanzee experimentally infected with (human-derived) isolate SA13. Previously described as 6u. ¹⁸			
4c	QC381	FJ462436	16				
4d	03-18, QC382	DQ418786, FJ462437	49,16				
4f	IFBT88, PS6	EF589161, EU392175	50,51				
4g	QC193	FJ462432	16				
4k	PS3, QC383	EU392173, FJ462438	51,16				
4l	QC274	FJ839870	16				
4m	QC249	FJ462433	16				
4n	QC97	FJ462441	16				
4o	QC93	FJ462440	16				
4p	QC139	FJ462431	16				
4q	QC262	FJ462434	16				
4r	QC384	FJ462439	16				
4t	QC155	FJ839869	16				
4v	CYHCV073, BID-G1248	HQ537009, JX227959	52,8				
4w[‡]	P212, P245	FJ025855, FJ025856	14				



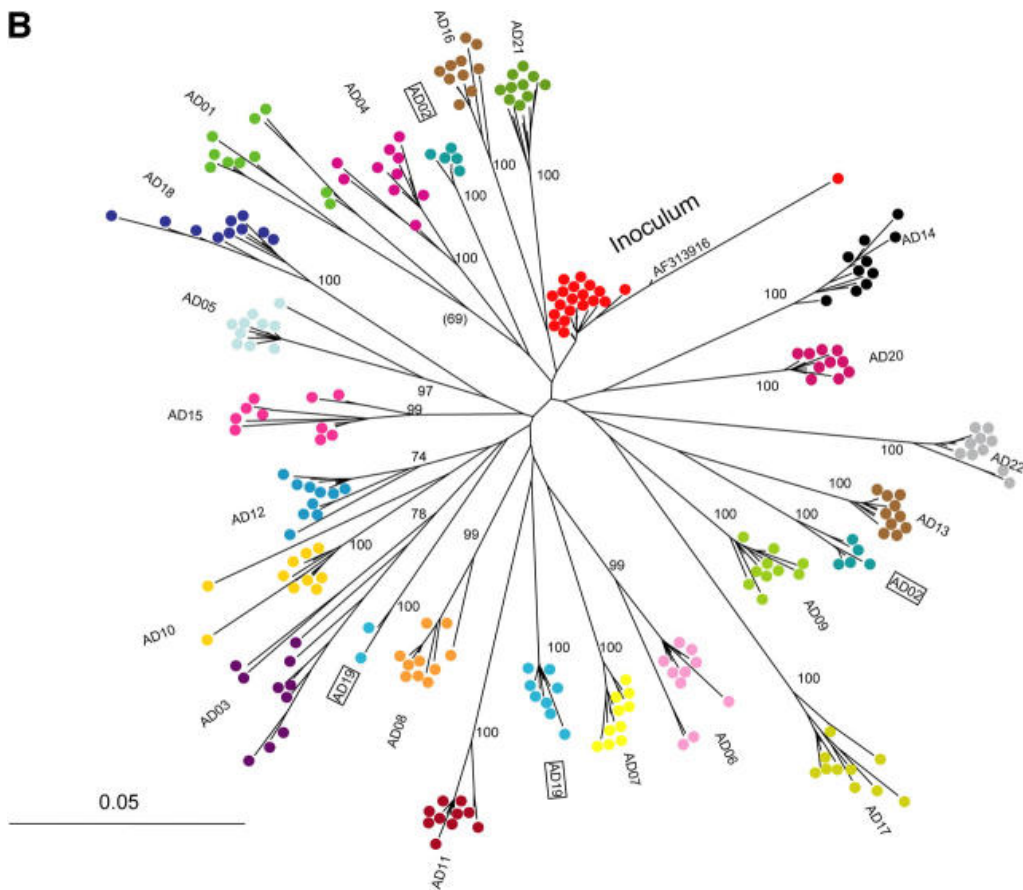
Εικόνα 8. Γενετική ποικιλομορφία γονότυπων και υπότυπων HCV, HIV, HBV. Φυλογενετικό δέντρο με τη μέθοδο Neighbor Joining αλληλουχιών HCV πλήρους γονιδιώματος.

Πηγή: Clinical Care Options, 2011 (<http://www.clinicaloptions.com/HIV/Annual>

%20Updates/2011%20Annual%20Update/Modules/HCV%20Resistance/Pages/Page%204.aspx)

2.1 Γενετική Ποικιλομορφία HCV

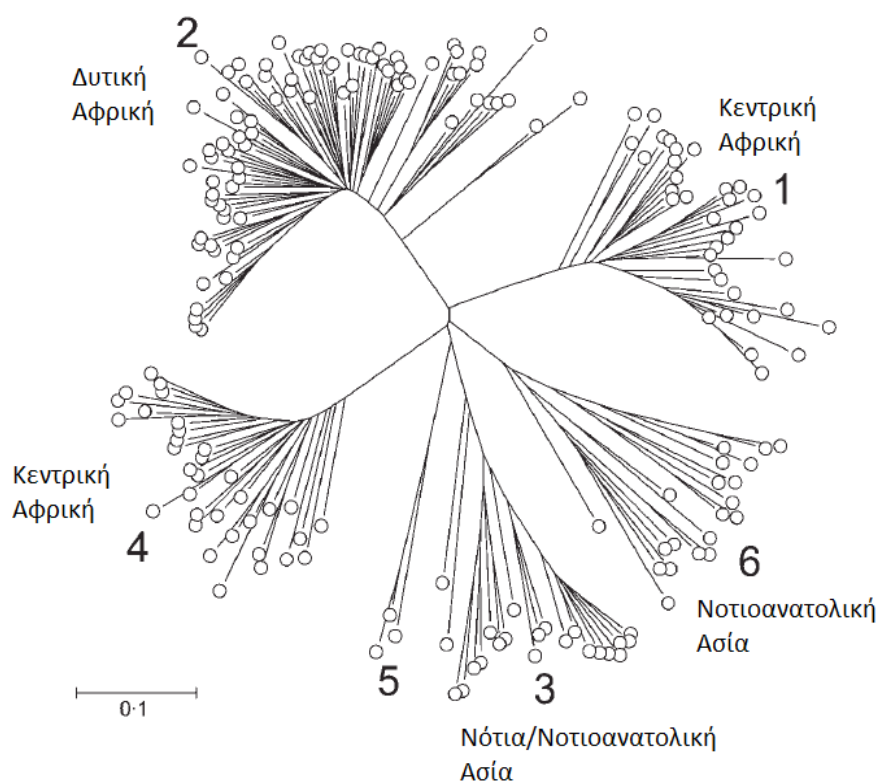
Ο HCV παρουσιάζει μεγάλη γενετική ποικιλομορφία τόσο μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων και υπότυπων, αλλά και εντός του ιδίου υπότυπου στο χρονίως πάσχοντα ασθενή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο ιός αντιγράφει το γενετικό του υλικό χρησιμοποιώντας μια RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, η οποία δεν έχει δυνατότητα επιδιόρθωσης της αντιγραφόμενης νουκλεοτιδικής αλυσίδας. Οι ιδιότητες της πρωτεΐνης αυτής επεξηγούν τον υψηλό ρυθμό φυσικών μεταλλάξεων του ιού ο οποίος κυμαίνεται από 0.001 έως 0.01 αντικαταστάσεις βάσεων ανά γενετικό τόπο ανά έτος (Hussain, 2013). Δεδομένου του γεγονότος ότι συμβαίνει 1 αντικατάσταση βάσης ανά 10,000 έως 100,000 αντιγραφόμενα νουκλεοτίδια σε συνδυασμό με την παραγωγή 10^{12} ιικών σωματιδίων (βίρια) ανά ημέρα λόγω ιικού πολλαπλασιασμού, παράγεται ένας πληθυσμός με εξαιρετικά μεγάλη γενετική ποικιλομορφία (Peter Simmonds, 2004). Τα ιικά σωματίδια κυκλοφορούν εντός του οργανισμού ως ετερογενής πληθυσμός (quasispecies) και διαφέρουν μεταξύ τους κατά 1-5% ως προς τη νουκλεοτιδική αλληλουχία (Hussain, 2013) (Εικόνα 10). Αυτό επιτρέπει την ταχεία προσαρμοστικότητα του ιού σε τυχόν περιβαλλοντικές αλλαγές και του δίνει τη δυνατότητα να ανθίσταται στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή ή στα αντιικά φάρμακα. Πιθανόν, έτσι επεξηγείται και η αδυναμία δημιουργίας εμβολίου. Επίσης, ορισμένες περιοχές του γονιδιώματος του ιού παρουσιάζουν διαφορετικού βαθμού γενετική ετερογένεια. Στο 3' άκρο του γονιδιώματος που περιέχει αλληλουχίες σχετικές με τον πολλαπλασιασμό του ιού και τη μετάφραση των πρωτεϊνών βρίσκονται οι πιο καλά συντηρημένες αλληλουχίες μεταξύ των γονότυπων (NS5B). Ο ρυθμός νουκλεοτιδικής αντικατάστασης στη συγκεκριμένη περιοχή είναι περίπου 4.1×10^{-4} μεταλλάξεις / γενετικό τόπο / έτος. Ομοίως, ισχύει και για την περιοχή core στο 5' άκρο του γονιδιώματος (Εικόνα 6). Άλλες περιοχές όπως οι E1 και E2 που κωδικοποιούν τις γλυκοπρωτεΐνες του περιβλήματος χαρακτηρίζονται ως υπερμεταβλητές και είναι εξαιρετικά ανομοιογενείς μεταξύ των γονότυπων και μπορεί να διαφέρουν μέχρι και 50% (Simmonds, 2001). Ο ρυθμός νουκλεοτιδικής αντικατάστασης στη συγκεκριμένη περιοχή υπολογίζεται περίπου 7.1×10^{-4} μεταλλάξεις / γενετικό τόπο / έτος (Simmonds, 2004).

B

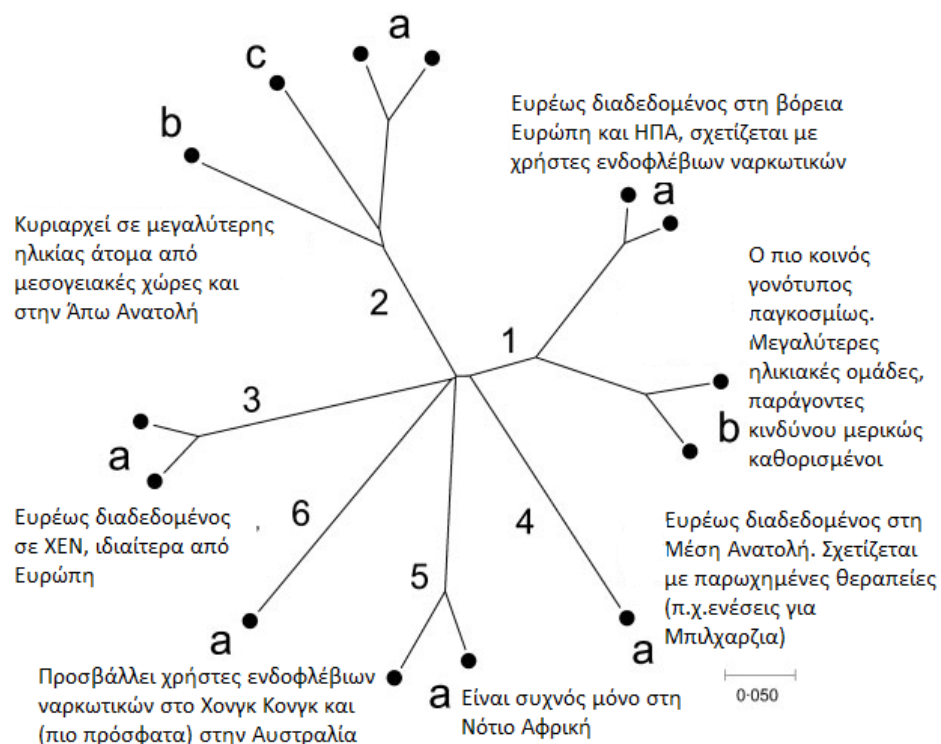
Εικόνα 10. Φυλογενετικό δέντρο των quasispecies 22 ατόμων (10 αλληλουχίες / άτομο) που μολύνθηκαν από κοινή πηγή (Inoculum) πριν από 17-22 έτη (Ray et al., 2005)

Η μεγάλη γενετική ετερογένεια που καταγράφεται εντός των ιδίων γονότυπων (1, 2, 4) σε αλληλουχίες του HCV σε χώρες της Αφρικής πιθανόν να επεξηγεί την προέλευση του ιού από τις περιοχές αυτές. Ομοίως συμβαίνει και στους γονότυπους 3 και 6 στην νότια και νοτιοανατολική Ασία (Εικόνα 11). Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο της κατανομής των γονότυπων, ο HCV ενδημούσε στις περιοχές της υποσαχάριας Αφρικής και της νοτιοανατολικής Ασίας για σημαντικό χρονικό διάστημα, ενώ η επιδημία στο δυτικό κόσμο και σε άλλες μη τροπικές χώρες είναι πιο πρόσφατη λόγω των νέων παραγόντων κινδύνου που ανέκυψαν. Ορισμένοι από αυτούς είναι η ευρεία εφαρμογή των μεταγγίσεων αίματος και προϊόντων του από τη δεκαετία του '40 και έπειτα, η διαδεδομένη εφαρμογή των παρεντερικών θεραπειών με μη αποστειρωμένες σύριγγες πολλαπλών χρήσεων για ενέσεις και εμβόλια και η χρήση των ενδοφλέβιων ναρκωτικών τα τελευταία 50 χρόνια (Peter Simmonds, 2004).

Οι γονότυποι και οι υπότυποι που επικράτησαν στις ανεπτυγμένες χώρες έχουν μικρότερη ετερογένεια σε σύγκριση με τις αφρικανικές χώρες και τις χώρες της νοτιοανατολικής Ασίας (Εικόνα 12). Αν υποθέσουμε ότι η μετάδοση έγινε από τις τελευταίες στις πρώτες αυτό συνιστά, σύμφωνα με την Πληθυσμιακή Γενετική, το φαινόμενο του ιδρυτή (founder effect). Το φαινόμενο του ιδρυτή περιγράφηκε από τον Ernst Mayr το 1942 και είναι η απώλεια της γενετικής ετερογένειας που συμβαίνει όταν ένας πληθυσμός λίγων ατόμων που προέρχεται από έναν μεγαλύτερο πληθυσμό εγκαθίσταται σε μια νέα περιοχή. Ο νέος πληθυσμός που θα προκύψει θα είναι γονοτυπικά διαφορετικός από τον πατρικό πληθυσμό (Provine, 2004).



Εικόνα 11. Φυλογενετικό δέντρο όλων των γνωστών γονότυπων και υπότυπων του HCV σε περιοχές με υψηλή ετερογένεια για τους γονότυπους 1, 2 και 4 στην υποσαχάρια Αφρική και 3 και 6 στην Νοτιοανατολική Ασία (Peter Simmonds, 2004).



Εικόνα 12. Φυλογενετικό δέντρο των κυριότερων HCV γονότυπων που βρίσκονται στις αναπτυγμένες χώρες και οι κύριες επιδημιολογικές συσχετίσεις με συγκεκριμένες ομάδες κινδύνου. Οι συγκεκριμένοι γονότυποι πιστεύεται ότι επικράτησαν κατά τη διάρκεια του 20ου αιώνα (Simmonds, 2004).

2.2 HCV Γονότυποι και Γεωγραφική Κατανομή

Η κατανομή των γονότυπων διαφέρει ανά γεωγραφική περιοχή αλλά και ανά ομάδα κινδύνου. Οι γονότυποι 1, 2, 3 είναι οι πιο συχνοί και έχουν παγκόσμια διασπορά. Παρόλα αυτά, η γεωγραφική τους κατανομή είναι ανόμοια (Εικόνα 13). Οι υπότυποι 1a και 1b είναι οι επικρατέστεροι στις ΗΠΑ και την Ευρώπη. Ο 1a, ειδικότερα, σχετίζεται με τη χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών και ο 1b κυριαρχεί στις μεγαλύτερες ηλικιακές κατηγορίες (Hussain, 2013). Στην Ιαπωνία και στην Τουρκία ο 1b ευθύνεται για πάνω από το 60% των HCV λοιμώξεων (Cornberg et al., 2011; Sievert et al., 2011). Όσον αφορά το γονότυπο 2, οι υπότυποι 2a και 2b ανευρίσκονται όχι σπάνια σε περιοχές της βορείου Αμερικής, της Ευρώπης και της Ιαπωνίας ενώ ο 2c είναι συχνός στη βόρεια Ιταλία. Υπάρχουν, επίσης, ενδείξεις από μικρού μεγέθους μελέτες ότι ενδημεί σε χώρες της δυτικής Αφρικής (Jeannel et al., 1998; Mellor et al., 1995; Ruggieri et al., 1996; Wansbrough-Jones et al., 1998). Ο γονότυπος 3 είναι εξαιρετικά συνήθης σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών στην Ευρώπη και στις Η.Π.Α και αποτελεί το συχνότερο γονότυπο σε χώρες όπως η Ινδία, το Πακιστάν και η Ταϊλάνδη. Ο γονότυπος 4 εμφανίζεται στη βόρεια Αφρική και ιδιαίτερα στην Αίγυπτο, τη Συρία και τη Σαουδική Αραβία, ενώ ο γονότυπος 5 κυρίως στη Νότιο Αφρική. Ο γονότυπος 6 έχει το μεγαλύτερο επιπολασμό στο Χονγκ Κονγκ και στη νοτιοανατολική Ασία (Hussain, 2013) (Εικόνα 14). Ο γονότυπος 7 απομονώθηκε στον Καναδά σε ένα μετανάστη από τη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό (DRC) το 2006 και πληρούσε τα κριτήρια κατάταξης ως ξεχωριστός γονότυπος (Murphy et al., 2014). Λοιμώξεις από ανασυνδυασμένο τύπο γονότυπου καταγράφονται στο 0.9-12% των ασθενών (Cornberg et al., 2011; Sievert et al., 2011). Εννέα διαφορετικοί ανασυνδυασμένοι τύποι έχουν περιγραφεί εκ των οποίων μόνο ο 2k/1b έχει πολλαπλές προσβολές (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Ανασυνδυασμένες μορφές HCV με διαθέσιμο πλήρως το γονιδίωμα του ιού (Smith et al., 2014).

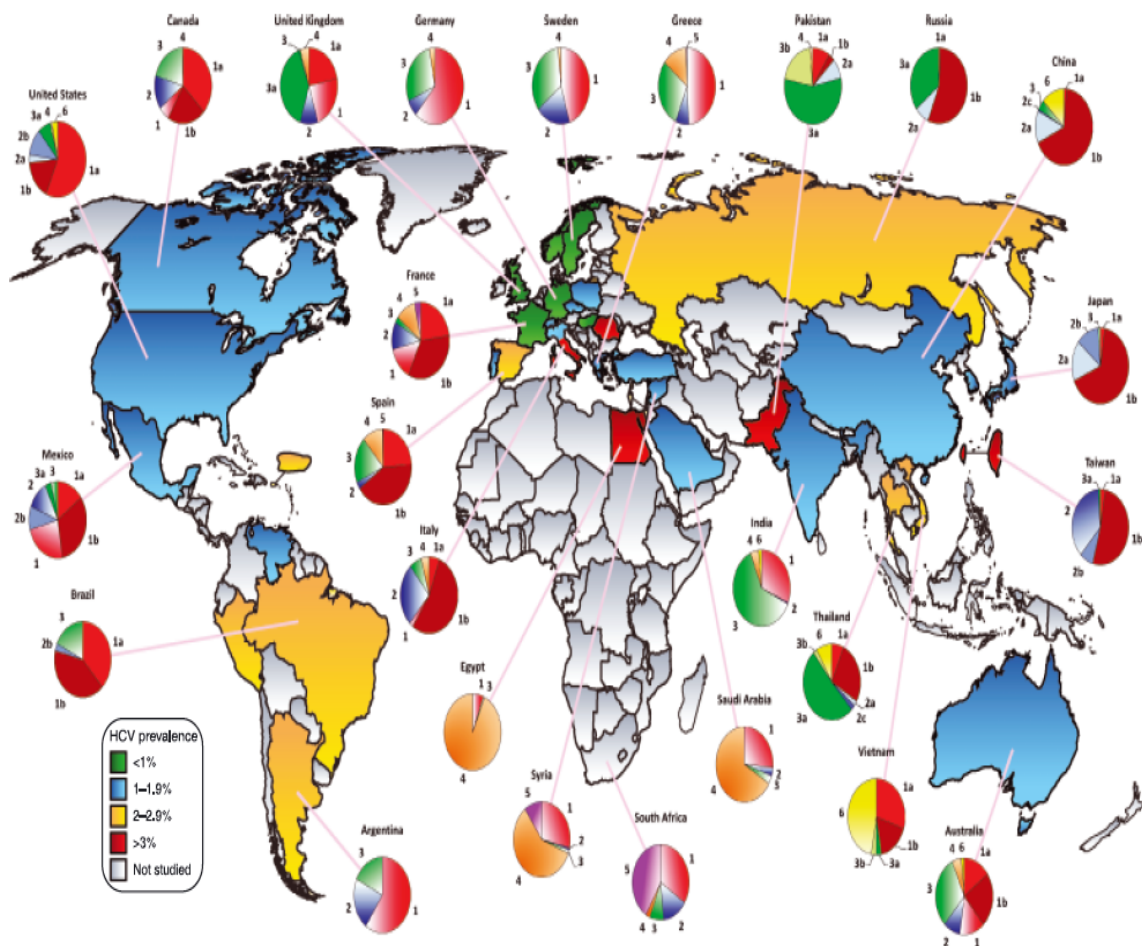
Table 4. Recombinant (RF) HCV Complete Coding Region Sequences

RF*	Breakpoint [†]	Accession	Isolates [‡]	Reference
RF2k/1b	3186	AY587845	33	75-77
RF2i/6p	3405-3464	DQ155560	1	41
RF2b/1b_1	3456	DQ364460	1	78
RF2/5	3366-3389	AM408911	1	79
RF2b/6w	3429	EU643835	1	64
RF2b/1b_2	3432	AB622121	1	80
RF2b/1a	3429-3440	JF779679	1	81
RF2b/1b_3	3286-3293	AB677530	1	82
RF2b/1b_4	3286-3293	AB677527	1	82

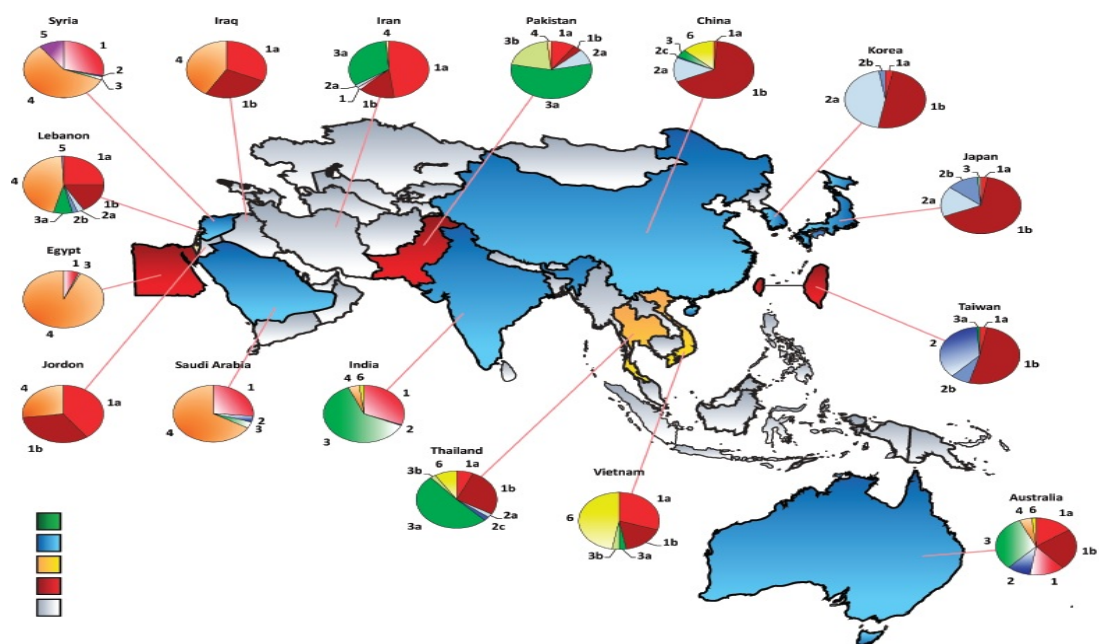
*Recombinant forms (RF) for which complete genome sequences are available are named according to the subtypes from which they are derived and in the order in which these appear in the genome.

[†]Breakpoints are numbered with reference to H77 (AF009606).

[‡]Number of individuals from whom the RF has been isolated.



Εικόνα 13. Παγκόσμια κατανομή των HCV γονοτύπων. (Negro & Alberti, 2011)



Εικόνα 14. Επιπολασμός HCV και κατανομή γονότυπων σε Ασία, Αυστραλία και Αίγυπτο (Sievert et al., 2011).

2.3 Γονότυποι HCV και ομάδες κινδύνου

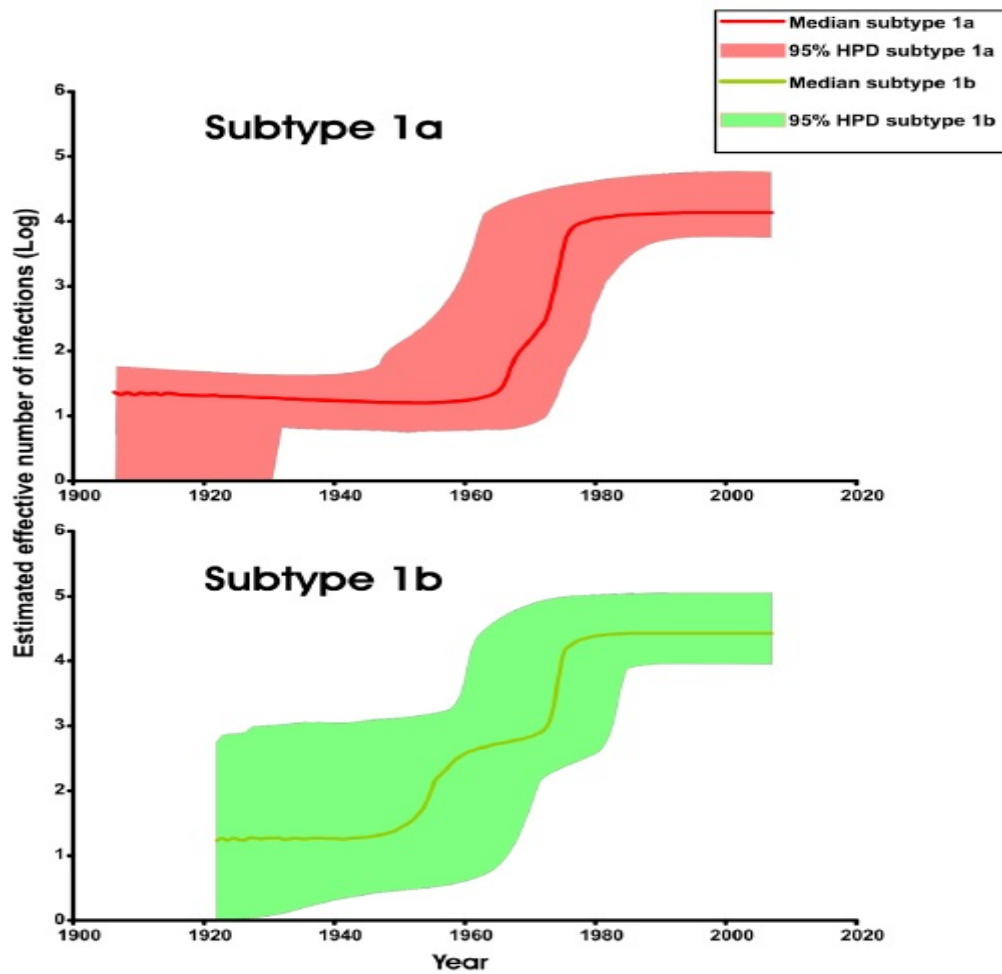
Εκτός από την ετερογενή γεωγραφική κατανομή των γονότυπων καταγράφεται σημαντική ετερογένεια ανά ομάδα κινδύνου. Η επιδημία του υπότυπου 1b φαίνεται ότι είναι παλαιότερη σε σύγκριση με αυτή των υπόλοιπων ιών και προσβάλλει συχνότερα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Ο 1b εξαπλώθηκε ταχύτατα σε πολλούς πληθυσμούς γεωγραφικά απομακρυσμένους μεταξύ τους (Η.Π.Α, Ευρώπη, Ιαπωνία). Αυτό αποτυπώνεται σε επιδημιολογικές μελέτες (Cornberg et al., 2011; Sievert et al., 2011) αλλά και μελέτες φυλοδυναμικής μεθοδολογίας (Magiorkinis et al., 2009). Το χρονικό διάστημα από 1922-1940 ο υπότυπος 1b εμφάνιζε σταθερό αριθμητικά πληθυσμό, ενώ από το 1940-1980 παρουσιάζει εκθετική αύξηση του πληθυσμού του και έκτοτε μέχρι το 2000 φαίνεται να σταθεροποιείται αριθμητικά (Εικόνα 15). Η έκρηξη της επιδημίας του 1b πιθανόν να οφείλεται στην ευρεία εξάπλωση των παρεντερικών θεραπειών μετά το Β' παγκόσμιο πόλεμο όπως οι μεταγγίσεις και οι ενέσιμες θεραπείες. Στο φαινόμενο αυτό συνέτεινε και η δημιουργία δεξαμενών πλάσματος από πολλαπλούς δότες, όπου μετά από κατάλληλη επεξεργασία (λυοφιλίωση) το πλάσμα μπορούσε να αποθηκευτεί για μακρό χρονικό διάστημα σε ξηρά-παγωμένη μορφή. Κατά αυτόν τον τρόπο ένας μολυσμένος δότης μπορούσε να μολύνει περισσότερους του ενός δέκτες, εφόσον ο HCV ήταν δυνατόν να επιβιώνει σε αυτή τη μορφή και να μεταδίδεται αποτελεσματικά πέρα από τον τόπο και τον χρόνο της αιμοδοσίας. Οι εξαγωγές αίματος και προϊόντων του σε όλο τον κόσμο συνέτειναν επίσης στην παγκόσμια εξάπλωση του συγκεκριμένου υπότυπου. Για τους παραπάνω λόγους ο επιπολασμός του είναι αυξημένος σε άτομα που έχουν λάβει μετάγγιση πριν την καθιέρωση του ελέγχου του αίματος (Magiorkinis et al., 2009).

Η έξαρση της επιδημίας του 1a έπεται αυτής του 1b κατά 16 έτη περίπου. Μέχρι το 1960 ο πληθυσμός του 1a φαίνεται να είναι σταθερός, ενώ από το 1960-1980 εμφανίζει εκθετική αύξηση και έκτοτε σταθεροποιείται (Εικόνα 15). Το πρότυπο εξάπλωσης φαίνεται να συμπίπτει χρονικά με την κορύφωση της ενδοφλέβιας χρήσης ηρωίνης στα τέλη του 1960' σε Ευρώπη, Β. Αμερική και Αυστραλία (Magiorkinis et al., 2009).

Ο 3a έχει πιο πρόσφατη διασπορά, αφορά νεότερες ηλικίες και ο επιπολασμός του είναι αυξημένος στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών σε Ευρώπη και Αμερική. Η εξάπλωση του 3a υπότυπου συμπίπτει με την έξαρση των ενδοφλέβιων ναρκωτικών με την πρακτική της κοινής σύριγγας μεταξύ των χρηστών. Δεδομένου ότι ο έλεγχος του αίματος έχει καθιερωθεί από τη

δεκαετία του '90 στον ανεπτυγμένο κόσμο, αναμένεται αύξηση των μεταδόσεων του συγκεκριμένου υπότυπου. Στην Ινδία, την Ταϊλάνδη και το Πακιστάν είναι ο επικρατέστερος γονότυπος και η εξάπλωσή του οφείλεται κατά κύριο λόγο στις ενέσεις με σύριγγα πολλαπλών χρήσεων που χρησιμοποιούνται σε πολλά νοσοκομεία και ιατρεία και στις μεταγγίσεις μολυσμένου αίματος (Sievert et al., 2011).

Ο γονότυπος 4 προήλθε από την κεντρική Αφρική και ενδημεί σε πολλές αφρικανικές χώρες. Ο 4a είναι ο συχνότερος υπότυπος στη Μέση Ανατολή και η επιδημία εξαπλώθηκε στην Αίγυπτο λόγω της εκτεταμένης εφαρμογής παρεντερικών θεραπειών για μια ενδημική παρασίτωση (Σχιστοσωμίαση) με γυάλινες μη αποστειρωμένες σύριγγες πολλαπλών χρήσεων (Iles et al., 2014).



Εικόνα 15. Παγκόσμια Δυναμική Πληθυσμών HCV 1a, 1b σύμφωνα με τη χρήση του μοριακού ρολογιού (relaxed clock) της NS5B' περιοχής (Magiorkinis et al., 2009)

2.4 Κλινική Σημασία των Γονότυπων

Ο ρόλος των HCV γονότυπων στην εξέλιξη της ηπατικής νόσου είναι ένα από τα πιο αμφιλεγόμενα πεδία στην έρευνα για τον HCV. Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι ο γονότυπος του HCV επηρεάζει την έκβαση και την ανταπόκριση στην αντική θεραπεία. Εκτός από τη δημοσιευμένη βιβλιογραφία, αυτό ενσωματώθηκε και στις κατευθυντήριες οδηγίες θεραπείας του HCV των ηπατολογικών εταιριών. Παρόλα αυτά, δεν έχει αποδειχτεί ο ρόλος του γονότυπου ως ανεξάρτητου προγνωστικού παράγοντα στην πρόοδο της νόσου. Η διενέργεια προοπτικών μελετών είναι δύσκολη εξαιτίας της μακροχρόνιας κλινικής πορείας, ενώ στις αναδρομικές μελέτες οι ασθενείς δυσκολεύονται να δώσουν ακριβείς πληροφορίες για τη χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών ή τη λήψη αλκοόλ. Κατά συνέπεια, η ημερομηνία μόλυνσης από τον ιό παραμένει αβέβαια και διάφοροι άλλοι συγχυτικοί παράγοντες πιθανόν να επηρεάζουν το αποτέλεσμα (Zein, 2000). Σημειώνεται ότι και οι έξι γονότυποι μπορούν να προκαλέσουν κίρρωση ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Ο υπότυπος 1b έχει συσχετιστεί με πιο επιθετική εξέλιξη της ηπατικής νόσου σε σύγκριση με τους υπόλοιπους γονότυπους (Bellentani et al., 1999; Bruno et al., 1997). Παρόλα αυτά, το παραπάνω συμπέρασμα έχει αμφισβητηθεί από μία σειρά μελετών που απέτυχαν να συσχετίσουν την κλινική έκβαση με την παρουσία κάποιου γονότυπου (Naoumov et al., 1997; Reid et al., 1999; Serra, Rodríguez, del Olmo, Escudero, & Rodrigo, 2003). Επίσης, ο γονότυπος 3 έχει συσχετιστεί με την παρουσία σημαντικού βαθμού ηπατικής στεάτωσης και ίνωσης (Hissar et al., 2006) αλλά και ηπατοκυτταρικού καρκίνου (Kanwal et al., 2014).

Η θεραπεία της HCV λοίμωξης εξειδικεύεται με βάση το γονότυπο όπως και τα ποσοστά ανταπόκρισης στη θεραπεία. Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό για τη Μελέτη του Ήπατος (European Association for the Study of the Liver) για το γονότυπο 1 προτείνεται τριπλό θεραπευτικό σχήμα με σοφοσμπουβίρη, ριμπαβιρίνη και πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη για 12 εβδομάδες. Το παραπάνω σχήμα επιδέχεται τροποποιήσεις ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των φαρμάκων και την παρουσία πολυμορφισμών που προβλέπουν πτωχή ανταπόκριση (Q80K). Οι γονότυποι 2 και 3 ήταν και παραμένουν οι πιο ευαίσθητοι στο σχήμα ιντερφερόνης και ριμπαβιρίνης. Με την έλευση των αναστολέων της πρωτεάσης και της σοφοσμπουβίρης, το παραπάνω σχήμα δεν προτείνεται πλέον ως πρώτης γραμμής θεραπεία. Για το γονότυπο 2 αρκεί το διπλό, από του στόματος σχήμα με ριμπαβιρίνη και σοφοσμπουβίρη για 12 εβδομάδες με πολύ καλή μακροχρόνια ιολογική ανταπόκριση. Ο γονότυπος 3 απαιτεί τριπλό σχήμα με πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη, ριμπαβιρίνη και σοφοσμπουβίρη. Τα ποσοστά ασθενών με μακροχρόνια ιολογική

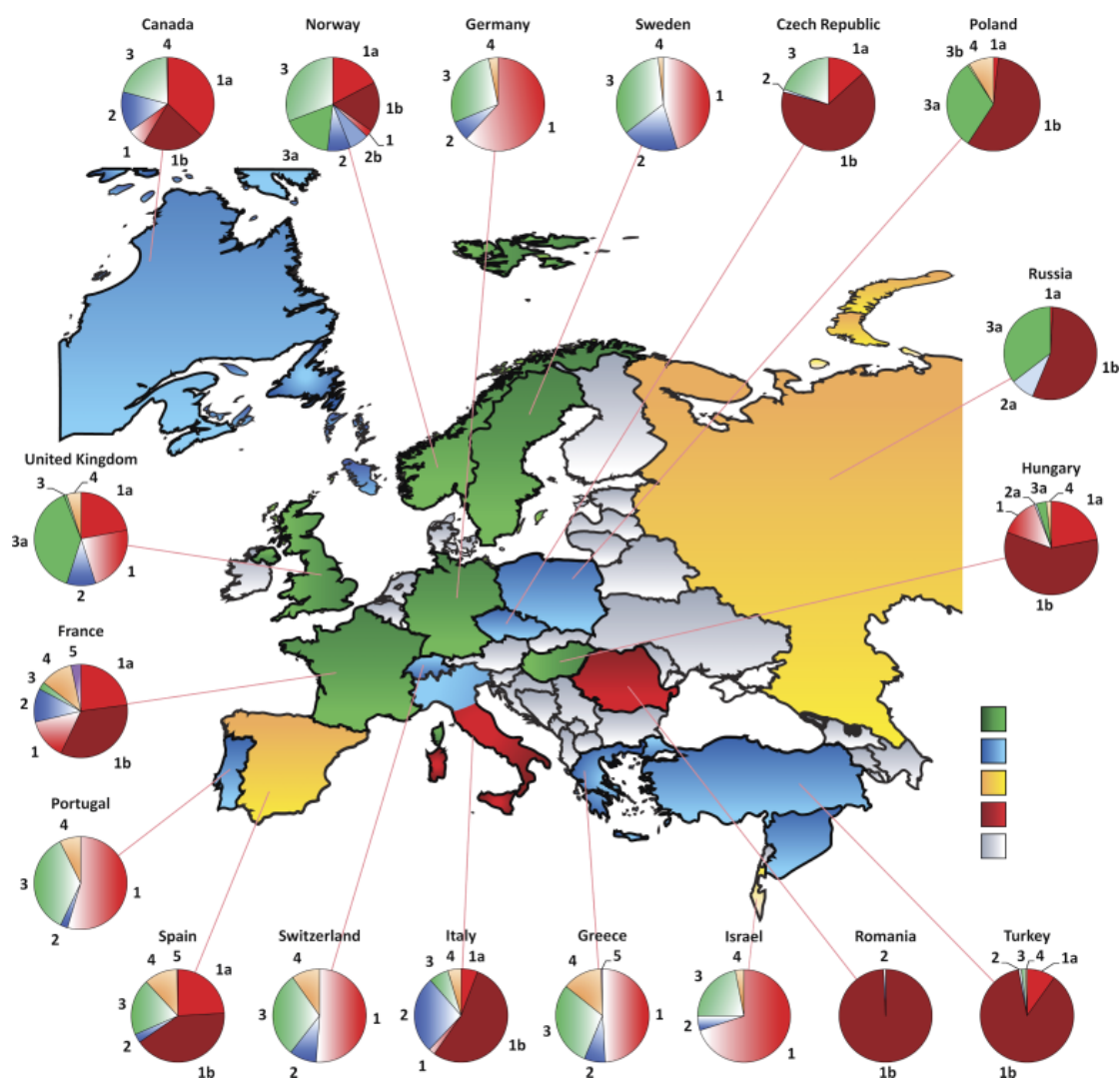
ανταπόκριση είναι σαφώς καλύτερα σε ασθενείς με γονότυπο 2 και 3 (European Association for the Study of the Liver, 2014).

2.5 Επιδημιολογική Σημασία των Γονότυπων

Η διάδοση και η προέλευση των HCV γονότυπων αποτελεί το αντικείμενο πολλών μελετών καθώς η σημασία αυτής της πληροφορίας έγκειται τόσο στην πρόβλεψη του κλινικού αποτελέσματος, αλλά και στην πρόληψη της μετάδοσης στο μέλλον. Η κατανομή των HCV γονότυπων σε συνδυασμό με τους τοπικούς παράγοντες κινδύνου παρέχουν καλύτερη κατανόηση του τρόπου διάδοσης και εξέλιξης της επιδημίας. Αυτό επιτρέπει καλύτερο σχεδιασμό των μέτρων πρόληψης, της κατανομής των πόρων και της παροχής υπηρεσιών υγείας στους ασθενείς με HCV λοίμωξη.

Η επιδημία στις ευρωπαϊκές χώρες, στον Καναδά και στο Ισραήλ συνεχίζεται και αφορά περισσότερους του ενός γονότυπους παρά το γεγονός ότι οι χώρες αυτές κατάφεραν να ελέγξουν την ιατρογενή μετάδοση (έλεγχος αίματος, αποστείρωση εργαλείων, σύριγγες μιας χρήσης). Σημαντικό ρόλο σε αυτή την ετερογενή επιδημία φαίνεται να παίζει και η μετανάστευση ατόμων από χώρες όπου ενδημεί ο ιός (Εικόνα 16).

Στις χώρες της δυτικής και κεντρικής υποσαχάριας Αφρικής παρατηρείται η μέγιστη ετερογένεια των γονότυπων 1, 2 και 4 αντίστοιχα και ο ιός ενδημεί για 200-250 χρόνια στις περιοχές αυτές σύμφωνα με φυλοδυναμικές αναλύσεις (Peter Simmonds, 2004). Είναι δύσκολο, παρόλα αυτά, να επεξηγηθεί με βάση τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου η ευρεία διάδοση του ιού στις περιοχές αυτές εφόσον η ιατρογενής μετάδοση ξεκίνησε πολύ αργότερα (1940'-). Μία πιθανή εξήγηση είναι η συνύπαρξη προηγούμενων σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων στους πάσχοντες από HCV λοίμωξη, καθώς όταν προσβάλλεται ο βλενογόνος του γεννητικού συστήματος χάνεται η ακεραιότητά του και διευκολύνεται η μόλυνση από τον ιό. Επιπλέον παράγοντες κινδύνου για HCV μετάδοση που έχουν αναφερθεί είναι η περιτομή και ο σκαριφισμός του δέρματος (Simmonds, 2004).



Εικόνα 16. Κατανομή των HCV γονότυπων στην Ευρώπη, το Ισραήλ και τον Καναδά

3. Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών (XEN) και Ηπατίτιδα C

Η HCV λοίμωξη θεωρείται ενδημική στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών παγκοσμίως. Ο επιπολασμός της ηπατίτιδας C στο συγκεκριμένο πληθυσμό κυμαίνεται από 40-90% ανάλογα με τη χώρα (Εικόνα 17). Οι χώρες με το μεγαλύτερο επιπολασμό του αντι-HCV αντισώματος στους XEN είναι το Μεξικό (97.4%), ο Μαυρίκιος (97.3%), η Εσθονία (90.5%), η Ταϊλάνδη (89.8%) και η Λιθουανία (89.4%). Σύμφωνα με τους Nelson et al, το 68% των XEN έχει μολυνθεί από τον HCV και υπολογίζονται στα δέκα εκατομμύρια άτομα σε 148 χώρες το 2010. Σε 77 χώρες υπάρχει το 82% των XEN εκ των οποίων οι χώρες με τους μεγαλύτερους πληθυσμούς είναι η Κίνα, οι Η.Π.Α. και η Ρωσία. Ο επιπολασμός στις χώρες αυτές είναι 67%, 73.4% και 72.5% αντίστοιχα και ο αριθμός των μολυσμένων από ηπατίτιδα C XEN αγγίζει τα 1.6, 1.5 και 1.3 εκατομμύρια άτομα αντίστοιχα (Nelson et al., 2012). Στην Ευρώπη, ο επιπολασμός της ενδοφλέβιας χρήσης ναρκωτικών στις ηλικίες 15-64 ετών κυμαίνεται από 2.9 άτομα ανά 1000 άτομα πληθυσμό στην Κύπρο μέχρι 10 άτομα ανά 1000 άτομα στην Ιταλία (Εικόνα 18). Οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί XEN μολυσμένων με HCV βρίσκονται στην ανατολική Ευρώπη και στην νότια και νοτιοανατολική Ασία με 2.3 και 2.6 εκ. αντίστοιχα (Πίνακας 5,6).

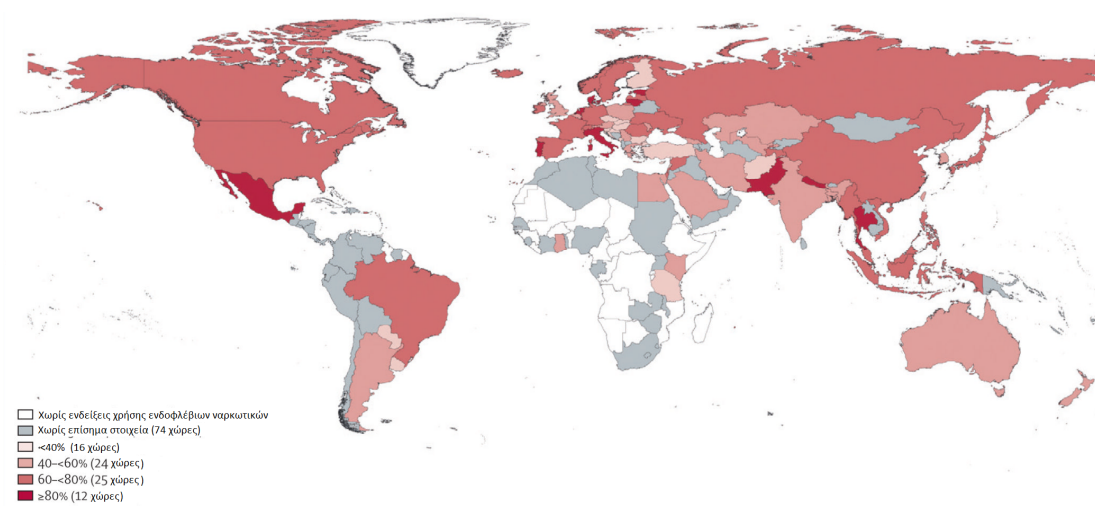
Η χρήση των ενδοφλέβιων ναρκωτικών αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου για HCV λοίμωξη στην Ευρώπη, τη βόρεια Αμερική και την Αυστραλία και εξαιτίας αυτής οφείλεται το 68-80% των νέων λοιμώξεων την τελευταία τριακονταετία (Shepard et al, 2005). Στη Νορβηγία, το 67% των ατόμων με ηπατίτιδα C ανέφεραν ιστορικό ενδοφλέβιας χρήσης. Στην Ιταλία, η χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών καταγράφηκε ως ο πιο συχνός παράγοντας κινδύνου ανάμεσα σε ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα C για τα έτη 1994-1996 και στην ηλικιακή ομάδα ασθενών 15-24 ετών αναφέρθηκε από το 60%. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, σε μελέτες επιπολασμού το 1997 για το αντίσωμα έναντι του HCV βρέθηκε ως ο πιο συχνός παράγοντας κινδύνου ανάμεσα στους οροθετικούς. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε μελέτες για το αντι-HCV αντίσωμα στη Γαλλία ανάμεσα σε αιμοδότες (Shepard et al., 2005).

Οι εκτιμήσεις, όσον αφορά στον αριθμό των χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών, υποδηλώνουν ότι υπάρχει σημαντικός πληθυσμός ο οποίος διατρέχει κίνδυνο μόλυνσης σε όλες τις χώρες. Η μετάδοση της νόσου γίνεται κυρίως λόγω κοινής χρήσης βελονών, συριγγών και άλλων αντικειμένων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή και λήψη ναρκωτικών ενδοφλεβίως. Ακόμη και η από κοινού χρήση σύνεργων όπως δοχεία ανάμειξης, νερό για τη διάλυση των ναρκωτικών ή φίλτρα μπορεί να οδηγήσει στη μετάδοση του ιού (European Monitoring Centre for

Drugs and Drug Addiction, 2011). Το μολυσματικό δυναμικό του ιού είναι ισχυρό καθώς μπορεί να επιβιώσει εκτός του ανθρώπινου οργανισμού υπό ορισμένες συνθήκες για αρκετές ημέρες. Μπορεί να διατηρηθεί σε ξηρό περιβάλλον μέχρι μια εβδομάδα όπως σε ξερό αίμα, πάνω σε επιφάνειες, κατσαρόλες, κουτάλια, φίλτρα και πέραν της μίας εβδομάδας σε υγρές συνθήκες όπως το βαρέλι της σύριγγας, εφόσον μελέτες απέδειξαν ότι ο ιός μπορεί να επιβιώσει σε φιάλη νερού μέχρι 3 εβδομάδες (Doerrbecker et al., 2011, 2013). Αυτό επεξηγεί τη μετάδοση του HCV ανάμεσα σε χρήστες που ισχυρίζονται ότι χρησιμοποιούν ατομικές σύριγγες μιας χρήσης, ενώ ενίοτε ομαδικά.

Η μόλυνση από τον ιό συμβαίνει ταχύτατα στους XEN και ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα με πτωχούς πόρους. Στις αναπτυγμένες χώρες ο διάμεσος χρόνος σε κίνδυνο, δηλαδή ο διάμεσος χρόνος που μεσολαβεί από την έναρξη χρήσης μέχρι τη μόλυνση εκτιμάται στα 5.29 έτη. Επίσης, ο μέσος επιπολασμός του HCV μετά από ένα έτος χρήσης ενδοφλέβιων ναρκωτικών υπολογίστηκε 32.02% περίπου και μετά από 5 έτη χρήσης 53.01%. Στον αναπτυσσόμενο κόσμο τα παραπάνω ποσοστά ανεβαίνουν δραματικά καθώς ανέρχονται σε 59.13% και 77.64% για 1 και 5 έτη χρήσης αντίστοιχα (Hagan et al, 2008) (Εικόνα19).

Σήμερα στις Η.Π.Α., η ηλικιακή ομάδα με τη μεγαλύτερη επίπτωση οξείας ηπατίτιδας C είναι αυτή των 20-29 ετών και σχετίζεται άμεσα με την αναδυόμενη επιδημία του HCV σε νεαρούς XEN. Ειδικότερα, το 2010 ξέσπασε επιδημία HCV σε νέους χρήστες ενδοφλέβιας ηρωίνης, ηλικίας 15-24 ετών, λευκούς, κατοίκους μη αστικών περιοχών, που χρησιμοποιούσαν οπιοειδή με ιατρική συνταγή πριν την έναρξη της χρήσης παράνομων ουσιών. Μέχρι και το 2001, η ηλικιακή ομάδα που επηρεαζόταν περισσότερο ήταν αυτή των 30-49 ετών και ο επιπολασμός στους XEN μειωνόταν σταθερά χάρη στα προγράμματα παρέμβασης όπως διανομή δωρεάν εξοπλισμού στους χρήστες ή λόγω κορεσμού της λοίμωξης στη συγκεκριμένη ομάδα κινδύνου. Ο επιπολασμός του αντι-HCV αντισώματος παραμένει ωστόσο υψηλότερος στους παλαιούς και πρώην XEN (70-90%) αντικατοπτρίζοντας τον αυξανόμενο κίνδυνο της διαρκούς χρήσης. Δεδομένου του γεγονότος ότι κατά τις δεκαετίες 1970'-1980' δεν υπήρχε η ευαισθητοποίηση για την πρόληψη των αιματογενών νόσων, η από κοινού χρήση ήταν η πιο διαδεδομένη πρακτική με αποτέλεσμα τον αυξημένο επιπολασμό στις μεγαλύτερες ηλικιακές κοορτές (Office of HIV/AIDS & Infectious Disease Policy, 2013).

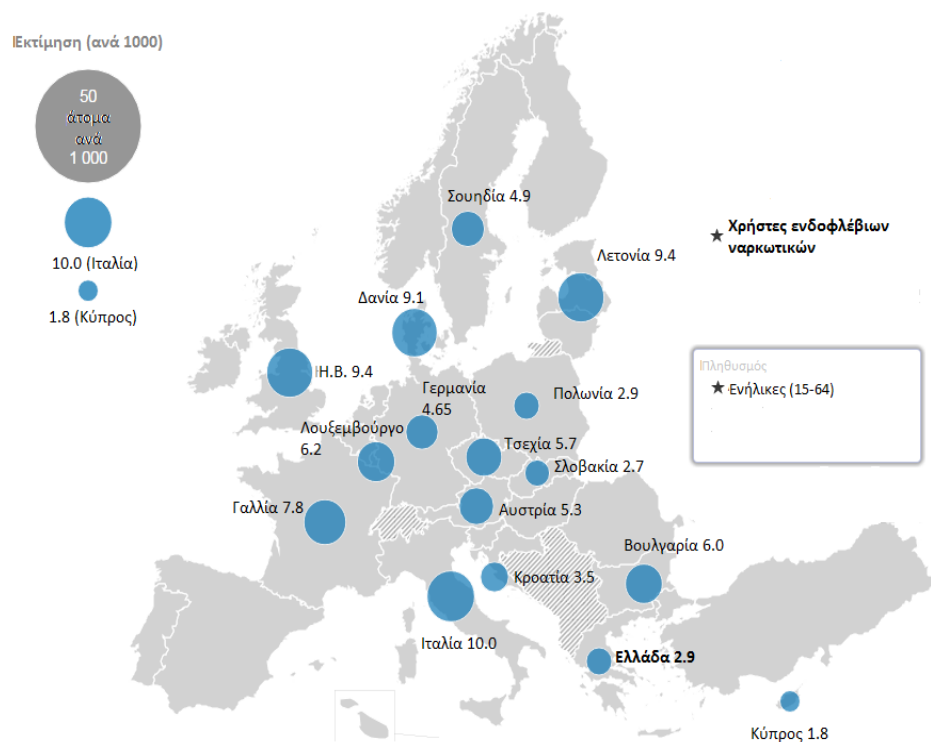


Εικόνα 17. Επιπολασμός των αντισωμάτων έναντι του HCV στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών παγκοσμίως (Nelson et al., 2012)

Πίνακας 5. Επιπολασμός του HCV αντισώματος στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, στην Τουρκία και τη Νορβηγία το 2012 ή το πιο πρόσφατο διαθέσιμο έτος. Πηγή: EMCDDA – European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction.

(www.emcdda.europa.eu/data/2014#displayTable:INF-111)

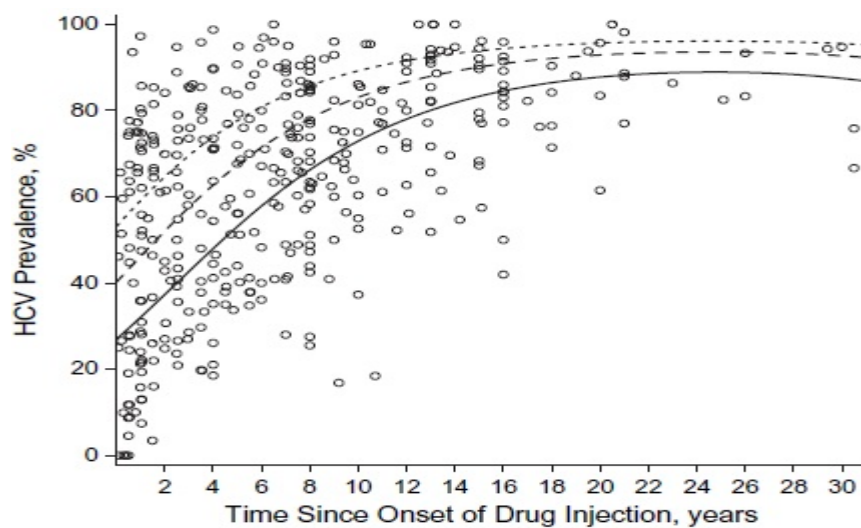
Χώρα	Έτος	Επιπολασμός HCV(%) στους ΧΕΝ
Λουξεμβούργο	2005	71.8–90.7
Λετονία	2007	74.4
Ελλάδα	2012	73.4
Νορβηγία	2012	65.8
Ιταλία	2010	60.5
Φινλανδία	2009	60.5
Κύπρος	2012	55.4
Δανία	2008	52.5
Τουρκία	2012	50.1
Αυστρία	2012	44.3-59.9
Κροατία	2007-2008	44.0
Ηνωμένο Βασίλειο	2011	43.0
Πορτογαλία	2010	36.5-83.2
Μάλτα	2012	40.8
Σλοβενία	2012	27.3
Ουγγαρία	2011	24.1
Τσεχία	2011	18.2



Εικόνα 18. Ενδοφλέβια Χρήση Ναρκωτικών: Εκτίμηση επιπολασμού ανάμεσα στον ενήλικο πληθυσμό των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (15-64 έτη). Πηγή: EMCDDA – European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction. (<http://www.emcdda.europa.eu/countries/prevalence-maps>)

Πίνακας 6. Περιοχικές και παγκόσμιες εκτιμήσεις του αριθμού των ΧΕΝ που είναι θετικοί στο αντι-HCV αντίσωμα, 2010 (Nelson et al., 2012)

Περιοχή	Αριθμός χωρών με έγκυρες αναφορές	Εκτιμώμενος αριθμός ΧΕΝ που είναι θετικοί στο αντίσωμα έναντι HCV
Ανατολική Ευρώπη	14	2,346,000
Δυτική Ευρώπη	22	727,500
Ανατολική και Νοτιοανατολική Ασία	11	2,642,000
Νότια Ασία	6	354,500
Κεντρική Ασία	3	146,000
Καραϊβική	0	--
Λατινική Αμερική	5	132,500
Καναδάς και Η.Π.Α.	2	1,022,000
Νησιωτικά κράτη του Ειρηνικού	0	--
Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία	2	97,000
Μέση Ανατολή και Βόρεια Αφρική	8	63,500
Υποσαχάρια Αφρική	4	800,000
Παγκόσμιος εκτιμώμενος αριθμός	77	10,018,000



Εικόνα 19. Επιπολασμός του HCV σε σχέση με τη διάρκεια ενδοφλέβιας χρήσης (χρόνος σε κίνδυνο).
συνεχής γραμμή: επιπολασμός σύμφωνα με το μοντέλο στις αναπτυγμένες χώρες μετά το 1995,
διακεκομμένη γραμμή: επιπολασμός σύμφωνα με το μοντέλο στις αναπτυγμένες χώρες πριν το 1995, στικτή
γραμμή: επιπολασμός σύμφωνα με το μοντέλο στις αναπτυσσόμενες χώρες (Hagan et al., 2008).

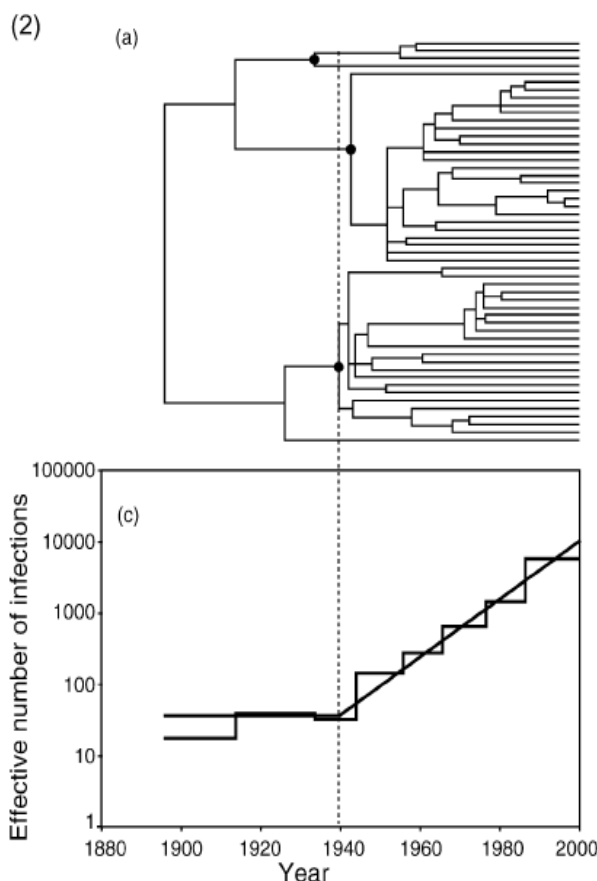
3.1 Υπότυποι και Προέλευση Επιδημίας στους XEN

Η επιδημία του HCV ξεκινάει πριν την ανακάλυψη του (Choo et al., 1989). Αυτό σε συνδυασμό με την έλλειψη κλινικών σημείων και την απουσία αποθηκευμένων δειγμάτων πριν το 1970 καθιστά αδύνατη τη διερεύνηση της προέλευσης και της διασποράς του ιού χωρίς μεθόδους μοριακής επιδημιολογίας. Η επιμέρους επιδημία στους XEN αναλύθηκε με παρόμοιες μεθόδους. Ο γονότυπος 1 είναι ο επικρατέστερος παγκοσμίως και ειδικότερα οι υπότυποι 1a και 1b. Αντίθετα, οι υπότυποι 1a και 3a αναδείχθηκαν πιο πρόσφατα και διαδόθηκαν σε πολλές περιοχές του πλανήτη ταχύτατα λόγω του επιπολασμού τους στους XEN όπου φαίνεται να είναι οι πιο διαδεδομένοι υπότυποι σε αυτή την ομάδα κινδύνου. Στους XEN πολλών ευρωπαϊκών πόλεων βρέθηκε, επίσης, ο γονότυπος 4 σε μικρότερο ποσοστό, το οποίο αυξάνεται καθώς μετακινούμαστε γεωγραφικά προς το νότο. Χώρες όπως η Ελλάδα, η Ιταλία, η Πορτογαλία και η Ισπανία έχουν ποσοστά στους XEN από 7.1-24.6% (Wiessing et al., 2011). Όσον αφορά τον υπότυπο, οι πιο συχνοί υπότυποι είναι ο 4a (Ελλάδα) και 4d (Πορτογαλία) (Calado et al., 2011; Raptopoulou et al., 2011). Η ύπαρξη του συγκεκριμένου γονότυπου πιθανόν να οφείλεται στην μετακίνηση πληθυσμών από τις χώρες όπου επικρατεί, δηλαδή της βόρειας Αφρικής και Μέσης Ανατολής, προς τις ευρωπαϊκές χώρες. Παρόλα αυτά, οι μικρές γενετικές αποστάσεις που υπολογίστηκαν σε φυλογενετικές μελέτες μεταξύ του υπότυπου 4d υποδεικνύουν πρόσφατη εισαγωγή και εξάπλωση στα δίκτυα των χρηστών (Nicot et al., 2005).

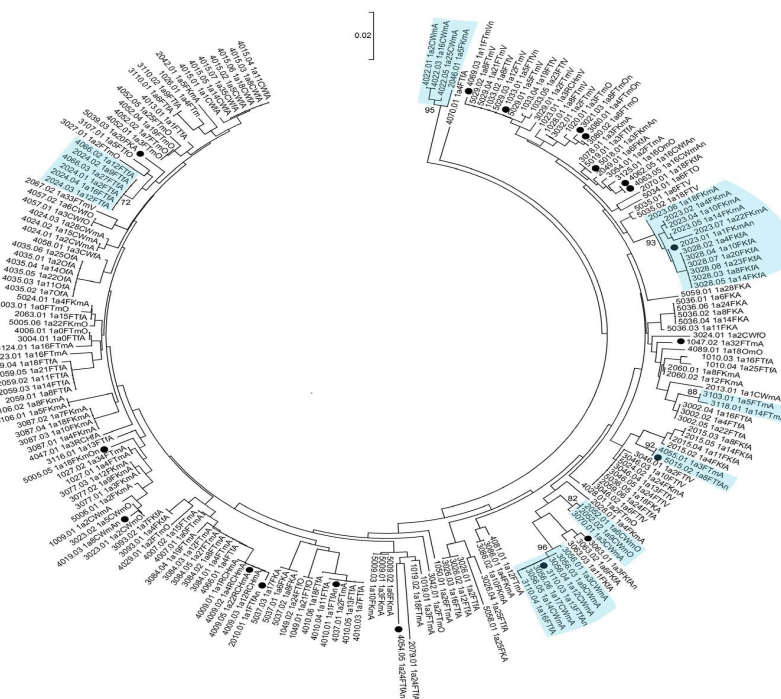
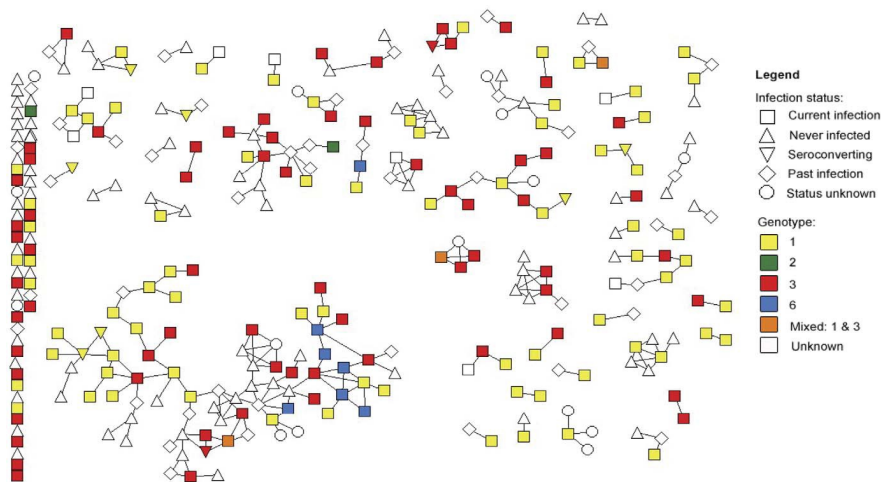
Σύμφωνα με τους Pybus et al, ο υπότυπος 1a έχει την προέλευσή του γεωγραφικά στην Δυτική Αφρική όπου διατηρούσε ένα σταθερό αριθμητικά πληθυσμό, δηλαδή ενδημούσε για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια ακολούθησε εκθετική αύξηση του πληθυσμού που συμπίπτει με την εισαγωγή του σε νέα δίκτυα διάδοσης στο δυτικό κόσμο. Ένα από τα δίκτυα αυτά είναι οι XEN. Η έναρξη της εκθετικής αύξησης τοποθετείται χρονολογικά μεταξύ του 1924 και 1953 και πιθανόν να οφείλεται στην εισαγωγή του ιού στις κοινότητες χρηστών ενδοφλέβιων οπιοειδών κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '50. Η εισαγωγή του υπότυπου 1a στους XEN έγινε με τρία ξεχωριστά γεγονότα μετάδοσης που συμπίπτουν με την αρχή της εκθετικής αύξησης του πληθυσμού του υπότυπου (Εικόνα 20). Η επιδημία του 3a τοποθετείται στις πρώτες δεκαετίες του 20ου αιώνα με άγνωστο δίκτυο διάδοσης υπεύθυνο για την εξάπλωση του ιού. Πιθανολογείται ότι περιελάμβανε ιατρογενή μετάδοση μέσω ενέσεων ή μετακινήσεις πληθυσμών από την Ασία ή διάδοση του ιού σε περιορισμένους πληθυσμούς στον αναπτυσσόμενο κόσμο και επακόλουθη

μετάδοση στην ομάδα των XEN. Παράδειγμα του τελευταίου ενδεχόμενου είναι η χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών από στρατιώτες στον Α' παγκόσμιο πόλεμο και είναι πιθανό ότι συνέβαλε στην πρώιμη διάδοση του HCV. Ο ρυθμός αύξησης κατά την εκθετική φάση της επιδημίας είναι όμοιος και για τους δύο υπότυπους και αντιπροσωπεύει διπλασιασμό του αριθμού των μολύνσεων κάθε 7 χρόνια (Pybus et al., 2005).

Η διάδοση του HCV ανάμεσα στα κοινωνικά δίκτυα των XEN είναι πολύ συχνή όπως έχει αποδειχτεί και με φυλογενετική ανάλυση. Μεταξύ των XEN που πιθανόν μοιράζονται τον ίδιο εξοπλισμό ενέσεων σχηματίζονται μονοφυλετικές συστάδες (Demetriou & Kostrikis, 2011; Pilon et al., 2011; Romano et al., 2010) (Εικόνα 21). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί κλαδοποίηση αλληλουχιών HCV στους XEN με αλληλουχίες από διαφορετική χώρα προέλευσης (Cochrane et al., 2002; Matheï et al., 2008; van Asten et al., 2004). Ειδικότερα, σε δειγματοληψία που έγινε μεταξύ XEN στην περιοχή του Λονδίνου βρέθηκε μεγάλη φυλογενετική διασπορά μεταξύ των HCV στελεχών, υποδεικνύοντας ευρείας κλίμακας ανταλλαγή μεταξύ των ευρωπαίων XEN (van Asten et al., 2004)



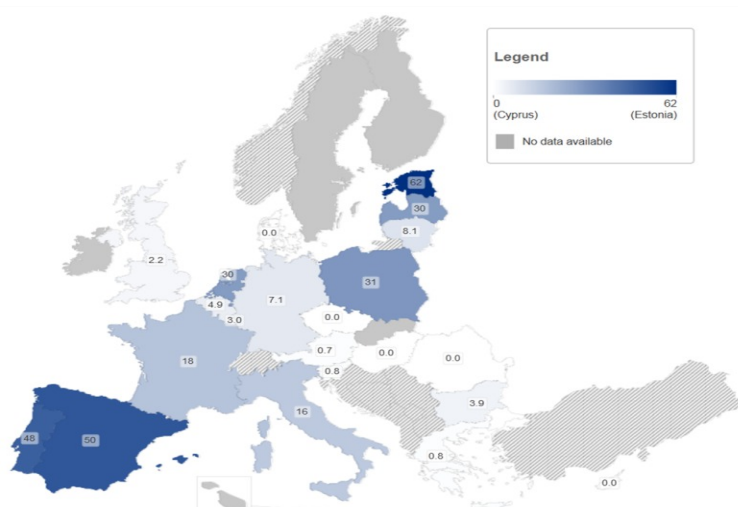
Εικόνα 20. (α) Φυλογενετικό δέντρο για τον υπότυπο 1a από XEN του Ηνωμένου Βασιλείου. (c) Εκτίμηση του αριθμού των αποτελεσματικών μεταδόσεων κατά τη διάρκεια της επιδημίας στην ίδια χρονολογική κλίμακα με το δέντρο. Η διακεκομμένη γραμμή σηματοδοτεί την εκτιμώμενη περίοδο έναρξης της εκθετικής αύξησης της επιδημίας η οποία συμπίπτει με τις 3 διακριτές εισαγωγές του συγκεκριμένου υπότυπου στον πληθυσμό των XEN (μαύρες τελείες).



Εικόνα 21. Κατάσταση χρηστών ως προς την HCV λοίμωξη και το γονότυπο σε ένα κοινωνικό δίκτυο χρηστών και το αντίστοιχο φυλογενετικό δέντρο του υπότυπου 1a όπου επισημαίνονται τα αντίστοιχα φυλογενετικά δίκτυα (Sacks-Davis et al., 2012)

3.2 HIV/HCV συλλοίμωξη

Οι δύο ιοί μοιράζονται κοινή οδό μετάδοσης με αποτέλεσμα 4-5 εκ. άτομα να έχουν προσβληθεί από HIV/HCV συλλοίμωξη παγκοσμίως (WHO, 2014). Στους ΧΕΝ της Ευρώπης ο επιπολασμός κυμαίνεται από 0-70% με διάμεση τιμή 3.9% και τα υψηλότερα ποσοστά να καταγράφονται στην Εσθονία, την Πορτογαλία, την Ισπανία και τη Λετονία (Εικόνα 22). Όπως είναι αναμενόμενο, ο επιπολασμός της συλλοίμωξης είναι υψηλότερος σε περιβάλλοντα με υψηλό επιπολασμό HIV. Η φυσική εξέλιξη της ηπατικής νόσου επηρεάζεται αρνητικά καθώς επιταχύνεται η κίρρωση και η ρήξη της αντιρρόπισης και ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος (Pineda et al., 2005). Επίσης, η ανταπόκριση στην αντιρετροϊκή θεραπεία, η οποία μετρήθηκε έχοντας ως βιολογικό δείκτη τον αριθμό των CD4+ κυττάρων, είναι χειρότερη στους ασθενείς με HIV/HCV συλλοίμωξη σε σύγκριση με τους HIV(+), όπως και η εξέλιξη της HIV λοίμωξης (Law et al., 2004).



Εικόνα 22. Ποσοστά (%) των ΧΕΝ με HIV συλλοίμωξη μεταξύ των HCV(+) στην Ευρώπη (Wiessing et al., 2014).

Η HCV λοίμωξη προηγήθηκε της HIV κατά 20 χρόνια περίπου καθώς τα στελέχη των ιών στα ίδια άτομα δεν παρουσιάζουν παρόμοια φυλογένεια και δε θεωρείται πιθανή ταυτόχρονη μετάδοση των ιών στο ίδιο άτομο στην πλειονότητα των ατόμων (van Asten et al., 2004).

3.3 Πρόληψη της HCV επιδημίας στους XEN

Για τον πρόληψη και τον έλεγχο της επιδημίας στους XEN προτείνονται από τον ΠΟΥ (WHO) και το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου για τα Ναρκωτικά και την Εξάρτηση (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction-EMCDDA)

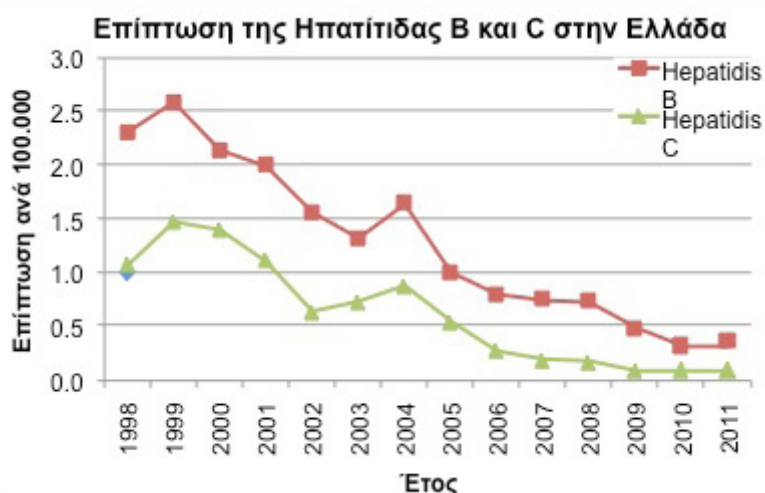
ορισμένα μέτρα παρέμβασης:

- εμβολιασμός των XEN για ηπατίτιδα A, B, τέτανο και γρίπη ή ολοκλήρωση του σχήματος εμβολιασμού
- χορήγηση σύνεργων ενδοφλέβιας χρήσης ναρκωτικών: Παροχή και νόμιμη πρόσβαση, δωρεάν και επαρκής διάθεση αποστειρωμένων βελονών και συριγγών χαμηλού νεκρού χώρου, στο πλαίσιο μίας συνδυασμένης πολύπλευρης προσέγγισης, η οποία εφαρμόζεται μέσω προγραμμάτων μείωσης της βλάβης, υποστήριξης και θεραπείας.
- θεραπεία απεξάρτησης από τα ναρκωτικά ή θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών
- ιατρικές εξετάσεις: Η δυνατότητα προαιρετικής εξέτασης για τον ιο HIV, την ηπατίτιδα C (ηπατίτιδα B για τους μη εμβολιασμένους) και για άλλες λοιμώξεις, όπως η φυματίωση, θα πρέπει να παρέχεται συστηματικά, διασφαλίζοντας την εμπιστευτικότητα των αποτελεσμάτων και με την παραπομπή σε θεραπεία, εάν χρειάζεται.
- θεραπεία λοιμωδών νοσημάτων: Χορήγηση αντιρετροϊκής ή αντιικής αγωγής βάσει κλινικών ενδείξεων στα άτομα που έχουν προσβληθεί από HIV, ηπατίτιδα B ή C.
- στοχευμένη παροχή των υπηρεσιών: Οι υπηρεσίες θα πρέπει να συνδυάζονται, να οργανώνονται και να παρέχονται σύμφωνα με τις ανάγκες των χρηστών και τις τοπικές συνθήκες· αυτό περιλαμβάνει την παροχή υπηρεσιών σε εξωτερικά και σταθερά σημεία όπου θα προσφέρεται θεραπεία, μέτρα ελαχιστοποίησης της βλάβης, συμβουλευτική υποστήριξη και εξετάσεις, καθώς και παραπομπή στις μονάδες πρωτοβάθμιας περίθαλψης και εξειδικευμένων ιατρικών υπηρεσιών. (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2011; WHO, 2014)

Συνδυάζοντας αυτές τις ενδεδειγμένες παρεμβάσεις, ενισχύεται η συνέργεια και η αποτελεσματικότητα στην πρόληψη.

4. Ηπατίτιδα C στην Ελλάδα

Ο ακριβής επιπολασμός της Ηπατίτιδας C στην Ελλάδα δεν είναι γνωστός, αλλά υπολογίζεται στο 2% περίπου, δηλαδή 200,000 άτομα έχουν μολυνθεί από τον ιό, με ευρεία διακύμανση ανά γεωγραφική περιοχή (0.5-10%) (Raptopoulou et al., 2011). Ιδιαίτερα υψηλός επιπολασμός οροθετικότητας έχει καταγραφεί σε περιοχές της ορεινής Ζακύνθου (6.8%), στο Ρέθυμνο Κρήτης (10.9%) και αγροτικές περιοχές της Θεσσαλίας (Gatselis et al, 2007; Goritsas et al., 2000; Lionis et al, 1997). Η μέση ετήσια επίπτωση της ηπατίτιδας C στο γενικό πληθυσμό για τα έτη 1998-2011 είναι 0.62 κρούσματα ανά 100,000 άτομα και για τα έτη 2004 έως 2011 σημείωσε πτωτική τάση (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, 2012) (Εικόνα 23). Σύμφωνα με στοιχεία από την πανελλαδική προοπτική μελέτη HEPNET-Greece (2003-2011) για τη χρόνια ηπατίτιδα C, η πλειονότητα των πασχόντων είναι άνδρες (59.3%) και η διάμεση ηλικία αγγίζει τα 41.3 έτη. Οι μετανάστες αποτελούν το 14.8% των πασχόντων και προέρχονται από χώρες της ανατολικής Ευρώπης, την Αίγυπτο και την Αλβανία (Raptopoulou et al, 2011).



Εικόνα 23. Επίπτωση της Ηπατίτιδας B και C στην Ελλάδα (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, 2012)

Η εξάπλωση της HCV λοίμωξης στην Ελλάδα σχετίζεται κυρίως με παρεντερικούς μηχανισμούς μετάδοσης. Σύμφωνα με την ίδια μελέτη, το 30.7% των ασθενών αναφέρουν χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών και το 22.6% αναφέρει μετάγγιση αίματος πριν το 1992. Άλλες πιθανές αιτίες

μετάδοσης (οδοντιατρικές εργασίες, χειρουργείο, επαγγελματική έκθεση) αναφέρονται στο 10.1%, ενώ στο 36.6% η οδός μετάδοσης παραμένει άγνωστη.

Ο αριθμός των ατόμων που ενίοτε ναρκοτικές ουσίες στην Ελλάδα έχει υπολογιστεί το 2012 στα 20,429, το οποίο μεταφράζεται σε 2.86 ανά 1,000 κατοίκους ηλικίας 15-64 ετών. Όσον αφορά την HCV λοίμωξη, ανευρέθηκαν θετικοί στο αντίσωμα το 60-73% των XEN, ποσοστό που καταγράφηκε στα άτομα που απευθύνθηκαν για θεραπεία. Οι νέες περιπτώσεις ηπατίτιδας C που σχετίζονται με ενδοφλέβια χρήση αρχισαν να αυξάνονται δραματικά από το 1980 και μετά. Στην ευρύτερη περιοχή της Αθήνας το ποσοστό των οροθετικών για το HCV αντίσωμα XEN φτάνει το 80%. Ειδικότερα για το διάστημα 2009-2012 σημειώθηκε μια αύξηση στον επιπολασμό του HCV στους XEN σε σύγκριση με τα δεδομένα του 2008. Η μόλυνση αφορούσε κυρίως XEN ηλικίας κάτω των 25 ετών, με μικρή διάρκεια χρήσης και XEN με παράλληλη χρήση κοκαΐνης (EMCDDA, 2014). Οι σημαντικές αυξήσεις που παρατηρούνται στον επιπολασμό των αντισωμάτων έναντι του HCV στους νεαρούς XEN και στους XEN με πρόσφατο ιστορικό ενέσιμης χρήσης είναι ενδεικτικές της πιθανής αύξησης της επίπτωσης της μόλυνσης με τον ιό σε αυτές τις υποομάδες του πληθυσμού και κατ' επέκταση ενδεικτικές της αύξησης της επίπτωσης της μόλυνσης στο σύνολο του πληθυσμού των χρηστών, δεδομένου ότι οι χρήστες με πρόσφατο ιστορικό ενέσιμης χρήσης έχουν κατά πάσα πιθανότητα μολυνθεί από χρήστες με μακρό ιστορικό χρήσης (Εθνικό Κέντρο Τεκμηρίωσης & Πληροφόρησης για τα Ναρκωτικά, 2013).

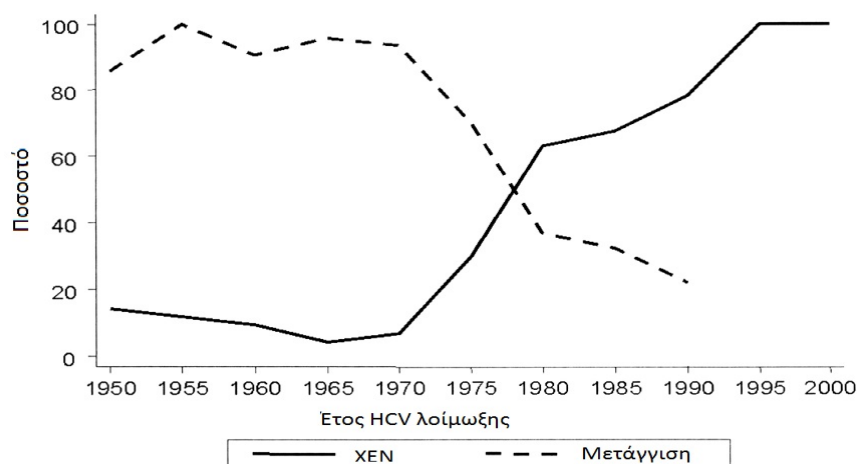
Η αύξηση αυτή σημειώνεται ότι συμπίπτει χρονικά με την επιδημία HIV-1 στους XEN που ξέσπασε τους πρώτους μήνες του 2011 καθώς οι δύο ιοί μοιράζονται κοινή οδό μετάδοσης. Η έξαρση του HIV στους XEN συνδέθηκε με την ανεπαρκή κάλυψη των αναγκών από τις υπηρεσίες θεραπείας υποκατάστασης οπιοειδών και των προγραμμάτων ανταλλαγής συριγγών. Επίσης, η εκτεταμένη οικονομική ύφεση συνέτεινε στο παραπάνω φαινόμενο καθώς οδήγησε σε μαζική πτωχοποίηση, ανεργία, αύξηση των αστέγων ιδιαίτερα στις περιθωριοποιημένες κοινωνικές ομάδες και δημιούργησε αρνητικές συνέπειες για την δημόσια υγεία του γενικού πληθυσμού (Paraskevis et al., 2013)

Η χρόνια ηπατίτιδα C που σχετίζεται με μετάγγιση αίματος ή προϊόντων του έχει μειωθεί σημαντικά κατά τη διάρκεια των δεκαετιών '80 και '90. Ως πιθανά αίτια αναγνωρίζονται η επιβολή της εθελοντικής αποκλειστικά αιμοδοσίας, η αποτελεσματικότερη αδρανοποίηση των ιών από τα προϊόντα αίματος και κυριότερα ο υποχρεωτικός έλεγχος των μονάδων αίματος της αιμοδοσίας με πρωτης γενιάς ανοσοενζυμικές μεθόδους το 1992, δεύτερης και τρίτης γενιάς το 1994 και το 1999 αντίστοιχα και τέλος με μοριακό έλεγχο το 2003. Τα άτομα που ανήκουν σε αυτή την ομάδα κινδύνου φαίνεται να είναι μεγαλύτερα σε ηλικία και να πάσχουν περισσότερα χρόνια από τη λοίμωξη (Raptopoulou et al., 2011).

Όσον αφορά την κατανομή των γονότυπων, ο επικρατέστερος γονότυπος στη χώρα είναι ο γονότυπος 1 και ειδικότερα ο υπότυπος 1b, ακολουθεί ο γονότυπος 3 με αποκλειστική σχεδόν επικράτηση του υπότυπου 3a, στη συνέχεια ο γονότυπος 4 και τέλος ο γονότυπος 2 με ποσοστά 45.1% : 34.0% : 13.9% : 7.0% αντίστοιχα (Raptopoulou et al., 2011). Η κατανομή των γονότυπων του HCV διαφέρει ανάμεσα στις ομάδες κινδύνου, την ηλικιακή ομάδα και το φύλο. Ο υπότυπος 1b κυριαρχεί σε ασθενείς που αναφέρουν μετάγγιση αίματος ως πιθανή οδό μετάδοσης, όπως και σε αυτούς που αναφέρουν νοσηλεία σε νοσοκομείο ή χωρίς άλλο αναγνωρισμένο παράγοντα κινδύνου για HCV λοίμωξη. Στους αιμορροφιλικούς ασθενείς καταγράφεται υψηλός επιπολασμός του γονότυπου 1 (66.3%) που οφείλεται κυρίως σε εισαγωγή μολυσμένων παραγόντων πήξης από τη βόρεια Αμερική όπου οι υπότυποι 1a και 1b είναι οι επικρατέστεροι. Το 55.9% των γυναικών που πάσχουν από HCV λοίμωξη έχουν προσβληθεί από γονότυπο 1, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό των ανδρών είναι 37.8%. Όσον αφορά τους ΧΕΝ που έχουν μολυνθεί από το γονότυπο 1, παρατηρείται ότι επικρατεί ο υπότυπος 1a έναντι του 1b (1a: 15% Vs 1b: 9.4%) (Katsoulidou et al., 2006).

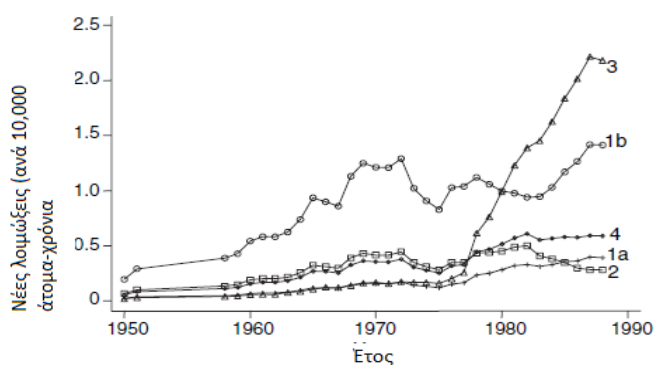
Ο γονότυπος 3 παρουσιάζει διαρκώς αυξανόμενο επιπολασμό τα τελευταία 30 χρόνια στην Ελλάδα. Η έναρξη της εξάπλωσής του συμπίπτει χρονικά με την ευρεία διάδοση της ενδοφλέβιας χρήσης ναρκωτικών ουσιών και κυρίως της ηρωίνης και την κοινή χρήση βελονών από τους χρήστες. Υπολογίζεται ότι 9 / 10 νέες λοιμώξεις μετά το 1992 σχετίζεται με χρήση ενδοφλέβιων ουσιών (Εικόνα 24). Ο γονότυπος 3 ανευρίσκεται στους ΧΕΝ σε ποσοστό 63.3% έναντι 11.7% των μεταγγισμένων. Το 43% του ανδρικού πληθυσμού έχει προσβληθεί από αυτόν έναντι 20.6% του γυναικείου πληθυσμού. Επίσης, τα άτομα που έχουν προσβληθεί από το γονότυπο 3 συνήθως έχουν πιο πρόσφατη λοίμωξη σε σύγκριση με το γονότυπο 1 με διάμεσο χρόνο λοίμωξης 15.2 έτη έναντι 21.1 έτη αντίστοιχα. Η επίπτωση του γονότυπου 3 από το 1970 έως το 1990 έχει 13-πλασιαστεί (Εικόνα 25). Όσον αφορά την κατανομή των γονότυπων με βάση τις ηλικιακές ομάδες, ο γονότυπος

3 ανευρίσκεται συχνότερα σε άτομα κάτω των 25 ετών σε σύγκριση με το γονότυπο 1 (49% έναντι 33.7%) (Raptopoulou et al., 2011). Στο εγγύς μέλλον προβλέπεται να υπάρξει, συνεπώς, σημαντικός αριθμός νέων ασθενών με κίρρωση ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Παρ' όλα αυτά, είναι ενθαρρυντικό το γεγονός ότι τα ποσοστά ανταπόκρισης του γονότυπου 3 στην αντική θεραπεία σε νέους ασθενείς είναι υψηλά.



Εικόνα 24. Κατανομή των τρόπων μετάδοσης του HCV με το χρόνο (Raptopoulou et al., 2011)

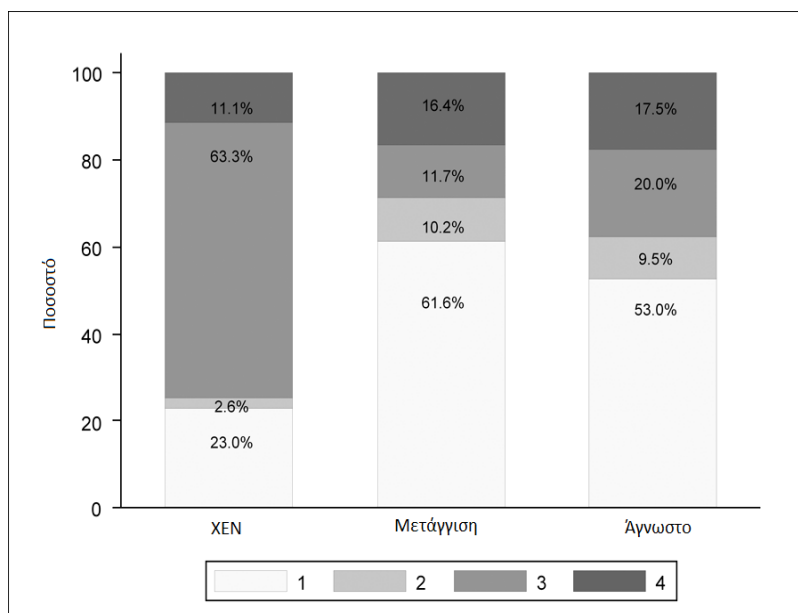
Ο γονότυπος 4 παρουσιάζει σχετικά αυξημένο επιπολασμό (13.9%) στην Ελλάδα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες. Σύμφωνα με φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών του υπότυπου 4a που απομονώθηκαν στην Ελλάδα δεν παρατηρήθηκε τοπολογία τέτοια ώστε να τις ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες αλληλουχίες παγκοσμίως, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν αποτελεί πρόσφατη εισαγωγή στη χώρα. Επίσης, δεν υπάρχει ένδειξη μετάδοσης του συγκεκριμένου υπότυπου σε μορφή δικτύων (Katsoulidou et al., 2006).



Εικόνα 25. Εκτιμώμενη επίπτωση της HCV λοίμωξης (1950-1990) ανά γονότυπο στην Ελλάδα (Katsoulidou et al., 2006).

Η κατανομή των γονότυπων στην ομάδα ασθενών με άγνωστη πηγή μετάδοσης είναι παρόμοια με αυτή της ομάδας που μολύνθηκαν από μετάγγιση (Εικόνα 26). Η ομοιότητα αυτή πιθανόν να υποδηλώνει παρόμοιο μηχανισμό παρεντερικής μετάδοσης. Πράγματι, αξίζει να σημειωθεί ότι η κατάργηση των συριγγών πολλαπλών χρήσεων καταργήθηκε μετά τη δεκαετία του 1970' και μέχρι

τότε η πρακτική αυτή ίσως να προκάλεσε αφανή παρεντερική μόλυνση και διασπορά της ηπατίτιδας C.



Εικόνα 26. Κατανομή των γονοτύπων με βάση την πηγή μόλυνσης (Raptopoulou et al., 2011).

Εν κατακλείδει, διαπιστώθηκαν σημαντικές μεταβολές της κατανομής των γονότυπων της HCV λοίμωξης μέσα στα τελευταία 30 χρόνια στην Ελλάδα, με σημαντική αύξηση του γονότυπου 3 και ελάττωση του γονότυπου 1, ως αποτέλεσμα του τρόπου λοίμωξης (ενδοφλέβια χρήση ουσιών), την ηλικία και τον χρόνο λοίμωξης. Επίσης, διαπιστώθηκε σχετικά μεγάλη συχνότητα γονότυπου 4. Κατά συνέπεια, θα πρέπει να δρομολογηθούν ενέργειες περιορισμού των συμπεριφορών κινδύνου σε μια προσπάθεια ελάττωσης του επιπολασμού της χρόνιας ηπατίτιδας C στους XEN και στην μετάδοση του HCV. Επιπλέον, απαιτείται συστηματική θεραπεία της ηπατίτιδας C στην ομάδα αυτή των ασθενών.

5. Το πρόγραμμα “Αριστοτέλης”

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες HCV χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών που είναι διαθέσιμες στη βάση δεδομένων του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Ρετροϊών (ΕΚΑΡ). Η προέλευση των δεδομένων αυτών είναι από το πρόγραμμα “Αριστοτέλης” («Υπηρεσίες έγκαιρης παρέμβασης σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών και στις υψηλού κινδύνου επαφές τους για την αντιμετώπιση της επιδημικής έκρηξης HIV/AIDS») που αφορούσε πρωτίστως τον HIV. Το πρόγραμμα υλοποιήθηκε στην Αθήνα από το Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, τον ΟΚΑΝΑ και το ΚΕΕΛΠΙΝΟ για την περίοδο 2012-2013. Ο στόχος του προγράμματος είναι η διερεύνηση των επιδημιολογικών, δημογραφικών, συμπεριφορικών, κοινωνικών και ιολογικών χαρακτηριστικών της επιδημίας HIV στους χρήστες ενέσιμων ναρκωτικών στην Αθήνα, η έγκαιρη παρέμβαση στους χρήστες και στο άμεσο περιβάλλον τους (οροθετικοί και οροαρνητικοί), η εκτίμηση του επιπολασμού HIV-1 στους XEN ανά τρίμηνο και η αναστολή της επιδημικής έξαρσης.

Πιο συγκεκριμένα, το πρόγραμμα “Αριστοτέλης” παρεμβαίνει σύμφωνα με τη στρατηγική “seek-test-treat-retain (STTR)” στις κοινότητες των XEN με στόχο τον περιορισμό της μετάδοσης του HIV. Οι XEN της ευρύτερης περιοχής της Αθήνας που συμμετείχαν στο πρόγραμμα ελέγχθηκαν για την HIV-οροθετικότητα, ενημερώθηκαν για θέματα πρόληψης και τους παρασχέθηκε θεραπεία και φροντίδα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της επίπτωσης του HIV στους XEN όπως αποδείχθηκε στο τέλος του προγράμματος. Τα αποτελέσματα του προγράμματος έδωσαν τη δυνατότητα εκτίμησης του επιπολασμού της νόσου. Με το ερωτηματολόγιο που απαντήθηκαν από τους XEN αποσαφηνίστηκαν επιδημιολογικά, συμπεριφορικά, κοινωνικά και ιολογικά χαρακτηριστικά της επιδημίας. Οι XEN που διασυνδέθηκαν για περαιτέρω φροντίδα ελέγχθηκαν για το anti-HCV αντίσωμα και εφόσον βρέθηκαν θετικοί ακολούθησε μοριακός έλεγχος. Τέλος, οι XEN διασυνδέθηκαν με παροχή φροντίδας και βοηθήθηκαν να παραμείνουν σε αυτή χάρη στο πρόγραμμα.

Το πρόγραμμα ολοκληρώθηκε σε 5 χρονικούς κύκλους κατά τη διάρκεια των οποίων συλλέχθηκαν 7,110 ερωτηματολόγια από 3,320 μοναδικά άτομα. Η δειγματοληψία έγινε με “Respondent Driven Sampling” (δειγματοληψία που καθοδηγείται από τον απαντητή). Επιλέγονται, δηλαδή, μη τυχαία ορισμένοι αρχικοί συμμετέχοντες (seeds) και λαμβάνουν μέχρι 3 κουπόνια τα οποία τα διανέμουν σε άλλους XEN για να συμμετέχουν στη μελέτη. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται για αρκετά κύματα μέχρι να δημιουργηθεί μια μακρά αλυσίδα και να

προσεγγιστεί το απαραίτητο μέγεθος δείγματος. Οι συμμετέχοντες λαμβάνουν κίνητρα συμμετοχής στο πρόγραμμα (πρωτογενή) και για κάθε άτομο που θα φέρουν στο πρόγραμμα (δευτερογενή κίνητρα). Κάθε υποψήφιος για συμμετοχή στο πρόγραμμα έδινε ενημερωμένη συγκατάθεση για τη συμμετοχή του σε αυτό. Στη συνέχεια ακολουθούσε συνέντευξη με ερωτηματολόγιο και λήψη δείγματος αίματος για HIV. Στο τέλος, ο χρήστης πληρωνόταν για τη συμμετοχή του, λάμβανε 3 κουπόνια για προσέλκυση άλλων ατόμων και του δίδονταν ενημερωτικά φυλλάδια, σύριγγες και προφυλακτικά. Μετά από 3 ημέρες το άτομο επέστρεφε για τα αποτελέσματα και πληρωνόταν για τα δευτερογενή κίνητρα. Σε περίπτωση που ήταν HIV(+) λάμβανε προτεραιότητα για ένταξη σε πρόγραμμα υποκατάστασης με οπιοειδή και έναρξη αντιρετροϊκής θεραπείας. Η επίπτωση του HIV στους χρήστες μειώθηκε κατά 78% όπως υπολογίστηκε στον τελευταίο κύκλο, εφόσον το χρονικό διάστημα 08/2012-12/2012 υπολογίστηκε σε 7.76 νέες μολύνσεις ανά 100 ανθρωποέτη και το τελευταίο χρονικό διάστημα 08/2013-12/2013 υποχώρησε στις 1.71 νέες μολύνσεις / 100 ανθρωποέτη. Μία άλλη θετική συμβολή του προγράμματος είναι η μείωση της κοινής χρήσης συριγγών μεταξύ των XEN (Sypsa, 2014).

6. Ειδικό Μέρος

6.1 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) αποτελεί έναν μείζονα ανθρώπινο παθογόνο οργανισμό που προκαλεί μεγάλη θνησιμότητα και νοσηρότητα παγκοσμίως. Υπολογίζεται ότι πάνω από 185 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί ανά τον κόσμο και 3-4 εκατομμύρια νέες μολύνσεις συμβαίνουν κάθε χρόνο. Οι πάσχοντες από χρόνια HCV λοίμωξη μπορεί να μολύνθηκαν είτε από μετάγγιση αίματος ή προϊόντων του ή υποβλήθηκαν σε παρεντερική θεραπεία με μη αποστειρωμένες βελόνες. Επιπρόσθετα, εκτεταμένη διασπορά της μόλυνσης καταγράφεται ανάμεσα στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών από το 1960 ή και νωρίτερα στις δυτικές χώρες. Δεδομένης της εισαγωγής αποτελεσματικού ελέγχου των δωρητών αίματος και της αδρανοποίησης των μολυσματικών σωματιδίων στα προϊόντα αίματος, η ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών ουσιών αποτελεί της πρωταρχική αιτία εξάπλωσης της συνεχιζόμενης επιδημίας στον αναπτυσσόμενο κόσμο (Nelson et al., 2012)

Ο αριθμός των ατόμων που ενίοτε ναρκωτικές ουσίες στην Ελλάδα έχει υπολογιστεί το 2012 στα 20,429. Ο επιπολασμός του HCV που καταγράφηκε στο συγκεκριμένο πληθυσμό το 2012 κυμαίνεται από 59.6-73.4%, ενώ τα ποσοστά αυτά αγγίζουν περίπου το 80% στον πληθυσμό των ΧΕΝ της Αττικής (EMCDDA, 2014). Σε σύγκριση με τα προηγούμενα χρόνια, ο επιπολασμός καταδεικνύει αυξητική τάση, ενισχύοντας τις προβλέψεις ότι το φορτίο νόσου από HCV στην Ελλάδα που αφορά κίρρωση ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνο θα αυξηθεί (Sypsa et al., 2004).

Ο HCV κατηγοριοποιείται σε 7 διαφορετικούς γονότυπους και 67 υπότυπους οι οποίοι έχουν διαφορετική κατανομή ανά γεωγραφική περιοχή και ομάδα κινδύνου (Smith et al., 2014). Η τυποποίηση του γονότυπου, εκτός από επιδημιολογικές πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο μετάδοσης του ιού, είναι απαραίτητη και για τη χορήγηση θεραπείας που διαφοροποιείται ανάλογα με το γονότυπο (American Association for the Study of Liver Diseases, 2014b; European Association for the Study of the Liver, 2014). Στους ΧΕΝ της Ευρώπης οι πιο διαδεδομένοι υπότυποι είναι ο 3a και ο 1a, όπως και στην Ελλάδα (Raptopoulou et al., 2011).

Η μελέτη των αλληλουχιών του ιού με μεθόδους μοριακής επιδημιολογίας συμβάλλει στην διερεύνηση της επιδημίας της HCV λοίμωξης. Η φυλογενετική μπορεί να εκτιμήσει τον γονότυπο-υπότυπο των υπαρχόντων στελεχών, την προέλευσή τους, τον τρόπο διασποράς τους, την ημερομηνία της πρώτης εισαγωγής καθώς και το ρυθμό αύξησης μιας επιδημίας.

Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη μεγάλης κλίμακας φυλογενετική ανάλυση βασισμένη σε ελληνικές και παγκόσμιες αλληλουχίες των υποτύπων 1a και 1b, ο πληθυσμός και των δύο υποτύπων παρέμεινε σχετικά μικρός και σταθερός στις αρχές του 20ού αιώνα, ενώ γνώρισε εκθετική αύξηση του πληθυσμού κατά το χρονικό διάστημα 1940 έως 1980 (Magiorkinis et al., 2009). Φυλογενετική ανάλυση έχει πραγματοποιηθεί σε αλληλουχίες του γονότυπου 4 που απομονώθηκαν στην Ελλάδα από την Κατσουλίδου και συν., όπου η τοπολογία τους απέτυχε να διαχωρίσει τα ελληνικά στελέχη από αυτά που κυκλοφορούν στις υπόλοιπες χώρες, αποκλείοντας τη μετάδοση με δίκτυα διασποράς (Katsoulidou et al., 2006). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει δημοσιευμένη μελέτη φυλογεωγραφίας ή φυλοδυναμικής του HCV στους XEN της Ελλάδας.

Η παρούσα εργασία εστιάζει στη φυλογενετική ανάλυση των υποτύπων 1a και 3a που απομονώθηκαν σε XEN στην Ελλάδα. Όπως έχει αναφερθεί, οι γονότυποι 1 και 3 ανευρίσκονται σε ποσοστό πάνω από 80% ανάμεσα στους XEN που μολύνθηκαν από ηπατίτιδα C στην Ελλάδα (Εικόνα 26). Μελετήθηκε η γενετική ετερογένεια των υποτύπων 1a και 3a και ειδικότερα της περιοχής NS5B' του γονιδιώματος του ιού σε μια κοορτή XEN στην περιοχή της Αττικής και αναπαραστάθηκε η εξελικτική ιστορία των κυκλοφορούντων στελεχών με τη χρήση φυλογενετικών δέντρων.

Η ανάλυση των αλληλουχιών με μεθόδους μοριακής επιδημιολογίας αποτελεί μια εκτίμηση της ιστορίας της επιδημίας κυκλοφορούντων στελεχών HCV στην ομάδα κινδύνου των ενδοφλέβιων χρηστών (XEN) στην Ελλάδα.

6.2 Μέθοδοι

6.2.1. Δείγματα Μελέτης

Ένα σύνολο 238 δειγμάτων ολικού αίματος από XEN συλλέχθηκε από εξειδικευμένο προσωπικό του Οργανισμού Κατά των Ναρκωτικών (OKANA) και του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ), στα πλαίσια του προγράμματος «Αριστοτέλης». Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από τον Αύγουστο του 2012 έως τον Μάιο του 2013. Από τη μελέτη εξαιρέθηκαν οι ασθενείς που βρέθηκαν οροθετικοί για HIV λοίμωξη. Στη συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία στο Εργαστήριο Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών όπου φυγοκεντρήθηκαν και το πλάσμα φυλάχθηκε στους -80°C μέχρι τη χρήση του. Ακολούθησε απομόνωση του ιικού RNA, PCR αντίστροφης μεταγραφής και διπλή PCR. Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση της αλληλουχίας του ιού και κατασκευάστηκαν τα φυλογενετικά δέντρα για τους υπότυπους 1a και 3a, με βάση τα οποία προσδιορίστηκε ο τρόπος διασποράς της HCV λοίμωξης ανά υπότυπο.

6.2.2. Απομόνωση ιικού RNA, PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

Για την απομόνωση του ιικού RNA χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο πρωτόκολλο (kit) “QIAamp Viral RNA Mini Kit” της εταιρείας Qiagen και ακολουθήθηκε η διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το ιικό RNA αποθηκεύτηκε στους 4°C μέχρι τη χρήση του. Στη συνέχεια ακολούθησε PCR αντίστροφης μεταγραφής ώστε το ιικό RNA να μετατραπεί σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Το cDNA αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι τη χρήση του.

6.2.3. Σχεδιασμός των εκκινήτων, Μη-εμπορικά διαθέσιμη διπλή PCR (In house nested PCR), Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων HCV Los Alamos Database (<http://hcv.lanl.gov/content/index>), επιλέχθηκαν συντηρημένες περιοχές του ιού HCV και φυλογενετικά πληροφοριακές, ώστε να γίνει ο σχεδιασμός των εκκινήτων. Ο σχεδιασμός των

εκκινητών έγινε με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Laser Gene (Primer Select). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7) συνοψίζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν:

Πίνακας 7. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν. Το όνομα του εκκινητή αντιστοιχεί στη νουκλεοτιδική θέση που αντιπροσωπεύει στο γονιδίωμα του HCV.

Όνομα εκκινητή	Περιοχή αναγνώρισης
8253-8281	Πολυμεράση (NS5B)
8616-8645	Πολυμεράση (NS5B)
8245-8275	Πολυμεράση (NS5B)
8611-8640	Πολυμεράση (NS5B)

Στη συνέχεια το cDNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την Taq πολυμεράση, η οποία παρουσία 2 ειδικών εκκινητών (8253-8281, 8616-8645) δημιούργησε δίκλωνο cDNA. Πραγματοποιήσαμε διπλή PCR σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για να αυξηθεί η ειδικότητα της αντίδρασης (“Kapa Taq HotStart PCR Kit” της εταιρείας KAPA Biosystems, 10mM dNTP Set της εταιρείας Invitrogen). Αφού είχε ήδη ενισχυθεί το DNA, με την τεχνική αυτή ενισχύθηκε επιλεκτικά τμήμα του γονιδιώματος με χρήση κατάλληλων εκκινητών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της PCR (“PureLink PCR Purification Kit” της εταιρείας Invitrogen).

6.2.4. PCR αλληλούχισης (Sequencing PCR)

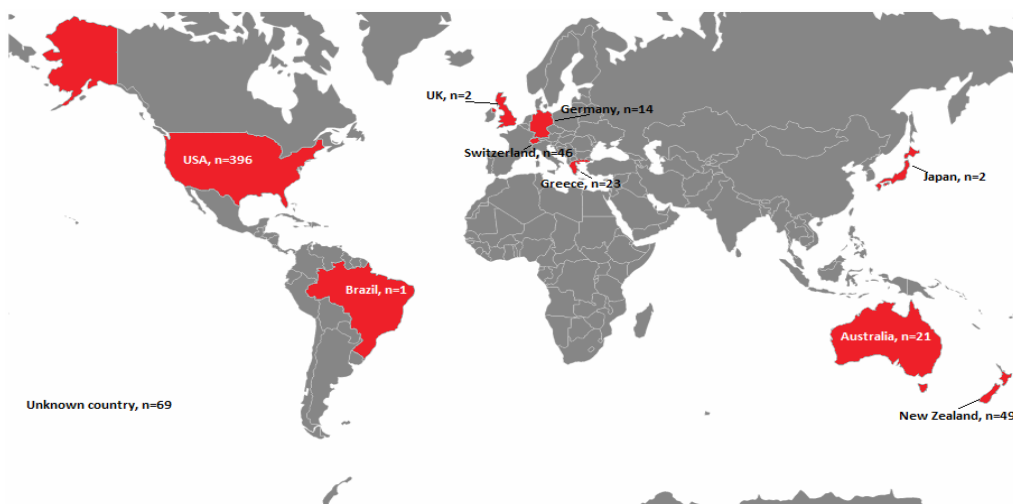
Για την PCR αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκε το έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” της εταιρείας Applied Biosystems και το καθαρισμένο προϊόν της προηγούμενης PCR. Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές της διπλής PCR ειδικοί για την περιοχή NS5B. Τέλος, το DNA αποδιατάχθηκε με θέρμανση στους 95°C για 2min και τοποθετήθηκε στον αναλυτή ABI 3500xL προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αλληλούχιση.

6.2.5. Φυλογενετική ανάλυση

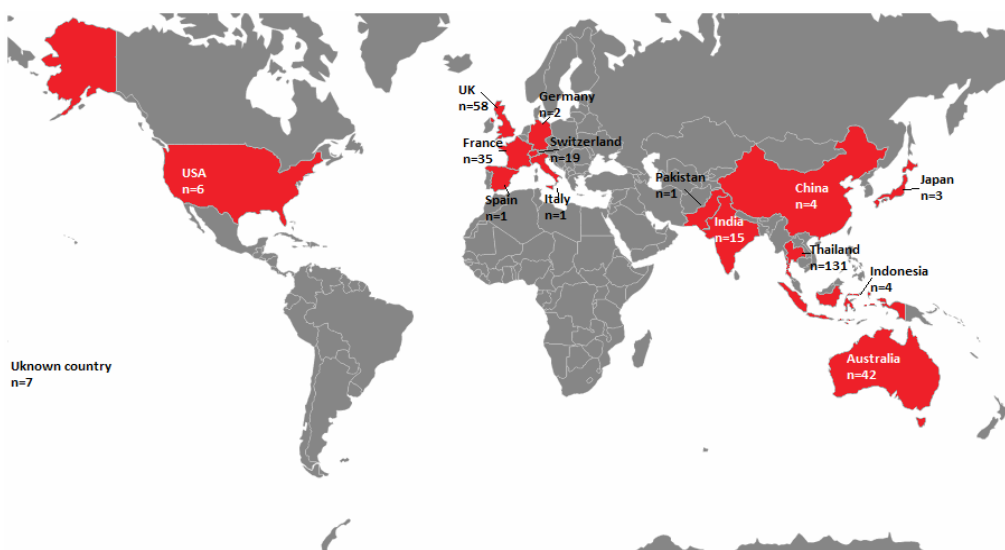
Μετά την αλληλούχιση, τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση των υπολογιστικών προγραμμάτων SeqVerter και Lasergene Seqman. Αφού έγινε η απαραίτητη διόρθωση των αλληλουχιών, οι αλληλουχίες αποθηκεύτηκαν με τη μορφή FASTA. Από τα δείγματα

χρησιμοποιήθηκαν μόνο αυτά με υπότυπο 1a (n=49) και 3a (n=132). Τα δείγματα με υπότυπο 1b (n=12), 2 (n=1), 4 (n=29) θεωρήθηκαν ανεπαρκή για φυλογενετική ανάλυση.

Για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου αναζητήθηκαν στη βάση αλληλουχιών HCV Los Alamos (<http://hcv.lanl.gov/>) όλες οι διαθέσιμες αλληλουχίες της περιοχής του γονιδιώματος NS5B για τον υπότυπο 1a και 3a. Αποθηκεύτηκαν 623 και 329 αλληλουχίες για τον 1a και 3a αντίστοιχα από διάφορες χώρες προέλευσης (Εικόνα 27, 28). Ακολούθησε στοίχιση των αλληλουχιών του δείγματος (alignment) με ομόλογες περιοχές των αλληλουχιών αναφοράς, με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA: Molecular Evolutionary Genetic Analysis 5.0. Οι στοιχισμένες πλέον αλληλουχίες υπέστησαν κατάλληλη επεξεργασία ώστε να είναι δυνατή η κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου με χρήση του προγράμματος PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony.4.0 Beta.



Εικόνα 27. Παγκόσμιος χάρτης όπου σημειώνονται οι χώρες προέλευσης 623 αλληλουχιών αναφοράς και ο αριθμός αλληλουχιών από κάθε χώρα (n) για τον υπότυπο 1a.



Εικόνα 28. Παγκόσμιος χάρτης όπου σημειώνονται οι χώρες προέλευσης 329 αλληλουχιών αναφοράς και ο αριθμός αλληλουχιών από κάθε χώρα (n) για τον υπότυπο **3a**.

Οι αριθμοί πρόσβασης (accession number) των αλληλουχιών αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για τα δέντρα είναι οι εξής για τον 1a: EU781810, GQ848857, GQ848858, GQ848859, GQ848860, GQ848861, GQ848862, GQ848863, GQ848864, GQ848865, GQ848866, GQ848867, GQ848868, GQ848869, GQ848870, GQ848871, GQ848872, GQ870586, GQ870587, GQ870588, GQ870590, GQ870593, GQ870594, GQ870595, GQ870596, GQ870597, GQ870598, GQ870600, GQ870601, GQ870602, GQ870603, GQ870604, GQ870606, GQ870607, GQ870608, GQ870609, GQ870610, GQ870611, GQ870612, GQ870613, GQ870614, GQ870615, GQ870616, GQ870617, GQ870618, EU781823, JX437205, JX437220, JX437221, JX437224, JX437231, JX437232, JX437233, JX437236, JX437237, JX437241, JX437242, JX437245, JX437254, JX437255, JX437259, JX437261, JX437268, JX437269, JX437270, JX437273, JX437274, EF032886, EU482854, EU155345, EU482855, EU482856, EU255954, EU255955, EU255927, EU255943, EU255944, EU255948, EU255928, EU256070, EU155350, EU155351, EU660385, EU255956, EU255959, EU255945, EU255929, EU256071, EU255957, EU482872, EU155352, EU255946, EU482853, EU255949, EU155346, EU255930, EU256072, EU155347, EU155348, EU255950, EU255951, EU155349, EU255952, EU529681, EU482857, EU256074, EU255958, EU155353, EU155354, EU255947, EU256069, EU255953, EU155355, EU482858, KC844049, AF290978, EU862823, EU482831, EU155378, EU862832, EU482873, EU155379, EU687194, EU256106, EU482832, EU155380, EU256107, EU862834, EU687193, EU687195, EU781821, EU781815, EU781820, EU781812, EU781817, EU781807, EU781814, EU781808, EU781824, EU781822, EU781818, EU781811, AB520610, AJ278830, D10749, AF511948, AF511949, AF511950, JX437195, JX437196, JX437197, JX437198, JX437199, JX437200, JX437202, JX437203, JX437204, JX437206, JX437207, JX437208, JX437211, JX437212, JX437213, JX437214, JX437215, JX437217, JX437218, JX437223, JX437225, JX437226, JX437227, JX437228, JX437229, JX437230, JX437243, JX437244, JX437246, JX437248, JX437249, JX437251, JX437252, JX437253, JX437257, JX437258, JX437260, JX437262, JX437263, JX437264, JX437265, JX437266, JX437271, JX437272, JX437275, JX437277, JX437278, JX437279, JX437280, AF271632, EU781816, EU781819, EU781813, EF407412, EF407457, EF407432, EU362876, EF407428, EU362877, EF407437, EF407441, AF009606, AF011751, AF011752, AF011753, NC004102, M67463, EU255968, EU155342, EU255986, EU255987, EU255991, EU569722,

EU482852, EU482850, EU255965, EU155339, EU862839, EU482889, EU255973, EU234064, EU255980, EU255981, EU255982, EU255983, EU255984, EU255989, EU234065, EU155344, EU155340, EU255977, EU255978, EU255979, EU255985, EU255963, EU255964, EU255969, EU255970, EU234063, EU255974, EU255976, EU155341, EU255990, EU255992, EU255975, EU255988, EU155338, EU155343, EU255966, EU255967, EU781767, EU781763, EU781773, EU781785, EU781770, EU781753, EU781772, EU781771, EU781749, EU781797, EU781776, EU781802, EU781779, EU781748, EU781746, EU781781, EU781747, EU155312, EU482846, EU781788, EU781793, EU781799, EU781796, EU781798, EU255998, EU256087, EU155216, EU239713, EU155284, EU155285, EU155286, EU155287, EU256096, EU155289, EU256097, EU155290, EU155292, EU155293, EU256044, EU155320, EU155321, EU155322, EU256053, EU595698, EU256105, EU595697, EU250017, EU256019, EU256019, EU595699, EU256028, EU256029, EU781751, EU781800, EU781787, EU781794, EU781795, EU781786, EU781782, EU781804, EU781789, EU255999, GQ149768, EU155288, EU155291, EU155294, EU482876, EU155295, EU155296, EU155297, EU155298, EU482834, EU155319, EU482835, EU155323, EU239716, EU155276, EU256008, EU256010, EU482836, EU256018, EU482887, EU482868, EU482869, EU155241, EU529679, EU482871, EU256025, EU529680, EU256095, EU256026, EU256030, JX463540, EU781803, EU781752, EU781783, EU781750, EU781768, EU781777, EU781774, EU781790, EU781760, EU781780, EU255996, EU255931, EU255997, EU256086, EU255933, EU155299, EU155309, EU862840, EU155311, EU155313, EU239715, EU155277, EU482865, EU862841, EU256020, EU256021, EU256022, EU256023, EU660387, EU256056, EU256027, EU255938, EU155245, EU256032, EU155246, JX463563, JX463547, JX463549, JX463574, EU660383, EU155213, EU255993, EU155215, EU255995, EU260396, EU862828, EU256039, EU482837, EU256040, EU482878, EU155310, EU482884, EU482840, EU482841, EU529676, EU155314, EU256009, EU256011, EU482847, EU256013, EU155239, EU256014, EU256015, EU155240, EU155242, EU256094, EU482870, EU256035, EU256036, EU256037, EU256038, JX463550, EF407452, EU260395, EU255994, EU155214, EU255932, EU569723, EU155247, FJ024282, EU256041, EU256043, EU155265, EU256051, EU256104, EU482843, EU256004, EU660384, EU256017, EU529678, EU256058, EU155243, EU155244, EU482848, EU256033, JX463616, JX463596, JX463599, JX463627, FJ205869, EU862830, EU155248, EU155249, EU155250, EU155251, EU256060, EU482838, EU155252, EU482842, EU155266, EU155267, EU256046, EU256047, EU256048, EU256049, EU155268, EU256050, EU155269, EU155270, EU862831, EU155271, EU256067, EU256052, EU155272, EU256068, EU155273, EU155274, EU255939, EU155275, EU482882, EU256002, EU255940, EU482844, EU155278, EU482845, EU256003, EU155233, EU482861, EU155236, EU256005, EU256006, EU255934,

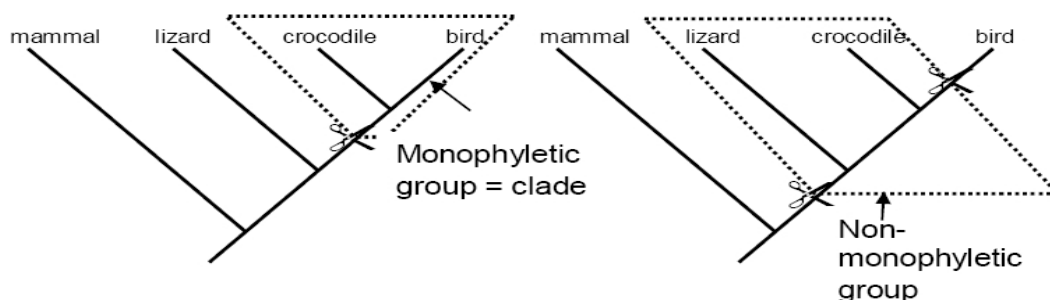
EU482862, EU482863, EU155237, EU482864, EU482866, EU482867, EU256007, EU255936, EU256012, EU529677, EU155282, EU255941, EU155283, EU255937, EU256057, EU256024, EU256031, EU256034, JX463634, JX463611, FJ024087, FJ181999, FJ024274, FJ024275, FJ205867, FJ024276, FJ182000, FJ024278, FJ205868, FJ182001, FJ024280, FJ024281, FJ390399, EU255935, EU155238, EU255942, JX463640, FJ390394, FJ410172, FJ390395, EF407434, EU362901, EF407449, EF407431, EU362882, EF407415, EF407456, EF407453, EU362884, EF407417, EF407419, EF407445, EF407413, EF407435, EU362886, EF407411, EF407422, EF407450, EU362887, EF407427, EF407444, EF407454, EF407425, EF407440, EF407438, EU362892, EF407414, EF407418, EF407443, EF407436, EF407451, EU362895, EF407433, EU362896, EF407455, EU362897, EF407439, EF407447, EF407446, EF407442, EU362898, EF407423, EF407421, EF407426, EU781764, EU781792, EU781765, EU781754, EU781758, EU781762, EF621489, M62321 , EU781775, EU781757, EU781761, EU781766, EU781759, EU781756, EU781791, EU781784, EU781801, EU781778, EU781769, EU781755, EU781805, EU781806, EU482836, FJ538017, FJ538018, FJ538019, FJ538020, FJ538021, FJ538022, FJ538024, FJ538025, FJ538026, FJ538027, FJ538028, FJ538029, FJ538030, FJ538031, FJ538032, FJ538033, FJ538034, FJ538035, FJ538036, FJ538037, FJ538038, FJ538040, FJ538041 και για τον 3a: AB792683, AB792683, AB691596, AB691595, AB691598, AB691597, EU710339, EU710332, EU710344, EU710436, EU710342, EU710347, EU710337, EU710349, EU710341, EU710353, EU710348, EU710434, EU710340, EU710448, EU710449, EU710450, EU710451, EU710452, EU710453, EU710454, EU710455, EU710456, EU710457, EU710351, EU710458, EU710459, EU710460, EU710461, EU710462, EU710463, EU710439, EU710440, EU710441, EU710442, EU710443, EU710333, EU710438, EU710444, EU710445, EF189902, EF189901, AF046866 , HC494001 , DQ437509 , EU710355 , EU710366, EU710367, EU710354, EU710360, EU710368, EU710371, EU710372, EU710374, EU710376, EU710377, EU710378, EU710379, EU710380, EU710381, EU710385, EU710386, EU710375, HQ912953, JX677482, HQ639942, HQ639941, X76918 , X79820, HM107694, FJ872293, FJ872284, FJ872285, FJ872286, FJ872287, FJ872288, FJ872289, FJ872290, FJ872291, FJ872292, FJ872294, FJ872295, FJ872296, FJ872281, FJ872282, FJ872283, FJ872272, FJ872273, FJ872274, FJ872275, FJ872276, FJ872277, FJ872278, FJ872279, FJ872280, GQ356216 , GQ356204 , GQ356200, GQ356212, GQ356201, GQ356211, GQ356213, GQ356214, GQ356215, GQ356217, GQ356202, GQ356203, GQ356205, GQ356206, GQ356207, GQ356208, GQ356209, GQ356210, EU710396, EU710429 , EU710430, EU710397, EU710407, EU710410, EU710418, EU710419, EU710425, EU710403, EU710391, EU710427, EU710428, EU710389, EU710404, EU710405, EU710406, EU710408, EU710412, EU710413, EU710416, EU710417, EU710420, EU710421, EU710390, EU710423, EU710424, EU710426,

EU710431, EU710392, EU710393, EU710394, EU710398, EU710399, EU710401, EU710388, EU710415, EU710414, EU710400, EU710402, AB714166, AB714166, AB714165, AB714165, GQ275355, JQ717260, JQ717255, JQ717254, JN714194, KF035123, JQ717256 JQ717257, JQ717258, JQ717259, KF035124, KF035125, KF035126, KF035127, HQ738645, GU814263, D28917, D17763, NC009824, AM423012, AM423012, AM423013, AM423014, AM423015, AM423016, AM423017, AM423018, AM423011, AM423011, HM135520, HQ229580, HQ229585, HQ229464, HQ229455, HQ229515, HQ229333, HQ229428, HQ229335, HQ229354, HQ229561, HQ229562, HQ229563, HQ229564, HQ229581, HQ229583, HQ229584, HQ229585, HQ229586, HQ229587, HQ229355, HQ229588, HQ229589, HQ229592, HQ229593, HQ229594, HQ229595, HQ229596, HQ229597, HQ229598, HQ229599, HQ229359, HQ229600, HQ229601, HQ229602, HQ229603, HQ229360, HQ229362, HQ229363, HQ229364, HQ229366, HQ229367, HQ229368, HQ229336, HQ229370, HQ229373, HQ229375, HQ229378, HQ229381, HQ229382, HQ229383, HQ229388, HQ229389, HQ229390, HQ229337, HQ229391, HQ229395, HQ229401, HQ229403, HQ229405, HQ229406, HQ229407, HQ229412, HQ229417, HQ229418, HQ229339, HQ229421, HQ229429, HQ229431, HQ229435, HQ229436, HQ229437, HQ229444, HQ229447, HQ229448, HQ229449, HQ229340, HQ229452, HQ229457, HQ229458, HQ229460, HQ229466, HQ229468, HQ229471, HQ229472, HQ229473, HQ229474, HQ229342, HQ229476, HQ229478, HQ229480, HQ229481, HQ229482, HQ229486, HQ229487, HQ229488, HQ229489, HQ229494, HQ229343, HQ229495, HQ229497, HQ229500, HQ229503, HQ229504, HQ229507, HQ229510, HQ229511, HQ229512, HQ229513, HQ229348, HQ229518, HQ229522, HQ229523, HQ229524, HQ229526, HQ229527, HQ229529, HQ229537, HQ229539, HQ229540, HQ229352, HQ229547, HQ229549, HQ229550, HQ229551, HQ229552, HQ229553, HQ229555, HQ229557, HQ229559, HQ229560, HQ229590, DQ430819, AY689327, DQ430820, EF523598, EF523597, AY973861.

Ο υπολογισμός των γενετικών αποστάσεων εκτιμήθηκε σύμφωνα με το εξελικτικό μοντέλο νουκλεοτιδικής αντικατάστασης GTR (general time reversible). Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων για τους 2 υπότυπους έγινε με τον αλγόριθμο Neighbour-Joining με κριτήριο τη γενετική απόσταση. Τα φυλογενετικά δέντρα οπτικοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος FigTree v1.4.1.

6.2.6. Εύρεση μονοφυλετικών ομάδων

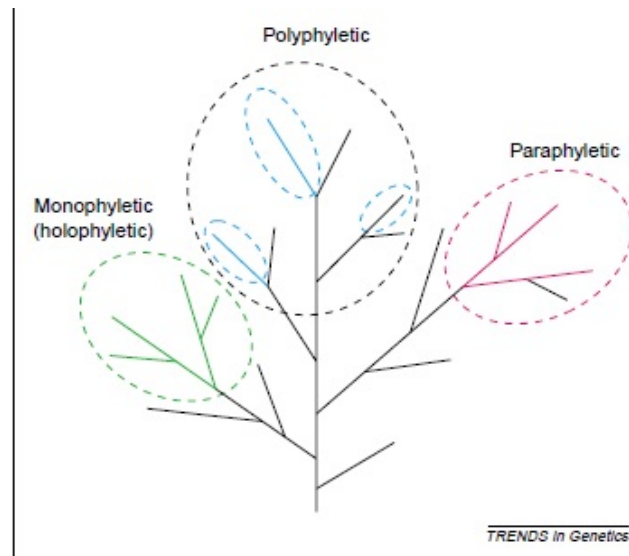
Μια μονοφυλετική ομάδα ή ένας κλάδος είναι ένα τμήμα του φυλογενετικού δέντρου που αποτελείται από έναν προγονικό κόμβο και όλους τους απογόνους από τον πρόγονο αυτό. Χαρακτηριστικό ενός κλάδου είναι η δυνατότητα αποκοπής του από το δέντρο με μια μοναδική νοητή “αποκοπή” και αποτελείται από τουλάχιστον 2 αλληλουχίες (Εικόνα 29, 30). Ο σχηματισμός μονοφυλετικών ομάδων από τις αλληλουχίες του δείγματος της μελέτης είναι ενδεικτικός μετάδοσης σε δίκτυα XEN, δηλαδή τα άτομα αυτά, πιθανόν, να μολύνθηκαν από κοινή πηγή. Στην παρούσα εργασία θεωρήσαμε ως μονοφυλετικές ομάδες τους κλάδους του φυλογενετικού δέντρου με ποσοστό αλληλουχιών >75% από το δείγμα μας. Αφού τις εντοπίσαμε σε κάθε δέντρο, υπολογίστηκε το ποσοστό μονοφυλετικότητας ως το πηλίκο του αριθμού των αλληλουχιών που ανήκουν σε μονοφυλετικές ομάδες προς το συνολικό αριθμό αλληλουχιών.



Εικόνα 29. Μονοφυλετική ομάδα και Μη-μονοφυλετική ομάδα

(Πηγή: <http://www.nature.com/scitable/resource?>

[action=showFullImageForTopic&imgSrc=/scitable/content/33730/Baum1_F4_FULLL.jpg](http://www.nature.com/scitable/resource?))



Εικόνα 30. Φυλογενετικό δέντρο όπου αναπαριστάται μονοφυλετική, πολυφυλετική και παραφυλετική ομάδα (Baldauf, 2003).

6.2.7. Στατιστική Ανάλυση

Για κάθε χρήστη γνωρίζαμε ορισμένα δημογραφικά χαρακτηριστικά (ηλικία, φύλο) καθώς και ηλικία έναρξης της ενδοφλέβιας χρήσης. Όσες από τις μεταβλητές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή περιγράφηκαν με τη διάμεσο και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR).

Χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney για τον έλεγχο της συσχέτισης της μετάδοσης μέσω μονοφυλετικών δικτύων και των υπόλοιπων χαρακτηριστικών των χρηστών. Η συσχέτιση της μετάδοσης του ιού μέσω μονοφυλετικών δικτύων, όπως υπολογίστηκε από την προηγούμενη φυλογενετική ανάλυση, με το γονότυπο του ιού υπολογίστηκε με το χ^2 τεστ.

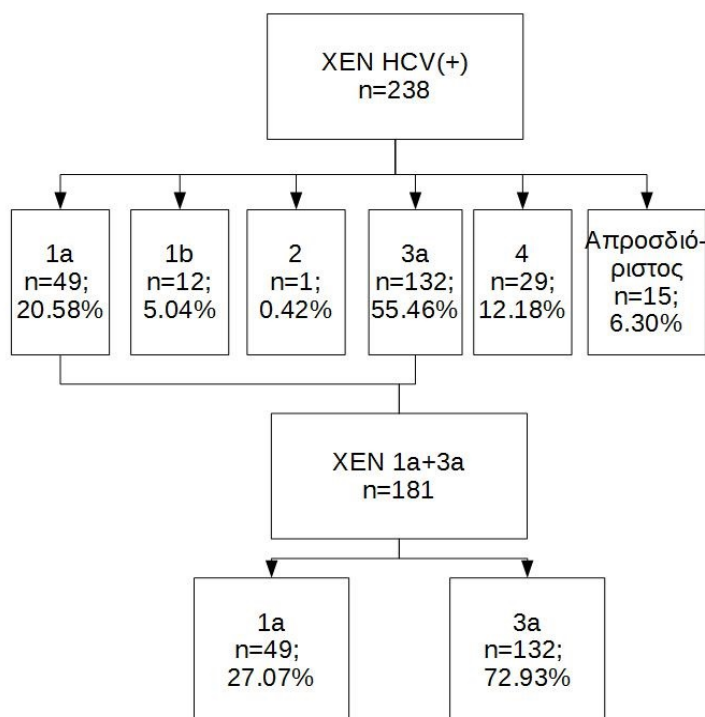
Ακολούθησε, τέλος, πολυμεταβλητή ανάλυση με τη χρήση της λογιστικής παλινδρόμησης. Ως εξαρτημένη μεταβλητή θεωρήσαμε τη μετάδοση ή όχι μέσω μονοφυλετικής ομάδας και εξετάσαμε την επίδραση των υπόλοιπων ανεξάρτητων μεταβλητών στον τρόπο μετάδοσης του ιού. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του Stata 12.0.

6.3 Αποτελέσματα

Όσον αφορά την κατανομή των γονότυπων και υπότυπων του αρχικού δείγματος, ο υπότυπος 3a είναι ο επικρατέστερος (55.46%) και ακολουθούν ο 1a (20.58%), ο γονότυπος 4, ο υπότυπος 1b και τέλος ο γονότυπος 2 (Πίνακας 8). Ο αριθμός των αλληλουχιών των γονότυπων 2, 4 και του υπότυπου 1b κρίθηκε ανεπαρκής για περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση και εστιάσαμε στον 3a και 1a που αποτελούν >75% των αλληλουχιών του δείγματος (Εικόνα 31).

Πίνακας 8. Κατανομή γονότυπων και υπότυπων HCV αρχικού δείγματος XEN στην περιοχή της Αττικής.

Γονότυπος HCV	n (%)
1a	49 (20.58)
1b	12 (5.04)
2	1 (0.42)
3a	132 (55.46)
4	29 (12.18)
Απροσδιόριστος	15 (6.3)
Σύνολο	238 (100)



Εικόνα 31. Διάγραμμα ροής συμμετεχόντων στη μελέτη.

Τα βασικά δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών στους οποίους απομονώθηκαν οι υπότυποι 1a και 3a φαίνονται στον Πίνακα 9. Σε 132 ασθενείς (72.9%) ανευρέθηκε ο υπότυπος 3a και σε 49 (27.1%) ο 1a. Οι δύο ομάδες ασθενών είχαν παρόμοια δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά και το ανδρικό φύλο ήταν επικρατέστερο (87.29%). Η χρονολογίες έναρξης χρήσης που καταγράφηκαν είναι από το 1974 έως το 2012 με την πλειονότητα (56.91%) των χρηστών να αναφέρουν ότι ξεκίνησαν ενδοφλέβια χρήση το χρονικό διάστημα 1986-2000.

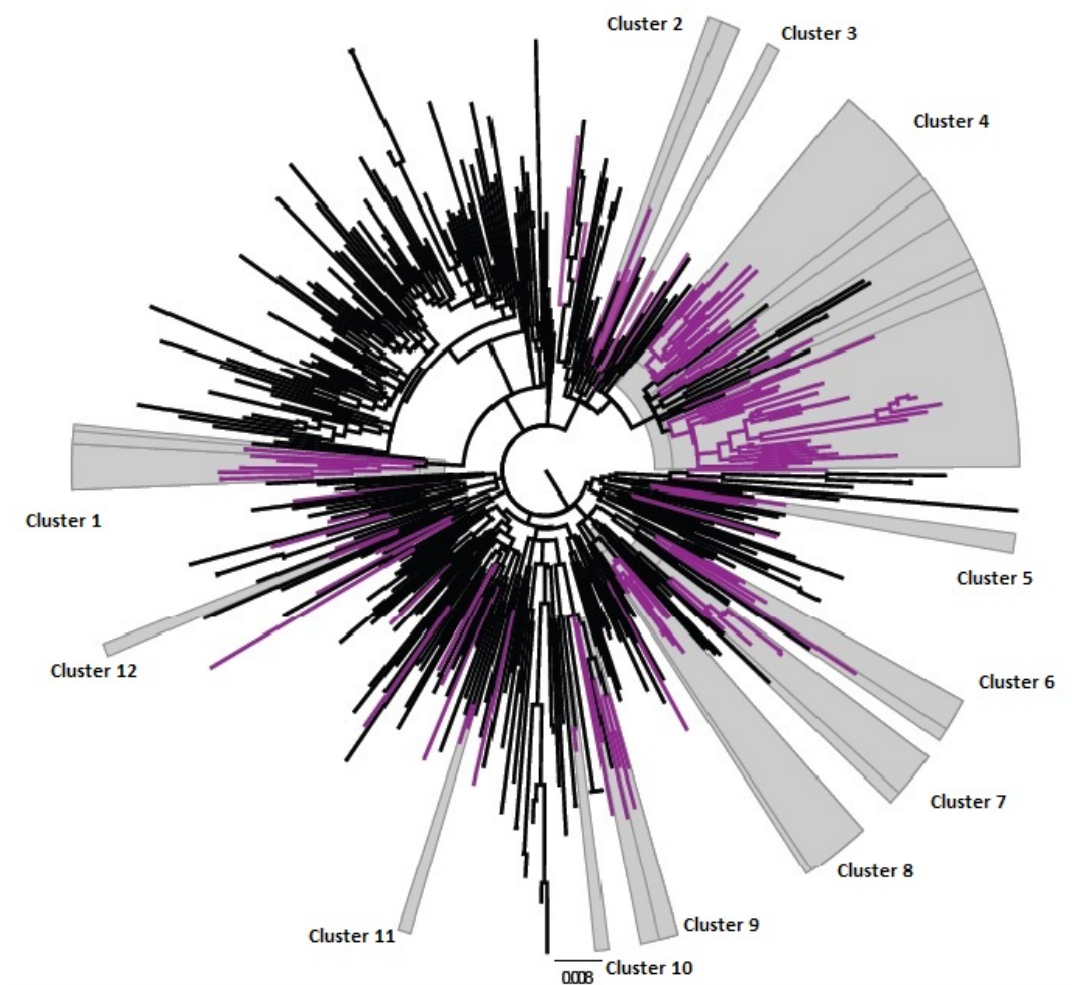
Πίνακας 9. Δημογραφικά στοιχεία ΧΕΝ ανά υπότυπο HCV

	Υπότυποι HCV	
	1a (n=49)	3a (n=132)
Φύλο, Άνδρες (%)	43 (87.76)	115 (87.12)
Ηλικία σε έτη, διάμεσος (IQR)	35 (30,40)	36 (31,43.5)
Διάρκεια χρήσης σε έτη, διάμεσος (IQR)	15 (8,21)	15 (10,20.5)
Χρονολογία έναρξης χρήσης (%):		
<1985	4 (21.05)	15 (78.95)
1986-2000	30 (29.13)	73 (70.87)
>2000	15 (25.42)	44 (74.58)

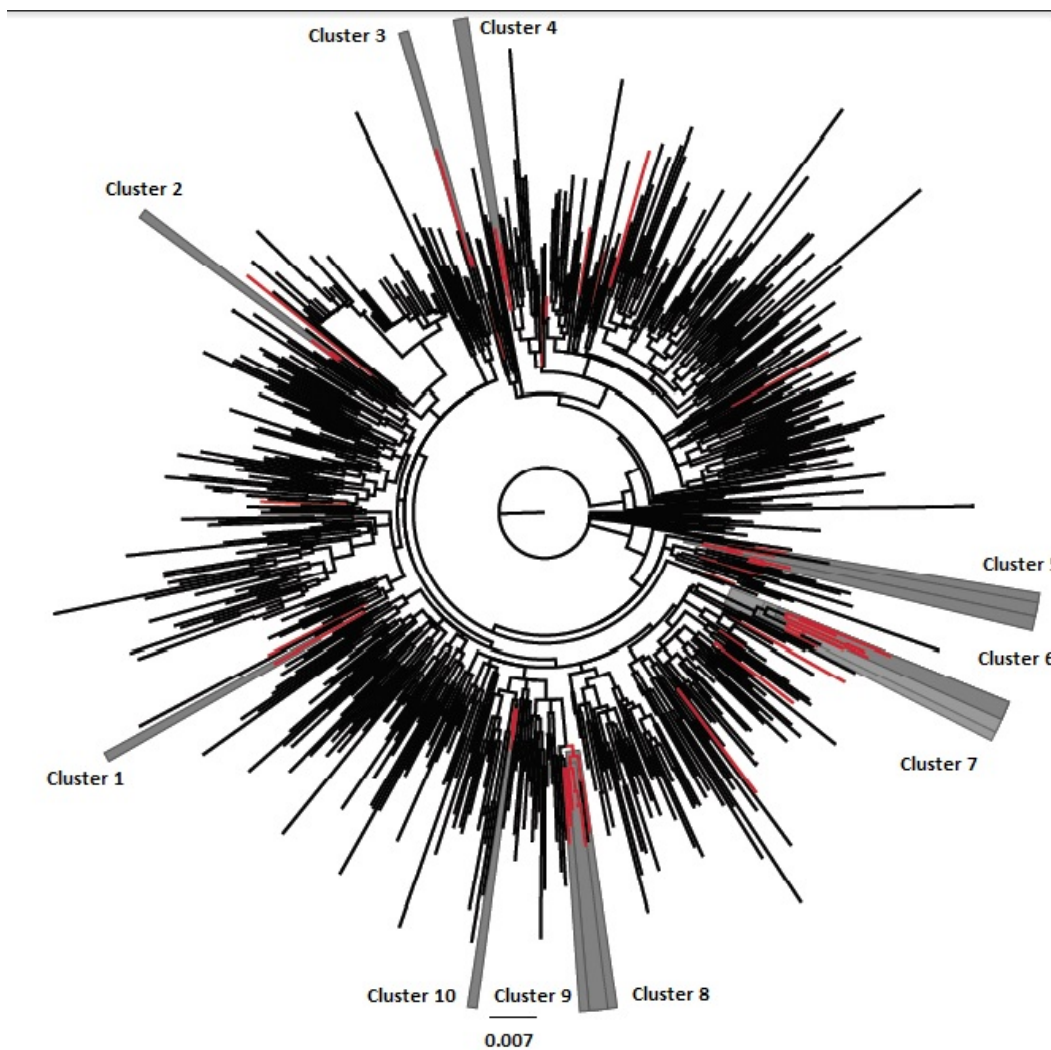
Το ιστορικό της επιδημίας του HCV-3a εκτιμήθηκε κατασκευάζοντας φυλογενετικό δέντρο. Χρησιμοποιήθηκαν 255 στοιχισμένοι γενετικοί τόποι από τη NS5B' περιοχή του γονιδιώματος του HCV από 461 αλληλουχίες -132 από το αρχικό δείγμα και 329 αλληλουχίες αναφοράς. Για τον υπότυπο 1a κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο που αποτελείται από 672 αλληλουχίες -49 από το αρχικό δείγμα και 623 αλληλουχίες αναφοράς- χρησιμοποιώντας 307 στοιχισμένους γενετικούς τόπους από την ίδια περιοχή του γονιδιώματος που κωδικοποιεί την RNA-πολυμεράση (Εικόνα 32, 33).

Οι περισσότερες αλληλουχίες του δείγματος (76.24%) σχηματίζουν μονοφυλετικές ομάδες μεταξύ τους, δηλαδή έχουν μικρότερες γενετικές αποστάσεις και κλαδοποιούνται μεταξύ τους σε σύγκριση με τις παγκόσμιες αλληλουχίες αναφοράς ίδιου υπότυπου. Το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο στο δέντρο του υπότυπου 3a, όπου το ποσοστό μονοφυλετικότητας ανέρχεται στο 80.30% (106/132), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για το δέντρο του 1a είναι 65.31% (32/49) με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.04$). Τα μονοφυλετικά δίκτυα στο δέντρο 3a είναι περισσότερα και πολυπληθέστερα από αυτά του δέντρου 1a (12 Vs 10) (Πίνακας 10). Για τον υπότυπο 3a, η ομάδα 4 (Cluster 4) είναι η μονοφυλετική ομάδα με τις περισσότερες αλληλουχίες ($n=54$) και περιλαμβάνει το 40.91% των αλληλουχιών του συγκεκριμένου υπότυπου. Είναι αξιοσημείωτο δε, ότι υπάρχει επιδημιολογική σχέση της ομάδας 4 με αλληλουχίες αναφοράς με προέλευση τη Μεγάλη Βρετανία και Γαλλία (Εικόνα 34). Η δεύτερη μεγαλύτερη μονοφυλετική ομάδα του υπότυπου 3a (Cluster 8) περιλαμβάνει 10 αλληλουχίες οι οποίες κλαδοποιούνται με μία αλληλουχία

αναφοράς με προέλευση την Αυστραλία. Οι υπόλοιπες μονοφυλετικές ομάδες κλαδοποιούνται με αλληλουχίες από την Ταϊλάνδη (Cluster 1,12), τη Μεγάλη Βρετανία (Cluster 2,3,5,7, 10,11) και τη Γαλλία (Cluster 6). Οι αλληλουχίες που δε συσταδοποιούνται σε μονοφυλετικές ομάδες (non-clustered) κλαδοποιούνται με αλληλουχίες από τις προαναφερθείσες χώρες και ορισμένες με αλληλουχίες από Ινδία και Κίνα.



Εικόνα 32. Φυλογενετικό δέντρο Neighbour-Joining 461 αλληλουχιών NS5B' (255bp) του υπότυπου HCV-3a. Οι αλληλουχίες του δείγματος των XEN Αττικής είναι με μωβ χρώμα και οι αλληλουχίες αναφοράς με μαύρο. Οι μονοφυλετικές ομάδες (clusters) που σχηματίζουν μεταξύ τους οι αλληλουχίες του δείγματος υπογραμμίζονται με γκρι χρώμα και αριθμούνται (1-16). Η κλίμακα της εξελικτικής απόστασης είναι 0.008 (0.8%).



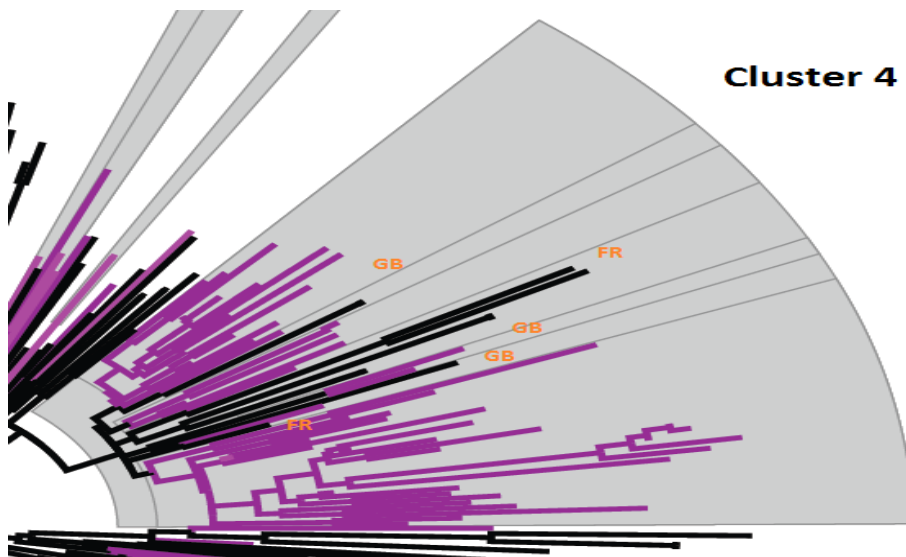
Εικόνα 33. Φυλογενετικό δέντρο Neighbour Joining 672 αλληλουχιών NS5B' (307 bp) του υπότυπου HCV-1a. Οι αλληλουχίες του δείγματος των XEN Αττικής είναι με κόκκινο χρώμα και οι αλληλουχίες αναφοράς με μαύρο. Οι μονοφυλετικές ομάδες (clusters) που σχηματίζουν μεταξύ τους οι αλληλουχίες του δείγματος υπογραμμίζονται με γκρι χρώμα και αριθμούνται (1-10). Η κλίμακα της εξελικτικής απόστασης είναι 0.007 (0.7%).

Πίνακας 10. Μονοφυλετικές συστάδες (Clusters) ανά υπότυπο και αριθμός αλληλουχιών που περιέχουν.

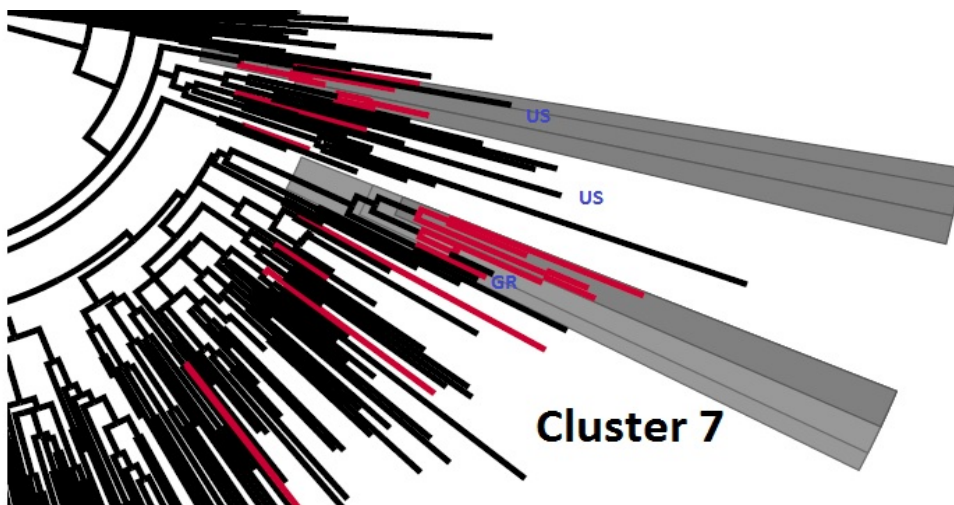
1a	Αριθμός αλληλουχιών	3a	Αριθμός αλληλουχιών
Cluster 1	2	Cluster 1	9
Cluster 2	2	Cluster 2	4
Cluster 3	2	Cluster 3	2
Cluster 4	3	Cluster 4	54
Cluster 5	4	Cluster 5	3
Cluster 6	3	Cluster 6	6
Cluster 7	7	Cluster 7	7
Cluster 8	5	Cluster 8	10
Cluster 9	2	Cluster 9	5
Cluster 10	2	Cluster 10	2
		Cluster 11	2
		Cluster 12	2
Σύνολο	32		106

Στο δέντρο του 1a οι μονοφυλετικές ομάδες έχουν μικρότερο αριθμό αλληλουχιών και εμφανίζονται σποραδικά και διάσπαρτα ανάμεσα στις παγκόσμιες αλληλουχίες αναφοράς. Οι 5 από τις 10 ομάδες έχουν τον ελάχιστο αριθμό αλληλουχιών ($n=2$), ενώ η μονοφυλετική ομάδα 7 (Cluster 7) έχει το μέγιστο αριθμό αλληλουχιών ($n=7$). Η συγκεκριμένη μονοφυλετική ομάδα περιλαμβάνει αλληλουχία αναφοράς από Ελλάδα και παρουσιάζει επιδημιολογική συσχέτιση με αλληλουχίες αναφοράς με προέλευση τις Η.Π.Α (Εικόνα 35). Ειδικότερα, οι αλληλουχίες του 1a έχουν άμεση επιδημιολογική συγγένεια με αλληλουχίες από τις Η.Π.Α.(Cluster 1,3,5,6,7) και τη Γερμανία (Cluster 10). Οι μη συσταδοποιημένες αλληλουχίες (non-clustered) εμφανίζονται να κλαδοποιούνται με αλληλουχίες, επίσης, από Η.Π.Α., Ελβετία αλλά και Ελλάδα εκτός των αλληλουχιών του δείγματος.

Οι χρήστες οι οποίοι ανήκουν σε μονοφυλετικά δίκτυα μετάδοσης σύμφωνα με την τοπολογία των δέντρων ήταν νεότερης ηλικίας κατά 2.76 ± 1.48 έτη (36.53 Vs 39.28 έτη), ενώ οι αντίστοιχες διάμεσες ηλικίες για τις δύο κατηγορίες είναι 35 και 40 έτη ($p=0.05$). Η διάμεση διάρκεια ενδοφλέβιας χρήσης στους χρήστες που ανήκαν σε δίκτυα μετάδοσης ήταν μικρότερη σε σύγκριση με τους χρήστες εκτός δικτύων (14.5 [IQR:9-20] Vs 17 [IQR:12-26] έτη). Οι χρήστες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ηλικία έναρξης χρήσης σύμφωνα με τη μονομεταβλητή μη παραμετρική ανάλυση ($p=0.88$) (Πίνακας 11).



Εικόνα 34. Τμήμα από το φυλογενετικό δέντρο του 3α εστιασμένο στη μονοφυλετική ομάδα 4 (Cluster 4) όπου επισημαίνεται η χώρα προέλευσης των αλληλουχιών αναφοράς που περιλαμβάνει (GB:Μεγάλη Βρετανία, FR:Γαλλία)



Εικόνα 35. Τμήμα φυλογενετικού δέντρου του 1α εστιασμένο στη μονοφυλετική ομάδα 7 (Cluster 7) όπου επισημαίνεται η χώρα προέλευσης των αλληλουχιών αναφοράς τις οποίες περιλαμβάνει ή έχει στενή φυλογενετική σχέση (GR:Ελλάδα, US:ΗΠΑ)

Πίνακας 11. Περιγραφικά στατιστικά των δεδομένων του δείγματος με βάση τη μετάδοση σε μονοφυλετική ομάδα που χρησιμοποιήθηκαν για τη λογιστική παλινδρόμηση.

Μετάδοση σε μονοφυλετική ομάδα	Συνολικό δείγμα	Υπότυπος 1a (n)	Υπότυπος 3a (n)	Διάμεση Ηλικία [IQR] σε έτη	Διάμεση Ηλικία έναρξης EX [IQR] σε έτη	Διάμεση Χρονολογία έναρξης EX [IQR]
Ναι	138	32	106	35 [30-42]	20 [17-24]	1998 [1993-2004]
Όχι	43	17	26	40 [32-45]	21 [18-25]	1995 [1987-2001]
Σύνολο	181	49	132	36 [31-43]	20 [17-24]	1998 [1992-2002]

*IQR: ενδοτεταρτημοριακό εύρος, EX: ενδοφλέβια χρήση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης η παρουσία του υπότυπου 3a φαίνεται ότι αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα κινδύνου για μετάδοση μέσω μονοφυλετικών δικτύων, εφόσον οι χρήστες με τον γονότυπο αυτό εμφανίζουν κατά 137% μεγαλύτερη πιθανότητα (odds) μετάδοσης με τον τρόπο αυτό σε σύγκριση με το γονότυπο 1a (OR=2.37 [1.127-5.00]) ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες μεταβλητές (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Αποτελέσματα λογιστικής παλινδρόμησης για τη μετάδοση του HCV μέσω μονοφυλετικών δικτύων. Το odds ratio των στατιστικά σημαντικών μεταβλητών σημειώνεται με έντονα γράμματα.

Εξαρτημένη μεταβλητή: Μετάδοση μέσω μονοφυλετικών ομάδων, n=181				
Συμμεταβλητές	Odds Ratio	Τυπικό Σφάλμα (S.E.)	P>z	95% Διάστημα Εμπιστοσύνης
Έτος Έναρξης EX ¹				
ανά 10ετία	1.594	0.358	0.038	(1.026 - 2.476)
Υπότυπος				
1a*	1			
3a	2.369	0.903	0.024	(1.122 - 4.998)
Ηλικία Έναρξης EX				
ανά έτος	0.965	0.029	0.236	(0.909 - 1.024)
Φύλο				
άνδρες*	1			
γυναίκες	0.809	0.425	0.686	(0.289 - 2.265)
¹ EX: Ενδοφλέβια Χρήση * Κατηγορία αναφοράς				

Το έτος έναρξης της ενδοφλέβιας χρήσης, επίσης, όταν σταθμιστεί με την ηλικία έναρξης χρήσης συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά με το συγκεκριμένο τρόπο μετάδοσης. Ειδικότερα, ανά χρονολογική δεκαετία το OR αυξάνει κατά 59.4% ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες μεταβλητές. Αντιθέτως, το φύλο και η ηλικία έναρξης χρήσης δεν έχουν στατιστικά σημαντική συνεισφορά.

Για το παραπάνω μοντέλο της λογιστικής παλινδρόμησης έγινε έλεγχος πολυσυγγραμμικότητας μέσω υπολογισμού του VIF (Variance Inflation Factor), όπου δεν αναδείχθηκε σοβαρό πρόβλημα πολυσυγγραμμικότητας μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών. Ο έλεγχος καλής προσαρμογής του μοντέλου Hosmer-Lemeshow δεν ήταν στατιστικά σημαντικός ($p=0.84$), οπότε δεν απορρίφθηκε η καλή προσαρμογή του μοντέλου. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποτύπου και των υπόλοιπων ανεξάρτητων μεταβλητών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι έγινε ξεχωριστή ανάλυση για την μονοφυλετική ομάδα 4 του υπότυπου 3a χωρίς να βρεθούν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα από τη λογιστική παλινδρόμηση. Οι

XEN της ομάδας αυτής δε διαφέρουν ως προς το φύλο, την ηλικία, τη διάρκεια χρήσης και την έναρξη χρήσης ως προς τους υπόλοιπους χρήστες (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Αποτελέσματα λογιστικής παλινδρόμησης για τη μετάδοση του HCV μέσω του μεγαλύτερου μονοφυλετικού δικτύου (Cluster 4) του υποτύπου 3a

Εξαρτημένη Μεταβλητή: Μετάδοση μέσω Cluster 4 n=181				
Συμμεταβλητές	Odds Ratio	Τυπικό Σφάλμα (S.E.)	P>z	95% Διάστημα Εμπιστο- σύνης
Έτος Έναρξης EX ¹				
ανά έτος	1.005	0.021	0.810	(0.965 - 1.047)
Φύλο				
άνδρες*	1			
γυναίκες	1.590	0.739	0.318	(0.639 - 3.954)
Ηλικία έναρξης EX ¹				
ανά έτος	1.022	0.028	0.430	(0.968 - 1.080)
¹ EX: Ενδοφλέβια Χρήση				
* Κατηγορία Αναφοράς				

6.4 Συζήτηση

Η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη μεγάλης κλίμακας έρευνα για τη γενετική ποικιλομορφία του HCV στον πληθυσμό των XEN της Αττικής όπου, στη συγκεκριμένη περιοχή, καταγράφεται ο μεγαλύτερος επιπολασμός HCV ανάμεσα στους χρήστες (Εθνικό Κέντρο Τεκμηρίωσης & Πληροφόρησης για τα Ναρκωτικά, 2013). Αν και παρατηρήθηκε υψηλού βαθμού ποικιλομορφία στα στελέχη της μελέτης, ο γονότυπος 3 και ειδικότερα ο υπότυπος 3a παραμένει ο επικρατέστερος μεταξύ των XEN και ακολουθεί ο υπότυπος 1a, εύρημα συμβατό και με προηγούμενες επιδημιολογικές μελέτες στην Ελλάδα (Raptopoulou et al., 2011). Η κατανομή των υπόλοιπων γονότυπων στη συγκεκριμένη ομάδα κινδύνου συμπίπτει με αυτή άλλων ελληνικών μελετών (Katsoulidou et al., 2006).

Η φυλογενετική ανάλυση έχει σημαντικά ευρήματα όσον αφορά την εξάπλωση του HCV σε δίκτυα μετάδοσης. Σύμφωνα με την τοπολογία των δέντρων, οι αλληλουχίες του δείγματός μας σχηματίζουν σε μεγάλο βαθμό μονοφυλετικές ομάδες γεγονός που υποδηλώνει μετάδοση του ιού από χρήστη σε χρήστη από τους οποίους έγινε η δειγματοληψία στη μελέτη. Η ομοιότητα αυτού του προτύπου εξάπλωσης και ο μεγάλος βαθμός του γενετικού διαχωρισμού στους δύο υπότυπους οφείλεται πιθανόν στον παρόμοιο τρόπο και αποτελεσματικότητα της μετάδοσης. Το φαινόμενο αυτό εξαρτάται από τον υπότυπο και ειδικότερα στο δέντρο του υπότυπου 3a φαίνεται πιο εκτεταμένο. Οι μονοφυλετικές ομάδες που σχηματίζονται είναι πολλαπλές, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι έγιναν πολλαπλές εισαγωγές HCV στον πληθυσμό των χρηστών της Αττικής. Τα στελέχη του δείγματος υπότυπου 1a είναι περισσότερο γενετικά ετερογενή σε σύγκριση με αυτά του 3a. Η στενή γενετική συγγένεια των στελεχών του 3a υποδηλώνει πιο πρόσφατη μετάδοση. Παρ'όλα αυτά, η στατιστική ανάλυση απέτυχε να αποδείξει το παραπάνω καθώς δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη χρονολογία έναρξης της ενδοφλέβιας χρήσης και του υπότυπου. Σύμφωνα με τα ευρήματα των Hagan et al (2008) θεωρήσαμε ισχυρά συσχετισμένο το χρόνο έναρξης χρήσης ο οποίος ήταν γνωστός και το χρόνο μόλυνσης ο οποίος ήταν άγνωστος. Το πρόσφατο έτος έναρξης χρήσης και κατά συνέπεια η μικρότερη διάρκεια χρήσης συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τη μετάδοση μέσω δικτύων ανεξαρτήτως υπότυπου.

Οι αλληλουχίες του δείγματος με προέλευση την Ελλάδα είναι αναμειγμένες με αλληλουχίες HCV με προέλευση άλλων χωρών. Αυτό είναι ενδεικτικό χαμηλού βαθμού γεωγραφικής απομόνωσης του ιού. Ο υπότυπος 1a είναι ο πιο διαδεδομένος στη βόρεια και νότια Αμερική καθώς και στην Αυστραλία (Zein, 2000), που μπορεί να εξηγεί τη συνάφεια των ελληνικών

αλληλουχιών με αυτές των Η.Π.Α. Αν και ο μηχανισμός της μετάδοσης στον υπό εξέταση πληθυσμό είναι προφανής, λόγω ενδοφλέβιας χρήσης ναρκωτικών, η προέλευση του 1a δεν αποκλείεται να εντοπίζεται στην εξαγωγή αίματος και προϊόντων του (λυοφιλιωμένο πλάσμα) από τις Η.Π.Α. στον υπόλοιπο κόσμο, πρακτική που ξεκίνησε κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου πολέμου (Hedley-Whyte & Milamed, 2013).

Αντιθέτως για τον υπότυπο 3a, φαίνεται ότι οι αλληλουχίες από τη Μεγάλη Βρετανία είναι οι πιο συγγενείς γενετικά με τις ελληνικές αλληλουχίες. Στη συγκεκριμένη χώρα παρατηρείται, επίσης, αύξηση του υπότυπου 3a και ιδιαίτερα η μετάδοση του συνδέεται με τη χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών (Cornberg et al., 2011). Άλλες αλληλουχίες αναφοράς που αναφέρονται σε μικρή γενετική απόσταση από αυτές του δείγματος είναι από την Ταϊλάνδη χώρα της νοτιοανατολικής Ασίας όπου ο υπότυπος 3a επικρατεί καθώς και από Ινδία και Κίνα. Η γονοτυπική κατανομή της Ινδίας είναι παρόμοια με αυτή της Ταϊλάνδης με επικρατέστερο τον 3a υπότυπο (Sievert et al., 2011). Το δίκτυο μετάδοσης το οποίο ευθύνεται για τη μετάδοση του 3a στην Ελλάδα παραμένει σε μεγάλο βαθμό ακόμη άγνωστο και απαιτούνται περαιτέρω φυλογενετικές αναλύσεις για την εύρεση της προέλευσης των στελεχών αυτών. Θα μπορούσε να περιλαμβάνει ιατρικές παρεμβάσεις ή μετακινήσεις πληθυσμών εντός και εκτός Ασίας όπου πιστεύεται ότι προέρχεται ο 3a (P Simmonds et al., 1996) ή μετάδοση του ιού σε νέους περιορισμένους ευάλωτους πληθυσμούς στον αναπτυσσόμενο κόσμο με επακόλουθη μετάδοση στην νέα ολοένα αυξανόμενη ομάδα κινδύνου των XEN.

Η μεγαλύτερη παρατηρούμενη μονοφυλετική ομάδα 4 που σχηματίζεται στον υπότυπο 3a (Cluster 4) αποτελεί το μεγαλύτερο τοπικό μονοφυλετικό δίκτυο μετάδοσης της Αττική σαφώς διακριτό τοπολογικά από τις παγκόσμιες αλληλουχίες αναφοράς. Περιλαμβάνει ορισμένες αλληλουχίες αναφοράς (σε αναλογία <25%) από τη Μεγάλη Βρετανία και τη Γαλλία διασπαρμένες ανάμεσα στις ελληνικές αλληλουχίες υποδηλώνοντας πρόσφατη και ταχεία διασπορά ενός στελέχους σε ένα δίκτυο χρηστών XEN μιας περιοχής που πιθανόν να συνδέεται με δίκτυο χρηστών όμορων χωρών. Σημειωτέον, ότι οι χώρες αυτές ανήκουν στην ευρύτερη επικράτεια της Ευρωπαϊκής Ένωσης και είναι χώρες υποδοχής της ελληνικής ομογένειας (Συμβούλιο Απόδημου Ελληνισμού, 2015). Σημαντικοί περιορισμοί στις παραπάνω υποθέσεις αποτελεί ο περιορισμένος αριθμός αλληλουχιών αναφοράς για τον συγκεκριμένο υπότυπο, καθώς είναι σχεδόν οι μισές σε αριθμό από αυτές του 1a. Η έλλειψη αλληλουχιών αναφοράς μπορεί να εντείνει το φαινόμενο της συσταδοποίησης στο φυλογενετικό δέντρο, καθώς αλληλουχίες με σχετικά μεγάλη γενετική απόσταση είναι δυνατόν να ανήκουν στην ίδια συστάδα. Επίσης δεν είναι γνωστό αν οι αλληλουχίες αναφοράς προέρχονται από XEN, ώστε να θεωρήσουμε ότι τα δίκτυα μετάδοσης λόγω χρήσης από διαφορετικές χώρες διασυνδέονται.

Ξεχωριστή στατιστική ανάλυση των χαρακτηριστικών των ασθενών στους οποίους απομονώθηκαν οι αλληλουχίες της Cluster 4 δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη διάρκεια χρήσης, το φύλο, την ηλικία έναρξης χρήσης σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς (Πίνακας 13). Πρόκειται, συνεπώς, για ένα δίκτυο μετάδοσης με χρήστες διαφόρων ηλικιών και έτη ενδοφλέβιας χρήσης, γεγονός που επιβεβαιώνει προηγούμενες παρατηρήσεις ότι νέοι χρήστες ενίοτε ομαδικώς με παλαιότερους χρήστες (Goldsamt et al, 2010).

Η πολυμεταβλητή ανάλυση μέσω του μοντέλου της λογιστικής παλινδρόμησης ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση για μετάδοση μέσω μονοφυλετικών δικτύων και του υπότυπου 3a, προς επιβεβαίωση της τοπολογίας των φυλογενετικών δέντρων. Σημαντικό εύρημα είναι επίσης η θετική συσχέτιση της χρονολογίας έναρξης της χρήσης με τη μετάδοση μέσω μονοφυλετικών δικτύων, όταν σταθμίσουμε για την ηλικία έναρξης και τον υπότυπο. Δηλαδή, οι χρήστες με πιο πρόσφατη έναρξη χρήσης έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να ανήκουν σε τέτοια δίκτυα σε σύγκριση με παλαιότερους χρήστες. Αν η υπόθεσή μας ότι η χρονολογία έναρξης χρήσης είναι ισχυρά συσχετισμένη με τη χρονολογία μόλυνσης, η φυλογενετική μας ανάλυση βρίσκεται σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες οι οποίες απέδειξαν ότι η συσταδοποίηση των στελεχών που αποκτήθηκαν πρόσφατα είναι συχνή (Sacks-Davis et al., 2012). Υπάρχουν, παρ' όλα αυτά, περιορισμοί στο παραπάνω συμπέρασμα οι οποίοι έγκεινται στο χαρακτήρα της δειγματοληψίας respondent-driven (δίκην χιονοστιβάδας) η οποία δεν είναι τυχαία και πιθανόν να εξαρτάται από τα αρχικά άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη. Η δειγματοληψία αυτού του τύπου, ίσως, να απέτυχε να συμπεριλάβει παλαιότερα στελέχη που να συσταδοποιούνται με τις πιο παλιές μολύνσεις του δείγματος. Παρ' όλα αυτά, δεν μπορούμε να προτείνουμε άλλη μέθοδο δειγματοληψίας για τους συγκεκριμένους σκοπούς που πραγματοποιήθηκε το πρόγραμμα “Αριστοτέλης”, εφόσον η συγκεκριμένη θεωρείται η πλέον ενδεδειγμένη σε πληθυσμούς που εντοπίζονται ή προσεγγίζονται με δυσκολία όπως είναι η ευαίσθητη ομάδα των XEN (Goodman, 1961). Επίσης, η ηλικία έναρξης χρήσης δε φαίνεται να συσχετίζεται με το συγκεκριμένο τρόπο μετάδοσης καθώς δεν ήταν στατιστικά σημαντική ούτε στη μονομεταβλητή ούτε στη πολυμεταβλητή ανάλυση. Όπως προαναφέρθηκε, ένα από τα χαρακτηριστικά των δικτύων των XEN είναι ότι μεγαλύτερης ηλικίας χρήστες ενίοτε ομαδικά με νεότερους σε ηλικία χρήστες.

Τα συμπεράσματα της συγκεκριμένης μελέτης θα μπορούσαν να επεκταθούν αν γνωρίζαμε περισσότερα στοιχεία συμπεριφοράς των χρηστών. Θα ήταν ενδιαφέρον για την ανάλυσή μας να γνωρίζαμε αν κάνουν από κοινού χρήση, αν μοιράζονται και τι από τον εξοπλισμό, τον αριθμό κοινών συντρόφων στη χρήση, τη συχνότητα, αν κάνουν ενδορρινική χρήση, τη σεξουαλική συμπεριφορά (ομοφυλόφιλοι ή όχι), τη χρησιμοποίηση προφυλακτικού, αν ο σεξουαλικός σύντροφος είναι XEN και τέλος αν γνωρίζει σχετικά με την ηπατίτιδα C. Η συγκεκριμένη μελέτη

στοχεύει αποκλειστικά στους ΧΕΝ Αττικής γεγονός που αποκλείει τον εντοπισμό δικτύων ΧΕΝ από άλλες πόλεις της Ελλάδας όπου υπάρχουν αντίστοιχοι πληθυσμοί ΧΕΝ και στην περίπτωση αυτή ίσως εντοπίζαμε αλληλοσυνδεόμενα δίκτυα.

Τέλος, το υψηλό ποσοστό μετάδοσης μέσω δικτύων που αναδείχθηκε από τη μελέτη μας καταδεικνύει την ανάγκη για παρέμβαση στη συγκεκριμένη ομάδα κινδύνου ατομικά αλλά και ομαδικά στις κοινότητες των χρηστών όπου θα πρέπει να τονιστεί η σημαντικότητα των δικτύων στη μόλυνση από τον ΗCV. Η παροχή βοήθειας στους χρήστες θα πρέπει να είναι στοχευμένη και να προσαρμόζεται στις ανάγκες των χρηστών και τοπικά και χρονικά. Δεδομένου το γεγονός ότι η συντριπτική πλειονότητα των νέων μολύνσεων οφείλεται στη χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών στη χώρα μας (Εικόνα 24) τέτοιου είδους παρεμβάσεις κρίνονται απαραίτητες για τη μείωση του φορτίου νόσου από την ηπατίτιδα C.

Περίληψη

Η ηπατίτιδα C αποτελεί σοβαρή ηπατική νόσο με παγκόσμια εξάπλωση. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, 150 εκ. άτομα έχουν προσβληθεί από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) και κάθε χρόνο 350,000 άνθρωποι πεθαίνουν εξαιτίας αυτού. Η μετάδοση του ιού γίνεται παρεντερικά (αιματογενώς) με τον κύριο όγκο των λοιμώξεων να γίνεται μέσω ιατρικών πράξεων με μη αποστειρωμένα μέσα και μεταγγίσεων στον αναπτυσσόμενο κόσμο και μέσω της ενδοφλέβιας χρήσης ναρκωτικών στον αναπτυγμένο κόσμο. Στην Ελλάδα, οι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών αποτελούν την κύρια δεξαμενή της επίπτωσης της νόσου και διάφορα προγράμματα πρόληψης έχουν εστιάσει στη συγκεκριμένη ομάδα κινδύνου. Ο HCV παρουσιάζει μεγάλη γενετική ετερογένεια και ταξινομείται σε 7 γονότυπους και 67 υπότυπους με ξεχωριστή κατανομή ανά γεωγραφική περιοχή και ομάδα κινδύνου. Οι μέθοδοι μοριακής επιδημιολογίας έχουν συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της επιδημιολογίας της λοίμωξης και έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του τρόπου διασποράς στους πάσχοντες και ειδικότερα στους XEN. Στην παρούσα μελέτη περιγράφηκε η επιδημία στους XEN της Αττικής με μεθόδους φυλογενετικής και υπολογίστηκε ο επιπολασμός των υπότυπων HCV στη συγκεκριμένη πληθυσμιακή ομάδα. Κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με τις αλληλουχίες των υπότυπων 1a και 3a που ήταν οι επικρατέστεροι και βρέθηκαν πολλαπλά μονοφυλετικά δίκτυα μετάδοσης γεγονός που υποδηλώνει πολλαπλές εισαγωγές του HCV στους XEN. Τα φυλογενετικά δίκτυα σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση ήταν περισσότερα και μεγαλύτερα στο δέντρο του υπότυπου 3a, όπως και οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των αλληλουχιών ήταν μικρότερες στον 3a έναντι του 1a. Οι XEN που έχουν μολυνθεί σε δίκτυα έχουν πιο πρόσφατη έναρξη ενδοφλέβιας χρήσης έναντι των υπολοίπων και η επιδημία σε αυτούς είναι πιο πρόσφατη. Τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα επιδημιολογικά δεδομένα τονίζουν την ανάγκη για στοχευμένη παρέμβαση στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών με σκοπό την πρόληψη και τη μείωση του φορτίου της νόσου.

Abstract

Hepatitis C is a serious liver disease with worldwide spread. According to the World Health Organisation (WHO), 150 million people have been infected with hepatitis C virus (HCV) and suffer from the chronic form of the disease, while 350,000 people per year die from adverse HCV-related sequelae. HCV is transmitted through blood-to-blood contact via injections with unsterilized equipment or transfusion of infected blood in the developing world and the majority of new cases in the developed countries are among people who inject drugs (PWID). In Greece, most of new HCV cases are diagnosed among PWID and several programmes for the prevention and treatment of the disease have been implemented in this specific risk group. HCV is a genetically diverse RNA-virus and is classified into 7 genotypes and 67 subtypes. Genotype distribution varies among geographic regions and risk groups. Molecular epidemiology methods have been used to understand the evolution of the epidemic and study the route of transmission of the disease especially in PWID. In the present study, phylogenetic methods were applied in HCV sequences isolated from PWID in Attica and subtype prevalence was evaluated among them. Phylogenetic trees for the most prevalent subtypes, 1a and 3a, were constructed. According to tree topology, several monophyletic clusters were formed revealing multiple introductions of HCV through transmission networks in the population under study. Phylogenetic tree of subtype 3a had more and larger monophyletic clusters than that of 1a. Moreover, 3a sequences were less genetically diverse with smaller genetic distances than 1a sequences. PWID who belonged in a transmission network had less years of injecting career indicative of a more recent spread of HCV. The results of our study in conjunction with data coming from classic epidemiology address the need of targeted intervention in PWID communities in order to prevent HCV epidemic and reduce the burden disease.

Βιβλιογραφία

American Association for the Study of Liver Diseases. (2014). UNIQUE PATIENT POPULATIONS | Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. Retrieved October 18, 2014, from <http://hcvguidelines.org/full-report/unique-patient-populations>

American Association for the Study of Liver Diseases. (2014a). Hcv testing and linkage to care. Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. Retrieved from <http://hcvguidelines.org/full-report/hcv-testing-and-linkage-care>

American Association for the Study of Liver Diseases. (2014b). When and in whom to initiate hcv therapy |Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. Retrieved from <http://www.hcvguidelines.org/full-report/when-and-whom- initiate-hcv-therapy>

Baldauf, S. L. (2003). Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics : TIG*, 19(6), 345–51. doi:10.1016/S0168-9525(03)00112-4

Bellentani, S., Pozzato, G., Saccoccio, G., Crovatto, M., Crocè, L. S., Mazzoran, L., ... Tiribelli, C. (1999). Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population : report from the Dionysos study, 874–880.

Blatt, L. M., Mutchnick, M. G., Tong, M. J., Klion, F. M., Lebovics, E., Freilich, B., ... McHutchison, J. G. (2000). Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in the United States. *Journal of Viral Hepatitis*, 7(3), 196–202. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10849261>

Bruno, S., Silini, E., Crosignani, A., Borzio, F., Leandro, G., Bono, F., ... Mondelli, M. U. (1997). Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 25(3), 754–8. doi:10.1002/hep.510250344

Cacoub, P., Poynard, T., Ghillani, P., Charlotte, F., Olivi, M., Piette, J. C., & Opolon, P. (1999). Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. Multidepartment

Virus C. *Arthritis and Rheumatism*, 42(10), 2204–12. doi:10.1002/1529-0131(199910)42:10<2204::AID-ANR24>3.0.CO;2-D

Calado, R. A., Rocha, M. R., Parreira, R., Piedade, J., Venenno, T., & Esteves, A. (2011). Hepatitis C virus subtypes circulating among intravenous drug users in Lisbon, Portugal. *Journal of Medical Virology*, 83(4), 608–15. doi:10.1002/jmv.21955

Centers for Disease Control and Prevention. (2003). Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus. Retrieved October 18, 2014, from <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5203a1.htm>

Centers for Disease Control and Prevention. (2012). Recommendations for the Identification of Chronic Hepatitis C Virus Infection Among Persons Born During 1945 – 1965. *MMWR*, 61(4).

Centers for Disease Control and Prevention. (2014). CDC DVH - HCV FAQs for Health Professionals. Retrieved from <http://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/hcvfaq.htm#c7>

Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4902), 359–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2523562>

Chou, R., & Wasson, N. (2013). Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: a systematic review. *Annals of Internal Medicine*, 158(11), 807–20. doi:10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00005

Cochrane, A., Searle, B., Hardie, A., Robertson, R., Delahooke, T., Cameron, S., ... Simmonds, P. (2002). A genetic analysis of hepatitis C virus transmission between injection drug users. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(9), 1212–21. doi:10.1086/344314

Cornberg, M., Razavi, H. a., Alberti, A., Bernasconi, E., Buti, M., Cooper, C., ... Zeuzem, S. (2011). A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver International*, 31(SUPPL. 2), 30–60. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02539.x

Demetriou, V. L., & Kostrikis, L. G. (2011). Molecular epidemiology of hepatitis C infection in Cyprus within the general population and high-risk cohorts. *BMC Research Notes*, 4(1), 468. doi:10.1186/1756-0500-4-468

- Doerrbecker, J., Behrendt, P., Mateu-Gelabert, P., Ciesek, S., Riebesehl, N., Wilhelm, C., ... Steinmann, E. (2013). Transmission of hepatitis C virus among people who inject drugs: viral stability and association with drug preparation equipment. *The Journal of Infectious Diseases*, 207(2), 281–7. doi:10.1093/infdis/jis677
- Doerrbecker, J., Friesland, M., Ciesek, S., Erichsen, T. J., Mateu-Gelabert, P., Steinmann, J., ... Steinmann, E. (2011). Inactivation and survival of hepatitis C virus on inanimate surfaces. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(12), 1830–8. doi:10.1093/infdis/jir535
- EMCDDA. (2014). EMCDDA | Situation summary for Greece — up to date summary of the national drug situation in Greece (Country overviews). Retrieved January 21, 2015, from <http://www.emcdda.europa.eu/publications/country-overviews/el#pdu>
- European Association for the Study of the Liver. (2014). *EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C*.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2011). Πρόληψη και έλεγχος λοιμωδών νοσημάτων στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών. Κατευθυντηριες οδηγίες του ECDC και του EMCDDA. doi:10.2900/40542
- Frank, C., Mohamed, M. K., Strickland, G. T., Lavanchy, D., Arthur, R. R., Magder, L. S., ... Sallam, I. (2000). The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*, 355(9207), 887–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10752705>
- Gatselis, N. K., Rigopoulou, E., Stefos, A., Kardasi, M., & Dalekos, G. N. (2007). Risk factors associated with HCV infection in semi-rural areas of central Greece. *European Journal of Internal Medicine*, 18(1), 48–55. doi:10.1016/j.ejim.2006.09.008
- Goldsamt, L. A., Harocopos, A., Kobrak, P., Jost, J. J., & Clatts, M. C. (2010). Circumstances, pedagogy and rationales for injection initiation among new drug injectors. *Journal of Community Health*, 35(3), 258–67. doi:10.1007/s10900-010-9231-z
- Goodman, L. A. (1961). Snowball Sampling. *The Annals of Mathematical Statistics*, 32(1), 148–170. Retrieved from <http://projecteuclid.org/euclid.aoms/1177705148>

- Goritsas, C., Plerou, I., Agaliotis, S., Spinthaki, R., Mimidis, K., Velissaris, D., ... Labropoulou-Karatza, C. (2000). HCV infection in the general population of a Greek island: prevalence and risk factors. *Hepato-Gastroenterology*, 47(33), 782–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919032>
- Hagan, H., Pouget, E. R., Des Jarlais, D. C., & Lelutiu-Weinberger, C. (2008). Meta-regression of hepatitis C virus infection in relation to time since onset of illicit drug injection: the influence of time and place. *American Journal of Epidemiology*, 168(10), 1099–109. doi:10.1093/aje/kwn237
- Hedley-Whyte, J., & Milamed, D. R. (2013). Our blood your money. *The Ulster Medical Journal*, 82(2), 114–20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3756870&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hernandez, M. D., & Sherman, K. E. (2011). HIV/hepatitis C coinfection natural history and disease progression. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 6(6), 478–82. doi:10.1097/COH.0b013e32834bd365
- Hissar, S. S., Goyal, A., Kumar, M., Pandey, C., Suneetha, P. V, Sood, A., ... Sarin, S. K. (2006). Hepatitis C virus genotype 3 predominates in North and Central India and is associated with significant histopathologic liver disease. *Journal of Medical Virology*, 78(4), 452–8. doi:10.1002/jmv.20561
- Hussain, Z. (2013). *Practical Management of Chronic Viral Hepatitis*. (G. Serviddio, Ed.). InTech. doi:10.5772/46043
- Iles, J. C., Raghwani, J., Harrison, G. L. A., Pepin, J., Djoko, C. F., Tamoufe, U., ... Pybus, O. G. (2014). Phylogeography and epidemic history of hepatitis C virus genotype 4 in Africa. *Virology*, 464-465, 233–43. doi:10.1016/j.virol.2014.07.006
- Ison, M. G., Hager, J., Blumberg, E., Burdick, J., Carney, K., Cutler, J., ... Nalesnik, M. (2009). Donor-derived disease transmission events in the United States: data reviewed by the OPTN/UNOS Disease Transmission Advisory Committee. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(8), 1929–35. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02700.x

- Jeannel, D., Fretz, C., Traore, Y., Kohdjo, N., Bigot, A., Pê Gamy, E., ... Stuyver, L. (1998). Evidence for high genetic diversity and long-term endemicity of hepatitis C virus genotypes 1 and 2 in West Africa. *Journal of Medical Virology*, 55(2), 92–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9598927>
- Kanwal, F., Kramer, J. R., Ilyas, J., Duan, Z., & El-Serag, H. B. (2014). HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 60(1), 98–105. doi:10.1002/hep.27095
- Katsoulidou, A., Sypsa, V., Tassopoulos, N. C., Boletis, J., Karafoulidou, A., Ketikoglou, I., ... Hatzakis, A. (2006). Molecular epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in Greece: temporal trends in HCV genotype-specific incidence and molecular characterization of genotype 4 isolates. *Journal of Viral Hepatitis*, 13(1), 19–27. doi:10.1111/j.1365-2893.2005.00649.x
- Law, W. P., Duncombe, C. J., Mahanontharit, A., Boyd, M. A., Ruxrungtham, K., Lange, J. M. A., ... Dore, G. J. (2004). *Impact of viral hepatitis co-infection on response to antiretroviral therapy and HIV disease progression in the HIV-NAT cohort. AIDS (London, England)* (Vol. 18, pp. 1169–1177). doi:10.1097/00002030-200405210-00010
- Lionis, C., Koulentaki, M., Biziagos, E., & Kouroumalis, E. (1997). Current prevalence of hepatitis A, B and C in a well-defined area in rural Crete, Greece. *Journal of Viral Hepatitis*, 4(1), 55–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9031066>
- Ly, K. N., Xing, J., Klevens, R. M., Jiles, R. B., Ward, J. W., & Holmberg, S. D. (2012). The increasing burden of mortality from viral hepatitis in the United States between 1999 and 2007. *Annals of Internal Medicine*, 156(4), 271–8. doi:10.7326/0003-4819-156-4-201202210-00004
- Magiorkinis, G., Magiorkinis, E., Paraskevis, D., Ho, S. Y. W., Shapiro, B., Pybus, O. G., ... Hatzakis, A. (2009). The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: A phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS Medicine*, 6(12), e1000198. doi:10.1371/journal.pmed.1000198
- Marcellin, P. (1999). Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *Journal of Hepatology*, 31 Suppl 1, 9–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10622554>

- Matheï, C., Van Dooren, S., Lemey, P., Van Damme, P., Buntinx, F., & Vandamme, a-M. (2008). The epidemic history of hepatitis C among injecting drug users in Flanders, Belgium. *Journal of Viral Hepatitis*, 15(6), 399–408. doi:10.1111/j.1365-2893.2007.00950.x
- Mellor, J., Holmes, E. C., Jarvis, L. M., Yap, P. L., & Simmonds, P. (1995). Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *Journal of General Virology*, 76(10), 2493–2507. doi:10.1099/0022-1317-76-10-2493
- Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, a D., & Wiersma, S. T. (2013). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*, 57(4), 1333–1342. doi:10.1002/hep.26141
- Murphy, D. G., Sablon, E., Chamberland, J., Fournier, E., Dandavino, R., & Tremblay, C. L. (2014). Hepatitis C Virus Genotype 7: A New Genotype Originating from Central Africa. *Journal of Clinical Microbiology*. doi:10.1128/JCM.02831-14
- Naoumov, N. V., Chokshi, S., Metivier, E., Maertens, G., Johnson, P. J., & Williams, R. (1997). Hepatitis C virus infection in the development of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 27(2), 331–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288608>
- Negro, F., & Alberti, A. (2011). The global health burden of hepatitis C virus infection. *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 31 Suppl 2(July), 1–3. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02537.x
- Nelson, P., Mathers, B., Cowie, B., Hagan, H., Jarlais, D. Des, & Degenhardt, L. (2012). The epidemiology of viral hepatitis among people who inject drugs: Results of global systematic reviews, *The Lancet* 378(9791), 571–583. doi:10.1016/S0140-6736(11)61097-0.
- Nicot, F., Legrand-Abravanel, F., Sandres-Saune, K., Boulestin, A., Dubois, M., Alric, L., ... Izopet, J. (2005). Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4 strains circulating in south-western France. *The Journal of General Virology*, 86(Pt 1), 107–14. doi:10.1099/vir.0.80409-0
- Office of HIV/AIDS & Infectious Disease Policy. (2013). Hepatitis C Virus Infection in Young Persons Who Inject Drugs.

- Paraskevis, D., Nikolopoulos, G., Fotiou, A., Tsiara, C., Paraskeva, D., Sypsa, V., ... Hatzakis, A. (2013). Economic recession and emergence of an HIV-1 outbreak among drug injectors in Athens metropolitan area: A longitudinal study. *PLoS ONE*, 8(11), 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0078941
- Pilon, R., Leonard, L., Kim, J., Vallee, D., De Rubeis, E., Jolly, A. M., ... Sandstrom, P. (2011). Transmission patterns of HIV and hepatitis C virus among networks of people who inject drugs. *PloS One*, 6(7), e22245. doi:10.1371/journal.pone.0022245
- Pineda, J. A., Romero-Gómez, M., Díaz-García, F., Girón-González, J. A., Montero, J. L., Torre-Cisneros, J., ... García-García, J. A. (2005). HIV coinfection shortens the survival of patients with hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 41(4), 779–89. doi:10.1002/hep.20626
- Prati, D. (2006). Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. *Journal of Hepatology*, 45(4), 607–16. doi:10.1016/j.jhep.2006.07.003
- Provine, W. B. (2004). Ernst Mayr: Genetics and Speciation. *Genetics*, 1046(July), 1041–1046. Retrieved from <http://profiles.nlm.nih.gov/ps/access/BBABOU.pdf>
- Pybus, O. G., Cochrane, A., Holmes, E. C., & Simmonds, P. (2005). The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 5(2), 131–9. doi:10.1016/j.meegid.2004.08.001
- Raptopoulou, M., Touloumi, G., Tzourmakliotis, D., Nikolopoulou, G., Dimopoulou, M., Giannoulis, G., ... Manolakopoulos, S. (2011). Significant epidemiological changes in chronic hepatitis C infection : results of the nationwide HEPNET-GREECE cohort study, 26–31.
- Ray, S. C., Fanning, L., Wang, X.-H., Netski, D. M., Kenny-Walsh, E., & Thomas, D. L. (2005). Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(11), 1753–9. doi:10.1084/jem.20050122
- Reid, A. E., Koziel, M. J., Aiza, I., Jeffers, L., Reddy, R., Schiff, E., ... Liang, T. J. (1999). Hepatitis C virus genotypes and viremia and hepatocellular carcinoma in the United States.

The American Journal of Gastroenterology, 94(6), 1619–26. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.01153.x

Romano, C. M., de Carvalho-Mello, I. M. V. G., Jamal, L. F., de Melo, F. L., Iamarino, A., Motoki, M., ... de Andrade Zanotto, P. M. (2010). Social networks shape the transmission dynamics of hepatitis C virus. *PloS One*, 5(6), e11170. doi:10.1371/journal.pone.0011170

Rosen, H. R. (2011). Chronic Hepatitis C Infection, 2429–2438.

Ruggieri, A., Argentini, C., Kouruma, F., Chionne, P., D'Ugo, E., Spada, E., ... Rapicetta, M. (1996). Heterogeneity of Hepatitis C Virus Genotype 2 Variants in West Central Africa (Guinea Conakry). *Journal of General Virology*, 77(9), 2073–2076. doi:10.1099/0022-1317-77-9-2073

Sacks-Davis, R., Daraganova, G., Aitken, C., Higgs, P., Tracy, L., Bowden, S., ... Hellard, M. (2012). Hepatitis C virus phylogenetic clustering is associated with the social-injecting network in a cohort of people who inject drugs. *PloS One*, 7(10), e47335. doi:10.1371/journal.pone.0047335

Seeff, L. B. (1997). Natural history of hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 26(3 Suppl 1), 21S–28S. doi:10.1002/hep.510260704

Serra, M. A., Rodríguez, F., del Olmo, J. A., Escudero, A., & Rodrigo, J. M. (2003). Influence of age and date of infection on distribution of hepatitis C virus genotypes and fibrosis stage. *Journal of Viral Hepatitis*, 10(3), 183–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12753336>

Shepard, C. W., Finelli, L., & Alter, M. J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet. Infectious Diseases*, 5(9), 558–67. doi:10.1016/S1473-3099(05)70216-4

Sievert, W., Altraif, I., Razavi, H. a, Abdo, A., Ahmed, E. A., Alomair, A., ... Negro, F. (2011). A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 31 Suppl 2, 61–80. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02540.x

- Simmonds, P. (2001). Reconstructing the origins of human hepatitis viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 356(1411), 1013–26. doi:10.1098/rstb.2001.0890
- Simmonds, P. (2001). The origin and evolution of hepatitis viruses in humans 2000. *Journal of General Virology*, 693–712.
- Simmonds, P. (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 11), 3173–88. doi:10.1099/vir.0.80401-0
- Simmonds, P., Mellor, J., Sakuldamrongpanich, T., Nuchaprayoon, C., Tanprasert, S., Holmes, E. C., & Smith, D. B. (1996). Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. *The Journal of General Virology*, 77 (Pt 12, 3013–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9000092>
- Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T. -a., Chan, S.-W., McOmish, F., Irvine, B., ... Urdea, M. S. (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of General Virology*, 74(11), 2391–2399. doi:10.1099/0022-1317-74-11-2391
- Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T., & Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 59(1), 318–27. doi:10.1002/hep.26744
- Strickland, G. T. (2006). Liver disease in Egypt: hepatitis C superseded schistosomiasis as a result of iatrogenic and biological factors. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(5), 915–22. doi:10.1002/hep.21173
- Sypsa, V., Touloumi, G., Tassopoulos, N. C., Ketikoglou, I., Vafiadis, I., Hatzis, G., ... Hatzakis, a. (2004). Reconstructing and predicting the hepatitis C virus epidemic in Greece: Increasing trends of cirrhosis and hepatocellular carcinoma despite the decline in incidence of HCV infection. *Journal of Viral Hepatitis*, 11(4), 366–374.

- Sypsa, V. (2014). Πρόγραμμα Παρέμβασης σε XEN: Πρόγραμμα ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ. In 26ο Πανελλήνιο Συνεδριο AIDS, Νοέμβριος 2014, Αθήνα. Retrieved from <http://www.aids.org.gr/pdfs/26aids/sypsa.pdf>
- Van Asten, L., Verhaest, I., Lamzira, S., Hernandez-Aguado, I., Zangerle, R., Boufassa, F., ... Bruisten, S. (2004). Spread of hepatitis C virus among European injection drug users infected with HIV: a phylogenetic analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(2), 292–302. doi:10.1086/380821
- Varaklioti A. (2008). Surveillance in blood bank. *Viral Hepatitis*, 16(2), 9.
- Wansbrough-Jones, M. H., Frimpong, E., Cant, B., Harris, K., Evans, M. R., & Teo, C. G. (1998). Prevalence and genotype of hepatitis C virus infection in pregnant women and blood donors in Ghana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(5), 496–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861360>
- WHO. (2010). Injection safety. Geneva: World Health Organization. Retrieved October 13, 2014, from http://www.who.int/injection_safety/toolbox/sign2010_meeting.pdf
- WHO. (2011). Global Database on Blood Safety, (june), 1–9.
- WHO. (2014). Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection. *WHO Press*, (April). Retrieved from <http://www.mendeley.com/research/guidelines-screening-care-treatment-persons-hepatitis-c-infection/>
- Wiessing, L., Ferri, M., Grady, B., Kantzanou, M., Sperle, I., Cullen, K. J., ... Matheï, C. (2014). Hepatitis C virus infection epidemiology among people who inject drugs in Europe: a systematic review of data for scaling up treatment and prevention. *PloS One*, 9(7), e103345. doi:10.1371/journal.pone.0103345
- Yaphe, S., Bozinoff, N., Kyle, R., Shivkumar, S., Pai, N. P., & Klein, M. (2012). Incidence of acute hepatitis C virus infection among men who have sex with men with and without HIV infection: a systematic review. *Sex Transm Infect*. doi:10.1136/sextrans-2012-050566
- Zein, N. N. (2000). Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 223–235. doi:10.1128/CMR.13.2.223-235.2000

Εθνικό Κέντρο Τεκμηρίωσης & Πληροφόρησης για τα Ναρκωτικά. (2013). Η Κατάσταση του Προβλήματος των Ναρκωτικών και των Ουνοπνευματωδών στην Ελλάδα. *Ετήσια Έκθεση Για Το 2012*.

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων. (2012). Ιογενείς ηπατίτιδες. *Ενημερωτικό Δελτίο*.

Συμβούλιο Απόδημου Ελληνισμού. (2015). Συμβούλιο Απόδημου Ελληνισμού - Περιφέρεια Ευρώπης-Μεγάλη Βρετανία. Retrieved April 20, 2015, from http://www.sae-europe.eu/index.php?view=article&id=149%3A2008-04-08-15-40-58&option=com_content&Itemid=137

Παπαθεοδωρίδης, Γ., Γερμανίδης, Γ., & Νταλέκος, Γ. (2012). *Κατευθυντήριες Οδηγίες Θεραπευτικής Παρέμβασης σε Ασθενείς με Λοίμωξη με τον Ιό της Ηπατίτιδας C. ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ*.